

Objetivos

La presente tesis doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación que se lleva a cabo en nuestro grupo sobre la relación estructura-función en metalocarboxipeptidasas, ya pertenezcan a la subfamilia de las pancreáticas como a la de las reguladoras. Dentro de las carboxipeptidasas pancreáticas, en cuyo estudio nuestro grupo posee una amplia experiencia, este trabajo se ha centrado en la procarboxipeptidasa B (PCPB) porcina. En ella, diseñado y probado ya el sistema de expresión, se ha querido ensayar ciertas hipótesis funcionales mediante mutagénesis dirigida. La amplia información disponible, tanto a nivel funcional como estructural, sobre las formas monoméricas A1 y B porcinas (con estructuras tridimensionales resueltas por nuestro grupo) permite establecer una hipotética relación entre las diferencias en los mecanismos de activación e inhibición que exhiben estos zimógenos y las correspondientes diferencias observables a nivel estructural. Los puntos a alcanzar en referencia a esta parte del trabajo son los siguientes:

- Diseño de proteínas mutantes de la PCPB porcina que nos ayuden a acabar de definir su mecanismo de activación e inhibición y la relación estructura-función en las procarboxipeptidasas pancreáticas.
- Mutagénesis dirigida para la obtención de los mutantes diseñados y expresión de los mismos en el sistema de *Pichia pastoris*.
- Caracterización detallada del mecanismo de activación de los diferentes mutantes de la PCPB en comparación con la proteína silvestre expresada heterológamente por el mismo sistema.

A diferencia de lo que ocurría con las metaloproteasas pancreáticas, al inicio de este proyecto nuestro grupo no contaba con experiencia en el estudio de las carboxipeptidasas reguladoras. Se estableció entonces una colaboración con el Dr. Lloyd D. Fricker del Albert Einstein College of Medicine (Bronx, NY) con el objetivo general de realizar estudios estructurales en esta subfamilia de metaloproteasas. En una

primera fase del proyecto, el objetivo fue la resolución de la estructura cristalográfica de una de las dos carboxipeptidasas reguladoras más estudiadas: la CPE o la CPD. Para ello era necesario desarrollar un sistema de expresión capaz de aportar la cantidad de proteína necesaria para llevar a cabo estudios estructurales, puesto que el método utilizado hasta entonces (Baculovirus) no proporcionaba la suficiente cantidad. Los objetivos propuestos en esta fase fueron los siguientes:

- Puesta a punto del sistema de expresión de *Pichia pastoris* para las carboxipeptidasas reguladoras incluyendo el subclonaje de los cDNAs de diferentes formas de la CPE y la CPD en el vector de expresión adecuado.
- Expresión heteróloga de las diferentes proteínas en cantidades suficientes para permitir su cristalización.
- Resolución de la estructura tridimensional de las diferentes proteínas por difracción de rayos X.

El motivo de realizar construcciones de diferentes formas de carboxipeptidasas reguladoras en el vector de expresión de *Pichia pastoris* es el de aumentar la probabilidad de éxito final, es decir, de que pueda resolverse la estructura tridimensional de alguna de ellas. Conseguirlo depende de la superación de varias etapas. El primer paso, una vez obtenida la construcción pertinente y habiendo transformado *P. pastoris* con ella, consiste en obtener una elevada expresión de la proteína, como mínimo de 5 mg por litro de cultivo. Para facilitar la posterior cristalización, no conviene mezclar proteínas procedentes de diferentes cultivos, por tanto la cantidad de proteína necesaria se ha de obtener en una sola expresión. En segundo lugar, hay que proceder a la purificación de la proteína heteróloga. Es imprescindible alcanzar un alto grado de pureza para que la proteína pueda cristalizar. El tercer paso consiste en concentrar la proteína hasta 10 mg/ml evitando cualquier fenómeno de agregación.

Una vez obtenida la proteína pura y concentrada, pueden empezarse los *screenings* de cristalización con el objeto de encontrar unas condiciones a las que someter a la proteína en que aparezcan cristales. Luego hay que optimizar estas

condiciones hasta que los cristales sean del tamaño adecuado y permitan una buena difracción.

A menudo, la muestra de proteína concentrada se agota antes de encontrar estas condiciones óptimas, lo que conlleva la repetición del proceso desde el principio.

En este trabajo, se empezó el proceso con las siguientes proteínas: la CPE de rata completa, la CPE de rata completa con la mutación E³⁰⁰Q, un mutante de CPE al que se han eliminado los 23 residuos del extremo N-terminal y el dominio 2 de la CPD de pato.

Se eligió el mutante de CPE E³⁰⁰Q pensando en un posible co-cristal enzima-sustrato, ya que este cambio puntual de un residuo catalítico provoca una pérdida total de la actividad dejando intacta su capacidad de unión a sustrato (Quian *et al*, 1999). A menudo resulta más fácil la cristalización de un complejo (por ejemplo, enzima-sustrato) que de una proteína aislada.

El mutante de la CPE truncada en su extremo N-terminal fue elegido como otro posible candidato para su cristalización, ya que un estudio anterior había demostrado que la delección de los 23 residuos reducía considerablemente la tendencia a agregarse que presenta la CPE completa. Una delección mayor afectaba a la actividad (Varlamov y Fricker, 1996). Reducir el fenómeno de la agregación facilita la expresión de la proteína, su purificación y su posterior concentración.

Por su parte, la CPD completa es una proteína dividida en tres dominios muy grande y difícil de manejar. Por eso se pensó que un solo dominio tendría más posibilidades de salir airoso de cada uno de los pasos del proceso previo a la cristalización. Se descartó el dominio 3 por ser inactivo y se acabó eligiendo el dominio 2 por ser algo más parecido a la CPE que el dominio 1, tanto a nivel de identidad secuencial como a nivel funcional, ya que el dominio 2, al igual que la CPE, actúa óptimamente a un pH ácido (Eng *et al*, 1998).

La CPE completa y su mutante E³⁰⁰Q fracasaron casi al principio del proceso: no se consiguieron unos niveles elevados de expresión y aún menos al intentar purificarlas. La razón de esta escasa expresión era la enorme tendencia de la CPE a la agregación. Sí se consiguió, en cambio, un buen nivel de expresión de la CPE truncada por su extremo N-terminal. Se obtuvo, además, un elevado grado de pureza de esta proteína. Sin embargo, al intentar concentrarla hasta el nivel requerido para su cristalización, presentaba claros síntomas de agregación. Sólo añadiendo detergente en cantidades mayores de las deseables para su cristalización fue posible concentrar la proteína. En los

experimentos de cristalización sólo se obtuvieron microcristales, no válidos para la difracción de rayos X

Así pues, la única proteína de las cuatro con las que se empezó el proyecto que superó todos los pasos previos a la cristalización fue el dominio 2 de la CPD de pato. Afortunadamente, los cristales que se obtuvieron permitieron la resolución de su estructura y han servido como base para estudios de modelado de otras carboxipeptidasas reguladoras.

En una segunda fase del proyecto referente a las carboxipeptidasas reguladoras en el que los estudios estructurales se realizan tanto a nivel cristalográfico como a nivel computacional, los objetivos a alcanzar fueron los siguientes:

- Cristalizar el dominio 2 de CPD de pato unido a un inhibidor (GEMSA) que permita perfilar la zona correspondiente al centro activo de forma más detallada.
- Creación de modelos de otras carboxipeptidasas reguladoras (CPE humana y dominios 1 y 3 de CPD de pato) basados en las estructuras conocidas del dominio 2.
- Análisis comparativo de estos modelos y de su relación estructura-función.

En definitiva, en el apartado dedicado a carboxipeptidasas reguladoras se pretende realizar estudios a nivel estructural sobre estas enzimas para las que, a pesar de su gran importancia fisiológica, se dispone de muy pocos datos estructurales hasta el momento. Un conocimiento exhaustivo de su estructura macromolecular es imprescindible para posteriores estudios en ingeniería de proteínas, y puede ser crucial para la elucidación de las funciones de algunas de ellas que todavía quedan por esclarecer. Además, la familia de carboxipeptidasas reguladoras crece constantemente, haciendo más necesario el conocimiento de las trazas estructurales comunes, adquirible mediante la resolución de alguna de las estructuras de referencia.

Referencias

Eng F, Novikova EG, Kuroki K, Ganem D, Fricker LD (1998) gp180, a protein that binds duck hepatitis B virus particles, has metallopeptidase D-like enzymatic activity. *J Biol Chem* 273, 8382-8388.

Quian Y, Varlamov O, Fricker LD (1999) Glu³⁰⁰ of rat carboxypeptidase E is essential for enzymatic activity but not substrate binding or routing to the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* 274, 11582-11586.

Varlamov O, Fricker LD (1996) The C-terminal region of carboxypeptidase E involved in membrane binding is distinct from the region involved with intracellular routing. *J Biol Chem* 271, 28884-28889.

M. Material y métodos

Prólogo

Este apartado pretende recoger exhaustivamente los protocolos seguidos en las diversas fases de esta tesis. Los dos primeros subapartados, M1 y M2, describen procedimientos generales de trabajo con DNA recombinante y en química de proteínas, mientras que los apartados M3 y M4 describen más específicamente los protocolos seguidos con proteínas pancreáticas y con las carboxipeptidasas reguladoras en sus procesos de expresión heteróloga y purificación.

M1. DNA recombinante

M1.1. Material biológico y medios de cultivo

M.1.1.1. Microorganismos y cepas

Escherichia coli

Cepa JM83 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

Genotipo: *ara*, $\Delta(lac-proAB)$, *rpsL*, *f80*, *lacZ* $\Delta M15$

Cepa que contiene el gen de la β -galactosidasa (*lac Z*). Se ha utilizado como huésped general de los vectores plasmídicos tipo pBluescript.

Cepa MC1061 (Casadaban *et al.*, 1980)

Genotipo: *hsd R2*, *hsd M*⁺, *hsd S*⁺, *ara D139*, $\Delta(ara-leu)$ 7-696, $\Delta(lac)X47$, *gal E15*, *gal K16*, *rpsL* (Str^r) *Mcr A*, *Mcr B1*.

Se ha utilizado como huésped de vectores plasmídicos; también contiene el gen de la β -galactosidasa. Su eficiencia de transformación es superior a la anterior.

Pichia pastoris

P. pastoris es una levadura que puede usar metanol como fuente de carbono. Es capaz de alcanzar densidades de cultivo muy elevadas y por ello era utilizada tradicionalmente para producir biomasa. Recientemente ha demostrado ser una alternativa a *Saccharomyces cerevisiae* para la sobreexpresión de proteínas recombinantes en un huésped eucariota.

Cepa GS115

Genotipo: his4

Fenotipo: Mut+ y Mut S

Cepa KM71

Genotipo: arg4 his4 aox1::ARG4

Fenotipo: Mut S Arg+

M.1.1.2. Vectores

pBluescript SK+

Su medida es de 2,96 kb. Es un derivado de pUC, que incorpora un policonector más completo y los promotores de las polimerasas T3 y T7. Se ha utilizado como paso intermedio en la construcción de los mutantes de la PCPB y para su secuenciación.

pPIC9

Vector de expresión de *P. pastoris*. Éste es un vector lanzadera que se puede usar tanto en *P. pastoris* como en *E. coli*, ya que parte de él deriva del plásmido pBR322. Este vector posee el promotor del gen *AOX1* y el gen histidinol deshidrogenasa (*his4*), usado para seleccionar los clones positivos. Se trata de un vector de secreción, ya que contiene el péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* que secreta las proteínas al medio extracelular.

M.1.1.3. Medios de cultivo

Medio LB (Luria –Bertani)

Medio rico para cepas de *E. coli*. Para 1 litro:

10 g triptona

5 g extracto de levadura

10 g NaCl

pH ajustado a 7,0 con NaOH. Esterilización en autoclave.

Medio YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*)

Medio rico para levadura. Para 1 litro:

10 g extracto de levadura

20 g peptona

10 g dextrosa

Esterilización en autoclave.

Medio MD (*Minimal Dextrose Medium*)

Medio mínimo, sin aminoácidos, para levadura. Para 1 litro:

13,4 *yeast nitrogen base*

0,4 mg biotina

20 g dextrosa

Esterilización en autoclave. Se conserva a 4 °C.

Medio MM (*Minimal Methanol Medium*)

Medio mínimo, sin aminoácidos y con metanol, para *P. pastoris*. Para 1 litro:

13,4 *yeast nitrogen base*

0,4 mg biotina

5 ml metanol 100%

Esterilización con autoclave (excepto metanol y biotina). La biotina se esteriliza por filtración.

Medio BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*)

Medio tamponado rico con glicerol. Para 1 litro:

100 ml tampón fosfato potásico 1 M (pH 6,0)

13,4 g *yeast nitrogen base*
0,4 mg biotina
5 ml metanol
10 g extracto de levadura
20 g peptona

Para el crecimiento de un cultivo bacteriano líquido inoculamos unos 100 µl de cultivo de noche en 100 ml de LB estéril con ampicilina (50 mg/ml). También se puede inocular a partir de una colonia o un glicerinado. El crecimiento de *E. coli* se lleva a cabo a 37 °C, mientras que el de *P. pastoris* es a 30 °C. Las placas se pueden conservar a corto plazo (1-2 meses) a 4 °C. Para guardar las cepas a largo plazo, se añade glicerol a un cultivo crecido hasta un 15% del volumen final y se congela inmediatamente a -80 °C.

M.1.2. Métodos de DNA recombinante

M.1.2.1. Extracción con fenol-cloroformo

Éste es el método utilizado para desproteinizar el DNA aprovechando las propiedades hidrofóbicas de las proteínas, que tienen afinidad por los disolventes orgánicos.

M.1.2.1.1. Preparación del fenol

El protocolo utilizado en la preparación del fenol equilibrado en TE es el siguiente:

- 1.- El fenol sólido (250 g) se funde calentándolo al baño maría.
- 2.- Se añade 0,25 g de 8-hidroxiquinolina. Este producto es un antioxidante que da un color amarillo al fenol.
- 3.- Se añade un volumen de TE pH 7,6. Se mezcla hasta formar una emulsión y se deja reposar a 4 °C durante unas horas hasta que las dos fases se separan; entonces se aspira la fase acuosa con una bomba de vacío.

Disolución TE pH 7,6:

Tris-HCl 10 mM

EDTA 1 mM

Se ajusta el pH a 7,6

- 4.- Se añade nuevo tampón, se vuelve a mezclar y se repite la extracción. El proceso se repite hasta que el pH de la fase acuosa es igual al del tampón de equilibrado (pH 7,6).
- 5.- Finalmente se recupera la fase fenólica, se hacen alícuotas, se añade 1 volumen de TE pH 7,6 y se conserva a 20 °C protegida de la luz.

M.1.2.1.2. Extracción

- 1.- Se añade 1 volumen de fenol equilibrado en TE. Se mezcla con el vórtex para formar una emulsión y se centrifuga a 12000 x g durante 2 min. En la interfase aparece una capa de proteínas. Se recupera con mucho cuidado la fase superior.
- 2.- Se añade ½ de volumen de fenol y ½ de volumen de cloroformo. Se mezcla y se centrifuga a 12000 x g 2 min. Se recupera la fase acuosa (superior).
- 3.- Se añade 1 volumen de cloroformo. Se mezcla con el vórtex y se centrifuga a 12000 x g durante 2 min. Se recupera la fase acuosa y se repite el mismo paso.

M.1.2.1.3. Precipitación del DNA

La fase acuosa de la extracción con fenol-cloroformo se puede concentrar de la siguiente forma para trabajar con volúmenes pequeños:

- 1.- Se añade 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M, pH 7,0 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se mezcla por inversión. La disolución se deja o bien 1 h a -80 °C o bien toda la noche a -20 °C.
- 2.- Se centrifuga a 12000 x g durante 15 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.
- 3.- Se lava el precipitado con 500 µl de etanol 70% frío. Se mezcla por inversión y se centrifuga a 12000 x g durante 10 min a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.
- 4.- Se seca el precipitado al vacío durante 20 min. Si el DNA está limpio, el precipitado es casi transparente. Se resuspende con el volumen adecuado de TE pH 7,6 o agua estéril.

M.1.2.2. Determinación de la concentración del DNA

M.1.2.2.1. Determinación espectrofotométrica

Consiste en registrar el espectro de absorción de la región de 200 a 320 nm. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale aproximadamente a 50 µg/ml de DNA de doble cadena y a 40 µg/ml de DNA de cadena sencilla.

La pureza del DNA se puede valorar con el coeficiente $A_{260/280}$, que ha de ser cercano a 1,8. Valores inferiores indican contaminación por proteínas, y valores superiores, contaminación por RNA.

M.1.2.2. Estimación por electroforesis en gel de agarosa

Cuando se trabaja con cantidades muy pequeñas de DNA, es mejor estimar su concentración a partir de la fluorescencia emitida por la tinción con bromuro de etidio que se intercala entre las bases nitrogenadas.

Se realiza una electroforesis analítica en agarosa y se visualiza por iluminación con luz ultravioleta. La cantidad de DNA presente en la banda de la disolución problema se estima por comparación de su intensidad con las bandas correspondientes a los marcadores.

M.1.2.3. Extracción de DNA plasmídico

Se han utilizado dos métodos para minipreparar el DNA plasmídico.

M.1.2.3.1. Procedimiento de la lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979)

Este método degrada todo el DNA celular excepto el circular.

- 1.- Se inocular una colonia de la cepa deseada en 5 ml de LB fresco con el antibiótico apropiado. Se incuba durante 12 a 15 h en agitación a 37 °C.

M.1.2.4. Digestiones enzimáticas de ácidos nucleicos

M.1.2.4.1. Digestión con endonucleasas de restricción

Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan por secuencias específicas de DNA. Las del tipo II constituyen herramientas básicas de la biología molecular. La actividad de las enzimas de restricción depende del pH, de la fuerza iónica y de la temperatura de la reacción. Cada enzima tiene unas condiciones óptimas de funcionamiento.

Normalmente, la cantidad de DNA utilizada en las digestiones oscila entre 0,5 y 10 μg y se añaden de 1 a 10 unidades de enzima por μg de DNA. Hay que tener en cuenta que la cantidad de enzima no puede superar nunca el 10% del volumen total de la reacción, ya que los enzimas de restricción vienen suministrados en una disolución de glicerol al 50%, y una concentración de glicerol en el medio de reacción superior al 5% puede hacer perder la especificidad de reconocimiento.

La temperatura de reacción varía para cada enzima. El tiempo de reacción es de 2 h. como mínimo. Si se utilizan dos enzimas a la vez, se puede aumentar el tiempo hasta 3 ó 4 h. En algunos casos, la mezcla de reacción se complementa con BSA a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para estabilizar la enzima.

M.1.2.4.2. Tratamiento con RNasa A

Se prepara la disolución madre de RNasa A a 10 mg/ml.

Disolución de RNasa A (para 10 ml):

RNasa A	100 mg
Tris-HCl 1 M	100 μg
NaCl 4 M	37,5 μl

Se ajusta el pH a 7,5

Esta disolución se calienta al baño maría durante 15 min para inactivar la DNasa contaminante. Luego se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente, se hacen alícuotas y se guardan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La digestión se realiza a una concentración final de

RNasa A de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 60 °C durante 45 min. También se puede realizar al mismo tiempo la digestión con RNasa A y endonucleasas de restricción, entonces se trabaja a 37 °C.

M.1.2.5. Separación del DNA mediante geles de agarosa

M.1.2.5.1. Electroforesis de DNA

La electroforesis horizontal en geles de agarosa se ha utilizado como método habitual de análisis de DNA. El entramado molecular del gel de agarosa es el principal factor de la separación. De esta manera, las moléculas de tamaño más pequeño avanzan más rápidamente a través del gel. Existen diferentes tipos de agarosa y se pueden utilizar a diferentes concentraciones. Si no se pretende recuperar ningún fragmento de DNA separado durante la electroforesis, la agarosa utilizada es la llamada de calidad para biología molecular (suministrada por Promega), a una concentración entre 0,8 y 1,2%. Si se pretende recuperar algún fragmento de DNA separado durante la electroforesis, entonces se utilizan agarosas de bajo punto de fusión suministradas por la casa FMC: la agarosa *Nu Sieve* al 2-3% para separar y recuperar fragmentos inferiores a 1000 pb y la agarosa *Sea Plaque* al 0,8-1,2% para separar y recuperar fragmentos superiores a 1000 pb. Estas agarosas de bajo punto de fusión son muy poco consistentes y normalmente se les añade una quinta parte de agarosa normal.

Como tampones de recorrido se utilizan alternativamente las siguientes disoluciones:

Disolución TBE 10x (para 1 litro):

Tris	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0,2 M (pH 8,0)	100 ml

Disolución TAE 10x (para 1 litro):

Tris	48,4 g
Ácido acético glacial	11,42 ml
EDTA 0,2 M (pH 8,0)	50 ml

Preparación del gel:

- 1.- Se pesa la cantidad de agarosa correspondiente y se introduce en un erlenmeyer. Para un minigel se añade 50 ml de tampón de electroforesis (TAE o TBE) y para un gel grande se añade 200 ml.
- 2.- Se funde la agarosa calentando el erlenmeyer hasta la ebullición. Se agita durante el proceso para obtener una disolución homogénea.
- 3.- Se deja enfriar y se añade bromuro de etidio (10 mg/ml) hasta una concentración final de 0,5 µg/ml. Alternativamente, los geles se pueden teñir después de la electroforesis.
- 4.- Cuando la agarosa está a una temperatura inferior a 50 °C, se vierte en el molde del gel, que lleva un peine para formar los pocillos. Hay que evitar la formación de burbujas.
- 5.- Se deja solidificar durante 20-30 min.
- 6.- Se coloca el gel dentro de la cubeta de electroforesis y se cubre con el tampón de electroforesis (TAE o TBE) hasta 2-3 mm por encima del gel.

Electroforesis:

- 1.- Se añade a las muestras el tampón de carga.

Tampón de carga 5x (para 50 ml):

TBE 10x	25 ml
Ficoll 5%	25 ml
Azul de bromofenol (BP)	30 mg
Xileno cianol (XC)	30 mg

- 2.- Se cargan de 10 a 20 µl de muestra por pocillo. En uno de ellos, se carga también 1 µg de marcadores de peso molecular. Se utilizan los suministrados por la casa comercial BRL Gibco, con fragmentos que van desde 12216 pb hasta 75 pb.
- 3.- Se conecta la electroforesis a 70-90 voltios hasta que el colorante azul de bromofenol llegue a 2/3 del recorrido del gel.

Tinción a posteriori del gel:

- 1.- Si no se ha añadido el bromuro de etidio durante la preparación del gel, hay que sumergirlo después durante 20 min en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml. A continuación se destiñe con agua durante 10 min.
- 2.- Las bandas de DNA se ven al transiluminar el gel con luz ultravioleta.

M.1.2.5.2. Purificación de bandas de DNA de geles de agarosa

Para la extracción del DNA de la agarosa de bajo punto de fusión se utiliza un kit comercial de la casa Pharmacia Biotech llamado “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*”. El protocolo de utilización es el siguiente:

- 1.- Se pesa un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml vacío y se apunta el peso.
- 2.- Se recorta la banda del gel de agarosa de bajo punto de fusión y se pone en el tubo previamente pesado. Se calienta el tubo durante 5 min a 60 °C hasta que se funde la agarosa.
- 3.- Se pesa el tubo que contiene la banda de agarosa y se le resta el peso del tubo vacío para determinar el peso de la banda.
- 4.- Se añade 10 µl del tampón suministrado por el kit por cada 10 mg de banda.
- 5.- Se agita el tubo con el vórtex y se incuba a 60 °C hasta fundir la agarosa (5-10 min).
- 6.- Se coloca una mini-columna en un tubo colector para cada purificación.
- 7.- Se pone la muestra en la mini-columna y se incuba 1 min a temperatura ambiente.
- 8.- Se centrifuga a 15700 x g 30 s. Se tira el líquido del tubo colector y se vuelve a poner la mini-columna.
- 9.- Se pone 500 µl de tampón de lavado en la columna y se vuelve a centrifugar 30 s.
- 10.- Se coloca la columna en un tubo limpio y se aplican 50 µl de agua estéril.
- 11.- Se incuba la muestra a temperatura ambiente durante 1 min y se centrifuga durante 1 min para recuperar el DNA purificado.

M.1.2.6. Clonaje de fragmentos de DNA en plásmidos

M.1.2.6.1. Defosforilación de extremos 5' del DNA

En las ligaciones de fragmentos de DNA a vectores con los mismos extremos cohesivos o entre extremos romos, hay que defosforilar los extremos 5' del vector para evitar su recircularización. Para defosforilar los extremos 5' del DNA se utiliza la fosfatasa alcalina de ternera (CIP).

Protocolo:

- 1.- Se linealiza el vector con la enzima de restricción adecuada.

2.- Se desactiva la enzima calentando 10 min a 65 °C. Si la enzima no es inactivable por calor, se fenoliza. Se purifica el DNA, ya sea utilizando el kit comercial “*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” de Pharmacia Biotech o mediante una extracción con fenol/cloroformo seguida de una precipitación etanólica (ambos métodos descritos anteriormente).

3.- Se mezcla:

- Vector linealizado de 0,2 a 5 µg
- 1 unidad de CIP (Promega) para cada 100 pmoles de residuos fosfato 5’ en el caso de extremos cohesivos idénticos o 1 unidad de CIP para cada 2 pmoles en el caso de extremos romos (recuérdese que 2 µg de un DNA linealizado de 5 kb presenta 1,4 pmoles de residuos fosfato 5’).
- 2 µl de tampón CIP 10x suministrado por la casa comercial.
- Agua estéril hasta un volumen final de 20 µl.

Tampón CIP 10x:

ZnCl ₂	10 mM
MgCl ₂	10 mM
Tris-HCl (pH 8,3)	100 mM

4.- Se deja reaccionar durante 1 h a 37 °C.

5.- Se inactiva la CIP calentando a 75 °C durante 10 min y añadiendo EDTA a una concentración final de 5 mM.

6.- Se purifica el DNA.

M.1.2.6.2. Ligación de fragmentos de DNA

La ligación permite unir fragmentos de DNA con extremos compatibles. Se acostumbra a usar para insertar fragmentos de DNA en vectores plasmídicos y así generar moléculas recombinantes. La DNA ligasa de T4 es la enzima utilizada para esta tarea por ser la única que liga extremos romos. Las cantidades de DNA y las condiciones de la ligación varían en función de que los extremos sean cohesivos o romos.

Ligación entre extremos cohesivos compatibles:

El cociente entre el número de moléculas de vector y el número de moléculas de inserto ha de ser cercano a 0,5, es decir, 2 moléculas de fragmento por cada molécula de vector.

Para hacer los cálculos hay que tener en cuenta el tamaño del vector y del inserto que se ha de clonar.

1.- Se mezcla:

100 ng de vector linealizado.

Los ng de inserto digerido necesarios siguiendo la relación antes expuesta.

1 μ l de tampón de ligasa 10x suministrado por la casa comercial.

1 unidad de T4 DNA ligasa de *E. coli* (Promega).

Agua estéril hasta un volumen de 10 μ l.

2.- Se deja incubar a 16 °C durante toda la noche.

Ligación entre moléculas de extremos romos:

El cociente entre el número de moléculas de vector y el número de moléculas de inserto ha de ser cercano a 0,2, es decir, 5 moléculas de inserto por cada molécula de vector.

1.- Se mezcla:

100 ng de vector linealizado.

Los ng de inserto digerido necesarios siguiendo la relación antes expuesta.

1 μ l de tampón de ligasa 10x suministrado por la casa comercial.

1 unidad de T4 DNA ligasa de *E. coli* (Promega).

Agua estéril hasta un volumen de 10 μ l.

2.- Se deja incubar a 16 °C durante 12 h, después se añade 1 unidad más de T4 DNA polimerasa y se deja incubar durante 12 h más a la misma temperatura.

Tampón T4 DNA ligasa 10x:

Tris-HCl (pH 7,6) 200 mM

MgCl₂ 100 mM

DTT 100 mM

ATP 10 mM

M.1.2.7. Preparación de células competentes de *E. coli*

La introducción de vectores plasmídicos en células de las cepas adecuadas de *E. coli* se realiza mediante la transformación de células competentes de estas cepas (Mandel *et al.*, 1970).

Las células competentes se preparan siguiendo este protocolo:

- 1.- Se inocula 10 ml de LB fresco con una colonia o 50 μ l de glicerinado y se incuba durante 12-15 h a 37 °C en agitación a 300 rpm.
- 2.- Se inocula 200 μ l del cultivo anterior en 20 ml de LB fresco y se incuba a 37 °C en agitación hasta que la DO₅₅₀ del cultivo esté entre 0,4 y 0,5 (suele tardar unas 3 h).
- 3.- Se transfiere el cultivo a un tubo de polipropileno estéril de 50 ml y se enfría el cultivo en gel durante 15 min como mínimo.
- 4.- Se centrifuga a 2200 x g durante 10 min a 4 °C. Se decanta el sobrenadante y se seca el precipitado por inversión durante 10 min. Se resuspende en 10 ml de CaCl₂ 100 mM enfriado previamente en hielo. Se deja reposar en hielo durante 1 h.
- 5.- Se centrifuga a 2200 x g durante 10 min a 4 °C. Se decanta el sobrenadante y se seca el precipitado por inversión durante 10 min. Se resuspende en 10 ml de CaCl₂ 100 mM enfriado previamente en hielo. Se deja reposar en hielo durante 1 h. Al cabo de este tiempo, ya tenemos preparadas las células competentes, que se pueden alicuotar.

El CaCl₂ 100 mM se esteriliza por filtración. Las alícuotas de células competentes se pueden congelar a -80 °C si previamente se añade glicerol a una concentración final del 15%.

M.1.2.8. Transformación de células competentes de *E. coli*

Las células competentes pueden ser transformadas con DNA que proceda de una ligación o de una minipreparación plasmídica. Las cepas de *E. coli* utilizadas son la JM83 y la MC1061. El protocolo de transformación es el siguiente:

- 1.- Se mezcla 100 μ l de suspensión de células competentes con 50 ng de DNA de la mezcla de ligación. Para comprobar la eficiencia del proceso se hacen dos controles. Un control negativo donde sólo se incuban células competentes sin DNA y un control positivo donde se transforman células competentes con un plásmido circular que presenta resistencia a la ampicilina, pero sin inserto.
- 2.- Se incuba en hielo durante 30 min.
- 3.- Choque térmico. Se transfieren las muestras a un baño a 42 °C durante 2 min y luego a 0 °C 2 min o más.
- 4.- Se añade 1 ml de LB fresco a cada muestra y se deja incubar a 37 °C en agitación suave de 100 rpm durante 1 h.
- 5.- Se siembran 200 μ l de cada muestra con un asa de Digrafsky estéril sobre placas de LB, Amp y X-gal (si se selecciona por color).
- 6.- Se deja reposar las placas a temperatura ambiente durante 10 min.

- 7.- Se invierten las placas y se incuban a 37 °C durante 12 - 15 h.
- 8.- Selección de transformantes. Ya sea por color si llevan el gen de la β -galactosidasa, o sólo por resistencia a la ampicilina.

M.1.2.9. Mutagénesis dirigida por PCR

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido una herramienta fundamental para la biología molecular en los últimos años. Es un sistema rápido y sencillo para amplificar DNA *in vitro*. Entre otras utilidades, la PCR permite hacer mutagénesis dirigida sobre secuencias de DNA. Estas mutaciones pueden ser puntuales, inserciones o deleciones. En este trabajo, se ha aplicado la técnica de la PCR en unos casos concretos de mutagénesis dirigida sobre la carboxipeptidasa B utilizando la estrategia denominada extensión por solapamiento.

M.1.2.9.1. Extensión por solapamiento

Debido a que las mutaciones que se querían introducir no se encontraban en el extremo del fragmento de DNA a amplificar, se utilizó la estrategia de PCR de extensión por solapamiento (“overlap extension”). Ésta consiste en amplificar independientemente dos segmentos solapantes de un gen y luego unirlos en una segunda reacción.

La mutagénesis se consigue gracias al uso de cebadores específicamente diseñados que incluyen en su secuencia los cambios deseados. La unión de los dos fragmentos se puede producir porque estos cebadores, además, tienen complementariedad terminal. Es importantísimo, pues, un buen diseño de los cebadores.

M.1.2.9.2. Diseño de los cebadores

En el diseño de los cebadores se han de tener en cuenta los siguientes puntos:

- 1.- La temperatura de fusión (T_m) del extremo 3' del cebador ha de ser suficientemente alta como para permitir una buena hibridación con el DNA molde. La T_m se puede

calcular con la siguiente fórmula: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$, donde A,T,C y G indican, respectivamente, el número de adeninas, timinas, citosinas y guaninas en la región de solapamiento. Se considera suficiente una T_m de 50 °C.

- 2.- Se ha de comprobar que las secuencias oligoméricas no forman estructuras secundarias ni son complementarias a otros cebadores de la misma reacción.
- 3.- La Taq polimerasa añade una A al extremo 3' de la nueva cadena que sintetiza. Esto será importante en la posterior hibridación de los productos de la primera reacción.

M.1.2.9.3. 1ª fase de PCR

Se prepara la siguiente mezcla para cada reacción:

DNA molde	1 µl (1 µg/µl)
Cebador A	5 µl (20 mM)
Cebador B	5 µl (20 mM)
dNTPs	4 µl (125 mM)
Tampón x10	5 µl
Polimerasa Taq	0,5 µl
Agua estéril	29,5 µl

Es muy importante que ninguno de los componentes esté disuelto en TE, ya que el EDTA inhibe las polimerasas. También hay que llevar a cabo todo el proceso a 0 °C hasta que se introduzcan los tubos en el termociclador. En el caso de nuestros mutantes, se introduce el siguiente programa al aparato:

Ciclo 1 (x1)	2 min	95 °C
Ciclo 2 (x30)	30 s	94 °C
	1 min	55 °C
	1 min	72 °C
Ciclo 3 (x1)	5 min	72 °C

A continuación, se hace correr en un gel de agarosa el producto de la reacción. Se ha de observar una banda del tamaño esperado y otra más pequeña, correspondiente a la dimerización de los cebadores. Se purifican las bandas deseadas y se resuspenden en 50 µl de agua.

M.1.2.9.4. 2ª fase de PCR

Aquí, los productos de la fase anterior actúan como DNA molde. Se prepara la misma mezcla que en la 1ª fase, pero en este caso se pone 0,5 µl de cada uno de los dos productos purificados anteriormente como DNA molde. Se puede usar el mismo programa en el termociclador. Una vez finalizada la reacción, se hace correr el producto en un gel de agarosa y se purifica la banda de interés. Entonces se digiere con las enzimas de restricción adecuadas y se liga al vector deseado. Como alternativa, si esta digestión presenta problemas, se puede ligar directamente al vector pGEM-T, que está especialmente diseñado para clonar productos de PCR sin restricción previa, siempre que la PCR se haya obtenido con una polimerasa que añada A en el extremo 3' del producto (como es el caso de la Taq).

Cuando se hace mutagénesis por PCR, siempre es necesario secuenciar las construcciones definitivas con tal de asegurarnos que la polimerasa no ha introducido ningún error al amplificar la secuencia.

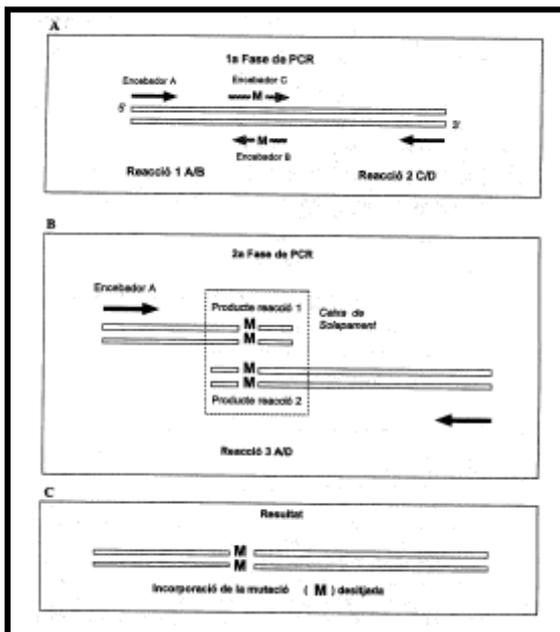


Figura M.1. Esquema de la estrategia de PCR de extensión por solapamiento (Reproducido de S. Ventura, Tesis Doctoral 1998)

M.1.2.9.5. Secuenciación del DNA

La secuenciación del DNA se realizó de manera automática en el Servicio de Secuenciación del Departamento de Microbiología y Genética de la UAB (Unidad de Microbiología).

M.1.2.10. Transformación de *Pichia pastoris*. Método de los esferoplastos

Este método para *P. pastoris* fue descrito por primera vez por la empresa Philips Petroleum Company. Para este trabajo, se ha utilizado el kit de transformación de la casa comercial Invitrogen. El método de los esferoplastos permite la introducción del DNA plasmídico gracias a la formación de esferoplastos al romperse la pared celular. El protocolo es el siguiente:

- 1.- Se inoculan 20 ml de YPD con la cepa GS115 o KM71. Se deja crecer a saturación (1-2 días).
- 2.- Se inoculan 100 ml de medio YPD con 1-10 μ l del cultivo anterior. Se deja crecer durante la noche.
- 3.- Cuando la OD₆₀₀ está entre 0,2 y 0,5, se centrifuga 5-10 min a 1500 x g.
- 4.- Se lava con 10 ml de agua estéril y se vuelve a centrifugar igual que antes.
- 5.- Se lava con 10 ml de SED fresco y se centrifuga.

SED: Sorbitol 1 M
EDTA 25mM
DTT 50 mM (poner justo antes de usar).

- 6.- Se lava con 10 ml de sorbitol 1 M y se centrifuga.
- 7.- Se lava con 10 ml de SCE. Se separa en 2 tubos de 5 ml.

SCE: Sorbitol 1 M
EDTA 25 mM
Tampón citrato sódico 10 mM (pH 5,8)

- 8.- Para una buena transformación, hace falta llegar a tener un 70% de esferoplastos. Para medir el tiempo de incubación necesaria con la zimoliasa, se utiliza uno de los tubos anteriores de 5 ml. Se añade 7,5 μ l de zimoliasa, se incuba a 30°C, y se mide el tiempo que tarda en llegar al 70% de esferoplastos con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ esferoplastos} = 100 - [(OD_{800} \text{ a } t / OD_{800} \text{ a } t_0) \times 100]$$

Las medidas se hacen en el espectrofotómetro en una disolución de SDS 5%. Una vez hemos determinado el tiempo, se incuba a 30 °C el tubo de 5 ml.

- 9.- Se centrifuga a 750 x g unos 5 min. Los esferoplastos son muy frágiles y hay que tratarlos con cuidado.
- 10.- Se lava con 5 ml de sorbitol 1M y se centrifuga.

11.- Se lava con 5 ml CaS y se centrifuga.

CaS: Sorbitol 1 M
Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)
CaCl₂ 10 mM

12.- Se resuspende el pellet en 0,3 ml de CaS. Ahora las células ya están preparadas para ser transformadas. Se transfieren 250 µl a un eppendorf.

13.- Se añade de 1 a 10 µg del DNA a insertar (ha de ser lineal) y 10 µg de DNA “carrier”. Se hace también un control negativo sin añadir DNA. Se mantiene a temperatura ambiente 10 min.

14.- Se añade 1 ml de PEG, se mezcla con cuidado y se espera 15 min.

PEG: 20% polietilenglicol 3350
Tris-HCl 10 mM (pH 7,5)
CaCl₂ 10 mM

15.- Se centrifuga a 750 x g durante 10 min. Se elimina bien el PEG.

16.- Se resuspende en 750 µl de SOS. Se mantiene a temperatura ambiente 20 min.

SOS: Sorbitol 1 M
YPD x 3
CaCl₂ 10 mM

17.- Se añade 0,75 ml de sorbitol 1 M. La muestra ya está preparada para el sembrado.

18.- El sembrado se realiza sobre placas MD (*minimal dextrose medium*) para seleccionar colonias His⁺. Se hace una siembra en doble capa, se prepara una disolución regenerativa llamada RD, de la que 10 ml se mezclan con unos 0,25 ml del material de la transformación y se siembran por decantación sobre la placa de MD.

RD (1 litro): 186 g sorbitol
10 g agar o agarosa
20 g dextrosa
13,4 g *yeast nitrogen base*
0,4 mg biotina

Esterilización por autoclave.

19.-Se incuban las placas a 30 °C. En 3-5 días aparecen transformantes.

M.2. Métodos de química de proteínas

M.2.1. Métodos electroforéticos

Estas técnicas se han utilizado fundamentalmente para realizar el seguimiento de los procesos de purificación de proteínas, calcular los pesos moleculares y analizar la activación de los proenzimas.

El aparato de electroforesis utilizado es un mini kit comercial de la casa Bio Rad con placas de 80 x 70 x 0,75 mm.

En este trabajo se han utilizado los siguientes tipos de electroforesis:

- Electroforesis discontinua en presencia de SDS.
- Electroforesis en geles de tricina.
- Electroforesis en geles de TBE y TBE/urea.

M.2.1.1. Electroforesis discontinua en presencia de SDS

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) es una técnica muy empleada por la gran resolución que proporciona. Presenta la característica de que las proteínas migran a una velocidad que está en función inversa del logaritmo de su masa molecular. El SDS es un detergente iónico que se une a las proteínas proporcionalmente a su tamaño y por tanto su separación en el gel de poliacrilamida se hará según este criterio.

La electroforesis discontinua descrita por Laemmli (1970) aumenta la resolución porque los complejos SDS-proteína corren a través de dos geles de diferente densidad: el gel superior o concentrador, que es suficientemente laxo como para permitir la formación de un frente homogéneo y el gel inferior o separador, que es más denso y

permite que cada proteína tenga una velocidad diferente en función de su masa molecular.

Disoluciones de partida:

Solución A: 40% Acrilamida/Bis 37,5:1

Solución B: Tris-HCl 1,5 M, SDS 0,4% (pH 8,8)

Solución C: Tris-HCl 0,46 M, SDS 0,4% (pH 6,8)

Preparación del gel:

1.- Se limpian y se montan las placas de vidrio y la cubeta siguiendo las instrucciones de Bio Rad. Generalmente utilizamos separadores de 0,75 mm.

2.- Se prepara el gel separador, habitualmente al 15% de poliacrilamida, mediante la siguiente mezcla:

Solución A: 1,875 ml.

Solución B: 1,25 ml.

Agua Milli-Q: 1,703 ml.

Persulfato amónico al 10%: 40µl.

TEMED: 4 µl.

3.- Con ayuda de una pipeta Pasteur, se rellena el espacio entre las placas con el gel antes de que polimerice. Inmediatamente se añade una pequeña cantidad de isopropanol con tal de formar una fina capa sobre la superficie superior de polimerización y conseguir de esta manera que la interfase entre los dos geles sea lo mas recta posible. Se deja polimerizar y después se decanta el isopropanol y se limpia la superficie del gel varias veces con agua destilada.

4.- Se prepara el gel concentrador:

Gel concentrador (superior) 3%:

Disolución A 0,187 ml.

Disolución C 0,610 ml.

Agua Milli-Q 1,703 ml.

Persulfato amónico 10% 27,5 µl.

TEMED 2,75 µl.

5.- Se vierte el gel concentrador y antes de que gelifique se inserta entre las placas un peine que actuará de molde formador de pocillos donde se aplicará la muestra. Se deja polimerizar.

6.- Se prepara la cubeta de electroforesis y se llenan los compartimentos superior e inferior del kit con el tampón de elución preparado con agua Milli-Q.

Tampón de elución 10x:

Tris 0,25 M

Glicina 1,87 M

SDS 1%

Se ajusta el pH a 8,4 con HCl.

Electroforesis:

- 1.- Se mezclan las muestras con el tampón de aplicación 4x en una relación muestra/tampón de 3:1. El tampón de aplicación de muestras se prepara de forma concentrada con β -mercaptoetanol, un agente reductor para reducir los puentes disulfuro.

Tampón de aplicación 4x:

Tris 180 mM

Glicerol 30%

SDS 9%

β -mercaptoetanol 15%

Azul de Bromofenol 0,05%

Se ajusta el pH a 6,8 con HCl.

- 2.- Se hierven las muestras durante 2 ó 3 min a 100 °C y se aplican en el pocillo correspondiente. Junto con las muestras, se aplica también una mezcla de proteínas marcadoras de peso molecular que permite interpolar el peso de la proteína de interés.
- 3.- Se conecta la electroforesis a 20-40 mA durante 60 - 90 min hasta que el colorante sale del gel.
- 4.- Se desmonta el kit y se procede a la tinción.

M.2.1.2. Geles de tricina

Los geles de tricina descritos por Schägger y Van Jagow (1987) constan de tres geles de poliacrilamida de diferentes densidades: un gel superior o concentrador, un gel intermedio o espaciador y el gel inferior o separador, de malla estrecha para separar las proteínas en función de su tamaño. Los geles de tricina son muy resolutivos para proteínas de bajo peso molecular.

A continuación se indican las composiciones de los diferentes geles y del tampón necesario para prepararlos:

Tampón del gel 3x:

Tris-HCl 3 M

SDS 0,3%

Se ajusta el pH a 8,45

Gel separador 16%:

Acrilamida/Bisacrilamida 48 : 1,5	1,66 ml
Tampón del gel 1x	1,66 ml
Glicerol 50%	1,33 ml
Agua Milli-Q	0,33 ml
Persulfato amónico 20%	30 µl
TEMED	3 µl

Gel espaciador 9,6%:

Acrilamida/Bisacrilamida 48 : 1,5	0,50 ml
Tampón del gel 1x	0,83 ml
Agua Milli-Q	1,16 ml
Persulfato amónico 20%	30 µl
TEMED	3 µl

Gel concentrador 3,8%:

Acrilamida/Bisacrilamida 48 : 1,5	0,20 ml
Tampón del gel 1x	0,62 ml
Agua Milli-Q	1,68 ml
Persulfato amónico 20%	30 µl
TEMED	3 µl

El procedimiento de preparación del gel es el siguiente:

- 1.- Se limpian y se montan los cristales y la cubeta siguiendo las instrucciones de la casa Bio Rad. Se utilizan normalmente los espaciadores de 0,75 mm.
- 2.- Se prepara el gel separador al 16% de poliacrilamida según la receta dada anteriormente.
- 3.- Se vierte el gel separador entre las placas, con cuidado, sin formar burbujas y se añade inmediatamente una pequeña cantidad de isopropanol, con tal de formar una fina capa sobre la superficie superior de polimerización y conseguir de esta manera que la interfase entre los dos geles sea lo más regular posible. Se deja polimerizar y luego se decanta el isopropanol y se limpia la superficie del gel varias veces con agua destilada.
- 4.- Se prepara el gel espaciador al 9,6% de poliacrilamida según la receta dada anteriormente.
- 5.- Se vierte el gel espaciador e inmediatamente después se añade una pequeña cantidad de isopropanol. Se deja polimerizar y luego se decanta el isopropanol y se limpia la superficie del gel varias veces con agua destilada.
- 6.- Se prepara el gel concentrador al 3,8% de poliacrilamida según la receta dada anteriormente.
- 7.- Se vierte el gel concentrador y antes de que gelifique se inserta entre las placas y el peine que formará los pocillos donde se aplicará la muestra.
- 8.- Se prepara la cubeta del kit de electroforesis y se llena el compartimento interior con el tampón del cátodo 1x y la cubeta inferior con el tampón del ánodo 1x. Es muy importante evitar contactos entre los dos tampones.

Tampón del cátodo 10x:

Tris 1 M

Tricina 1M

SDS 1%

Tampón del ánodo 10x:
Tris-HCl (pH 8,9) 2M

Electroforesis:

- 1.- Se mezclan las muestras con el tampón de aplicación 4x en una relación muestra/tampón de 3:1. El tampón de aplicación de muestras se prepara tal y como se describe en el apartado anterior (M.2.2.1).
- 2.- Se calientan las muestras de 2 a 3 min a 100 °C y se aplican en el pocillo correspondiente. Junto con las muestras se aplica también una mezcla de proteínas marcadoras de peso molecular.
- 3.- Se conecta la electroforesis a 20 mA durante 2-3 h hasta que el colorante sale del gel.
- 4.- Se desmonta el kit y se procede a la tinción.

M.2.1.3. Densitometría de geles y membranas

La densitometría de bandas teñidas con azul de Coomassie o con anticuerpos es una forma rápida y sencilla de cuantificar proteínas a partir de geles o de membranas y permite utilizar la electroforesis como técnica cuantitativa. En el presente trabajo se ha aplicado a la cuantificación de especies generadas en el proceso de activación de la PCPB. Utilizando patrones, se puede extrapolar la cantidad de proteína problema, por ejemplo, de PCPB heteróloga obtenida en el medio de cultivo.

M.2.1.4. Tinción con azul de Coomassie

Es el colorante específico más utilizado. Su límite de detección es de 0,3 µg por banda. El procedimiento de tinción es el siguiente:

- 1.- Una vez acabada la electroforesis, los geles se sumergen directamente en la disolución colorante y se tiñen dentro del microondas durante 30 s a máxima potencia.

Disolución colorante:

Metanol 20%

Ácido acético 8%

Azul de Coomassie 0,15%

2.- Se destiñe también en el microondas durante 2 min con diversos cambios de la disolución decolorante hasta quedar contrastado.

Disolución decolorante:

Ácido acético 10%

M.2.2. Métodos cromatográficos

El análisis cromatográfico es una metodología usada exhaustivamente en este trabajo. Distinguimos:

- Cromatografía convencional a presión atmosférica.
- Cromatografía líquida de alta resolución FPLC.
- Cromatografía líquida de alta presión HPLC.

M.2.2.1. Cromatografía convencional a presión atmosférica

M.2.2.1.1. Cromatografía de interacción hidrofóbica

La fase estacionaria está formada por un soporte de partículas esféricas de sílice que contienen cadenas hidrocarbonadas unidas covalentemente y confieren a la superficie un carácter no polar. La interacción entre las moléculas y la fase estacionaria se realiza por interacciones hidrofóbicas y de reparto entre fases. Las diferentes moléculas de una disolución se separan por su carácter hidrofóbico siendo eluidas primero las moléculas más polares, es decir, aquellas cuya interacción con la matriz es pobre. La elución es provocada por la aplicación de un gradiente entre un tampón de alta fuerza iónica y otro de baja fuerza iónica. En nuestro caso, hemos utilizado columnas de 2 x 23 cm con la resina Toyopearl HIC Butyl-650 M (Toso-Hass) con un diámetro de partícula de 1,37 μm .

M.2.2.1.2. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es el método de purificación de proteínas más específico. Muchas proteínas muestran interacciones fuertes con otras moléculas, como por ejemplo las interacciones de las enzimas con análogos de sus sustratos o con cofactores. Las moléculas apropiadas, unidas covalentemente a una matriz inerte, actuarán como “anzuelos” para atrapar la proteína deseada. Todas las demás proteínas simplemente pasarán a través de la columna. Las moléculas de proteína inmovilizadas pueden ser eluidas con un tampón que contenga la molécula que interacciona en forma libre o con algún otro reactivo que pueda romper la interacción. En una variante de este método, anticuerpos contra la proteína deseada son unidos a la resina y proporcionan una retención altamente específica.

En este caso, se ha utilizado una columna de afinidad de 0.7 ml de *p*-aminobenzoil-Arg sefarosa 6B.

M.2.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (FPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography) ha sido el método elegido para la separación, purificación semipreparativa y repurificación de la pro-CPB y sus mutantes. La utilización del FPLC en el fraccionamiento cromatográfico permite la purificación en menos tiempo que otros métodos, proporciona un alto rendimiento y permite una recuperación óptima de especies puras y nativas en menos etapas.

El equipo utilizado es un LKB-Pharmacia FPLC System®, compuesto por:

- Bomba peristáltica P-1.
- Dos bombas de alta precisión P-500.
- Controlador de flujo y gradiente LCC-500 plus Liquid Chromatography Controller.
- *Loop* de volumen variable y *superloop* de 50 ml.
- Detector variable LKB 2140 Rapid Spectral Detector.
- Registrador Plotter Hewlett Packard modelo 7475 A.

- Válvulas MV-7 Motor Valve.
- Ordenador Tandon PAC 3865.

Todos los solventes usados en el FPLC han sido preparados con agua destilada desionizada a través de un equipo Milli-Q. Posteriormente han sido filtrados a través de membranas de 0,22 μm (Sartorius) y desgasificados con trompa de vacío durante 10 min.

La elución de las proteínas se sigue por absorción a 280 nm.

Para el FPLC se han utilizado columnas de intercambio aniónico.

M.2.2.2.1. Columnas de intercambio aniónico

El fraccionamiento cromatográfico en el FPLC se ha llevado a cabo con columnas de intercambio aniónico. La columna utilizada a nivel preparativo fue una TSK-DEAE 5 PW Ultrapac de LKB con un diámetro de partícula de 10 μm , un poro de 0,1 μm y unas dimensiones de 21,5 x 150 mm, protegida con una precolumna del mismo material. Para las repurificaciones se ha utilizado una columna analítica de las mismas características, pero de una medida de 7,5 x 75 mm.

La muestra, dializada frente al solvente de equilibrado de la columna, se centrifuga a 10000 x g durante 10 min a 4°C y se filtra con una membrana de 0,22 μm de poro de baja absorción de proteínas (Millex-GV-Millipore) antes de ser inyectada en estas columnas. Se comprueba también que la conductividad de la muestra sea igual o inferior a las condiciones de equilibrado de la columna. El pH de la muestra ha de tener un valor similar al de los solventes de la cromatografía.

M.2.2.3. Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

En el presente trabajo, la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) se ha utilizado como método analítico para separar e identificar las diferentes especies generadas durante el proceso de activación de la PCPB y sus mutantes.

El equipo de cromatografía líquida de alta presión utilizado es de Waters, Assoc. y consta de las partes siguientes:

- 2487 Dual Absorbance Detector
- 2690 Separations Module
- Ordenador Compaq y software Millennium32

Para el presente trabajo en el HPLC se han utilizado columnas de fase reversa.

M.2.2.3.1. Columnas de fase reversa

El material de empaquetamiento de la fase reversa suele estar formado por un soporte de sílice de medida de poro de aproximadamente 100 Å, que lleva unidas covalentemente cadenas hidrocarbonadas de entre 4 y 18 átomos de carbono. Variaciones en la medida del poro, de la partícula y en la densidad y longitud de las cadenas hidrocarbonadas determinarán diferentes especificidades o aplicaciones.

Para seguir la evolución en el tiempo de los diferentes fragmentos peptídicos generados durante la activación tróptica de la PCPB, así como para la purificación de los mismos, se utilizó una columna Vydac C-4 con un diámetro de partícula de 5 µm, poro de 300 Å y un tamaño de 25 x 0,54 cm protegida con una precolumna del mismo material.

Para el análisis de los diferentes aminoácidos liberados a lo largo de la activación de la pro-CPB hemos utilizado una columna Novapack C-18.

Las muestras a inyectar han de estar completamente limpias y disueltas en el solvente en que se equilibra la columna. Con tal de evitar que material insoluble precipite dentro de la columna, se centrifuga a 10000 x g durante 10 min antes de su aplicación. La elución de las proteínas y péptidos se sigue por absorción a 214 y 280 nm.

M.2.3. Métodos espectroscópicos

Las técnicas espectroscópicas han sido una herramienta muy utilizada en el presente trabajo para el control de la presencia, la actividad y la identidad de las proteínas y péptidos estudiados.

M.2.3.1. Determinación de la concentración de proteínas: espectro de absorción en ultravioleta

La concentración de proteína se determinó generalmente con el espectro de absorbancia en el ultravioleta a partir del valor de absorbancia a 280 nm. Sabiendo el coeficiente de extinción molar de la proteína a 280 nm ($\epsilon_{280}^{0,1\%}$) podemos calcular a qué concentración se encuentra una disolución según la ley de Lambert-Beer:

$$C = OD_{280} / \epsilon_{280}^{0,1\%}$$

Coefficientes de absorción ($\epsilon_{280}^{0,1\%}$) de la PCPB, enzima activo y segmento de activación:

PCPB	$1,58 \pm 0,05$
CPB	$2,0 \pm 0,09$
Sa B	$0,93 \pm 0,03$

M.2.3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para la cuantificación de proteínas en disolución, se ha utilizado el método colorimétrico de Bradford (Bradford *et al.*, 1976). Se basa en la interacción del reactivo de Bradford, que contiene azul de Coomassie, con el enlace peptídico de las proteínas. El protocolo se ha modificado y adaptado a placas de ELISA (Costar Corp., EEUU):

- 1.- En una fila de pocillos de una placa de ELISA se pone 40 μ l de una proteína patrón (seroalbúmina bovina) en diluciones crecientes de 0 a 0,1 μ g/ μ l.
- 2.- En las otras filas se coloca 40 μ l de diversas diluciones de las muestras proteicas a cuantificar.
- 3.- Se añade a cada pocillo 160 μ l de reactivo de Bradford (Bio Rad) diluido previamente 4 veces con agua destilada.
- 4.- Se lee la absorbancia a 600 nm con un lector de placas de ELISA, entre 15 y 60 min después de iniciar la reacción.

5.- Se calculan los valores de las proteínas problema en la curva realizada con la proteína patrón.

M.2.3.3. Determinación espectroscópica de actividades enzimáticas

M.2.3.3.1. Activación de las fracciones y medida de las actividades enzimáticas

En el caso de los proenzimas, es necesaria la activación de las fracciones cromatográficas para determinar las correspondientes actividades enzimáticas y escoger las adecuadas para continuar el proceso de purificación. Para la detección de actividad carboxipeptidásica, se tratan 100 µl de cada fracción durante 30 min a temperatura ambiente con 5 µl de tripsina porcina (Sigma) disuelta a 30 mg/ml en un tampón que inhibe su autólisis (HCl 1,13 mM, CaCl₂ 1mM).

Para el estudio del proceso de activación de la PCPB se utiliza tripsina Worthington tratada con TPCK (para inhibir las posibles trazas de quimotripsina contaminante) y unas condiciones suaves: relación zimógeno:proteasa activante 400:1 a 0 °C.

M.2.3.3.2. Medida de la actividad carboxipeptidasa B

Sustrato:

N-benzoil-glicil-L-arginina (BGA)

Descrito por Folk *et al.* (1960).

Condiciones:

Concentración de sustrato: 1 mM.

Tampón: Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,1 M (pH 7,5)

Longitud de onda: 254 nm (se sigue el aumento)

Cantidad de enzima detectable: 0,5 a 5 µg.

M.2.3.3.3. Medida de la actividad tripsina

Sustrato:

N-benzoil-L-Arg-etiléster (BAEE)

Descrito por Schwert y Takenaka (1955), modificado.

Condiciones:

Concentración de sustrato: 0,25 mM

Tampón: HNa₂PO₄ 67 mM (pH=7,6)

Longitud de onda: 253 nm (se sigue el aumento).

Cantidad de enzima detectable: 0,1 – 1 µg.

Normalmente, se añaden entre 1 y 20 µl de muestra a 1 ml de disolución de sustrato y las medidas se realizan durante 2 min en un espectrofotómetro HP 8452A *diode array* o un Cary 100 Bio controlando la temperatura a 25 °C. La actividad enzimática se deduce a partir de la pendiente del registro de absorbancia de la disolución enzima-sustrato a lo largo del tiempo, y se expresa como la cantidad de sustrato consumido (o de producto formado) por unidad de tiempo. La forma más exacta de expresar esta actividad es refiriéndola a la proteína de la muestra. Esta expresión se denomina *actividad específica (Ae)*.

$$Ae = \frac{\text{µmoles de sustrato}}{\text{mg de proteína x min}}$$

Para poder estandarizar los ensayos, se realiza una *hidrólisis total del sustrato (Ath)*, con exceso de enzima, para ver el incremento absoluto en densidad óptica de una disolución de sustrato a concentración 1 mM. El valor obtenido ha de ser igual o próximo al teórico, que para el benzoil-glicil-L-arginina (BGA) es de 0,36.

$$Ae = \frac{A / \text{min x ml sustrato}}{Aht \text{ x mg enzima}}$$

Todas las medidas se realizan con 1 ml de sustrato 1mM y cubetas de 1 cm, así que la expresión anterior queda de la siguiente manera:

$$Ae = \frac{A / \text{min}}{Aht \times \text{mg enzima}}$$

El seguimiento de actividad de los perfiles cromatográficos se expresa en UDO/min ml disolución de proteína, mientras que en el estudio del proceso de activación se expresa como $\mu\text{moles S} / \text{mg (pro)enzima min}$. Para la determinación de actividades enzimáticas, se han usado sustratos peptídicos sintéticos de Sigma. Todos los ensayos se realizan con 1 ml de disolución de sustrato y en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

M.2.3.3.4. Medida de la actividad de carboxipeptidasas reguladoras

La base del ensayo de actividad de las carboxipeptidasas reguladoras está en el cambio de actividad que se produce cuando la arginina terminal es escindida del sustrato soluble en agua, generando un producto altamente soluble en cloroformo (Fricker y Snyder, 1982). Después de incubar enzima y sustrato a 37 °C durante unos minutos, la reacción es acidificada (para maximizar la separación de sustrato y producto). A continuación, se añade el cloroformo, se mezcla con el vórtex y se centrifuga brevemente. El producto se detecta insertando el tubo de ensayo en un fluorímetro, donde sólo la fase de cloroformo es atravesada por el haz de luz. Este ensayo es además cuantitativo ya que 2 unidades de fluorescencia corresponden a 1 nmol de producto.

Los sustratos se habían sintetizado anteriormente en el laboratorio activando un aminoácido dansilado (Sigma) con diciclohexilcarbodiimida y N-hidroxisuccinimida (Aldrich) y luego acoplado el producto de esta reacción a un dipéptido (Bachem) para la síntesis de tripéptidos o a Arg (Sigma) para la síntesis de dansil-Leu-Arg. La mezcla de reacción se diluye con HCl 10 mM, se lava con cloroformo y se purifica con una columna Sep-Pak C18 (Waters), usando acetonitrilo 10-20 % para eluir el tripéptido

dansilado. La pureza fue determinada por cromatografía en capa fina de los péptidos (Fricker y Snyder, 1983).

M.2.3.4. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) permite determinar en pocos minutos la masa molecular relativa de cualquier péptido o proteína pequeña con un error menor al 0,1%. En este trabajo se ha utilizado un sistema MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) (Hillenkamp *et al.*, 1991) model Bruker Biflex (Alemania). El sistema MALDI se caracteriza por la formación de una especie protonada gracias a que la matriz cede un protón al ser impactado por el láser, generándose un número de estados de ionización menor que en otros sistemas, y por lo tanto, espectros más fáciles de analizar.

Para moléculas de menos de 3 kDa se acumularon de 1 a 5 disparos por espectro, usando el reflector y una atenuación de la potencia del láser (20 kV) alrededor del 70%. Para moléculas más grandes se acumularon de 10 a 40 disparos por espectro, realizados en modo lineal y con una atenuación del láser alrededor del 40%. Para el análisis de la masa de los segmentos de activación cortos se utilizó como matriz el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico y para los segmentos de activación largos, enzimas y proenzimas, el ácido sinapínico. En ambos casos, la proteína o directamente la mezcla de activación se diluyó al 50% con la matriz y se aplicó sobre el soporte de muestras del aparato. En cada experimento se incluyó una proteína de masa molecular conocida para calibrar el aparato, y patrones internos donde fue necesario.

M.2.4. Secuenciación N-terminal de proteínas

La determinación de la secuencia N-terminal de proteínas se ha llevado a cabo en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Fundamental de la Universitat Autònoma de Barcelona. El equipo de secuenciación utilizado es un Beckman modelo LF 3000 Protein Sequencer (EEUU).

M.2.5. Procedimientos generales

M.2.5.1. Diálisis

La diálisis es el procedimiento utilizado para desalar y cambiar la composición de los tampones de las disoluciones. Los sacos de diálisis utilizados son de la casa Medicell International LTD (Gran Bretaña) de medida de exclusión de 12 kDa.

M.2.5.2. Mini-diálisis

Para volúmenes pequeños se ha utilizado la técnica de *drop dialysis* descrita por Görisch (1988), en que se utilizan las membranas serie VS de 0,025 μm y 25 mm de diámetro.

M.2.6. Técnicas de detección inmunológica: inmunotransferencia

Esta técnica, también denominada Western Blotting, fue descrita por primera vez por Towbin *et al.* (1979) y Renart *et al.* (1979), y combina la especificidad de los anticuerpos con la resolución de las técnicas electroforéticas. Las proteínas cargadas en un gel de electroforesis son transferidas a una membrana de material sintético cuando se aplica un campo eléctrico perpendicular a ambos. Posteriormente se hace una detección específica utilizando anticuerpos. El protocolo se describe a continuación:

Transferencia:

- 1.- Se realiza la electroforesis (SDS-PAGE, tricina) en las condiciones adecuadas para separar las proteínas.

- 2.- La membrana utilizada para la transferencia (Selex 20 polypropylen de la casa Schleicher & Schuell), se ha de manipular siempre con guantes. Cortamos la membrana a la misma medida que el gel y la pretratamos durante 5 min con metanol. Luego se lava durante 5 – 10 min con agua milli-Q.
- 3.- Todos los componentes del sistema (papel Whatman 3M, esponjas, el gel y la membrana pretratada) son incubados en el tampón de transferencia durante 20 min.

Tampón de transferencia

Glicina 39 mM

Tris 48 mM

SDS 0,04%

Metanol 20%

Se ajusta el pH a 9,0.

- 4.- Se monta el sistema de transferencia según el siguiente orden a partir del polo negativo (parte de color negro del sistema):

Esponja

Papel Whatman

Gel de poliacrilamida

Membrana

Papel Whatman

Esponja

Es necesario hacer rodar una varilla de vidrio sobre el sistema para eliminar las burbujas de aire.

- 5.- Dentro de la cubeta del Mini-trans-blot de Bio Rad se coloca el sistema de transferencia, el bloque de hielo refrigerante y una barra agitadora magnética. Se llena de tampón, que ha de estar en agitación durante todo el proceso.
- 6.- El aparato se conecta a una fuente de electroforesis a amperaje constante 250 mA durante el tiempo necesario para la transferencia.
- 7.- Se separa el gel de la membrana y se comprueba la efectividad del proceso tiñendo el gel con azul de Coomassie.

Detección inmunológica o revelado específico con anticuerpos:

- 1.- Se lava la membrana durante 10 min con tampón TBS.

Tampón TBS (para 1 litro):

Na Cl 8 g

M.3.1.1. Obtención del medio extracelular

Se parte de 100 ml del medio de cultivo de la levadura *P. pastoris* con la construcción génica correspondiente y se procede como se indica:

- 1.- Se precipitan las células por centrifugación a 1500 – 3000 x g durante 5 min a temperatura ambiente.
- 2.- Una vez recogido el sobrenadante, se mide el volumen e inmediatamente se añade sulfato amónico hasta el 30% de saturación.
- 3.- Se centrifuga a 20000 x g durante 20 min a 4 °C, se recoge el sobrenadante y se inicia el primer paso de purificación.

M.3.1.2. Primer fraccionamiento cromatográfico

El primer paso de purificación consiste en una cromatografía atmosférica de interacción hidrofóbica. La resina Butyl-650M Toyopearl (Toso-Hass) se equilibra con el tampón de alta fuerza iónica (tampón A) y se empaqueta por gravedad en una columna de medidas 2 x 23 cm. Se ajusta el flujo y se asegura que el pH y la fuerza iónica sean correctas. Una vez entrada la muestra, se lava con tampón A hasta que la absorción del eluido está por debajo de 0,2 UDO a 280 nm. Seguidamente, se aplica un gradiente lineal entre el tampón de alta y baja fuerza iónica (75 ml de cada uno). Los tampones utilizados son:

Tampón A: Tris-acético 20 mM, sulfato amónico al 30% de saturación (pH 8,0)

Tampón B: Tris-acético 20 mM (pH 8,0)

Se controla la absorbancia de las fracciones eluidas a 280 y 320 nm y se decide cuáles de las fracciones hay que activar con tripsina para obtener un perfil de actividades. Paralelamente, se mide la fuerza iónica de las fracciones para comprobar la linealidad del gradiente.

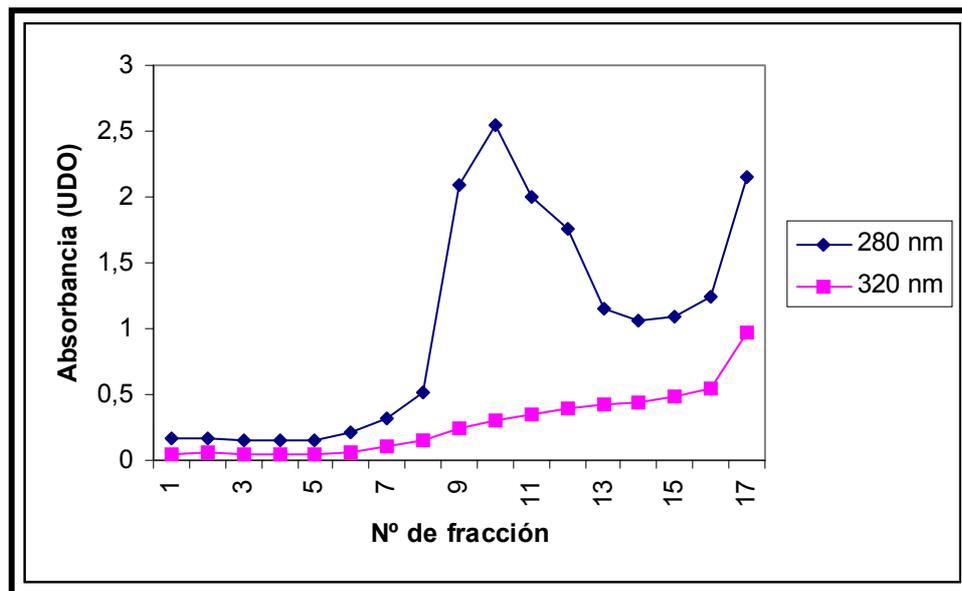


Figura M.2. Ejemplo de seguimiento espectrofotométrico de una cromatografía de interacción hidrofóbica. La proteína purificada en este caso era la pro-CPB silvestre. Las fracciones 10, 11, 12 y 13 se eligieron para su repurificación, mientras que las demás se descartaron.

M.3.1.3. Repurificación de la PCPB y sus mutantes

Se utiliza una columna preparativa TSK-DEAE de 2,15 x 15,0 cm a un flujo de 4 ml/min. Los tampones utilizados son:

Tampón A: Tris-acético 20 mM (pH 8,0)

Tampón B: Tris-acético 20 mM, acetato amónico 0,8 M (pH 8,0)

Después de la primera cromatografía, tanto la fuerza iónica como el pH de las fracciones a recromatografiar se ajustan por diálisis frente al solvente A. Además, se filtran con una membrana de 0,22 μm de diámetro de poro antes de su aplicación, para evitar la precipitación de material insoluble en la entrada de la columna.

A continuación se muestra el gradiente utilizado en la repurificación de la PCPB y sus mutantes mediante FPLC en la columna preparativa TSK-DEAE anteriormente mencionada:

Tiempo (min)	% A	%B
0	100	0
10	100	0
20	80	20
100	30	70
101	0	100
111	0	100

La elución de las proteínas se sigue habitualmente por absorbancia a 280 nm; se recogen fracciones de 2 ml y se caracterizan tanto por análisis electroforética como enzimática. Luego son precipitadas al 43% de sulfato amónico (Merck) y guardadas a 4 °C hasta su uso. Así las procarboxipeptidasas se mantienen durante más de seis meses sin liberación espontánea de actividad y sin pérdida de activabilidad.

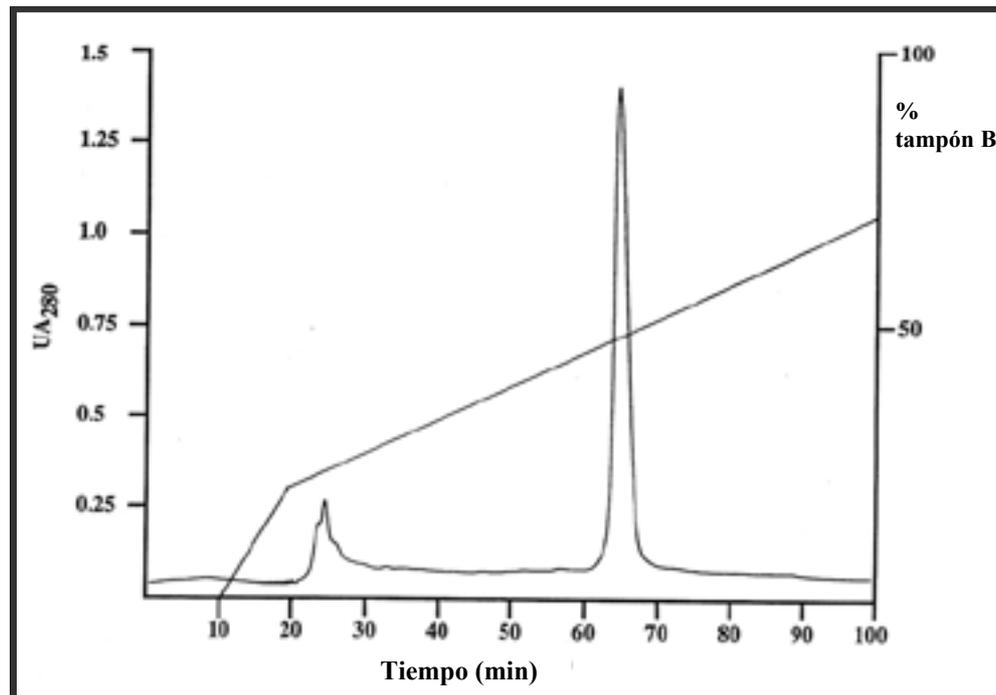


Figura M.3. Ejemplo de seguimiento espectrofotométrico de una cromatografía de intercambio iónico. Se trata de la repurificación de pro-CPB silvestre usando un FPLC. En la gráfica también se representa el gradiente de sal aplicado en la cromatografía.

M.3.1.4. Seguimiento y análisis electroforéticos

Para analizar los procesos de purificación y el grado de pureza de las fracciones de PCPs eluidas cromatográficamente, se utiliza la electroforesis discontinua en presencia de SDS (Laemmli) descrita en el apartado M.2.1.1. A una alícuota de cada muestra se añade la cantidad correspondiente de tampón de aplicación. Se calienta 2–3 min a 100 °C y las muestras se conservan a –20 °C hasta el momento de la electroforesis. Una vez acabada la electroforesis, el método de tinción usado habitualmente es el azul de Coomassie (M.2.1.4).

M.3.2. Estudio del proceso de activación trípica de los mutantes de la PCPB porcina

Las procarboxipeptidasas pancreáticas liberan, por acción trípica, carboxipeptidasa activa y un segmento de activación que sufre posterior proteólisis. En nuestro grupo se había hecho una primera caracterización de este proceso en el sistema de la PCPB (Burgos *et al.*, 1989, 1991) y un estudio posterior más completo (Villegas *et al.*, 1995). En este último estudio se utilizaron condiciones de activación extremadamente suaves: 0 °C y relación PCPB:tripsina de 400:1 y se añadieron diferentes inhibidores de carboxipeptidasas a la PCPB antes de activar con tripsina, con el propósito de ralentizar el proceso de proteólisis C-terminal del segmento de activación. Más recientemente se ha hecho un estudio de diferentes mutantes de la PCPB (Ventura *et al.*, 1999) para comprobar las hipótesis postuladas en trabajos anteriores y esclarecer el posible papel inhibitor del segmento. En este trabajo se han añadido nuevos mutantes de la PCPB para completar el estudio del proceso de activación de este proenzima.

Se han realizado los siguientes experimentos:

1. Medida de la actividad carboxipeptidasa B (CPB) a lo largo del tiempo.
2. Seguimiento de la aparición y evolución de diferentes especies moleculares mediante geles de tricina.
3. Seguimiento de la aparición y evolución de diferentes especies moleculares mediante Western blotting.
4. Estudio de unión del segmento de activación primario a la CPB por electroforesis de TBE/urea.
5. Seguimiento de la aparición y evolución de diferentes especies moleculares por cromatografía líquida de alta resolución en columnas de fase reversa (RP-HPLC).
6. Seguimiento de la aparición y evolución de diferentes especies moleculares por espectrometría de masas en un sistema Bruker Biflex.

7. Purificación de los segmentos de activación mediante RP-HPLC para la determinación de sus pesos moleculares mediante espectrometría de masas.

El procedimiento utilizado en todas las activaciones fue el siguiente:

La procarboxipeptidasa B (PCPB) precipitada en sulfato amónico se centrifuga a 7000 x g durante 30 min a 4 °C, se resuspende en tampón Tris-HCl 50 mM, ZnCl₂ 10µM pH 7,5 a una concentración superior a 1 mg/ml. Se dializa frente al mismo tampón durante toda la noche a 4 °C. A continuación, se calcula la concentración de proteína y se ajusta a 1 mg/ml. Se añade ZnCl₂ al tampón de activación dado que la CPB presenta un átomo de Zn²⁺ en el centro activo.

Se utiliza tripsina bovina doblemente cristalizada y tratada con TPCK (Worthington), con una relación de PCPB:tripsina de 400:1 (p:p), a 0 °C. Se van tomando muestras a diferentes tiempos. Antes de iniciar la activación, hay que atemperar tanto la PCPB como la tripsina a 0 °C.

M.3.2.1. Seguimiento de la aparición de actividad CPB

A diferentes tiempos de activación, y considerando tiempo 0 la adición de tripsina a la muestra de PCPB, se extraen 5 µl de la mezcla de activación, que se añaden sobre 95 µl de inhibidor de tripsina de páncreas bovino (BPTI) a 0,1 mg/ml disuelto en el mismo tampón que el sustrato. Para la medida de actividad CPB se utilizan 10-20 µl de la mezcla. Paralelamente, se extraen muestras para electroforesis y HPLC.

La dilución en presencia de BPTI permite la extracción de alícuotas próximas en el tiempo sin tener que medir sus actividades simultáneamente, dado que la activación triptica se para totalmente (Burgos, 1989). Esto permite estudiar los rápidos acontecimientos en los primeros momentos de la activación.

M.3.2.2. Seguimiento electroforético

Una alícuota de cada muestra se añade a una disolución de TLCK (inhibidor irreversible de tripsina) hasta alcanzar una concentración final de inhibidor de 2 mM. Seguidamente se mezcla con un vórtex y se añade el tampón de aplicación electroforético, calentando inmediatamente a 100 °C durante 1 min. Las muestras se guardan a -20 °C hasta el momento de su análisis por electroforesis con geles de tricina.

M.3.2.3. Seguimiento por RP-HPLC

Se toman alícuotas de 120 µl, que se añaden a una solución de ácido trifluoroacético (TFA) hasta una concentración final de 0,5% del ácido. El pH de esta disolución es inferior a 2,0, asegurando así la inhibición de la tripsina. Las muestras se almacenan a -20 °C hasta el momento de su análisis.

Las condiciones escogidas para analizar los péptidos liberados durante el proceso de activación se indican en la tabla T.M1.

Se utilizaron los siguientes solventes:

Solvente A: H₂O, TFA 0,10%

Solvente B: Acetonitrilo TFA 0,09%

Flujo: 0,5 ml/min.

Tabla T.M.1. Gradiente utilizado en columna Vydac C-4 con un diámetro de partícula de 5 µm, poro de 300 Å y un tamaño de 25 x 0,54 cm. Detección a 214 nm.

Tiempo (min)	%A	%B
0	90	10
10	90	10
130	46	54
131	0	100
141	0	100

M.3.2.4. Seguimiento del proceso de activación por espectrometría de masas

Se toman alícuotas de la correspondiente activación a diferentes tiempos y se para la reacción con TFA a concentración final 0,5%. Con esto se inactivan las proteasas presentes. Las muestras se diluyen al 50% con la matriz: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico para visualizar los fragmentos de activación cortos y ácido sinapínico para los segmentos de activación largos, enzimas y proenzimas. En el caso de enzimas y proenzimas, la sensibilidad mejora si se hace un lavado con TFA al 1% después de haber depositado la muestra en el soporte.