

## **MATERIAL I MÈTODES**

## **PRÒLEG**

Aquesta part de la tesi pretén recollir exhaustivament els protocols i procediments generals seguits en les diferents parts d'aquest treball. Els dos capítols de resultats i discussió que es presenten més endavant inclouen apartats de materials i mètodes propis que indiquen els procediments específics seguits, cosa que pot produir certa redundància amb la informació continguda en aquest apartat general de Material i Mètodes.

## **M.1.- APARELLS I PRODUCTES QUÍMICS**

### **M.1.1.- APARELLS**

Agitador rotatiu de gels Biotron (Espanya).

Agitador vòrtex Heidolph, model Reax 2000 (Alemanya).

Agitadors magnètics SBS, model A-03.

Autoclaus Autester-E i Autester 437-P de JP Selecta (Espanya).

Balances Mettler AJ100, PJ300 i H64 (Alemanya).

Bany termostàtic JP Selecta, model Tectron Bio-Medic 60 (Espanya).

Cabina de flux laminar Faster, model TWO-30 (Itàlia).

Centrífugues Beckman models J2-HS i J2-21 (EE.UU.) amb rotors JA20 i JA14.

Concentrador Speed Vac, refrigerador i bomba VP100 Savant (EE.UU.).

Congelador -80°C Forma Scientific, model 8325 (EE.UU.).

Cubeta de transferència Bio Rad, model Mini Trans-Blot (EE.UU.).

Cubetes d'electroforesi per a gels d'acrilamida Bio Rad, model Mini-Protean II (EE.UU.).

Cubetes d'electroforesi per gels d'agarosa Miniphor Submarine Electrophoresis Unit LKB, model 2013 (Suècia) i cubeta Pharmacia, model GNA-100 (Suècia).

Equip de seqüenciació Beckman, model LF 3000 Protein Sequencer (EE.UU.).

Equip de seqüenciació de DNA ALF, Pharmacia (Suècia).

Espectrofotòmetre UV-Vis Cary100 Bio, Varian (EE.UU.).

Espectròmetre de masses Bruker Biflex TOF (Alemanya).

Estufa incubadora de cultius Sanyo, model Mir-152 (Japó).

Font d'alimentació per a electroforesi Hoefer Scientific Inst., model PS500XT (EE.UU.).

FPLC System de Pharmacia (Suècia).

HPLC de Waters Assoc., 2690 Separations Module, 2487 Dual Absorbance Detector i Software Millennium32 (EE.UU.).

Incubador d'aire amb agitació orbital Braun, model Certomat S (Alemanya) i incubador Infors AG CH-4103 (Suïssa).

Microcentrífuga IEC, model Micro Max (EE.UU.) i microcentrífugues refrigerades Sigma, models 2MK i 2K15 (Alemanya).

pHmetre Crison Instruments S.A., model Micro pH 2001 (Espanya) amb un elèctrode Ingold (Suïssa).

Transil·luminador de llum ultraviolada Fotodyne Inc. (EE.UU.).

## M.1.2.- PRODUCTES QUÍMICS

Els productes químics d'ús general utilitzats han estat de grau analític de les firmes Merck (Alemanya) i Sigma Chemical Co. (EE.UU.). La procedència dels productes d'ús més específic s'indicarà a mesura que apareguin en el text.

## M.2.- MÈTODES DE BIOLOGIA MOLECULAR

### M.2.1.- MATERIAL BIOLÒGIC I MEDIS DE CULTIU

#### M.2.1.1.- Soques i vectors

Soca *E.coli* MC1061 (Casadaban *et al.*, 1980)

Genotip: *hsd* R2, *hsd* M<sup>+</sup>, *hsd* S<sup>+</sup>, *ara* D139,  $\Delta(\textit{ara-leu})$  7-697,  $\Delta(\textit{lac})$ X47, *gal* E15, *gal* K16, *rpsL* (Str<sup>r</sup>) *Mcr* A, *Mcr* B1.

S'ha utilitzat com a hoste de vectors plasmídics.

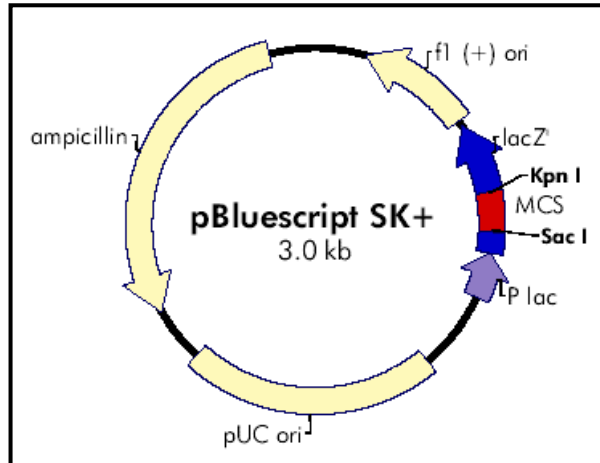
Soca *Pichia pastoris* KM71 (Cregg *et al.*, 1993)

Genotip: *arg4 his4 aox1::ARG4*; fenotip: Mut<sup>S</sup> Arg<sup>+</sup>.

*P. pastoris* és un llevat metil·lotròfic. La soca KM71 és incapaç de créixer en absència d'histidina, ja que té una mutació en el gen de la histidinol deshidrogenasa, essencial per a la síntesi d'histidina. Per altra part, el gen de l'alcohol oxidasa (*AOX1*) presenta una disrupció, de manera que aquesta soca es caracteritza per créixer lentament en presència de metanol, d'aquí que s'anomeni Mut<sup>S</sup> (**m**ethanol **u**tilization **s**low).

Vector pBluescript SK+

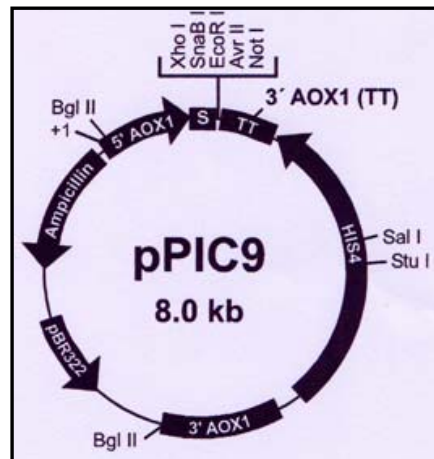
La seva mida és aproximadament de 3 kb. És un derivat de pUC, que incorpora un policonnector més complet i els promotors derivats dels bacteriòfags T3 i T7 (Figura M.1). S'ha utilitzat com a pas intermig en el clonatge de les PCPs humanes per a la seva seqüenciació.



**Figura M.1.- Esquema del vector pBluescript SK+. Extret del catàleg d' Invitrogen.**

Vector pPIC9

Vector d'expressió de *P. pastoris* (Figura M.2). Aquest és un vector llançadora que es pot usar tant en *P. pastoris* com en *E. coli*, ja que part d'ell deriva del plasmidi pBR322. Aquest vector posseeix el promotor del gen *AOX1* i el gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*), usat per seleccionar els clons positius. Es tracta d'un vector de secreció, ja que posseeix el pèptid senyal de l' $\alpha$ -mating factor de *S. cerevisiae* que dirigeix les proteïnes al medi extracel·lular (Zsebo *et al.*, 1986).



**Figura M.2.- Esquema del vector pPIC9. S indica el pèptid senyal de l' $\alpha$ -mating factor de *S. cerevisiae*. Extret del manual d'expressió en *P. pastoris* d' Invitrogen.**

### **M.2.1.2.- Medis de cultiu**

Com a medi ric pel creixement de soques d' *E.coli* s'ha utilitzat medi LB:

#### **Medi LB (Luria-Bertani)**

Per a 1 litre:

10 g triptona

5 g extracte de llevat

10 g NaCl

pH ajustat a 7,0 amb NaOH. Esterilització per autoclau.

Pel creixement de *P. pastoris* s'han usat els medis que es descriuen a continuació, els quals es troben descrits en el manual de mètodes del kit d'expressió en *Pichia* d'Invitrogen. Tots els medis s'esterilitzen amb autoclau durant 20 min. La biotina, els aminoàcids i el *Yeast Nitrogen Base* s'esterilitzen per filtració i s'afegeixen després d'autoclavar; els medis que contenen alguns d'aquests components s'han de conservar a 4°C.

#### **Medi YPD o YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*)**

Medi ric per al creixement de llevat; per a 1 litre :

10 g extracte de llevat

20 g peptona

10 g dextrosa

#### **Medi MD (*Minimal Dextrose Medium*)**

Medi mínim, sense aminoàcids, per créixer llevat; per a 1 litre:

13,4 g *yeast-nitrogen-base*

0,4 mg biotina

20 g dextrosa

#### **Medi BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*)**

Medi tamponat ric amb glicerol; per a 1 litre:

100 mL tampó fosfat potàssic 1M (pH 6.0)

13,4 g *yeast nitrogen base*

0,4 mg biotina

10 mL glicerol

10 g extracte de llevat

20 g peptona

### **Medi BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*)**

Medi tamponat ric amb metanol 1%; per 1 litre:

- 100 mL tampó fosfat potàssic 1M (pH 6.0)
- 13,4 g *yeast-nitrogen-base*
- 0,4 mg biotina
- 10 mL metanol
- 10 g extracte de llevat
- 20 g peptona

Pel creixement d'un cultiu bacterià líquid inoculem 10 µL de cultiu de nit sobre 10 mL de LB estèril amb ampicil·lina (50 µg/mL). També es pot inocular a partir de colònia o de glicerinat. El creixement d'*E.coli* es fa a 37°C, mentre que el de *P. pastoris* és a 30°C.

Les plaques es poden mantenir a curt plaç (1-2 mesos) a 4°C. Per guardar les soques a llarg termini s'afegeix glicerol a un cultiu crescut fins a un 15 % del volum final i es congela immediatament a -80°C.

### **M.2.2.- "POLIMERASE CHAIN REACTION" (PCR)**

La tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) ha estat una eina fonamental per a la biologia molecular en els últims anys. És un sistema ràpid i senzill per amplificar DNA *in vitro*. En aquest treball hem emprat la tècnica de PCR per introduir unes dianes de restricció adequades als extrems dels cDNAs de la PCPA1 i PCPB humanes i per realitzar mutagènesi dirigida sobre la PCPB humana. Quan es realitza una reacció de PCR, sempre és necessari seqüenciar les construccions per comprovar que la polimerasa no ha introduït cap error a l'amplificar la seqüència.

En el disseny dels encebadors cal tenir en compte els següents punts:

- 1.- La temperatura de fusió ( $T_m$ ) de l'extrem 3' de l'encebador ha de ser prou alta com per permetre una bona hibridació amb el DNA motlle. La  $T_m$  es pot calcular mitjançant la següent fórmula:  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  on A, T, C i G indiquen, respectivament, el nombre d'adenines, timines, citosines i guanines en la regió de solapament. Es considera com a prou bona una  $T_m$  més gran o igual a 50°C.
- 2.- S'ha de comprovar que les seqüències oligomèriques no són potencialment capaces de formar estructures secundàries ni són complementàries a altres encebadors de la mateixa reacció.
- 3.- La temperatura de fusió ( $T_m$ ) dels dos encebadors ha de ser semblant. Una manera aproximada de calcular la temperatura d'hibridació òptima és restar 5°C a la  $T_m$  dels encebadors.

Els encebadors emprats en aquest treball han estat sintetitzats per la casa Pharmacia Biotech.

### M.2.2.1.- Introducció de dianes de restricció

Els cDNAs de les procarboxipeptidases pancreàtiques humanes han estat aïllats a partir d'una genoteca construïda en el vector  $\lambda$ gt11 (Catasús, 1995). Usant com a motlles aquests cDNAs clonats en pUC9 i amb la tècnica de PCR s'han introduït als extrems de les seqüències les dianes de tall dels enzims de restricció *XhoI* i *EcoRI* per tal de poder clonar-les en el vector d'expressió de *Pichia Pastoris* pPIC9.

Els encebadors dissenyats per a la PCPA1 són:

- Encebador 5': GTATCT**CTCGAG**AAAAGAAAGGAGGACTTTGTGGGG  
*XhoI*
- Encebador 3': CAT**GAATTC**TTTGGTTGCCTGGATGGG  
*EcoRI*

i per a la PCPB:

- Encebador 5': GTATCT**CTCGAG**AAAAGACATCATGGTGGTGAGCAC  
*XhoI*
- Encebador 3': CAT**GAATTC**TGAAACAAGGCCATCAGC  
*EcoRI*

on els sis nucleòtids marcats en cursiva en els encebadors 5' corresponen a la diana de tall del pèptid senyal de l' $\alpha$ -mating factor.

La barreja de reacció que es va usar per fer les amplificacions ha estat:

- 10  $\mu$ L encebador 5' a concentració 2,5  $\mu$ M
- 10  $\mu$ L encebador 3' a concentració 2,5  $\mu$ M
- 5  $\mu$ L DNA motlle (pUC9-PCP)
- 10  $\mu$ L dNTPs a concentració 1mM (Pharmacia Biotech)
- 0,3  $\mu$ L Vent polimerasa (New England Biolabs)
- 1  $\mu$ L MgSO<sub>4</sub>
- 5  $\mu$ L tampó de la polimerasa x10
- 8,7  $\mu$ L aigua

i el programa emprat per a la amplificació ha estat el següent:



cicle 1(x1):	2 min	94°C
cicle 2(x25):	30 s	94°C
	1 min	60°C
	1 min	72°C
cicle 3(x1):	5 min	72°C

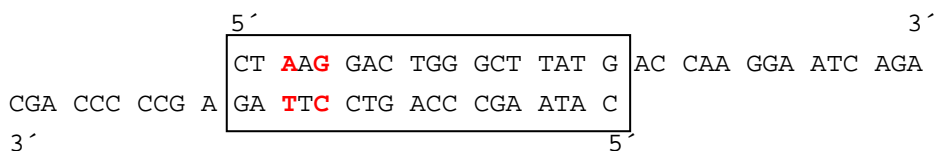
### M.2.2.2.- Mutagènesi mitjançant el mètode d'extensió per solapament

Entre d'altres utilitats, la PCR permet fer mutagènesi dirigida sobre seqüències de DNA. En aquest treball, s'ha utilitzat aquesta tècnica en un cas concret de mutagènesi sobre la PCPB humana utilitzant l'estratègia anomenada extensió per solapament (*overlap extension*), la qual permet introduir mutacions a l'interior de la seqüència de DNA. Aquest mètode consisteix en amplificar independentment dos segments solapants d'una seqüència de DNA i després unir-los en una segona reacció.

La mutagènesi s'aconsegueix gràcies a l'ús d'encebadors específicament dissenyats que inclouen en la seva seqüència els canvis desitjats. La unió dels dos fragments es pot produir perquè aquests encebadors tenen complementarietat terminal. Per dissenyar els encebadors, a més de considerar els punts comentats anteriorment, cal tenir en compte que la Taq polimerasa afegeix una A a l'extrem 3' de la nova cadena que sintetitza. Això serà important per a la posterior hibridació dels productes de la primera reacció.

#### 1ª fase de PCR

Com a encebadors dels extrems de la seqüència s'han usat els mateixos que es van fer servir per introduir en la seqüència de la PCPB salvatge les dianes de restricció *XhoI* i *EcoRI* i com a encebadors interns s'han fet servir els que es mostren a continuació:



El requadre conté la caixa de solapament dels dos encebadors, la qual permetrà que els dos productes de reacció obtinguts en la primera fase de PCR hibridin, de manera que la polimerasa podrà acabar de sintetitzar les seqüències en la segona fase de PCR. La mutació desitjada

consisteix en la mutació puntual D255K sobre la PCPB. Es mostren en vermell els nucleòtids alterats.

Es prepara la següent barreja de reacció per obtenir el primer producte de PCR:

10 µL encebador extern 5´ a concentració 2,5 µM  
10 µL encebador intern 3´ a concentració 2,5 µM  
2 µL DNA motlle (pBluescript-PCPBwt)  
10 µL dNTPs a concentració 1mM  
0,5 µL Taq polimerasa (Genecraft)  
2,5 µL MgCl<sub>2</sub>  
5 µL tampó de la polimerasa x10  
10 µL aigua

i per al segon producte de PCR:

10 µL encebador intern 5´ a concentració 2,5 µM  
10 µL encebador extern 3´ a concentració 2,5 µM  
i la resta de components tal i com s´indica en la reacció anterior

El programa usat per fer l´amplificació és:

Cicle 1 (x1)	2 min	94 °C
Cicle 2 (x25)	30 s	94 °C
	1 min	50 °C
	1 min	72 °C
Cicle 3 (x1)	5 min	72 °C

A continuació, es corre en un gel d´agarosa la barreja de la reacció de PCR i es tallen les bandes corresponents als productes desitjats, els quals són purificats segons el procediment indicat a l´apartat M.2.7.2.

## **2ª fase de PCR**

En aquesta reacció, els productes de la fase anterior actuen com a DNA motlle. Es prepara la següent barreja de reacció:

- 10 µL encebador extern 5´ a concentració 2,5 µM
- 10 µL encebador extern 3´ a concentració 2,5 µM
- 4 µL primer producte de la primera PCR
- 4 µL segon producte de la primera PCR
- 10 µL dNTPs a concentració 1mM
- 0,5 µL Taq polimerasa
- 2,5 µL MgCl<sub>2</sub>
- 5 µL tampó de la polimerasa x10
- 4 µL aigua

Per fer l´amplificació s´utilitza el mateix programa que l´usat en la primera fase.

### **M.2.3.- SEQÜENCIACIÓ DE DNA**

La seqüenciació de DNA es va realitzar a través del Servei de Seqüenciació Automàtica del Departament de Microbiologia i Genètica de la UAB (Unitat de Microbiologia) amb un equip ALF de Pharmacia. El mètode de seqüenciació és una variació del mètode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) basat en la seqüenciació cíclica. S´usen encebadors marcats amb un grup fluorescent (ALFexpress), els quals permeten l´elongació del DNA en presència de Taq polimerasa. Es duen a terme separatament quatre reaccions amb cadascun dels quatre ddNTPs.

### **M.2.4.- EXTRACCIÓ DE DNA PLASMÍDIC**

#### **M.2.4.1.- Procediment de la lisi alcalina**

Aquest mètode (Birnboim *et al.*, 1979) degrada tot el DNA cel·lular excepte el circular. Se segueix el protocol següent:

- 1.-S´inocula una colònia de la soca desitjada en 5 mL d´LB fresc amb l´antibiòtic apropiat. S´incuba durant 12 a 15 h amb agitació a 37°C.
- 2.-Es centrifuga 1,5 mL de cultiu a 12.000xg durant 2 min.
- 3.-S´elimina el sobrenedant i s´afegeix 1,5 mL més de cultiu i es torna a centrifugar. Opcionalment es pot tornar a repetir el mateix pas amb 1,5 mL més de cultiu. Al final s´ha de deixar el precipitat de bacteris el més eixut possible.
- 4.-Es resuspèn el precipitat en 100 µL de la dissolució I. Es barreja amb vòrtex. Es deixa a temperatura ambient entre 5 i 7 min.

**Dissolució I de la lisi alcalina:**

Glucosa 50 mM

Tris-HCl 25 mM (pH 8,0)

EDTA 10 mM (pH 8,0)

Opcionalment s'afegeix lisozim a una concentració final de 5 mg/mL.

5.-S'afegeix 200 µL de la dissolució II acabada de preparar. Es barreja per inversió, no amb vòrtex. Es deixa en gel durant 5 min.

**Dissolució II de la lisi alcalina:**

NaOH 0,2 N

SDS 1%

6.-S'afegeix 150 µL de la dissolució III atemperada prèviament en gel. Es barreja amb el vòrtex. Es deixar en gel durant 5 min.

**Dissolució III de la lisi alcalina (per a 100 mL):**

Acetat potàssic 60 mL

Àcid acètic glacial 11,5 mL

Aigua destil·lada Milli-Q 28,5 mL

Aquesta dissolució és 3 M en potassi i 5 M en l'acetat.

7.- Es centrifuga a 12.000xg durant 5 min. Es transfereix el sobrenedant a un tub nou.

8.- Extracció amb fenol/cloroform.

9.- Precipitació del DNA plasmídic amb 2,5 volums d'etanol.

10.- Es resuspén el precipitat de DNA en 10 a 50 µL de TE o aigua estèril.

**M.2.4.2.- Extracció amb kit comercial**

S'ha utilitzat el kit d'extracció plasmídica de la casa comercial Pharmacia Biotech, basat en el mètode de la lisi alcalina. Aquest kit proporciona un bon rendiment i deixa el DNA net i lliure d'RNA.

**M.2.5.- DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE DNA**

**M.2.5.1.- Determinació espectrofotomètrica**

Consisteix en enregistrar l'espectre d'absorbància de la regió de 200 a 360 nm. Una unitat d'absorbància a 260 nm equival aproximadament a 50 µg/mL de DNA de doble cadena i a 40 µg/mL de DNA de cadena senzilla.

La puresa del DNA es pot valorar amb el coeficient  $UDO_{260/280}$ , que ha de ser proper a 1,8. Valors inferiors indiquen contaminació per proteïnes, i valors superiors, contaminació per RNA.

#### **M.2.5.2.- Estimació per electroforesi en gels d'agarosa**

Quan es treballa amb quantitats molt petites de DNA, és millor estimar la seva concentració a partir de la fluorescència emesa per la tinció amb bromur d'etidi, el qual s'intercala entre les bases nitrogenades.

Es realitza una electroforesi en agarosa i es visualitza per il·luminació amb llum ultraviolada. La quantitat de DNA present a la banda de la dissolució problema s'estima per comparació de la seva intensitat amb les bandes corresponents als marcadors.

#### **M.2.6.- DIGESTIONS ENZIMÀTIQUES D'ÀCIDS NUCLEICS**

Les endonucleases de restricció són enzims que tallen per seqüències específiques de DNA. Són les eines bàsiques de la biologia molecular. L'activitat dels enzims de restricció depèn del pH, de la força iònica i de la temperatura de la reacció. Cada enzim té unes condicions òptimes de funcionament.

Normalment, la quantitat de DNA assajada en les digestions oscil·la entre 0,5 i 10 µg i s'afegeixen d'1 a 10 unitats d'enzim per µg de DNA. Cal tenir en compte que la quantitat d'enzim no pot superar mai el 10% del volum total de la reacció, ja que els enzims de restricció vénen en una dissolució de glicerol al 50%, i una concentració de glicerol en el medi de reacció superior al 5% pot fer perdre l'especificitat de reconeixement. La temperatura de reacció varia per a cada enzim. El temps de reacció és de 1-2 h. Si s'utilitzen dos enzims alhora, es pot augmentar el temps fins a 3 o 4 h.

Els enzims de restricció emprats en aquest treball han estat de la casa Roche Molecular Biochemicals.

#### **M.2.7.- SEPARACIÓ DEL DNA MITJANÇANT GELS D'AGAROSA**

##### **M.2.7.1.- Electroforesi de DNA**

L'electroforesi horitzontal en gels d'agarosa s'ha utilitzat com a mètode habitual d'anàlisi del DNA. L'entramat molecular del gel d'agarosa és el principal factor de la separació, d'aquesta manera les molècules de mida més petita avancen més ràpidament a través del gel.

Existeixen diferents tipus d'agarosa i es poden utilitzar a diferents concentracions. Per realitzar aquest treball s'ha utilitzat agarosa tipus I-A de la casa Sigma. La concentració d'agarosa utilitzada varia segons la grandària de les molècules que cal separar:

<u>% Agarosa</u>	<u>Rang de separació (kb)</u>
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
2,0	0,1-2

Com a tampó de recorregut s'utilitza:

**Dissolució TAE 10x (per a 1 litre):**

Tris	48,4 g
Àcid acètic glacial	11,42 mL
EDTA 0,2 M (pH 8,0)	50 mL

a) Preparació del gel:

- 1.- Es pesa la quantitat d'agarosa corresponent i s'introdueix en un erlenmeier. Per a un minigel s'afegeix 50 mL de tampó d'electroforesi (TAE o TBE) i per a un gel gran s'afegeix 200 mL.
- 2.- Es fon l'agarosa escalfant l'erlenmeier fins a ebullició. S'agita durant el procés per a obtenir una dissolució homogènia.
- 3.- Es deixa refredar i s'afegeix bromur d'etidi (10 mg/mL) fins a una concentració final de 0,5 µg/mL.
- 4.- Quan l'agarosa està a una temperatura inferior a 50°C, es vessa dins el motllo del gel que duu una pinta per formar les butxaques. Cal evitar la formació de bombolles.
- 5.- Es deixa solidificar durant 20 - 30 min.
- 6.- Un cop solidificat es col·loca el gel dins la cubeta d'electroforesi i es recobreix amb el tampó d'electroforesi fins 2 - 3 mm per sobre del gel.

b) Electroforesi:

- 1.- S'afegeix a les mostres el tampó de càrrega.

**Tampó de càrrega 10x:**

Glicerol 50%
Colorant Orange-G (punta d'espàtula)

- 2.- Es carreguen de 10 a 20 µL de mostra per butxaca. En una d'elles es carrega també 1 µg de marcadors de pes molecular. En aquest treball s'ha utilitzat com a marcador el *1 Kb DNA ladder* de Life Technologies.
- 3.- Es connecta l'electroforesi a 70 - 90 volts.

c) Tinció del gel:

Les bandes es visualitzen per transil·luminació dels gels amb llum ultraviolada, ja que el bromur d'etidi intercalat entre les bases del DNA emet fluorescència.

d) Imatges dels gels:

Les imatges dels gels d'agarosa s'han obtingut amb un aparell Gel Doc 1000 de BioRad.

### **M.2.7.2.- Purificació de bandes de DNA de gels d'agarosa**

Per a l'extracció del DNA de l'agarosa s'ha utilitzat un kit comercial de la casa Pharmacia Biotech anomenat "*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*". El protocol d'utilització és el següent:

- 1.- Es retalla la banda del gel d'agarosa i s'afegeix 1µL del tampó caotrópic subministrat pel kit per cada miligram de banda.
- 2.- S'incuba a 60°C fins a fondre l'agarosa (5-10 min).
- 3.- S'incuba la mostra durant 1 min. en una columneta que conté una reina que reté el DNA.
- 4.- Es centrifuga a 13.000 rpm 30 s. Es llença l'eluat i es posa 500 µL de tampó de rentat a la columna i es torna a centrifugar 30 s.
- 5.- El DNA purificat s'elueix amb 50 µL d'aigua milliQ estèril. S'incuba la mostra amb l'aigua durant 1 min, i es centrifuga a 13.000 rpm 1min.

### **M.2.8.- CLONATGE DE FRAGMENTES DE DNA EN PLÀSMIDS**

En aquest treball s'ha realitzat només clonatge d'extrems cohesius. El procediment comprèn els següents passos:

- 1.- Es restringeixen el vector i l'insert amb els enzims de restricció adequats.
- 2.- Es realitza electroforesi en gel d'agarosa, es tallen les bandes que interessen i es purifica el DNA segons el protocol de l'apartat M.2.7.2.
- 3.- Reacció de lligació: ens permet unir fragments de DNA amb extrems compatibles. L'enzim usat per a dur a terme aquesta reacció és la T4 DNA lligasa (Promega). Les quantitats de DNA i les condicions de la lligació varien en funció de que els extrems siguin cohesius o roms. Per a la lligació d'extrems cohesius compatibles cal que el quocient entre el nombre de molècules de vector i el nombre de molècules d'insert sigui proper a 0,5, és a dir, 2 molècules de fragment per cada molècula de vector. Es barregen vector linialitzat i insert en la proporció indicada anteriorment, una unitat de la lligasa, 1µL del tampó de la lligasa 10x (composició: Tris-HCl 300 mM pH 7.8, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM) i aigua milliQ estèril fins a un volum final de 10µL. La reacció es pot dur a terme durant tota la nit a 4°C o 3 hores a temperatura ambient.

## **M.2.9.- INCORPORACIÓ DE DNA FORANI EN BACTERIS**

### **M.2.9.1.- Preparació de cèl·lules competents d' *E. coli***

La introducció de vectors plasmídics en cèl·lules d'*E. coli* es realitza mitjançant la transformació de cèl·lules competents d'*E. coli*. Per a la preparació de cèl·lules competents s'ha usat el mètode del clorur càlcic (Mandel i Higa, 1970), que inclou els següents passos:

- 1.- S'inocula 10 mL d'LB fresc amb una colònia o 50 µL de glicerinat i s'incuba durant 12-15 h a 37°C amb agitació a 300 rpm.
- 2.- A partir d'aquest cultiu saturat es prepara un cultiu en creixement exponencial diluint-lo 1:100 en LB i incubant a 37°C amb agitació fins que  $UDO_{550}$  del cultiu estigui entre 0,4 i 0,5 (sol tardar 2 h).
- 3.- Es transfereix el cultiu a un tub de polipropilè estèril de 50 mL i es refreda el cultiu en gel durant 15 minuts com a mínim.
- 4.- Es centrifuga a 5000 rpm durant 10 minuts a 4°C. Es decanta el sobrenedant, i s'asseca el precipitat per inversió durant 10 minuts. Es resuspèn el pellet en V/2 de  $CaCl_2$  100 mM atemperat prèviament en gel. Es deixa reposar en gel durant 1 h.
- 5.- Es centrifuga a 5000 rpm durant 10 minuts a 4°C. Es decanta el sobrenedant i s'asseca el precipitat per inversió durant 10 minuts. Es resuspèn suaument en V/20 de  $CaCl_2$  100 mM atemperat prèviament en gel. Es deixa reposar en gel durant 1 h. Al cap d'aquest temps ja tenim preparades les cèl·lules competents, que es poden aliquotar.

El  $CaCl_2$  100 mM s'esterilitza per filtració. Les alíquotes de cèl·lules competents es poden congelar a -80°C si prèviament s'afegeix glicerol a una concentració final del 15%.

### **M.2.9.2.- Transformació de cèl·lules competents d' *E. coli***

Les cèl·lules competents poden ser transformades amb DNA que procedeixi d'una lligació o d'una minipreparació plasmídica. El protocol que s'ha seguit és el següent:

- 1.- Es barreja 100 µL de cèl·lules competents amb 50 ng de DNA de la barreja de lligació. Per comprovar l'eficiència del procés es fan dos controls. Un control negatiu on només s'incuben cèl·lules competents sense DNA, i un control positiu on es transformen cèl·lules competents amb un plasmidi circular que presenta resistència a l'ampicil·lina però sense cap insert.
- 2.- S'incuba en gel durant 30 min.
- 3.- Xoc tèrmic: es transfereixen les mostres a un bany a 42°C durant 2 min i després 5 minuts a en gel.
- 4.- S'afegeix 1 mL de LB i s'incuba a 37°C amb agitació suau (100 rpm) durant 1h.
- 5.- Es fa un pols de centrifuga per peletejar les cèl·lules (30 segons a 8000 rpm) i s'extreu medi suficient com perquè en quedi 200 µL.
- 6.- Es plaqueja amb una nansa de Digrafsky i es deixa reposar la placa durant 10 minuts.
- 7.- S'inverteix la placa i s'incuba a 37°C durant 14 hores.
- 8.- Selecció de transformants per resistència a ampicil·lina.



## M.2.10.- TRANSFORMACIÓ DE *P. pastoris* PEL MÈTODE DELS ESFEROPLASTES

La transformació de *P. pastoris* s'ha fet pel mètode dels esferoplastes. Aquest permet la introducció del DNA plasmídic gràcies a la formació d'esferoplastes, els quals s'obtenen per digestió de la paret cel·lular del llevat amb l'enzim zimoliasa. El protocol seguit és l'indicat en el manual del kit d'expressió en *P. pastoris* comercialitzat per Invitrogen. Les solucions usades són les subministrades amb l'esmentat kit. Els passos que se segueixen són els següents:

- 1.- S'inoculen 20 mL d'YPD amb la soca GS115 o KM71. Es fa créixer a saturació 1-2 dies.
- 2.- S'inoculen 100 mL de medi YPD amb 1-10 µL del cultiu anterior. Es fa créixer durant la nit.
- 3.- Quan  $UDO_{600}$  està entre 0.2 i 0.5, es centrifuga 5-10 minuts a 1500xg.
- 4.- Es renta amb 20 mL d'aigua estèril i es torna a centrifugar igual que abans.
- 5.- Es renta amb 20 mL de SED fresc i es centrifuga.

### SED:

Sorbitol 1 M  
EDTA 25 mM  
DTT 50 mM (posar just abans d'usar)

- 6.- Es renta amb 20 mL de Sorbitol 1M i es centrifuga.
- 7.- Es renta amb 20 mL de SCE. Es separa en 2 tubs de 5 mL.

### SCE:

Sorbitol 1M  
EDTA 25 mM  
Tampó citrat sòdic 10 mM (pH 5,8)

- 8.- Per a una bona transformació cal arribar a obtenir un 70% d'esferoplastes. Per mesurar el temps d'incubació amb la zimoliasa s'utilitza un dels tubs anteriors de 5 mL. S'afegeix 7.5 µL de zimoliasa (3mg/mL) i es mesura el temps que tarda en arribar al 70% d'esferoplastes amb la següent fórmula:  
$$\% \text{ esferoplastes} = 100 - [(UDO_{800} \text{ a } t / UDO_{800} \text{ a } t_0) \times 100].$$

Les mesures es fan a l'espectrofotòmetre en una dissolució de SDS 5%. Un cop hem determinat el temps òptim d'incubació s'afegeix l'enzim a l'altre tub de 5mL i s'incuba a 30°C sense agitació.

- 9.- Es centrifuga a 750xg 10 minuts. Els esferoplastes són molt fràgils i cal manipular-los amb cura.
- 10.- Es renta amb 10 mL Sorbitol 1 M i es centrifuga a 750xg 10 minuts.
- 11.- Es renta amb 10 mL CaS i es centrifuga a 750xg 10 minuts

### CaS:

Sorbitol 1 M  
Tris-Cl 10 mM (pH 7,5)  
Ca Cl<sub>2</sub> 10 mM

- 12.- Es peleteja i es resuspen en 0,6 mL de CaS. Ara les cèl·lules ja estan preparades per ser transformades. Se'n transfereixen 250 µL a un eppendorf.
- 13.- S'afegeix d'1 a 10 µg del DNA a insertar (ha d'estar linearitzat). Cal fer també un control negatiu sense afegir DNA. Mantenir-ho a temperatura ambient 10 min.
- 14.- S'afegeix 1ml de PEG/CaT, barreja 1:1 de 40% PEG i CaT, incubar 10 minuts.

**CaT:**

Tris-Cl 20 mM (pH 7,5)  
Ca Cl<sub>2</sub> 20 mM

- 15.- Es centrifuga a 750xg durant 10 min. S'elimina bé el PEG.
- 16.- Es resuspen en 150 µL de SOS. Es manté a temperatura ambient 20 min.

**SOS:**

Sorbitol 1 M  
YPD x 3  
Ca Cl<sub>2</sub> 10 mM

- 17.- S'afegeix 0,75 mL de Sorbitol 1 M.
- 18.- El plaqueja sobre plaques MD (sense histidina) per seleccionar colònies His<sup>+</sup>. Es fa un plaquejat en doble capa, es prepara una dissolució regenerativa anomenada RD, de la que 10 mL es barregen amb uns 0,25 mL del material de la transformació i es sembren per decantació sobre la placa MD.

**RD (1 litre):**

186 g sorbitol  
10 g agar o agarosa.  
20 g dextrosa  
13,4 g *yeast-nitrogen-base*  
0,4 mg biotina

- 19.- S'incuben les plaques a 30°C. En 3-5 dies apareixen transformants, els quals han incorporat el plàsmid d'expressió. Aquest conté el gen *HIS4*, de manera que es complementa la deficiència de la soca hoste.

## **M.2.11.- EXPRESSIÓ DE PROTEÏNA RECOMBINANT**

### **M.2.11.1.- Producció a nivell analític**

Per tal de seleccionar els clons transformants més productius es preparen minicultius i s'analitza la producció de proteïna mitjançant SDS-PAGE.

- 1.- Es parteix de 30-40 colònies aïllades i s'inocula 15 mL de BMGY en un tub de 50 mL amb cadascuna d'elles. Es fan créixer els cultius a 30°C amb una agitació de 250-300 rpm durant dos dies.
- 2.- Es recullen les cèl·lules centrifugant a 3000xg durant 5 minuts a T ambient. Es decanten els sobrenedants i es resuspenen les cèl·lules en 3 mL de BMMY, el qual conté metanol, l'inductor de l'expressió. Els tubs es tapen amb cotó estèril per tal d'augmentar l'aireació. Cada 24 hores s'afegeix metanol a una concentració de l'1%.
- 3.- Un cop transcorregut el temps òptim d'inducció es pren una alíquota del cultiu i es centrifuga a 3000xg durant 5 minuts per separar el sobrenedant, on la proteïna recombinant es troba dissolta. Afegim al sobrenedant tampó de càrrega per realitzar electroforesi en SDS. *Pichia pastoris* secreta molt poques proteïnes al medi extracel·lular, de manera que la proteïna recombinant és la majoritària i es pot visualitzar per tinció amb blau coomassie.

### **M.2.11.2.- Producció preparativa de proteïna recombinant**

Un cop s'ha determinat quin és el clon més productor es procedeix a una producció preparativa:

- 1.- Usant un volum de 50 µL d'un cultiu líquid en medi MD del clon seleccionat inoculem 1 litre de medi BMGY en un erlenmeyer de 2L i es fa créixer a 30°C amb agitació (250-300 rpm) fins que el cultiu assoleixi una OD<sub>600</sub>=2-6.
- 2.- Es recullen les cèl·lules centrifugant a 3000xg durant 5 minuts a T ambient en tubs de centrifuga estèrils. Es decanta el sobrenedant i es resuspenen les cèl·lules en 200 mL de medi BMMY. Tapem l'erlenmeyer amb cotó estèril i incubem el cultiu durant el seu temps òptim d'inducció. Cada 24 hores afegim al cultiu metanol a l'1%.
- 3.- Un cop acabada la inducció centrifuguem el cultiu a 3000xg durant 5 minuts a T ambient i recollim el sobrenedant, el qual es sotmet seguidament al procés de purificació.

## **M.3.- MÈTODES D'ANÀLISI DE PROTEÏNES**

### **M.3.1.- MÈTODES ELECTROFORÈTICS**

#### **M.3.1.1.- Electroforesi discontinua en presència d'SDS**

L'electroforesi en gels de poliacrilamida en presència de dodecilsulfat sòdic (SDS-PAGE) és una tècnica molt emprada per la seva gran resolució. Presenta la característica de que les proteïnes migren amb una velocitat que està en funció inversa del logaritme de la seva massa molecular. L'SDS és un detergent iònic que desplega les proteïnes i les recobreix amb un núvol de càrregues negatives. Això té un efecte d'apantallament de la càrrega intrínseca de les proteïnes

(Shapiro *et al.*, 1967). L'SDS s'uneix a les proteïnes proporcionalment a la seva grandària i per tant la seva separació en el gel de poliacrilamida es farà segons aquest criteri.

L'electroforesi discontinua descrita per Laemmli (Laemmli, 1970) augmenta la resolució perquè els complexos SDS-proteïna corren a través de dos gels de diferent densitat: el gel superior o concentrador, que és prou laxe com per permetre la formació d'un front homogeni i el gel inferior o separador, que és més dens i permet que cada proteïna tingui una velocitat diferent en funció de la seva massa molecular.

a) Preparació el gel:

Es fan servir les següents dissolucions:

Solució A: solució al 40% d'acrilamida/bisacrilamida, 37,5:1

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

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

Composició del gel separador (12% d'acrilamida):

Solució A:	1,5 mL
Solució B:	1,2 mL
Aigua Milli-Q:	2,25 mL
Persulfat amònic 10 %:	50 µL
TEMED:	10 µL

Composició del gel concentrador ( 2,4 % d'acrilamida):

Solució A:	0,3 mL
Solució C:	0,5 mL
Aigua Milli-Q:	1,2 mL
Persulfat amònic 10%:	25 µL
TEMED:	2,5 µL

b) Electroforesi:

1.- Es prepara la cubeta d'electroforesi i s'omplen els compartiments superior i inferior del kit amb el tampó de recorregut diluït amb aigua Milli-Q.

Tampó de recorregut 10x:

Tris 0,25 M

Glicina 1,87 M

SDS 1%

S'ajusta el pH a 8,4 amb HCl

- 2.- Es barregen les mostres amb el tampó d'aplicació 3x en una relació mostra/tampó de 3:1. El tampó d'aplicació de mostres es prepara de forma concentrada amb  $\beta$ -mercaptoetanol, un agent reductor per trencar els ponts disulfur.

Tampó d'aplicació 3x:

Tris 180 mM

Glicerol 30%

SDS 9%

$\beta$ -mercaptoetanol 15%

Blau de Bromfenol 0,05%

S'ajusta el pH a 6,8 amb HCl

- 3.- Es posen les mostres durant 2 o 3 min a 100°C i s'apliquen en la butxaca corresponent 25  $\mu$ L com a màxim. En un carril paral·lel s'aplica també una barreja de proteïnes marcadores de pes molecular. D'aquesta manera la massa molecular relativa (Mr) de les proteïnes analitzades pot calcular-se per interpolació en una corba construïda amb aquesta barreja de proteïnes marcadores de pes molecular conegut. Habitualment s'ha usat una barreja comercial de la casa Bio Rad formada per:

	<b>Mr (KDa)</b>
Miosina	200,00
$\beta$ -galactosidasa	116,25
Fosforilasa b	94,00
Albúmina sèrica bovina	67,00
Ovoalbúmina	45,00
Anhidrasa carbònica	31,00
STI	21,50
Lisozima	14,40
Aprotinina	6,50

- 4.- Es connecta l'electroforesi a 20 mA durant 1 h aprox. fins que surti el colorant del tampó de càrrega.

- 5.- Es desmunta el kit i es procedeix a la tinció.

c) Tinció amb blau de Coomassie:

Té un límit de detecció de 0,3 a 1  $\mu$ g per banda de l'electroforesi. El protocol és el següent:

- 1.- Un cop acabada l'electroforesi, els gels es submergeixen directament dins la dissolució colorant. El temps de tinció depèn del gruix del gel, però per minigels de 0,75 mm n'hi ha prou amb 15 - 30 min en agitació suau a temperatura ambient. En aquest treball s'ha utilitzat el Phast Gel Blue R de Pharmacia per preparar la dissolució colorant.

Dissolució colorant:

Metanol 30%  
Àcid acètic 8%  
Blau de Coomassie 0,15%

2.- Passat aquest temps es destenyeix amb diversos canvis de la dissolució decolorant fins que quedi contrastat, amb el fons blanc i les bandes de proteïna en blau.

Dissolució decolorant:

Metanol 25%  
Acid acètic 8%

d) Imatges dels gels:

Les imatges dels gels d'electroforesi s'han obtingut per escanejat amb l'aparell *Model GS-700 Imaging Densitometer* de BioRad.

### **M.3.1.2.- Gels de tricina**

Els gels de tricina, descrits per Schägger i Van Jagow (1987), consten de tres fases de poliacrilamida de diferents densitats: un gel superior o concentrador, un gel intermig o espaiador i un gel inferior o separador, de malla estreta per a separar les proteïnes en funció de la seva grandària. Els gels de tricina són molt resolutius per a proteïnes de baix pes molecular.

El procediment de preparació del gel és anàleg a l'explicat a l'apartat M.3.1.1, però tenint en compte les següents composicions per a les diferents fases del gel:

#### **Tampó del gel 3x:**

Tris-HCl 3 M  
SDS 0,3%  
S'ajusta el pH a 8,45

#### **Gel separador 16%:**

40% Acrilamida/Bisacrilamida 37,5:1	1,66 mL
Tampó del gel 3x	1,66 mL
Glicerol 50%	1,33 mL
Aigua Milli-Q	0,33 mL
Persulfat amònic 20%	30 µL
TEMED	3 µL

**Gel espaiador 9,6%:**

40% Acrilamida/Bisacrilamida 37,5:1	0,50 mL
Tampó del gel 3x	0,83 mL
Aigua Milli-Q	1,16 mL
Persulfat amònic 20%	30 µL
TEMED	3 µL

**Gel concentrador 3,8%:**

40% Acrilamida/Bisacrilamida 37,5:1	0,20 mL
Tampó del gel 3x	0,62 mL
Aigua Milli-Q	1,68 mL
Persulfat amònic 20%	30 µL
TEMED	3 µL

L'electroforesi es realitza en presència de dos tampons diferents: en el compartiment interior del kit d'electroforesi posem el tampó del càtode 1x i en la cubeta inferior el tampó de l'ànode 1x. És molt important evitar contactes entre els dos tampons.

**Tampó del càtode 10x:**

Tris 1 M  
Tricina 1M  
SDS 1%

**Tampó del ànode 10x:**

Tris-HCl (pH 8,9) 2M

La preparació de les mostres es realitza tal i com s'indica a l'apartat anterior. El gel es corre a 20 mA (3-4 h) fins que surt el colorant del tampó de càrrega. El procediment de tinció del gel és com el que s'explica en l'apartat anterior.

**M.3.2.- IMMUNOTRANSFERÈNCIA**

Aquesta tècnica, també anomenada *Western blotting* (Renart *et al.*, 1979, Towbin *et al.*, 1979), combina la resolució de les tècniques electroforètiques amb l'especificitat dels anticossos, cosa que permet la detecció i identificació de proteïnes.

a) Electrotransferència: permet transferir les proteïnes separades en un gel d'electroforesi a una membrana de material sintètic (p.ex. nitrocel·lulosa o PVDF (difluorur de polivinilidè) gràcies a l'aplicació d'un camp elèctric perpendicular al gel. El protocol que es segueix és el següent:

- 1.- Realitzar l'electroforesi segons l'apartat M.3.1.
- 2.- Submergir el gel d'electroforesi en el tampó de transferència durant quinze minuts.

Tampó de transferència:

Glicina 39 mM  
Tris 48 mM  
SDS 0,04%  
Metanol 20%  
S'ajusta a pH 9,0

- 3.- Les membranes usades per a les transferències són d'Immobilon-P de la casa Millipore. S'han de manipular amb guants i amb molta cura per evitar que es trenquin. La membrana es talla a la mateixa mida que el gel, es tracta durant quinze segons amb metanol, es renta durant dos minuts en aigua milli-Q i s'equilibra en tampó de transferència durant cinc minuts.
- 4.- Es tallen dos trossos de paper Whatman a la mateixa mida que el gel.
- 5.- Es remullen el paper Whatman i les esponges en tampó de transferència i es munta el sistema segons el següent ordre a partir del pol negatiu (costat negre del sistema):

Esponja  
Paper Whatman  
Gel de poliacrilamida  
Membrana  
Paper whatman  
Esponja

A mesura que es posen els diferents components es fa rodolar una vareta de vidre per a eliminar les bombolles d'aire.

- 6.- El sistema es col·loca dins una cubeta de mini-trans-blot de Bio-Rad i s'omple amb tampó de transferència.
- 7.- La transferència es realitza a amperatge constant a 4°C
- 8.- Finalitzada la transferència, es comprova l'efectivitat d'aquesta per tinció del gel de poliacrilamida amb blau de coomassie.

b) Revelat de la membrana:

- 1.- Rentar la membrana durant 10 minuts en tampó TBS.

Tampó TBS (per a 1 litre):

NaCl 8 g  
KCl 0,2 g  
Tris 3 g  
S'ajusta a pH 8,0



- 2.- Incubar la membrana a temperatura ambient durant 1-2 hores o durant tota la nit a 4°C amb la dissolució bloquejant TBS, BSA 3%.
- 3.- Rentar tres cops durant 5 minuts amb TBS.
- 4.- Incubar a temperatura ambient amb l'anticòs primari durant 2 hores o tota la nit a 4°C. L'anticòs primari són anticossos de conill contra les procarboxipeptidases humanes. S'utilitza a una dilució variable (normalment 1/500) amb TBS, Tween-20 0,1%, BSA 1%. Aquesta solució és reciclable afegint azida sòdica 0.02% i guardant-la a 4°C.
- 5.- Rentar cinc cops durant 5 minuts amb TBS, Tween-20 0,1%.
- 6.- Incubar a temperatura ambient amb l'anticòs secundari durant 2 hores. L'anticòs secundari són anticossos de cabra anti-IgG de conill conjugats a fosfatasa alcalina, de la casa Bio Rad. Es preparen a una dilució 1:2000 en TBS, Tween-20 0,1%, BSA 1%.
- 7.- Rentar cinc cops durant 5 minuts amb TBS, Tween-20 0,1%.
- 8.- Pel revelat s'usa el kit de Bio Rad *Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate*. Es prepara la solució reveladora al moment i es submergeix la membrana.

Dissolució reveladora:

Dissolució AP: Tris-HCl (12,4 gr. en 1 litre)	10 mL
Dissolució A: Nitroblue tetrazolium en dimetilformamida	100µL
Dissolució B: 5-Br-4Cl-3 Indolilfosfat en dimetilformamida	100µL

- 9.- Aturar el revelat amb aigua destil·lada.
- 10.- Assecar la membrana entre papers de filtre

### **M.3.3.- SEQÜENCIACIÓ N-TERMINAL**

S'ha portat a terme en el Servei de Seqüenciació de Proteïnes de l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina. L'equip de seqüenciació utilitzat és un Beckman model LF 3000 Protein Sequencer, basat en el mètode de degradació d'Edman.

Quan la proteïna a seqüenciar no es trobava en estat pur s'ha realitzat una electroforesi per separar la banda de proteïna d'interès i aquesta s'ha recuperat mitjançant el procés que s'indica a continuació:

- 1.- Fer la transferència segons l'apartat M.3.2.a.
- 2.- Rentar la membrana amb aigua milli-Q tres cops durant 5 minuts.
- 3.- Visualitzar les bandes per tinció amb blau coomassie R-250 (Bio Rad) durant 5 minuts.
- 4.- Destenyir amb 50% metanol, 10% àcid acètic.
- 5.- Rentar la membrana amb aigua milli-Q diverses vegades i deixar-la assecar a l'aire.
- 6.- Retallar les bandes d'interès. Les bandes es poden conservar guardant-les a -20 °C.

### **M.3.4.- MÈTODES ESPECTROSCÒPICS**

Les tècniques espectroscòpiques han estat una eina molt utilitzada en aquest treball per al control de la presència, l'activitat i la identitat de les proteïnes estudiades.

#### **M.3.4.1.- Quantificació espectrofotomètrica de proteïnes**

Per calcular la concentració de proteïna s'aplica la llei de Lambert-Beer a la longitud d'ona de 280nm:

$$C = DO_{280} / E_{280}^{1\text{mg/mL}}$$

El coeficient d'extinció molar de la PCPA1 té un valor de 1,32 mL/mg.cm i de 1,56 mL/mg.cm per a la PCPB.

#### **M.3.4.2.- Determinació espectroscòpica d'activitats enzimàtiques**

##### Mesura de l'activitat carboxipeptidasa B:

Substrat:

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

Descrit per Folk *et al.* (1960)

Condicions:

Concentració de substrat: 1 mM

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

Longitud d'ona: 254 nm (se segueix l'augment)

Quantitat d'enzim detectable: 0,5 a 5 µg.

##### Mesura de l'activitat carboxipeptidasa A1:

Substrat:

N-furilacrilòil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (FAPP)

Descrit per Peterson *et al.* (1982)

Condicions:

Concentració de substrat: 0,2 mM

Tampó: Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,45 M (pH 7,5)

Longitud d'ona: 330 nm (se segueix la disminució)

Quantitat d'enzim detectable: 50 a 500 ng.

Mesura de l'activitat del mutant D255K:

Substrat:

N-benzoïl-alanil-L-glutamic

Sintetitzat i cedit per Zeneca.

Condicions:

Concentració de substrat: 0,75 mM

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

Longitud d'ona: 254 nm (se segueix l'augment).

Normalment, s'afegeixen entre 1 i 20 µL de mostra a 1 mL de dissolució de substrat i les mesures es realitzen durant 2 min en un espectrofotòmetre Cary 100 Bio a una temperatura de 25 °C. L'activitat enzimàtica es dedueix a partir del pendent del registre d'absorbància de la dissolució enzim-substrat al llarg del temps, i s'expressa com a la quantitat de substrat consumit (o de producte format) per unitat de temps. Per poder estandaritzar els assajos, es realitza una hidròlisi total del substrat amb excés d'enzim, per mesurar l'increment absolut en densitat òptica d'una dissolució de substrat (Aht). El valor obtingut ha de ser igual o pròxim al teòric, que per al benzoïl-glicil-L-arginina i el benzoïl-alanil-L-glutàmic és de 0,36 UDO/mM i pel FAPP és de 2 UDO/mM. La forma més adequada d'expressar l'activitat és referint-la a la quantitat d'enzim present a la mostra. Aquesta expressió es denomina activitat específica (Ae):

$$Ae = \frac{\text{UDO / min}}{\text{Aht x mg enzim/mL substrat}}$$

D'aquesta manera l'activitat específica queda expressada en:

$$\frac{\text{UDO/ min}}{\text{UDO/mmol/L x mg/mL}}$$

és a dir:

µmols de substrat/mg enzim x min

### **M.3.5.- ESPECTROMETRIA DE MASSES**

L'espectrometria de masses (MS) permet determinar en pocs minuts la massa molecular relativa de qualsevol pèptid o proteïna petita amb un error menor al 0,1%. En aquest treball s'ha utilitzat un sistema MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) (Hillenkamp *et al.*, 1991) model Bruker Biflex (Alemanya). El sistema MALDI es caracteritza per la formació d'una espècie protonada gràcies a què la matriu cedeix un protó al ser impactada pel làser, generant-se un nombre d'estats de ionització menor que en altres sistemes, i per tant, espectres més fàcils d'analitzar.

Per a l'anàlisi de la massa dels segments d'activació es va utilitzar com a matriu l'àcid sinapínic i es van acumular de 10 a 40 trets per espectre, realitzats en mode lineal i amb una atenuació del làser al voltant del 40%. Les mostres que es van analitzar van ser purificades per HPLC de fase reversa i es van analitzar usant citocrom C com a patró intern.

### **M.3.6.- DIÀLISI**

La diàlisi s'ha emprat per eliminar les sals de dissolucions proteiques. Els sacs de diàlisi usats són de la casa Medicell International LTD (Gran Bretanya) de mida d'exclusió de 12KDa. Es dialitza la mostra front un volum de tampó en una relació 1:1000 (v/v) durant la nit a 4°C.

Per a volums petits s'ha utilitzat la tècnica de *drop dialisi* descrita per Görisch (1988), en què s'utilitzen les membranes sèrie VS de 0,025 µm i 25 mm de diàmetre.

### **M.3.7.- MÈTODES CROMATOGRÀFICS**

#### **M.3.7.1.- Cromatografia atmosfèrica d'interacció hidrofòbica**

La fase estacionària està formada per un suport de partícules esfèriques de sílice que contenen cadenes hidrocarbonades unides covalentment i confereixen a la superfície un caràcter no polar. La interacció entre les molècules i la fase estacionària es realitza mitjançant interaccions hidrofòbiques i de repartiment entre fases. Les diferents molècules d'una dissolució se separen pel seu caràcter hidrofòbic essent eluïdes primer les molècules més polars, és a dir, aquelles que interaccionen més feblement amb la matriu. En el nostre cas, hem utilitzat columnes de 2 x 23 cm amb la reïna Toyopearl HIC Butyl-650 M (TosoHass) amb un diàmetre de partícula de 1,37 µm. La cromatografia s'ha realitzat a 4°C i a un flux màxim de 4mL/min. S'ha utilitzat una bomba peristàtica P-1 de Pharmacia.

### **M.3.7.2.- Cromatografia líquida d'alta resolució (FPLC) de bescanvi aniònic**

Aquesta cromatografia es basa en la interacció iònica que es produeix entre una reïna carregada i una proteïna amb càrrega oposada. En aquest treball s'ha utilitzat una columna amb una reïna carregada positivament i les proteïnes s'han dissolt en tampons a pH superior al seu punt isoelèctric, de manera que han adquirit càrrega negativa.

La utilització del FPLC en el fraccionament cromatogràfic permet la purificació en menys temps que altres mètodes, proporciona un alt rendiment i permet una recuperació òptima d'espècies pures i natives en menys etapes.

L'equip utilitzat ha estat un LKB-Pharmacia FPLC System®, compost per:

Bomba peristàltica P-1

Dues bombes d'alta precisió P-500

Controlador de flux i gradient LCC-500 plus Liquid Chromatography Controller

*Superloop* de 50 mL

Detector variable LKB 2140 Rapid Spectral Detector

Enregistrador Plotter Hewlett Packard model 7475 A

Vàlvules MV-7 Motor Valve

Ordinador Tandon PAC 3865

El fraccionament cromatogràfic en l'FPLC s'ha dut a terme amb una columna preparativa d'intercanvi aniònic TSK DEAE-5PW de TosoHaas amb un diàmetre de partícula de 10 µm, un porus de 0,1 µm i unes dimensions de 21,5 x 150 mm, protegida amb una precolumna del mateix material. Tots els solvents usats en l'FPLC han estat preparats amb aigua destil·lada desionitzada mitjançant un equip Milli-Q. Posteriorment han estat filtrats a través de membranes de 0,22 µm (Sartorius) i desgasificats en trompa de buit durant 10 min. La mostra, dialitzada front el solvent d'equilibrat de la columna, es filtra amb una membrana de 0,22 µm de porus de baixa adsorció de proteïnes (Millex-GV-Millipore) abans de ser injectada en la columna. L'elució de les proteïnes se segueix per mesura d'absorbància a 280 nm.

### **M.3.7.3.- Cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC)**

La cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) s'ha utilitzat com a mètode analític per a separar i identificar les diferents espècies generades durant el procés d'activació dels proenzims estudiats, així com per analitzar els aminoàcids alliberats durant el procés d'activació de la PCPA1 humana.

L'equip de cromatografia líquida d'alta pressió utilitzat és de Waters, Assoc. i consta de les parts següents:

2487 Dual Absorbance Detector

2690 Separations Module

Ordinador Compaq i software Millennium32

En aquest treball s'han utilitzat columnes de fase reversa. El material d'empaquetament de la fase reversa sol estar format per un suport de sílice de mida de porus d'aproximadament 100 Å, que té unides covalentment cadenes hidrocarbonades d'entre 4 i 18 àtoms de carboni.

Per a seguir l'evolució en el temps dels diferents fragments peptídics generats durant l'activació trípica de les PCPs estudiades, així com per a la purificació dels mateixos, s'ha utilitzat una columna Vydac C-4 analítica amb un diàmetre de partícula de 5 µm, porus de 300 Å i una mida de 25 x 0,54 cm protegida amb una precolumna del mateix material. Per a l'anàlisi dels aminoàcids alliberats durant l'activació de la PCPA1 s'ha utilitzat una columna analítica NovaPak C-18 de dimensions 15 x 0,39 cm.

Les mostres a injectar han d'estar completament netes i dissoltes en el solvent en què s'equilibra la columna. Per tal d'evitar que material insoluble precipiti dins de la columna, se centrifuga a 16000xg durant 10 min abans de la seva aplicació. L'elució de les proteïnes i pèptids se segueix per mesura d'absorbància a 214 i 280 nm.

### **M.3.8.- ANÀLISI D'AMINOÀCIDS MITJANÇANT DABSILACIÓ**

Per tal d'analitzar els aminoàcids alliberats durant el procés d'activació de la PCPA1 humana, s'ha seguit un mètode que combina la derivatització dels aminoàcids amb clorur de dabsil (clorur de dimetilaminoazobenzè-sulfonil) i la posterior separació d'aquests mitjançant cromatografia HPLC de fase reversa (Vendrell i Avilés, 1986). Els diferents aminoàcids són identificats en funció del seu temps de retenció, els quals són establerts amb una prèvia cromatografia d'una barreja de patrons que inclou tots els aminoàcids.

#### **M.3.8.1.- Dabsilació d'aminoàcids**

Se segueixen els següents passos:

- 1.- Resuspendre la mostra a analitzar en 20 µL de bicarbonat sòdic 200 mM, pH 8.1
- 2.- Afegir 40 µL de clorur de dabsil (DABS-Cl) a una concentració de 5 nmol/µL en acetonitril.
- 3.- Escalfar a 70 °C durant 12 minuts. Vortejar un parell de cops durant els 12 minuts de forma ràpida.
- 4.- Afegir 440 µL de fosfat sòdic 50mM, pH 7.0:etanol (1:1).

Aquest mateix tractament l'apliquem a una mostra comercial de patrons d'aminoàcids (SIGMA) que analitzarem també per RP-HPLC i ens servirà com a referència dels temps de retenció de cada aminoàcid.

### **M.3.8.2.- Anàlisi dels aminoàcids per RP-HPLC**

Les diferents mostres dabsilades s'analitzen en una columna de fase reversa C18, treballant a un flux d'1 mL/min. Els solvents usats són:

Solvent A: Acetat sòdic 21mM, 4% Dimetilformamida, Àcid acètic 0,42mM, pH 6.5

Solvent B: Acetonitril 100%

L'elució dels aminoàcids es segueix per mesura d'absorbància a 436 nm i el gradient utilitzat és:

<b>Temps (min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>
0	85	15
20	65	35
32	30	70
35	30	70

### **M.4.- MODELAT DE PROTEÏNES PER HOMOLOGIA**

El modelat per homologia es basa en utilitzar estructures de proteïnes determinades experimentalment com a referència per predir la conformació d'una proteïna que presenta una seqüència aminoacídica similar. Una proteïna que presenti un mínim d'un 40% d'identitat seqüencial amb una proteïna d'estructura coneguda pot ser modelada automàticament amb una precisió comparable a la d'una estructura cristal·logràfica de baixa resolució. Durant el procés de modelat cal dedicar especial atenció en l'elaboració de l'alineament entre la

seqüència de la proteïna problema i les seqüències de les estructures de referència, ja que aquest alineament guia el procés de modelat i, per tant, determina la qualitat del model obtingut.

#### **M.4.1.- Elaboració dels alineaments múltiples**

Per a cada una de les proteïnes modelades en aquest treball, s'ha escollit el conjunt de seqüències corresponents a les proteïnes de referència amb el nivell d'identitat més alt respecte la proteïna problema. Amb aquest conjunt de seqüències més la seqüència problema, s'ha realitzat un alineament múltiple preliminar amb el programa CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994). Aquest alineament es va millorar manualment tenint en compte informació sobre l'estructura secundària i terciària del conjunt de proteïnes. Per a les proteïnes problema es va usar el programa PHD (Rost *et al.*, 1994) per fer una predicció de la seva estructura secundària, mentre que per les estructures cristal·logràfiques es va calcular la seva estructura secundària fent ús del programa DSSP (Kabsch i Sander, 1983). Les estructures tridimensionals de referència es van superposar usant el programa SSAP (Orengo *et al.*, 1992). L'alineament múltiple de les seqüències de referència es va modificar d'acord amb la informació obtinguda de la seva superposició tridimensional i l'alineament resultant es va usar per construir un perfil Hidden-Markov-Model (HMM) amb el programa HMMER (Eddy, 1998). La seqüència problema es va alinear amb el perfil HMM i finalment es va obtenir un alineament múltiple que tenia en compte la informació estructural de totes les seqüències considerades.

#### **M.4.2.- Obtenció i avaluació dels models**

Els models tridimensionals de cada proteïna problema es van obtenir amb un mètode de modelat per homologia basat en la satisfacció de restriccions espaials partint de l'alineament múltiple realitzat per a cada cas. El programa usat per aplicar aquest mètode és el MODELLER (Sali i Blundell, 1993). Les constriccions espaials s'obtenen per transferència de les característiques espaials de les estructures conegudes cap a la seqüència de l'estructura desconeguda. Els models obtinguts són sotmesos a un procés de minimització d'energia per tal d'optimitzar la geometria dels enllaços i per eliminar contactes no covalents desfavorables fent ús del camp de força GROMOS per a sistemes no solvatats (van Gunsteren i Berendsen, 1987; Oliva *et al.*, 1991). Els models es van refinar usant 1000 passos d'*steepest descent*. Els càlculs de r.m.s.d. (root-mean-square deviation) i les superposicions de les estructures modelades amb les estructures cristal·logràfiques es van realitzar usant el programa SSAP. El càlcul de l'estructura secundària dels diferents models es va fer amb el programa DSSP i es va comparar



amb l'estructura secundària predita. La qualitat dels models es va avaluar amb el programa PROSA-II (Sippl, 1993). Aquest programa fa ús de potencials estadístics i permet identificar regions amb plegament no nadiu, gràcies a que aquestes presenten una pseudo-energia amb un valor positiu elevat. Per a cada cas, el model que presentava una pseudo-energia més baixa va ser seleccionat com a model final.