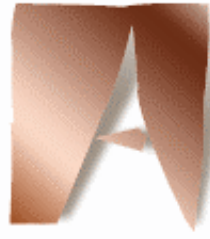




**Proteïnes petites i riques en ponts disulfur com a models de  
producció recombinant i plegament**

**Sílvia Bronsoms i Fabrellas**

**Setembre 2002**



**Universitat  
Autònoma  
de Barcelona**

**Institut de Biotecnologia i Biomedicina**

## **Proteïnes petites i riques en ponts disulfur com a models de producció recombinant i plegament**

Memòria presentada per Sílvia Bronsoms i Fabrellas, llicenciada en Bioquímica, per optar al grau de Doctora en ciències.

Treball realitzat a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció del Dr. Francesc Xavier Avilés i el Dr. Josep Villanueva.

Sílvia Bronsoms i Fabrellas

Dr. Francesc Xavier Avilés Puigvert

Dr. Josep Villanueva Cardús

## Pròleg

La memòria que es presenta està formada per tres treballs de recerca que tot i estar relacionats entre si, constitueixen cada un, un capítol independent.

En la primera part de la tesi s'assagen diversos sistemes per a la producció de l'inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI) en flascó, per tal de millorar el seu rendiment de producció i/o de simplificar el seu sistema de purificació. En la realització d'aquest treball va col·laborar el Dr. Francesc Canals.

En el segon treball s'estudia la influència de les regions precursoras del PCI (N i C-terminals) sobre el plegament *in vitro* i *in vivo* a *E.coli* de la forma madura i es duu a terme una primera caracterització estructural de la forma corresponent al PCI amb l'extensió N-terminal (ProNtPCI). El Dr. Francesc Canals i el Dr. Josep Villanueva van participar en la realització d'aquests estudis.

A la última part es caracteritza el plegament de dues proteïnes petites riques en ponts disulfur mitjançant la determinació de l'estabilitat conformacional dels seus intermediaris de plegament. S'avalua el paper dels intermediaris en el plegament de cada proteïna i es comparen els resultats obtinguts amb la informació aportada per altres mètodes. El Dr. Josep Villanueva va col·laborar en la realització d'aquest darrer estudi.

Tots tres treballs han estat realitzats a l'Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, en el grup dirigit pel Dr. Francesc Xavier Avilés.

El nexa d'unió entre els tres treballs és l'estudi de les proteïnes petites riques en ponts disulfur: expressió, anàlisi estructural, funcional o plegament. Els tres treballs presentats estan connectats per diverses seccions generals: introducció general, objectius, discussió general i conclusions, que ens permeten relacionar els tres capítols entre si.

**Índex**

PROTEÏNES PETITES I RÍQUES EN PONTS DISULFUR COM A MODELS DE PRODUCCIÓ RECOMBINANT I PLEGAMENT	1
--	---

PROTEÏNES PETITES I RÍQUES EN PONTS DISULFUR COM A MODELS DE PRODUCCIÓ RECOMBINANT I PLEGAMENT	3
--	---

PRÒLEG	5
--------	---

<u>ÍNDEX</u>	<u>7</u>
--------------	----------

<u>I-ABREVIATURES</u>	<u>1</u>
-----------------------	----------

<u>II-INTRODUCCIÓ GENERAL</u>	<u>5</u>
-------------------------------	----------

II.A ELS INHIBIDORS DE PROTEASES	7
----------------------------------	---

II.A.1 Inhibidors de serín-proteases	7
--------------------------------------	---

II.A.2 Inhibidors de cisteín-proteases	8
--	---

II.A.3 Inhibidors de metal.lo-proteases	8
---	---

II.A.4 Inhibidors d'aspàrtic-proteases	9
--	---

II.A.5 Els inhibidors de proteases emprats en aquest treball	9
--	---

II.A.5.1 L'inhibidor de carboxipeptidasa de patata (PCI)	9
--	---

II.A.5.2 L'inhibidor de carboxipeptidasa de sangonera (LCI)	11
---	----

II.A.5.3 La hirudina	11
----------------------	----

II.B L'EXPRESSIÓ HETERÒLOGA I LA PRODUCCIÓ RECOMBINANT DE PROTEÏNES	12
---	----

II.B.1 Expressió en organismes procariotes. <i>Escherichia coli</i>	13
---	----

II.B.1.1 Promotor	13
-------------------	----

II.B.1.2 Terminadors de la transcripció	14
---	----

II.B.1.3 Estabilitzadors dels transcrits	14
--	----

II.B.1.4 Elements que afecten la traducció	15
--	----

II.B.1.5 Terminadors de la traducció	15
--------------------------------------	----

II.B.1.6 Ús de codó	16
---------------------	----

II.B.1.7 Lloc d'expressió	16
---------------------------	----

CCitoplasma .....	16
-------------------	----

EExtracel.lular	16
-----------------	----

II.B.1.9 Proteòlisi	16
---------------------	----

II.B.1.10 Proteïnes de fusió	17
------------------------------	----

II.B.2 Expressió en organismes eucariotes. <i>Pichia pastoris</i>	17
---	----

II.C EL PROCÉS DE PLEGAMENT DE PROTEÏNES	18
--	----

II.C.1	Evolució històrica de la visió del plegament de proteïnes	18
II.C.2	Mètodes de seguiment del procés de plegament de proteïnes aplicats a les proteïnes riques en ponts disulfur	21
II.C.2.1	Captura en medi àcid	21
II.C.2.2	Bescanvi H/D	22
II.C.2.2.1	Bescanvi D/H seguit per RMN.....	23
II.C.2.2.2	Bescanvi H/D seguit per MS.....	25
II.C.2.2.2.1	Bescanvi H/D seguit per ESI MS	25
II.C.2.2.2.2	Bescanvi H/D seguit per MALDI-TOF MS	26
II.C.3	El procés de plegament de les proteïnes petites riques en ponts disulfur	28
II.C.3.1	El plegament de l'inhibidor de carboxipeptidasa de patata	29
II.C.3.2	El plegament del factor de creixement epidèrmic (EGF)	30

### III-OBJECTIUS 33

### IV- TREBALL 1. COMPARATIVE EXPRESSION OF POTATO CARBOXY- PEPTIDASE INHIBITOR IN *PICHIA PASTORIS* AND *ESCHERICHIA COLI* 37

IV.A	INTRODUCTION	39
IV.B	MATERIALS AND METHODS	39
IV.B.1	Construction of a Yeast Expression Vector and transformation	39
IV.B.2	Selection of High Expressors and Large-Scale Expression of PCI in Yeast	40
IV.B.3	Construction of a Bacterial Expression Vector: Generation of pIN3OmpAIII-HisTagPCI	40
IV.B.4	Construction of a Bacterial Expression Vector: Generation of pBAT4-PCI	41
IV.B.5	Screening for High-Expressing Clones and Large-Scale Expression of PCI in Bacteria	41
IV.B.6	Periplasmic Extraction in Bacteria	42
IV.B.7	Purification of PCI	42
IV.B.8	CPA inhibitory activity	42
IV.B.9	Mass Spectrometry analysis	42
IV.B.9.1	Purification Protocol for MS Samples	43
IV.C	RESULTS	43
IV.C.1	Expression of PCI by <i>Pichia pastoris</i>	43
IV.C.2	Expression of pIN3OmpAIII-His-Tag-PCI by <i>E.coli</i>	45

IV.C.3	Expression of pBAT4-OmpA-PCI by E.coli	46
IV.D	DISCUSSION	47
IV.E	REFERENCES	50

V- TREBALL 2. THE PROSEQUENCE OF POTATO CARBOXYPEPTIDASE INHIBITOR DOES NOT INFLUENCE THE MATURE PEPTIDE FOLDING 53

V.A	INTRODUCTION	55
V.B	EXPERIMENTAL PROCEDURES	56
V.B.1	Plasmid constructions and mutagenesis	56
V.B.2	Protein expression and purification	57
V.B.3	<i>In vitro</i> folding experiments	58
V.B.4	Inhibitory activity	58
V.B.5	Mass spectrometry	59
V.B.6	Circular Dichroism Spectroscopy	59
V.B.7	Deuterium to proton (D/H) exchange	59
V.B.8	Exoproteolysis	59
V.B.9	Nuclear Magnetic Resonance	59
V.C	RESULTS	60
V.C.1	Expression in <i>Escherichia coli</i>	60
V.D.2	Refolding <i>in vitro</i>	61
V.D.3	Influence of prosequences <i>in vivo</i>	63
V.D.4	Inhibitory activity	64
V.D.5	CD spectroscopy	65
V.D.6	D/H Exchange	66
V.D.7	Exoproteolysis	66
V.D.8	NMR analysis	67
V.E	DISCUSSION	69
V.F	REFERENCES	72

VI- TREBALL 3. MONITORING THE PROTEIN FOLDING BY D/H EXCHANGE FOLLOWED BY MALDI-TOF MS 75

VI.A	INTRODUCTION	77
VI.B	EXPERIMENTAL PROCEDURES	78
VI.B.1	Folding experiments	78
VI.B.2	Isolation of refolding intermediates	79
VI.B.3	Deuterium to proton exchange (D/H)	80
VI.B.4	Analysis of disulfide species	80
VI.B.5	MALDI-TOF MS analysis	80
VI.C	RESULTS	81
VI.C.1	Measurement of D/H exchange of hirudin during its oxidative refolding by MALDI-TOF MS	81
VI.C.2	Measurement of D/H exchange of isolated intermediates of hirudin oxidative refolding by MALDI-TOF MS	82
VI.C.3	Measurement of D/H exchange of LCI during its oxidative refolding by MALDI-TOF MS	83
VI.C.4	Measurement of D/H exchange of isolated intermediates of LCI oxidative refolding by MALDI-TOF MS	85
VI.D	DISCUSSION	86
VI.D.1	Comparison of the folding pathways of LCI and hirudin.	87
VI.D.2	LCI kinetic trap	87
VI.D.3	The intertwining dependence of the disulfide bonds and non-covalent forces	88
VI.E	REFERENCES	90
<u>VII- RESUM I DISCUSSIÓ GENERAL</u>		<u>93</u>
<u>VIII-CONCLUSIONS</u>		<u>103</u>
<u>IX-BIBLIOGRAFIA</u>		<u>107</u>
<u>X-APÈNDIXS</u>		<u>119</u>
	ANGLICISMES	121



## **I-Abreviatures**

<b>bp</b>	parells de bases
<b>BPTI</b>	inhibidor de tripsina de pàncrees boví
<b>CD</b>	dicroïsmes circulars
<b>Cys/Cys-Cys</b>	cisteïna/cistin a
<b>CE-MS</b>	electroforesi capil·lar-espectrometria de masses
<b>CPA/CPB</b>	carboxipeptidasa A/B
<b>(U)DO</b>	(unitats de) densitat òptica
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EGF</b>	factor de creixement epidèrmic
<b>ESI MS</b>	espectrometria de masses d'electrosprai
<b>H/D</b>	bescanvi protó/deuteri
<b>IR</b>	infraroig
<b>LCI</b>	inhibidor de carboxipeptidasa de sangonera
<b>LC-MS</b>	cromatografia líquida-espectrometria de masses
<b>MALDI-TOF MS</b>	espectrometria de masses MALDI-TOF ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight</i> )
<b>PCI</b>	inhibidor de carboxipeptidasa de patata
<b><i>P.pastoris</i></b>	<i>Pichia pastoris</i>
<b>ProCtPCI</b>	PCI amb l'extensió C-terminal
<b>ProNtPCI</b>	PCI amb l'extensió N-terminal
<b>ProPCI</b>	PCI amb l'extensió N i C-terminals
<b>RBS</b>	lloc d'unió al ribosoma
<b>RNasaA</b>	ribonucleasa A
<b>RP-HPLC</b>	cromatografia líquida d'alta pressió de fase reversa
<b>RMN</b>	ressonància magnètica nuclear
<b><i>S.cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>TAP</b>	pèptid anticoagulant de la paparra
<b>TCI</b>	inhibidor de carboxipeptidasa de tomata
<b>TFA</b>	trifluoroacetic acid
<b>tPA</b>	activador tissular del plasminogen
<b>UTR</b>	regió no traduïda
<b>UV</b>	ultra-violat
<b>wt</b>	tipus salvatge