

OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE LAS PROTEASAS TEV Y SENP2 MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Máster en Técnicas Cromatográficas Aplicadas

Trabajo de Fin de Máster

23/06/2022

Autora:

Itsasne Beitia Aguirre

Director:

Aitor Hierro Ayuela



Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas..... | 1 |
| 1. Introducción..... | 3 |
| 1.1. IMAC..... | 3 |
| 1.2. TEV..... | 4 |
| 1.3. SENP2..... | 4 |
| 1.4. Cromatografía de intercambio iónico..... | 5 |
| 1.5. Cromatografía de exclusión por tamaño/Gel filtración..... | 6 |
| 1.6. SDS-PAGE..... | 7 |
| 2. Objetivo..... | 9 |
| 3. Materiales y métodos..... | 10 |
| 4. Procedimiento experimental..... | 11 |
| 4.1. Expresión de proteínas..... | 11 |
| 4.2. Purificación de proteínas..... | 12 |
| 4.2.1. TEV..... | 12 |
| 4.2.2. SENP2..... | 15 |
| 4.3. Confirmación de las proteasas mediante SDS-PAGE..... | 17 |
| 5. Resultados y discusión..... | 18 |
| 5.1. TEV..... | 18 |
| 5.2. SENP2..... | 27 |
| 5.3. Ensayos de corte..... | 33 |
| 5. Conclusiones..... | 35 |
| Referencias..... | 38 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Características de la proteasa TEV..... | 12 |
| Tabla 2. Características de la proteasa SENP2. | 15 |
| Tabla 3. Tampones para cromatografía de intercambio catiónico. | 21 |
| Tabla 4. Mg de TEV obtenidos por litro de cultivo en cada procedimiento..... | 27 |
| Tabla 5. Mg de SENP2 obtenidos por litro de cultivo en cada procedimiento. | 33 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ligando de Ni..... | 4 |
| Figura 2. Cargas de las proteínas en función de su pH..... | 5 |
| Figura 3. Equipo de cromatografía Äkta con columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP 5 mL..... | 6 |
| Figura 4. Proteína con estructura compacta (izquierda), proteína con estructura cilíndrica (derecha). | 7 |
| Figura 5. Funcionamiento del SDS-PAGE..... | 8 |
| Figura 6. 1. Matraces en incubadora con medio LB, colonias y antibiótico. 2. Medios de cultivo después de centrifugar. 3. Pellet de bacterias. 4. Test de bacteriófagos positivo. 5. Test de bacteriófagos negativo..... | 11 |
| Figura 7. Esquema del procedimiento para la purificación de TEV..... | 13 |
| Figura 8. Esquema del procedimiento para la purificación de SENP2. | 16 |
| Figura 9. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV siguiendo el procedimiento del laboratorio..... | 18 |
| Figura 10. Gel SDS-PAGE obtenido para la purificación de TEV siguiendo el procedimiento del laboratorio..... | 19 |
| Figura 11. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL siguiendo el procedimiento del laboratorio. | 19 |
| Figura 12. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO1..... | 20 |
| Figura 13. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 1..... | 20 |
| Figura 14. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO2..... | 22 |
| Figura 15. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 2..... | 22 |
| Figura 16. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO3.1. | 23 |
| Figura 17. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 3.1..... | 23 |
| Figura 18. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO3.2. | 24 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 3.2..... | 24 |
| Figura 20. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO3.3. | 25 |
| Figura 21. Cromatogramas obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño para TEV tras aplicar el CAMBIO3.3. | 26 |
| Figura 22. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 ml (izq) y gel obtenido tras la cromatografía de exclusión por tamaño con Superdex 75 16/60 (dcha) tras el CAMBIO 3.3. | 26 |
| Figura 23. Cromatograma obtenido para el SENP2 con el procedimiento del laboratorio. | 28 |
| Figura 24. Gel SDS-PAGE obtenido para la purificación de TEV siguiendo el procedimiento del laboratorio..... | 28 |
| Figura 25. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para SENP2 tras aplicar el CAMBIO 1.1..... | 29 |
| Figura 26. Gel SDS-PAGE obtenido para el SENP2 en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 1.1. | 30 |
| Figura 27. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para SENP2 tras aplicar el CAMBIO1.2. | 31 |
| Figura 28. Gel SDS-PAGE obtenido para el SENP2 en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 1.2. | 31 |
| Figura 29. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para SENP2 tras aplicar el CAMBIO1.3. | 32 |
| Figura 30. Gel SDS-PAGE obtenido para el SENP2 en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 1.3. | 32 |
| Figura 31. Fracciones para cortar con TEV..... | 34 |
| Figura 32. Fracciones para cortar con SENP2..... | 34 |

Abreviaturas

TEV – Virus del grabado del tabaco (Tobacco Etch Virus)

SEN2 – Proteasa 2 específica de sentrin (Sentrin specific protease 2)

VC – Volúmen de columna (Equivale a 5 ml en cromatografía de intercambio iónico)

LB – Luria-Bertani

OD – Densidad óptica (optical density)

IPTG - isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

PI – Punto isoeléctrico

SDS PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

NTA – Ácido nitrilotriacético

IEX – Cromatografía de intercambio iónico (ion Exchange chromatography)

DTT – (2S, 3S) -1,4-Bis (sulfanil) butano-2,3-diol

PMSF - Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RPM – Revoluciones por minuto

MWCO – Corte del peso molecular (Molecula weight cut off)

HEPES - Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazina-metanosulfónico

MES - Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato

Resumen

El presente estudio se centra en la optimización del procedimiento del laboratorio en cuestión para purificar las proteasas TEV y SENP2 mediante técnicas cromatográficas. Para llevar a cabo el estudio, se han analizado los protocolos existentes y se han incluido modificaciones en etapas concretas. En el caso de TEV se ha demostrado que el aumento de imidazol en la cromatografía de afinidad ayuda a la elución de la proteasa, así como añadir una etapa de cromatografía de exclusión por tamaño después de la cromatografía de intercambio iónico resulta en una proteasa mucho más limpia. En el caso de SENP2 se ha demostrado que trabajar con una columna Hitrap SP HP 5 mL en vez de una columna Hitrap Q HP 5 mL ayuda a que la proteasa se una a la columna y se obtengan fracciones más abundantes. Además, se ha confirmado que las modificaciones aplicadas no afectan a la actividad de las proteasas en estudio.

1. Introducción

La purificación de proteínas es un proceso que cuenta con varias etapas para conseguir la proteína lo más pura posible¹. Una de las formas de purificar proteínas, es mediante la adición de una etiqueta o tag. Diseñamos la proteína de forma que tenga una etiqueta o un tag al final. Los tags son importantes para aumentar la solubilidad, permitir la purificación estandarizada y mejorar la detección de las proteínas recombinantes, además de para aumentar la especificidad en la captura de la proteína de interés. También pueden aumentar el rendimiento de la proteína y facilitar su pliegue². Hay una amplia gama de tags que se pueden elegir a la hora de purificar proteínas, y hoy en día la mayoría de proteínas recombinantes se purifican utilizando tags de afinidad³. El tag se elige teniendo en cuenta las particularidades de cada proteína, así se podría elegir un tag más simple (HIS) o uno que ayude a la solubilidad y expresión de proteínas recombinantes (GST), entre otros⁴. El tag de hexahistidinas es probablemente el más utilizado³, el cual contiene 6 histidinas en los terminales C o N de la proteína diana⁵.

1.1. IMAC

La adición del HISTag es una forma simple de generar una nueva afinidad por los iones metálicos, lo que hace posible la purificación en un solo paso mediante el uso de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). En comparación con otros métodos, IMAC tiene la ventaja de tener una mayor capacidad de unión y estabilidad del ligando, bajo coste y condiciones de elución suaves⁶.

La fase estacionaria de IMAC está compuesta por un soporte de agarosa, celulosa, sefarosa o sílica al que se le han unido covalentemente grupos quelante, como puede ser el NTA, que actúan como ligando de los iones metálicos. Los metales que se utilizan suelen ser Ni^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ca^{+2} , Co^{+2} o Fe^{+2} . La proteína se etiqueta previamente con una cola de histidinas en su extremo N o C terminal que permite su unión específica a la fase estacionaria que contiene el ión metálico y forma un complejo de coordinación con los componentes de la fase estacionaria y el grupo imidazol de los residuos de la cola de histidinas (Figura 1).

La reacción de unión con la proteína target depende del pH, y una forma de trabajar consiste en disminuir el pH del medio ya que de esta forma se protona el átomo de nitrógeno presente en las histidinas y se rompe el enlace de coordinación con el metal de transición. Sin embargo, reducir mucho el pH puede afectar a la proteína, ya que podría perder su configuración

tridimensional. Otra forma de trabajar, la que se lleva a cabo en este proyecto, es aumentando considerablemente la cantidad de imidazol en el tampón de elución. Así, el imidazol compite con las histidinas desplazándolas del complejo metálico⁷.

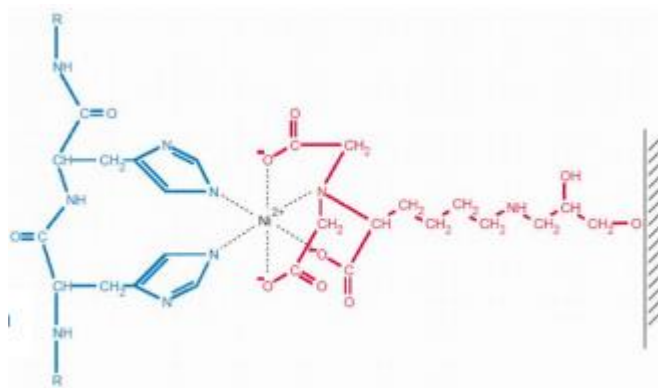


Figura 1. Proteína etiqueta con histidinas unida al ligando de Ni.

Hay algunos casos en los que la cola de fusión puede interferir en la actividad de la proteína. Cuando esto ocurre, es necesario eliminar los tags para obtener proteínas libre de cola. Este proceso se lleva a cabo utilizando proteasas⁸. En este trabajo, las proteasas que se van a utilizar son el TEV Y SENP2.

1.2. TEV

En biotecnología, la proteasa de 27 KDa TEV de *Tobacco Etch Virus* es una de las más utilizadas por su especificidad⁹. Esta proteasa, es activa de 4 a 34°C y en un rango de pH de 6 a 8. Por sus características se ha vuelto muy popular a la hora de eliminar tags de proteínas recombinantes¹⁰. La proteasa TEV es atractiva ya que puede expresarse y purificarse fácilmente en el laboratorio, lo cual hace que sea rentable¹¹. La secuencia de reconocimiento de TEV tiene una longitud de sólo 7 aminoácidos: EXXYXQ-S/G (donde X puede ser cualquier aminoácido) y la unión ocurre entre los residuos de aminoácidos Q y G/S¹². La secuencia óptima de reconocimiento es ENLYFQG¹³ y el TEV gracias a que es extremadamente selectiva se une a este sustrato con alta especificidad¹⁴. Se utiliza mucho en pasos de purificación para separar las proteínas de los tags de afinidad¹⁵.

1.3. SENP2

SENP2 (proteasa 2 específica de Sentrin) es parte de la familia SENP. En humanos se identifican 6 SENP SUMO-específicas que son SENP 1, 2, 3, 5, 6 y 7. Éstas, se categorizan en 3 subfamilias independientes: SENP1 y SENP2, SENP3 y SENP5 y finalmente SENP6 y SENP7¹⁶.

La modificación covalente de proteínas mediante la adición de pequeñas proteínas llamadas SUMO es un proceso reversible llamado sumoilación. La eliminación de SUMO, también conocido como desumoilación es mediado por las proteasas SENP¹⁷.

Entre las funciones de SENP2, se encuentran la regulación del desarrollo embrionario, del metabolismo de ácidos grasos o enfermedades neurodegenerativas¹⁸.

1.4. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se basa en la carga de las moléculas para la separación de las proteínas. El punto isoeléctrico de una molécula (pI), es el pH al que éste tiene carga 0. Cuando se trabaja a un pH debajo del pI, la biomolécula estará cargada positivamente, y se unirá a un intercambiador catiónico (SP) mientras que cuando se trabaja a un pH superior al pI la biomolécula estará cargada negativamente, y se unirá a un intercambiador aniónico (Q), como se muestra en la siguiente figura.

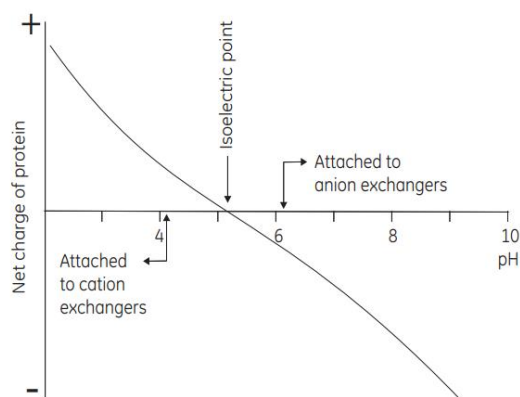


Figura 2. Cargas de las proteínas en función de su pH.

Para preparar la muestra de intercambio iónico, es necesario el uso de un loop donde se carga la muestra. El laboratorio dispone de un loop de 50 mL y un superloop de 150 mL donde se añade la proteína y si fuera necesario el volumen correspondiente de tampón A, para de esta forma bajar la cantidad de sal a la muestra. Cuando la muestra se inyecta en la columna, el émbolo se mueve hacia abajo. Cuando alcanza la posición inferior, el aumento de presión hace que la válvula se abra y que el tampón pase a través de la válvula. Uno de los métodos para la elución de las proteínas es trabajar en un gradiente de pH¹⁹. Como las proteínas son inestables en su pI y tienden a precipitar, no se va a utilizar este método. En su lugar, se trabajará en un gradiente de sal, aumentando gradualmente la composición de sal de la fase móvil (tampón B). De esta forma al aumentar la fuerza iónica, las macromoléculas de la muestra se irán desplazando de acuerdo con la fuerza de unión: las proteínas de mayor carga se retendrán con

mayor fuerza mientras las de menor carga eluirán con mayor velocidad²⁰. La Figura 3 muestra el equipo cromatográfico utilizado en el trabajo.



Figura 3. Equipo de cromatografía Äkta con columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP 5 mL.

1.5. Cromatografía de exclusión por tamaño/Gel filtración

La cromatografía de exclusión por tamaño es ampliamente utilizada para la purificar proteínas y estudiar su peso molecular²¹. Se utiliza para separar moléculas dependiendo de sus diferencias de tamaño y no sus propiedades químicas²².

Normalmente, las moléculas de mayor tamaño suelen ser primeras en eluir ya que las moléculas pequeñas penetran en el poro de la fase estacionaria y tardan más en eluirse. Sin embargo, en el caso de las proteínas, aunque la mayoría tienen una estructura compacta, algunas son cilíndricas, y su estructura puede afectar al orden de elución²³ (Figura 4. Proteína con estructura compacta (izquierda), proteína con estructura cilíndrica (derecha). ya que las proteínas se separan en base a su radio de Stokes. El radio de Stokes es una función de la masa y la forma moleculares. Una molécula cilíndrica ocupa mayor volumen que una molécula de estructura compacta (esférica) de la misma masa. Por tanto, un proteína cilíndrica tendrá un mayor radio de Stokes y saldrá antes que una proteína compacta²⁴.

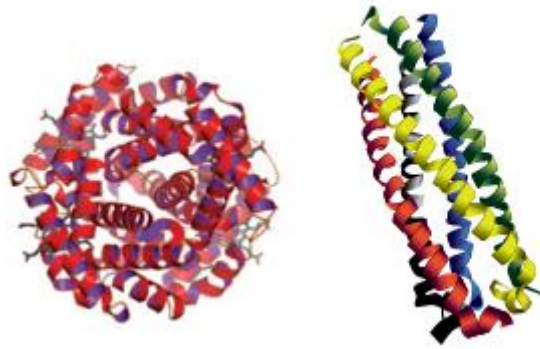


Figura 4. Proteína con estructura compacta (izquierda), proteína con estructura cilíndrica (derecha).

Para esta cromatografía es necesario concentrar la proteína obtenida en la cromatografía de intercambio iónico ya que al pasar la muestra por la columna, ésta se dispersa y si la dispersión es muy grande, se pierde resolución. Para una buena resolución, lo recomendable es que el volumen de muestra sea menor al 5% del volumen total de la columna. En este caso, el loop utilizado contiene 5 mL. Para concentrar las proteasas, se utilizan concentradores de 10000 MWCO (el tamaño del poro de la molécula debe de ser menor al peso molecular de la proteasa) ya que los pesos moleculares son 25000 (SENP2) y 27000 (TEV) Da.

1.6. SDS-PAGE

SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) es una técnica de electroforesis ampliamente utilizada para la separación, identificación y caracterización de proteínas de acuerdo con su movilidad electroforética. Las moléculas se desnaturalizan y pierden su estructura tridimensional gracias al SDS (dodecilsulfato sódico). El gel puede estar compuesto por diferente porcentaje de poliacrilamida. Este porcentaje depende del tamaño de la proteína, así, geles con un alto porcentaje de poliacrilamida, 10-15%, son adecuados para proteínas de pequeño tamaño (menores de 50 KDa), mientras que los geles con un porcentaje menor al 10% de poliacrilamida son utilizados en proteínas de mayor tamaño.

El gel se inserta en un cubeto con un tampón químico al que se le aplica un voltaje eléctrico lo cual provoca que las proteínas con carga negativa migren a través del gel al ánodo. Las proteínas de menor tamaño serán las primeras en migrar, mientras a las de mayor tamaño les costará más tiempo. Para la visualización de las proteínas en el gel, uno de los reactivos más utilizados es el azul de Coomassie²⁵ (Figura 5).

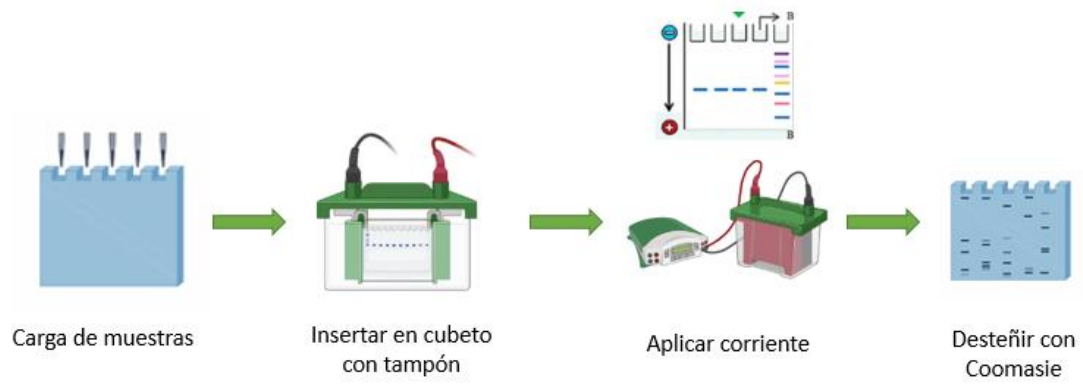


Figura 5. Funcionamiento del SDS-PAGE.

2. Objetivo

El objetivo principal del trabajo ha sido la optimización del procedimiento de purificación de las proteasas TEV y SENP2 mediante técnicas cromatográficas.

Para el desarrollo del objetivo se han analizado los protocolos existentes en el laboratorio y se han incluido modificaciones en etapas concretas que han mejorado tanto el rendimiento como la pureza de las enzimas. También se ha confirmado que la actividad enzimática de TEV y SENP2 no se ha visto afectada con los cambios implementados.

3. Materiales y métodos

Los plásmidos de TEV y SENP2 utilizados en este trabajo fueron cedidos por el laboratorio de James H. Hurley (University of California, Berkeley) y María Lucas (Universidad de Cantabria).

Para el crecimiento de las proteínas se empleó el medio de cultivo Luria-Bertani (LB) de Melford.

Los antibióticos empleados fueron ampicilina y kanamicina de la marca Goldbio, y para la inducción de los medios de cultivo se utilizó IPTG también de la marca Goldbio. Todos fueron almacenados a -19°C.

Para la purificación de las proteínas se empleó la resina de Ni-NTA Agarosa que se obtuvo de Protino®. Los reactivos utilizados fueron Trizma base >99.9% de Sigma Aldrich, ácido clorhídrico 37% de Fisher Chemical, cloruro de sodio >99.5% de Fisher Chemical, Imidazol 99% de Alfa Aesar, Glicerol 99.5% de Fisher bioreagents y DTT de Goldbio. También se utilizaron DNAsas, PMSF, y benzamidina de Sigma Aldrich. Las membranas para diálisis fueron SnakeSkin Dialysis tubing 10.000 MWCO de Thermo Scientific.

Se prepararon disoluciones stock de 1M TRIS-HCl, 1M imidazol y 5M NaCl disolviendo la cantidad apropiada de reactivo en agua Milli-Q. En el caso de TRIS-HCl, se ajustó el pH con HCl a 7,5 y a 8.

Los equipos utilizados fueron los siguientes: sistema cromatográfico ÄKTA de Thermo Scientific. Autoclave S1000 de Matachana, disruptor celular Constant Cell Disruptor Systems, sonicador Vibra cell sonics, nanodrop ND-1000 Spectrophotometer de Deyman, incubadores Innova 44 incubator shaker series de New Brunswick Scientific, Certomat BS-T de Sartorius y Excella E24 de Incubator Shake Series, termobloque VWR de Analog heatblock, cubeta para electroforesis Mini-Protean tetra cell y centrifuga Allegra X-22R Centrifuge de Beckman coulter.

4. Procedimiento experimental

4.1. Expresión de proteínas

El primer paso de este estudio biológico es la obtención de las proteasas de interés. Para ello, se realiza una clonación introduciendo la secuencia de aminoácidos de la proteasa en un DNA plasmídico (vector de clonación) que presenta resistencia a un antibiótico: ampicilina en el caso de TEV, y kanamicina en el caso de SENP2. De esta forma sólo crecen las bacterias transformadas con los plásmidos seleccionados que son resistentes al antibiótico. En este caso se parte de un glicerol que actúa como crioprotector y conserva dichas bacterias con el medio de cultivo y el antibiótico. En primer lugar, se realiza la expresión a pequeña escala para comprobar la solubilidad y niveles de expresión, antes de pasar a la purificación a gran escala.

Para la expresión a gran escala, se pesan 50 g de LB en matraces de 5L al que se le añaden 2L de agua destilada y se esterilizan en el autoclave. A esto se le añaden 20 mL de un preinóculo de *Escherichia Coli* (BL21) que se transforma previamente en el vector de interés y con el antibiótico correspondiente (1000X) y se incuba a 37°C unas 3 horas, hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,6-0,8. A continuación se inducen añadiendo 1 mL IPTG y se dejan toda la noche incubando a 18°C. Al día siguiente, se hace una prueba de bacteriófagos (virus que infectan y multiplican en la bacteria, llevando a la destrucción de la célula) en placas sólidas y blandas de agar, y si la prueba es negativa, los medios de cultivo se centrifugan en un rotor 8.1000 a 5500 rpm durante 15 minutos y se recogen los pellet en tubos falcon, los cuales se conservan a -80°C hasta su utilización (Figura 6).

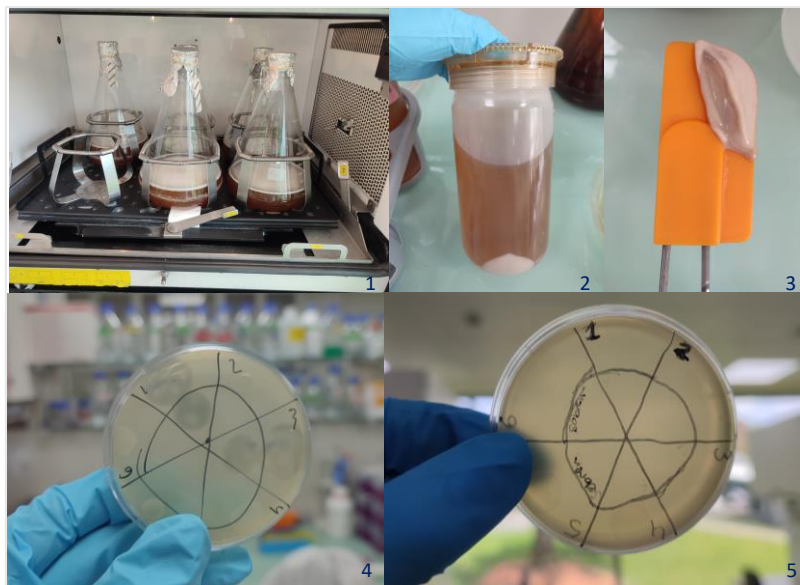


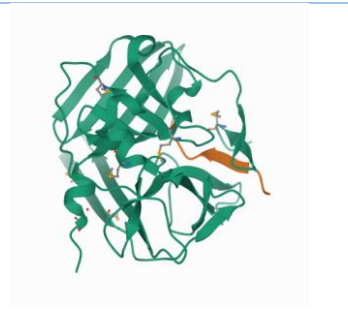
Figura 6. 1. Matraces en incubadora con medio LB, colonias y antibiótico. 2. Medios de cultivo después de centrifugar. 3. Pellet de bacterias. 4. Test de bacteriófagos positivo. 5. Test de bacteriófagos negativo.

4.2. Purificación de proteínas

En el presente apartado se detallan los procedimientos seguidos por el laboratorio para la purificación de las proteasas TEV y SENP2 y los cambios propuestos que podrían mejorar y optimizar dichos procedimientos. La Tabla 1 y Tabla 2 muestran características de cada proteasa.

4.2.1. TEV

Tabla 1. Características de la proteasa TEV.

| | | |
|---|------------|---|
| Proteasa: | TEV |  |
| Peso molecular (KDa): | 27 | |
| Punto isoeléctrico: | 9,10 | |
| Volumen inicial de cultivo bacteriano (L): | 4 | |
| Método de lisis: | Sonicación | |

El procedimiento que se sigue para la purificación de TEV según el laboratorio, es el siguiente.

El pellet de 4L crecido a partir del glicerol en BL21 se disuelve en 100 mL de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 20 mM imidazol, 1 mM DTT, pH 8) al que se le añaden inhibidores de proteasas para evitar la degradación de la proteína, y DNAsas para romper los enlaces fosfodiéster del DNA y reducir así la viscosidad de la muestra. La muestra se sonica para romper las células realizando 12 pulsos de 10 segundos a una amplitud del 60%, dejándolo 59 segundos en “off”. El lisado se centrifuga durante 40 minutos en un rotor 25.50 a 22500 rpm a 4°C y se recoge la fracción soluble.

A continuación, se realiza una cromatografía de afinidad de níquel. Para ello, se añaden unos 10 mL de resina Ni-NTA a una columna vacía que se acondiciona lavándola con agua destilada, 1M de imidazol para eliminar el exceso de iones de Ni⁺² libres, otra vez agua destilada para eliminar cualquier resto de imidazol que haya podido quedar y finalmente tampón de lisis. La resina se recoge en un bote junto con la muestra, la cual se mantiene en agitación durante una hora a 4°C para que se produzca la interacción por afinidad. Pasada la hora, el contenido se vuelca en la resina vacía y todo lo que no se pega “flowthrough” se recoge en un vaso de precipitado. Seguidamente se lava la resina con 400 mL de tampón de lisis, para eliminar impurezas, y a continuación con 50 mL de tampón de lavado, para bajarle la cantidad de sal (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5). La muestra se eluye con 100 mL de tampón de elución (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 10% glicerol, 1 mM DTT,

pH 7,5) donde se aumenta la cantidad de imidazol para eluir la muestra de la resina, y se pasa a la cromatografía de intercambio iónico.



Figura 7. Esquema del procedimiento para la purificación de TEV.

Los experimentos de intercambio iónico se llevan a cabo en el ÄKTA con un detector de UV, columna HiTrap SP HP 5 ml (GE, Healthcare) y un flujo constante de 5 ml/min. El análisis espectroscópico se lleva a cabo a 280 nm y se trabaja en un gradiente de sal aumentando la concentración del tampón B de la siguiente manera: 15 VC 0-50% B, 5 VC 50-100% B y 2 VC 100% B.

Previo al análisis, el equipo es equilibrado para dejarlo en las condiciones iniciales en las que se va a llevar a cabo la separación. Para ello se utilizan 20 ml de tampón A (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 20% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5), 20 ml de tampón B (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 20% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5) y otra vez 20 ml de tampón A.

Para la inyección de la muestra, se prepara un superloop de 150 mL donde se cargan los 100 mL obtenidos de muestra tras eluirla. Al termina la separación se toman las fracciones

pertenecientes al pico de la proteasa que se han recogido en un rack de 96 pocillos para correrlas en un gel SDS-PAGE con el objetivo de identificar y seleccionar las fracciones más limpias y abundantes para guardarlas. Las fracciones seleccionadas se juntan y su absorbancia se mide en el nanodrop. Se calcula la concentración y la muestra se reparte en alíquotas de 500 μ L.

El “flowthrough” obtenido, se dializa toda la noche para bajarle la sal. Para ello se utiliza una membrana de 10 KDa, donde se añade la proteasa (tampón diálisis: 50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 20% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5). La Figura 7 muestra un esquema del procedimiento. Al día siguiente se mide la absorbancia en el nanodrop, se calcula la concentración y la muestra se reparte en alíquotas de 500 μ L.

La concentración de las proteínas se obtiene con la ley de Lambert-Beer.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde $A = \text{Absorbancia}$

$\varepsilon = \text{coeficiente de extinción molar}$

$l = \text{longitud de celda}$

$c = \text{Concentración}$

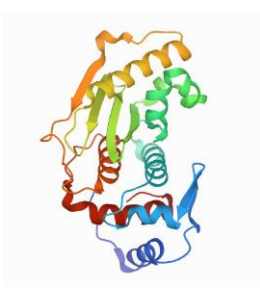
El coeficiente de extinción molar se consigue introduciendo la secuencia de la proteína en el programa ProtParam. La longitud de la celda se considera 1. Por tanto:

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Abs}_{\lambda=280 \text{ nm}}}{\varepsilon}$$

Para intentar optimizar este procedimiento, se sugiere probar a utilizar un tampón diferente ya que se está trabajando en intercambio catiónico, por tanto, utilizar un tampón cuyo contraión sean cationes y no aniones como en el caso de TRIS.

4.2.2. SENP2

Tabla 2. Características de la proteasa SENP2.

| | | |
|---|-------------------|---|
| Proteasa: | SENP2 |  |
| Peso molecular (KDa): | 25 | |
| Punto isoeléctrico: | 9,03 | |
| Volumen inicial de cultivo bacteriano (L): | 4 | |
| Método de lisis: | Disruptor celular | |

El procedimiento para la purificación de SENP2 seguido en el laboratorio, es el siguiente:

El pellet de 4L crecido a partir del glicerol en BL21 se disuelve en 150 mL de tampón de lisis (20 mM Tris-HCl, 350 mM NaCl, 20 mM imidazol y 1 mM DTT, pH 8). Este se pasa por el disruptor celular, el cual tiene la misma función que el sonicador, es decir, romper partes de la pared celular o célula completa para liberar moléculas biológicas, y después se le añaden inhibidores de proteasas para evitar la degradación de la proteína, y DNAsas para romper los enlaces fosfodiéster del DNA y reducir así la viscosidad de la muestra. El lisado se centrifuga durante 40 minutos en el rotor 25.50 a 22500 rpm a 4°C y se recoge la fracción soluble.

A continuación, se realiza una cromatografía de afinidad de níquel. Para ello, se añaden unos 4 mL de resina Ni-NTA a una columna vacía que se acondiciona lavándola con agua destilada, 1M de imidazol para eliminar el exceso de iones de Ni⁺² libres, otra vez agua destilada para eliminar cualquier resto de imidazol que haya podido quedar y finalmente tampón de lisis. La resina se recoge en un bote junto con la muestra, la cual se mantiene en agitación durante una hora a 4°C para que se produzca la interacción por afinidad. Pasada la hora, el contenido se vuelca en la resina vacía y todo lo que no se pega “flowthrough” se recoge en un vaso de precipitado. Seguidamente se lava la resina con 200 mL de tampón de lisis, para eliminar impurezas. La muestra se eluye con 30 mL de tampón de elución (20 mM Tris-HCl, 350 mM NaCl, 400 mM Imidazol, 1 mM DTT, pH 8) donde se aumenta la cantidad de imidazol para eluir la muestra de la resina, y se pasa a la cromatografía de intercambio iónico.

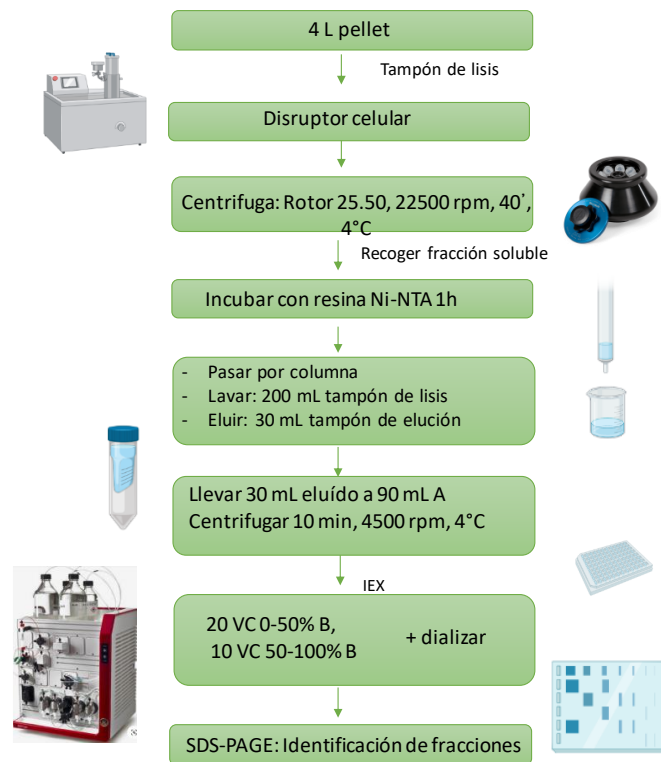


Figura 8. Esquema del procedimiento para la purificación de SENP2.

En el caso de SENP2 también tiene un pI teórico de 9,03 tampoco permite trabajar en intercambio aniónico. Se trabaja en intercambio catiónico, pero en este caso, con una columna de intercambio aniónico. Por tanto, la proteína no se une a la columna y se recoge en el “flowthrough”.

Las cromatografías se llevan a cabo en el ÄKTA con un detector de UV y con la columna HiTrap Q HP 5 ml (GE, Healthcare) con un flujo constante de 5 ml/min. El análisis espectroscópico se lleva a cabo a 280 nm y se trabaja en un gradiente de sal aumentando la concentración del tampón B de la siguiente manera: 20 VC 0-50% B, 10 VC 50-100% B.

El equipo se equilibra previamente para dejarlo en las condiciones iniciales en las que se va a llevar a cabo la separación. Para ello se utilizan 20 ml de tampón A (25 mM Tris-HCl 8, 1 mM DTT, pH 8), 20 ml de tampón B (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM DTT, pH 8) y otra vez 20 ml de tampón A.

Para la inyección de la muestra, los 30 ml obtenidos tras eluir el SENP2 se llevan a 90 ml con el tampón A para bajarle la sal. La muestra precipita y se centrifuga 10 minutos a 4500 rpm a 4°C. Una vez centrifugada, se carga en el superloop y se inyecta en el sistema cromatográfico. Como la proteasa aparece en el flowthrough, ésta se recoge y se dializa toda la noche con una membrana de 10 kDa a 4°C (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5). La

Figura 8 muestra un esquema del procedimiento. Al día siguiente la muestra se concentra en concentradores de 10000 MWCO y la absorbancia se mide en el nanodrop. La proteína se reparte en aliquotas de 500 μ L.

Con el objetivo de intentar optimizar el procedimiento de SENP2 ya que se está trabajando por debajo del pI y la proteasa estará cargada negativamente se propone trabajar en intercambio catiónico en vez de intercambio aniónico, por lo tanto, utilizando una columna HiTrap SP HP 5 ml. Además, también se propone trabajar a pH 7,5 para estar aún más lejos del punto isoeléctrico.

4.3. Confirmación de las proteasas mediante SDS-PAGE

La visualización e identificación de las fracciones en las que está presente la proteasa se hace mediante electroforesis SDS-PAGE al 12 o 15%. En las diferentes etapas de la purificación (lavado, elución, diálisis...) se recogen aliquotas que posteriormente se cargan en geles de poliacrilamida en un Mini-Proteom Tetra Cell (Bio Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) y la electroforesis es llevada a cabo a 240 V durante unos 50 minutos. Al finalizar, los geles son teñidos con azul de Coomassie para su visualización. La banda de la proteasa debe aparecer a la altura del peso molecular de éste, es decir 27 KDa en el caso de TEV y 25 KDa en el caso de SENP2. Con esta técnica además de confirmar que se trata de la proteasa de interés, se puede observar si queda alguna impureza.

5. Resultados y discusión

5.1. TEV

Se ha llevado a cabo el procedimiento del laboratorio para la purificación de TEV. Los resultados obtenidos no muestran el rendimiento esperado y por ese motivo se vuelve a realizar el mismo procedimiento de nuevo por descartar que haya habido algún fallo durante su ejecución. De nuevo, se obtiene un mal rendimiento con una baja concentración de TEV (0,3 mg/mL). El gel SDS-PAGE (Figura 10) muestra en la calle 8 cómo la fracción R2 (la resina después de eluir), contiene prácticamente la misma cantidad de TEV que en la calle 6, resina antes de eluir. Por lo tanto, por algún motivo mucha proteasa no se ha despegado de la resina. Además, en las calles 10 y 11, fracciones del “flowthrough” del intercambio iónico, también se puede observar que queda parte de TEV que no se ha unido a la columna. Estas fracciones que se recogen y se dializan toda la noche, también se miden en el nanodrop, pero su concentración resulta ser aún menor y no se guardan. El cromatograma obtenido se muestra a continuación.

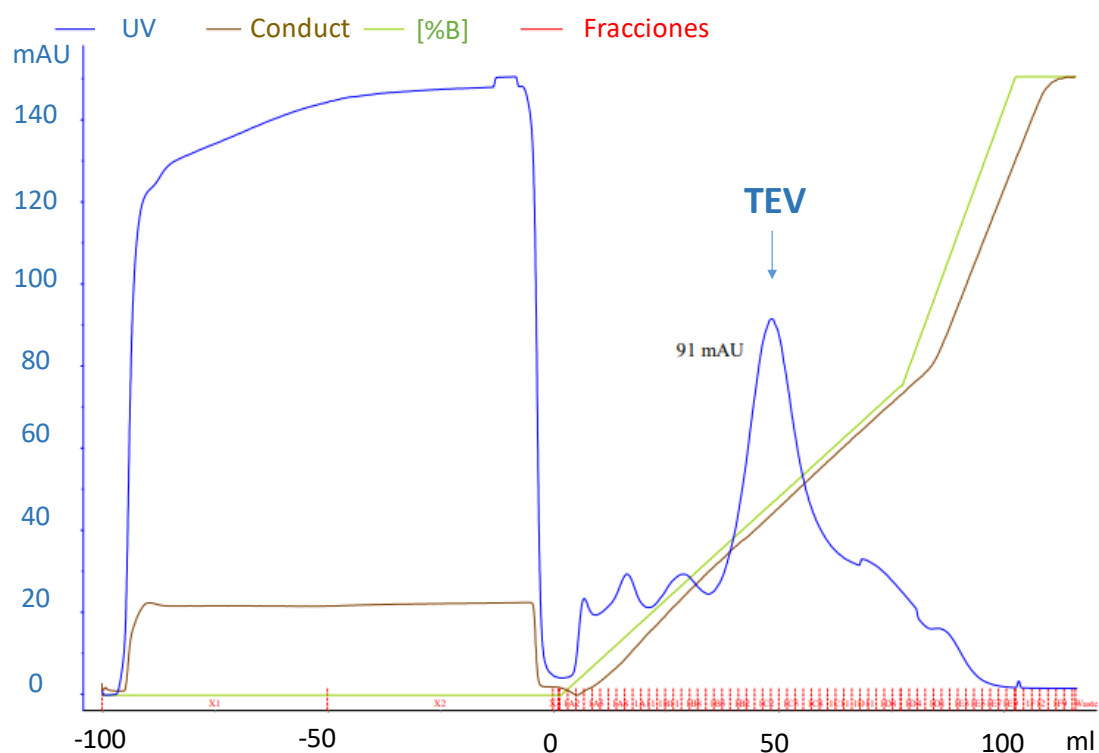


Figura 9. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV siguiendo el procedimiento del laboratorio.

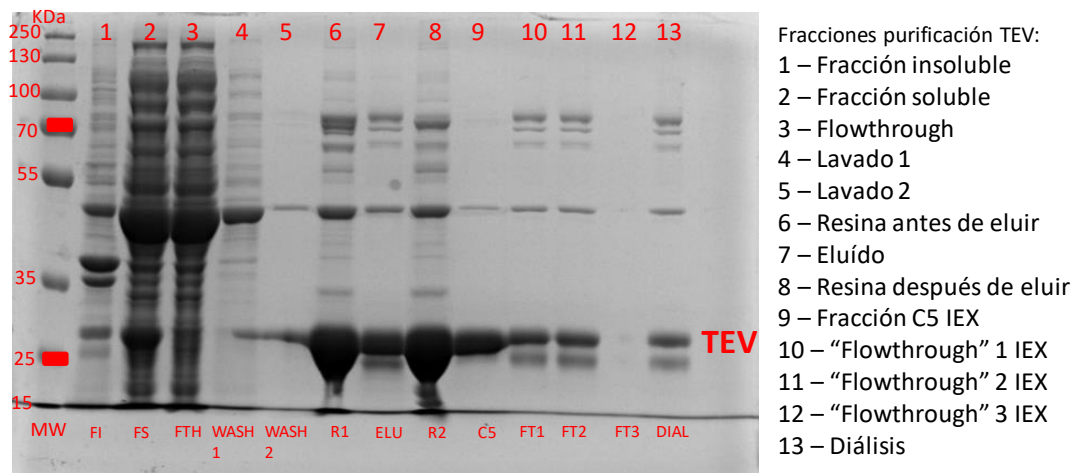


Figura 10. Gel SDS-PAGE obtenido para la purificación de TEV siguiendo el procedimiento del laboratorio.

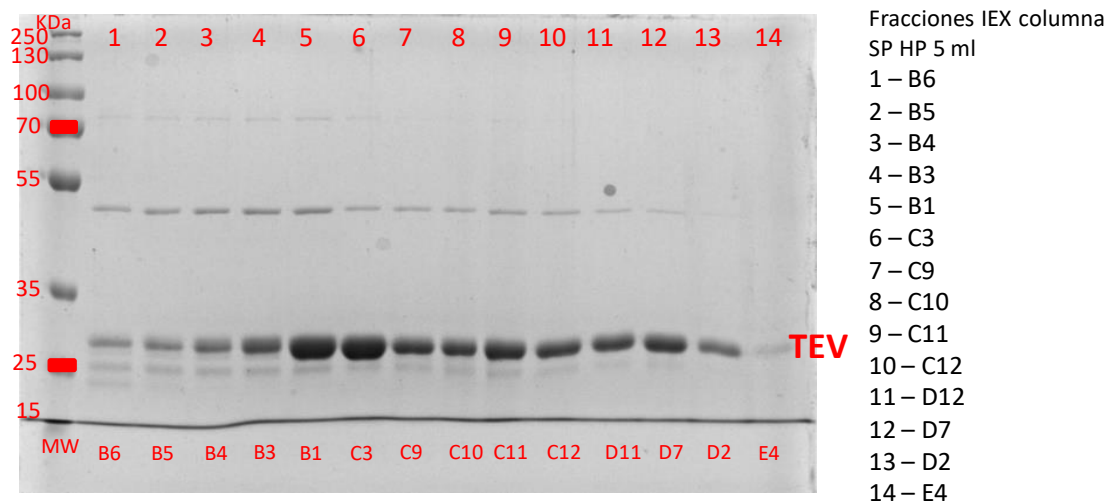


Figura 11. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL siguiendo el procedimiento del laboratorio.

CAMBIO 1: De acuerdo con estos resultados, el primer cambio que se le introduce al TEV es aumentar la cantidad de imidazol a 500 mM en el tampón de elución para intentar despegar la proteasa de la resina. Al aplicarse el CAMBIO 1, el aumento de imidazol, el rendimiento mejora considerablemente, y se obtienen 1,65 mg/mL de TEV. Respecto al “flowthrough” se puede observar en el cromatograma (Figura 12) que todavía hay parte de TEV que no se está pegando a la columna. Como también se obtiene TEV en el “flowthrough” en este caso se vuelve a medir en el nanodrop después de haberlo dializado. De nuevo la concentración obtenida es muy baja y a partir de aquí se considera que no merece la pena guardar el “flowthrough”.

La Figura 13 muestra las fracciones de TEV obtenidas en el intercambio catiónico donde se observan varias impurezas, que son mínimas en comparación con la cantidad de proteasa obtenida. También se observa que la cantidad de TEV obtenida tras en CAMBIO 1 es bastante superior al procedimiento original del laboratorio (Figura 11).

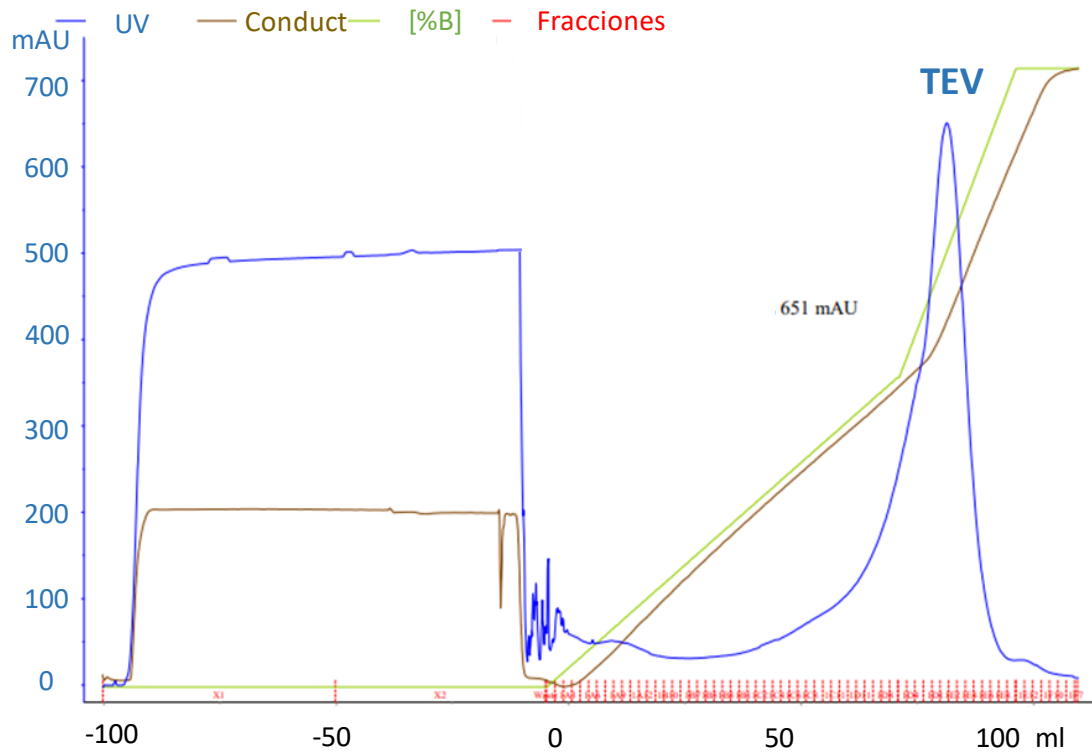


Figura 12. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO1.

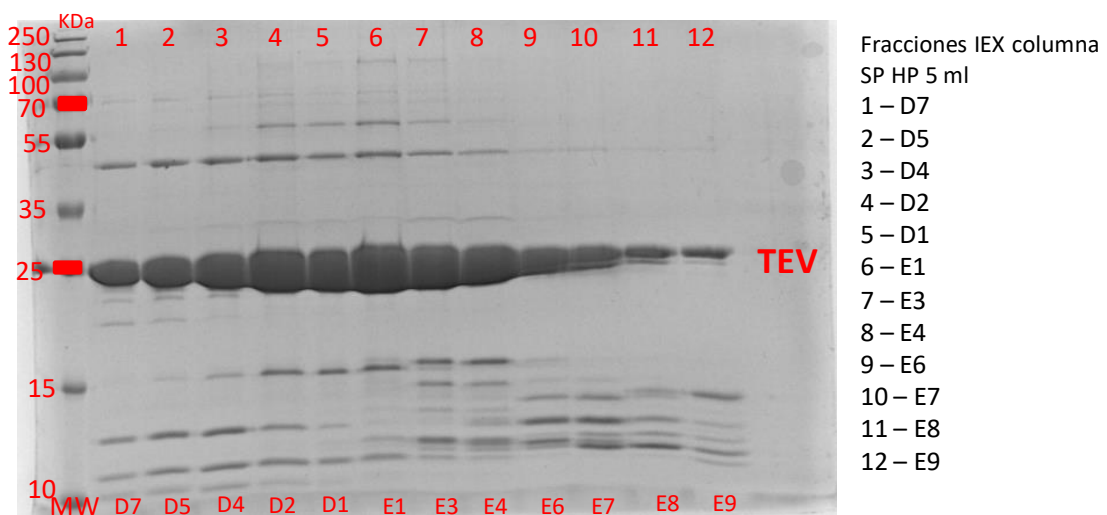


Figura 13. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 1.

CAMBIO 2: En el siguiente cambio, se lleva a cabo el cambio mencionado en el apartado anterior, donde se cambia el tampón TRIS por otro tampón cuyo contraión sean cationes (ya que estamos trabajando en intercambio catiónico) y así ver si se consigue pegar la proteína que se pierde en el “flowthrough” y mejorar la purificación. Las opciones disponibles en el laboratorio son MES, fosfato y HEPES (Tabla 3).

Tabla 3. Tampones para cromatografía de intercambio catiónico.

| Intervalo de pH | Tampón | Conc. (mM) | Contraión | pKa (25°C) |
|-----------------|---------|------------|-----------------------------------|------------|
| 5,5-6,6 | MES | 50 | Na ⁺ o Li ⁺ | 6,27 |
| 6,7-7,7 | Fosfato | 50 | Na ⁺ | 7,20 |
| 7,0-8,0 | HEPES | 50 | Na ⁺ o Li ⁺ | 7,56 |

Las histidinas se desprotonan a pH superior a 7 y se unen a metales, por tanto, nos interesa trabajar en ese rango para que estas se unan al níquel en la cromatografía de afinidad. El his-tag para unirse a la resina suele trabajar a un pH de 7,5-8, y por ello, MES queda fuera del intervalo requerido. Teniendo en cuenta que se ha encontrado más información de tampón fosfato en la bibliografía, se prueba trabajar con este tampón.

En este caso hay que trabajar a 3 mL/min en vez de 5 mL/min por problemas de presión, así que otro cambio que se le aplica es una presión más baja, para ver si el TEV se consigue pegar del todo. El cromatograma se puede observar en la Figura 14 y la concentración obtenida al final es de 1,39 mg/mL. Se comprueba una vez más que parte de la proteasa no termina de pegarse a la columna y que todavía sigue perdiéndose en el “flowthrough”. Aún así, se obtiene mucha cantidad de proteasa (Figura 15). El TEV contiene algunas impurezas, pero son mínimas en comparación con la cantidad de proteasa que se obtiene.

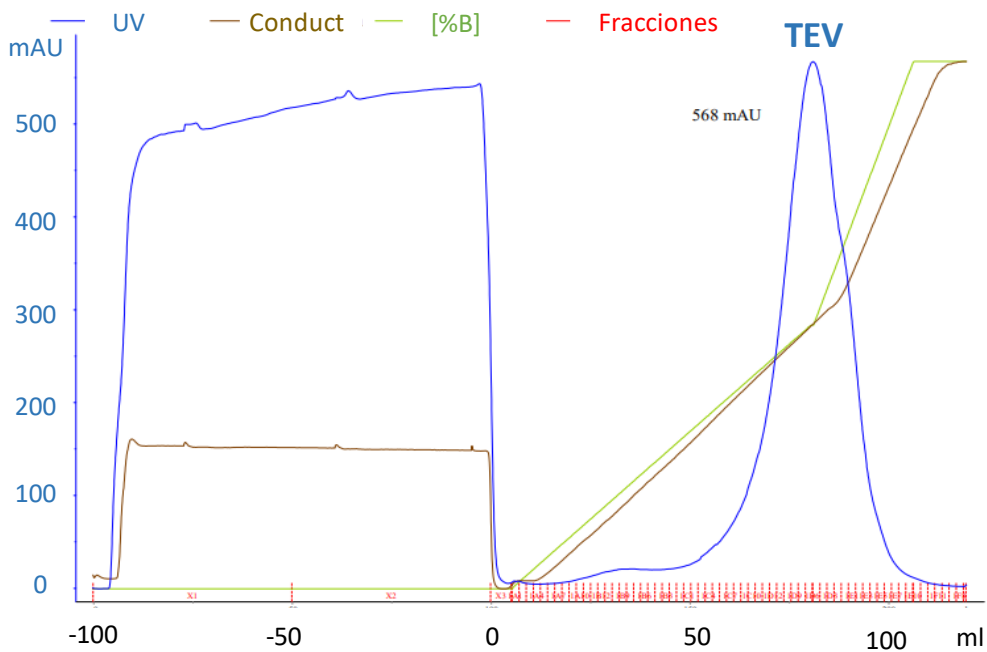


Figura 14. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO2.

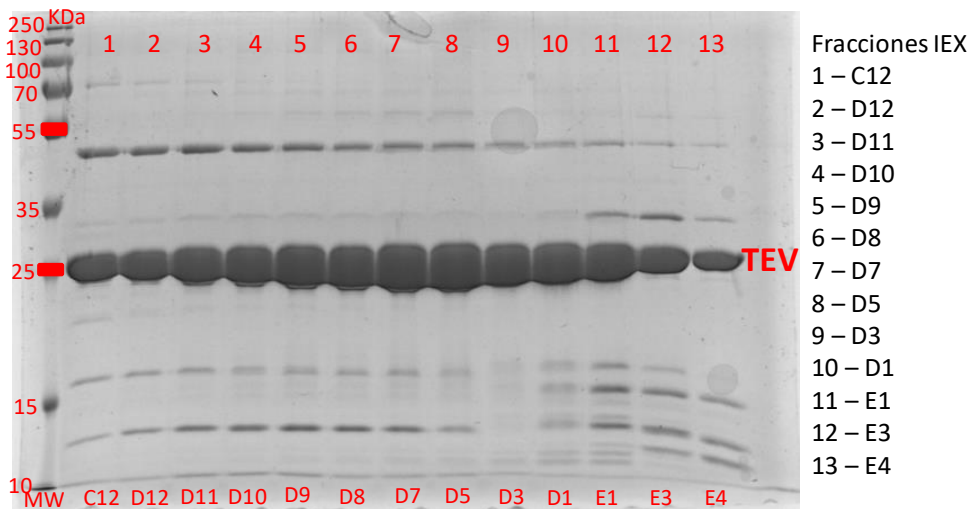


Figura 15. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 2.

CAMBIO 3: Tras los resultados obtenidos, se prueba a hacer nuevos cambios. Sin embargo, en el siguiente intento, para poder hacer más pruebas partiendo del mismo pellet, la proteasa se divide en tres después de eluirla en la cromatografía de afinidad. Como en todos los procedimientos anteriores, la muestra se eluye con 100 mL de tampón, y en este paso se hacen 3 alíquotas de 33 mL para aplicarle un cambio a cada una. Algo que se ha observado hasta ahora es que la conductividad del “flowthrough” está bastante cerca de la conductividad a la que

empieza a salir el TEV. Por ello, en los siguientes tres intentos se prueba a bajar la conductividad del “flowthrough” para ver si el TEV que se pierde en él se consigue pegar a la columna.

CAMBIO 3.1: En la primera prueba, se baja la cantidad de imidazol con la que se va a trabajar en el intercambio iónico. Al eluir el TEV en la cromatografía de afinidad, la muestra viene con 500 mM de imidazol (cantidad del tampón de elución). Para bajar esta cantidad, los 33 mL de muestra se llevan a 150 mL con el tampón A del intercambio iónico. Se consigue bajar la conductividad (Figura 16), pero la concentración obtenida de TEV resulta ser muy baja (Figura 17).

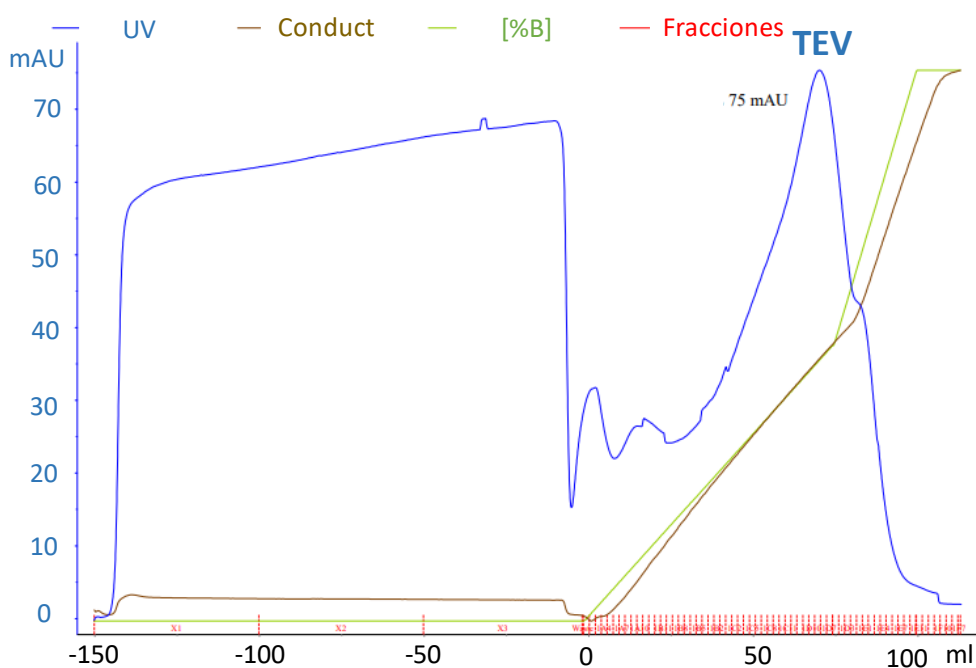


Figura 16. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO3.1.

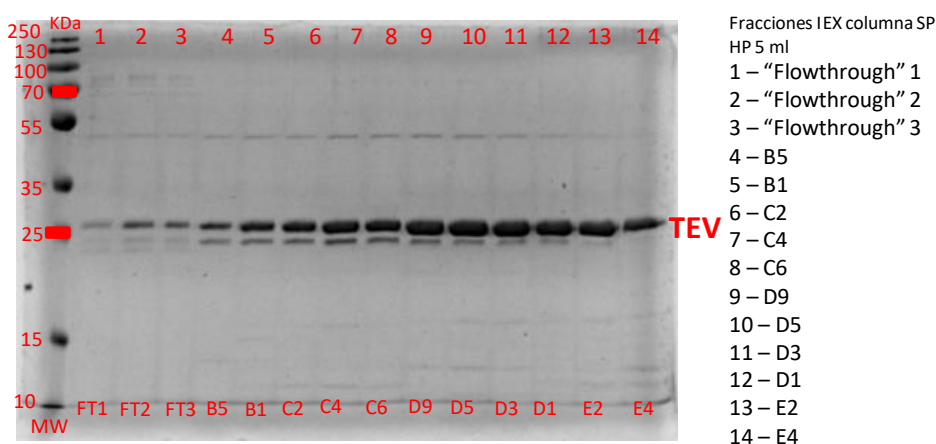


Figura 17. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 3.1.

CAMBIO 3.2: En el segundo cambio, se prueba a bajar la cantidad de sal con la que partir en el intercambio iónico. Es verdad que la cantidad de sal del tampón con el que se eluye el TEV es sólo 50 mM, pero aun así, los 33 mL de muestra se llevan a 150 mL con el tampón A del intercambio iónico, y de este modo se parte de 11 mM de sal al comienzo del intercambio iónico. En este caso, el tampón A también se modifica, y se utiliza un tampón sin sal (50 mM TRIS-HCl, 20 % glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5). En el CAMBIO 3.2, al igual que en el 3.1 la concentración obtenida de TEV resulta ser muy baja (Figura 19) y se obtiene un pico poco definido (Figura 18).

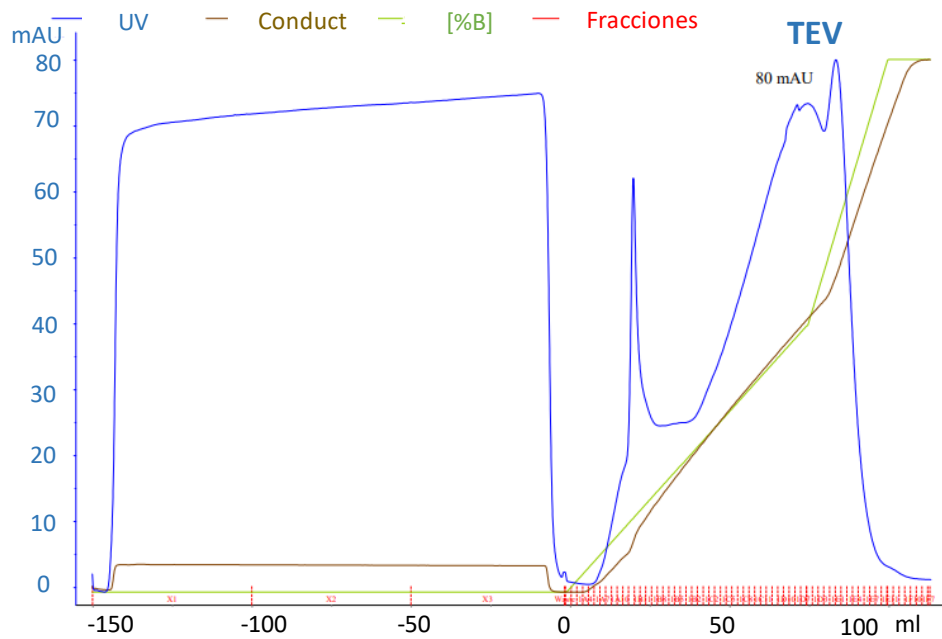


Figura 18. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO3.2.

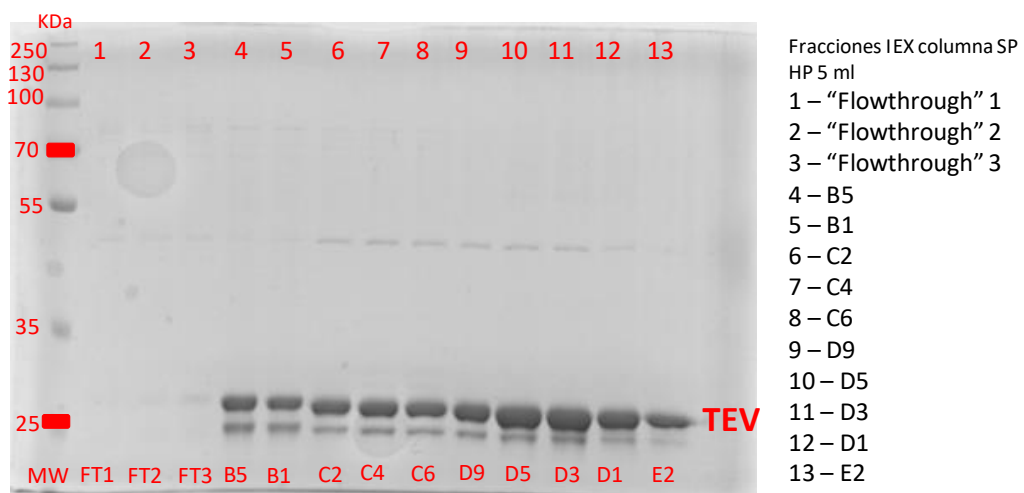


Figura 19. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 3.2.

CAMBIO 3.3: Finalmente, la tercera alícuota de TEV se deja dializando toda la noche en un tampón de 50 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl, 20% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5. Al día siguiente se le aplica la cromatografía de intercambio iónico (Figura 20) y una cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 21). Para la cromatografía de exclusión por tamaño, como el loop utilizado tiene sólo 5 mL, las fracciones obtenidas tras la cromatografía de intercambio iónico son concentradas en concentradores de 10000 MWCO hasta obtener 5 mL. Esta cromatografía también se lleva a cabo en el ÄKTA, con una columna Superdex 75 16/60 (GE, Healthcare) y un flujo constante de 1 ml/min.

En este último caso, como en los dos anteriores, tampoco se obtiene una buena concentración de TEV, sin embargo, se comprueba que la fina banda de impurezas de 25 KDa observada en los CAMBIOS 3.1 y 3.2 desaparece, como puede observarse en la la Figura 22 donde se muestra la presencia de dos bandas de TEV a la altura de 27 KDa (una para intercambio iónico y otra para cromatografía de exclusión por tamaño). Además, la banda observada a la altura de 50 KDa en intercambio iónico también se termina de eliminar tras la cromatografía de exclusión por tamaño. Por tanto, se obtiene proteasa muy limpia y pura.

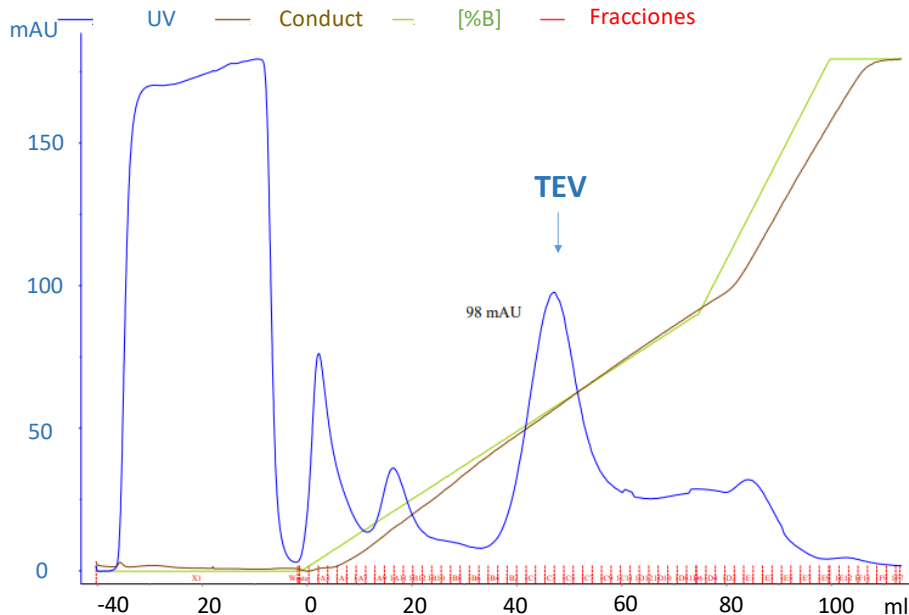


Figura 20. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para TEV tras aplicar el CAMBIO3.3.

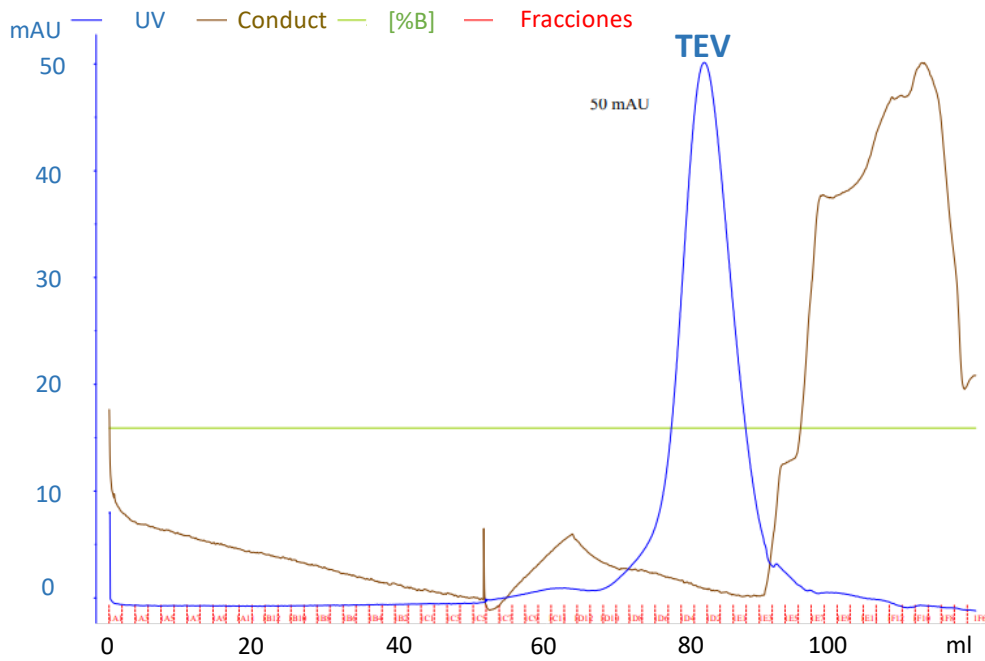


Figura 21. Cromatogramas obtenido por cromatografía de exclusión por tamaño para TEV tras aplicar el CAMBIO3.3.

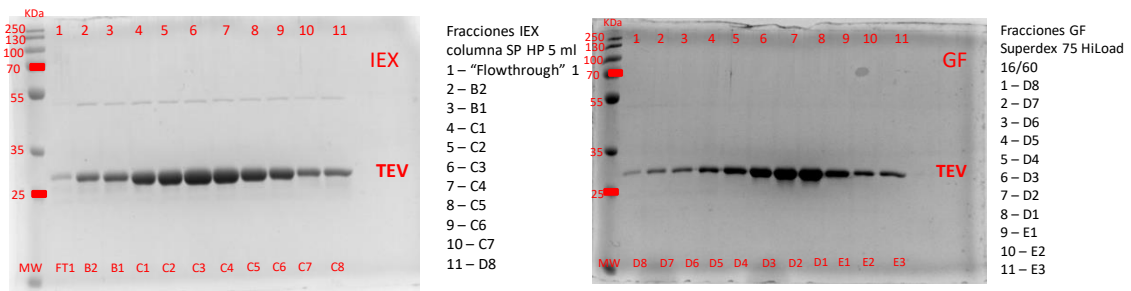


Figura 22. Gel SDS-PAGE obtenido para el TEV en IEX con columna SP HP 5 ml (izq) y gel obtenido tras la cromatografía de exclusión por tamaño con Superdex 75 16/60 (dcha) tras el CAMBIO 3.3.

Tras los cambios aplicados a TEV se calcula el rendimiento obtenido en la purificación aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\frac{mg}{ml} \text{ proteasa} \times mL}{4 \text{ L iniciales}} = mg \text{ proteasa/L}$$

Cabe destacar, que este cálculo no se aplica al CAMBIO3, ya que al obtener una baja concentración no se guarda ninguna muestra. La Tabla 4 muestra cómo el rendimiento del CAMBIO 2, utilizando el tampón de fosfato, es muy superior a los anteriores dos cambios. Sin

embargo, aplicándole el CAMBIO 3.3 la proteína que se obtiene es mucho más pura y limpia, por tanto éste termina siendo el procedimiento elegido para la purificación de TEV.

Tabla 4. Mg de TEV obtenidos por litro de cultivo en cada procedimiento.

| | Mg obtenidos por litro de cultivo |
|------------------------------|---|
| Procedimiento laboratorio | 3,525 |
| CAMBIO1 | 5,20 |
| CAMBIO2 | 27,8 |

5.2. SENP2

Se ha llevado a cabo el procedimiento del laboratorio para la purificación de SENP2. Como se ha mencionado previamente, el pI de SENP2 es 9,03. En el procedimiento del laboratorio se trabaja por debajo del pI, con el SENP2 cargado positivamente, pero con un intercambiador aniónico (Figura 2). De esta manera, la proteasa no se pega a la columna y se obtiene en el “flowthrough”. La concentración de SENP2 obtenida es de 1,90 mg/ml. El cromatograma obtenido tras la purificación de SENP2 ha sido el siguiente:

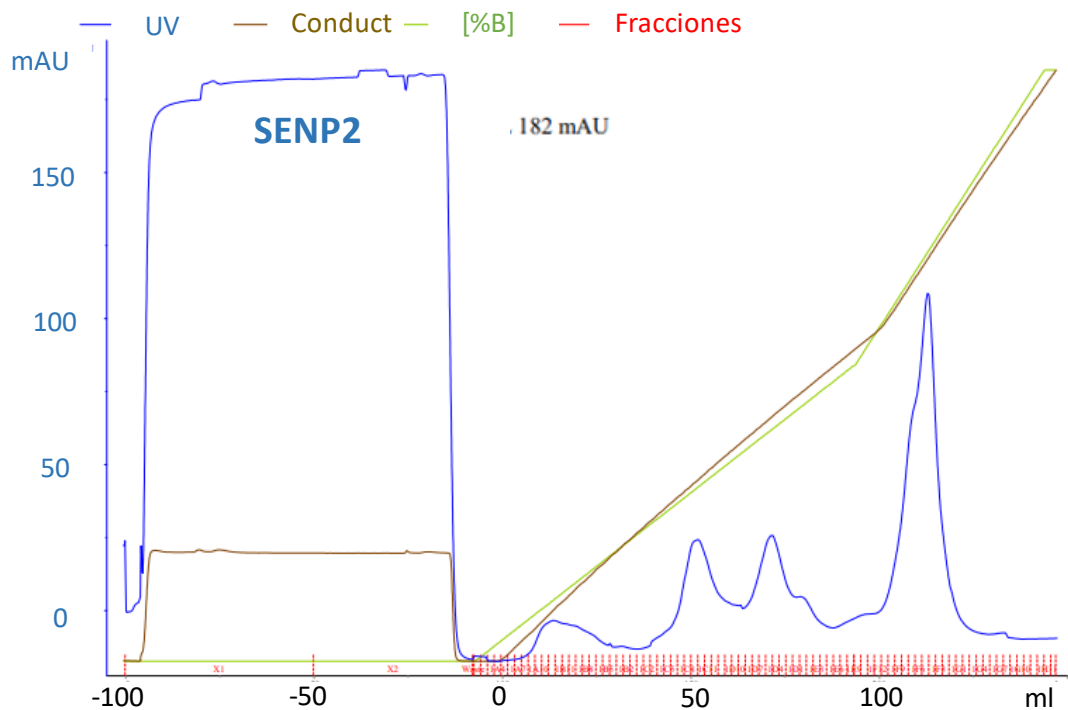


Figura 23. Cromatograma obtenido para el SENP2 con el procedimiento del laboratorio.

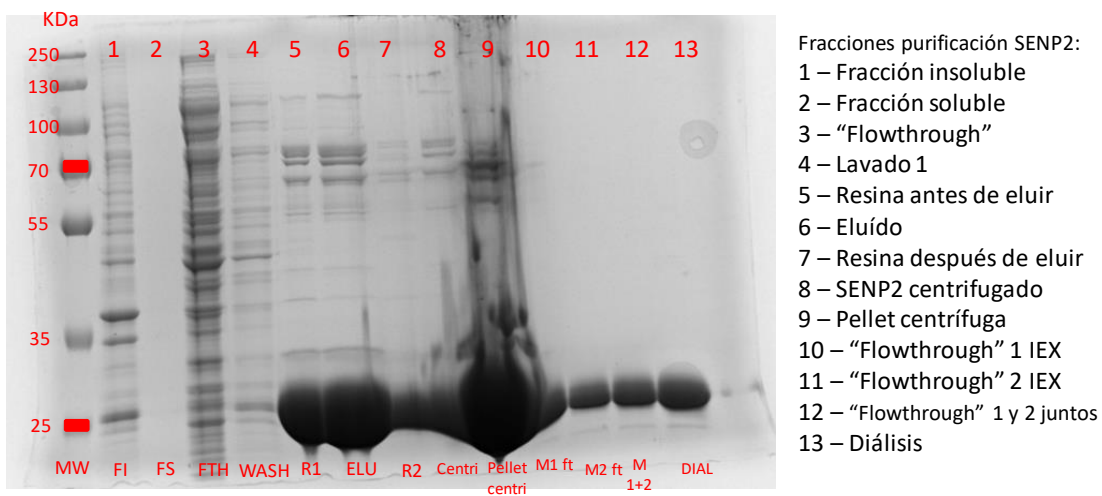


Figura 24. Gel SDS-PAGE obtenido para la purificación de TEV siguiendo el procedimiento del laboratorio.

La Figura 24 muestra las fracciones obtenidas en la purificación de SENP2. Cabe mencionar que en la calle 9 (pellet de la centrífuga) se adiciona demasiada cantidad de muestra y las calles colindantes aparecen un poco distorsionadas. Las calles 11-12 muestran las fracciones correspondientes al “flowthrough” del intercambio iónico donde se recoge el SENP2.

En cuanto a los cambios de SENP2 realizados, en este caso también partiendo de un mismo pellet la muestra se divide en 3 aliquotas tras eluirla en la cromatografía de afinidad para aplicarle 3 pruebas diferentes.

CAMBIO 1.1: en el primer intento lo único que se cambia respecto al procedimiento original es la columna utilizada. Los tampones y condiciones cromatográficas se mantienen igual. Una vez realizado este cambio, la proteasa se pega bien a la columna sin perderla en el “flowthrough” y se obtiene un pico. La concentración obtenida es de 1,52 mg/mL y se considera que el resultado es satisfactorio. El cromatograma se muestra en la Figura 25 y la Figura 26 muestra los carriles correspondientes a los eluidos del intercambio iónico con la presencia clara de la proteasa SENP2 en la banda de 25 KDa correspondiente a su peso molecular. A este resultado se le aplican otras dos modificaciones para ver si se obtiene un mayor rendimiento.

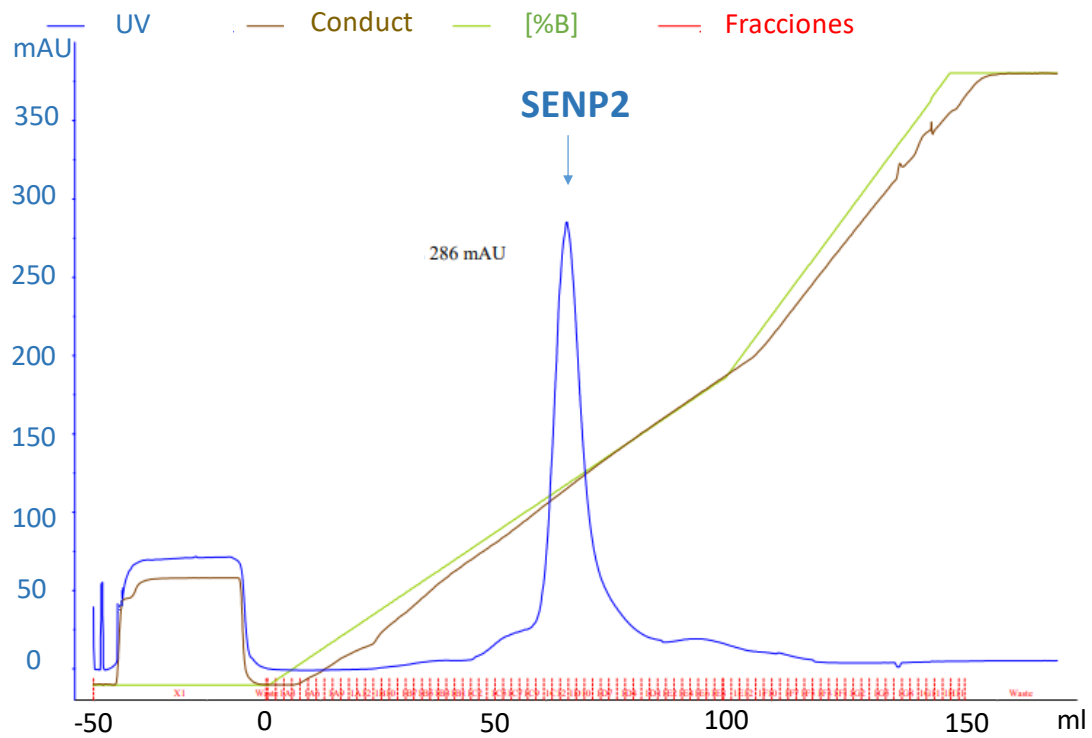


Figura 25. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para SENP2 tras aplicar el CAMBIO 1.1.

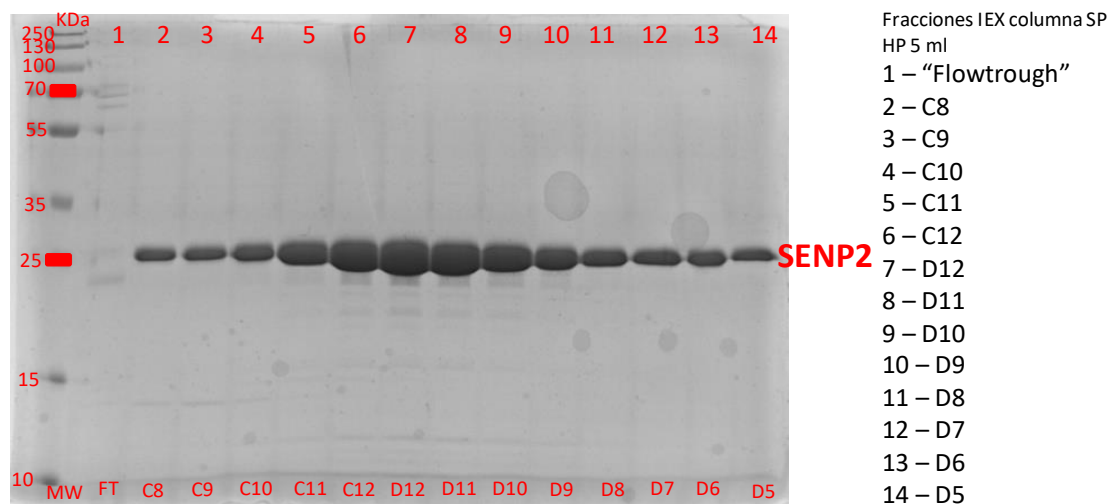


Figura 26. Gel SDS-PAGE obtenido para el SENP2 en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 1.1.

CAMBIO 1.2: El segundo cambio se hace basado en la conductividad obtenida en el CAMBIO 1.1. La conductividad obtenida en el “flowthrough” es de 15 mS/cm y el SENP2 empieza a salir en 25 mS/cm. Como la proteína se pega bien, en el siguiente cambio con el objetivo de conseguir un pico más alto se sube la conductividad del “flowthrough” a 20 mS/cm. Por tanto se hace una dilución llevando los 10 mL a 22 mL con el tampón A, de este modo dejando la sal a 159 mM. El resultado mejora (Figura 27) y se obtiene un pico más intenso y mayor concentración de SENP2 (3,76 mg/mL). La Figura 28 muestra los carriles correspondientes a los eluidos del intercambio iónico donde aumenta la presencia de SENP2 en la banda de 25 KDa correspondiente a su peso molecular.

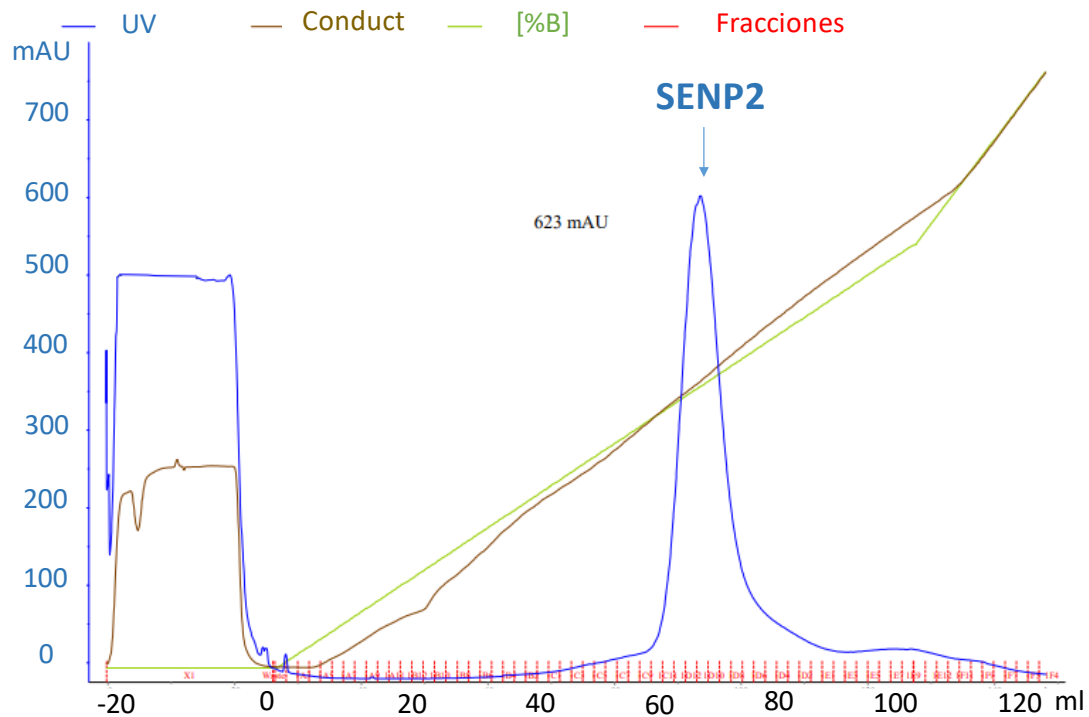


Figura 27. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para SENP2 tras aplicar el CAMBIO1.2.

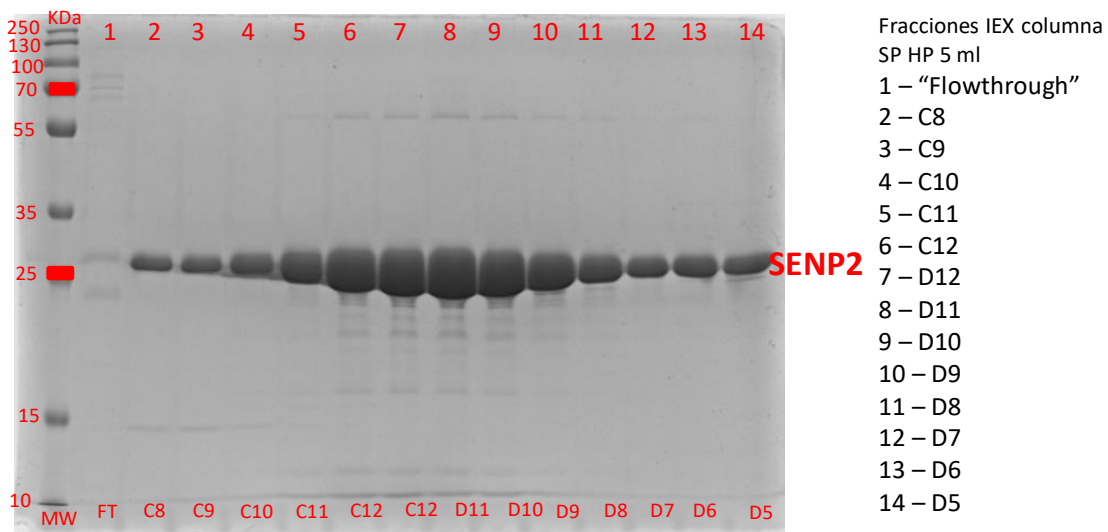


Figura 28. Gel SDS-PAGE obtenido para el SENP2 en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 1.2.

CAMBIO 1.3: En el último caso, el cambio que se le realiza al SENP2 es cambiar la rampa del intercambio catiónico respecto a la primera prueba. En tales circunstancias, para obtener un pico más alto y estrecho el gradiente utilizado es el siguiente: 10 VC 0-50%, 5 VC 50-100%, 2 VC 100%. Como se esperaba, el pico obtenido es más alto y más estrecho (Figura 29), y la concentración de SENP2 es de 4,35 mg/ml. Una vez más, los eluidos del intercambio iónico con la presencia de SENP2 en la banda de 25 KDa se muestran en la Figura 30.

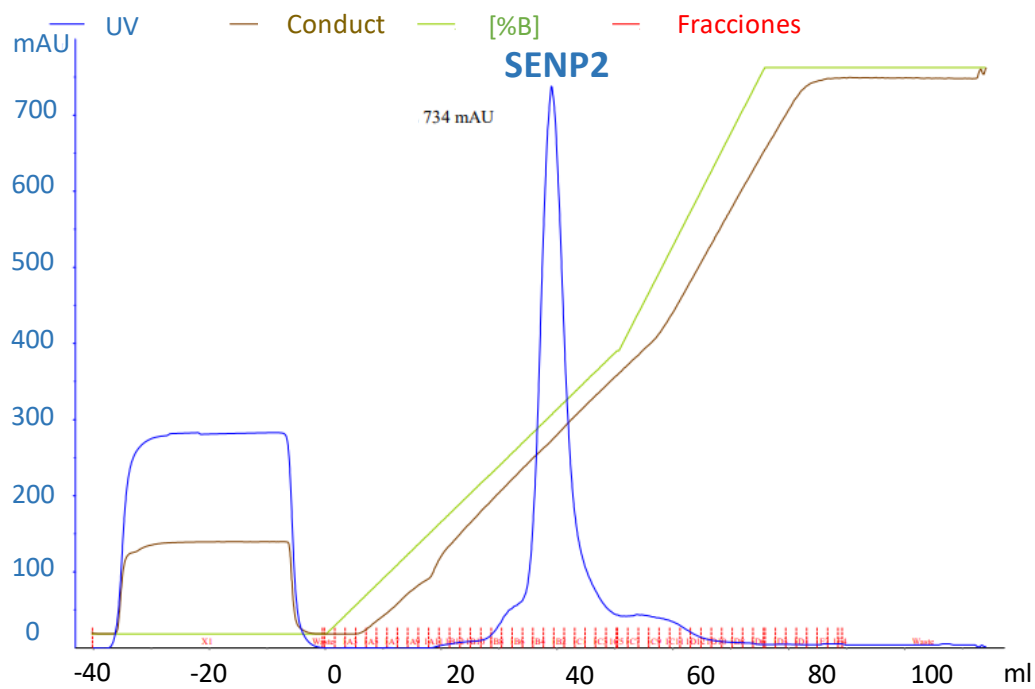


Figura 29. Cromatograma obtenido por cromatografía de intercambio iónico para SENP2 tras aplicar el CAMBIO1.3.

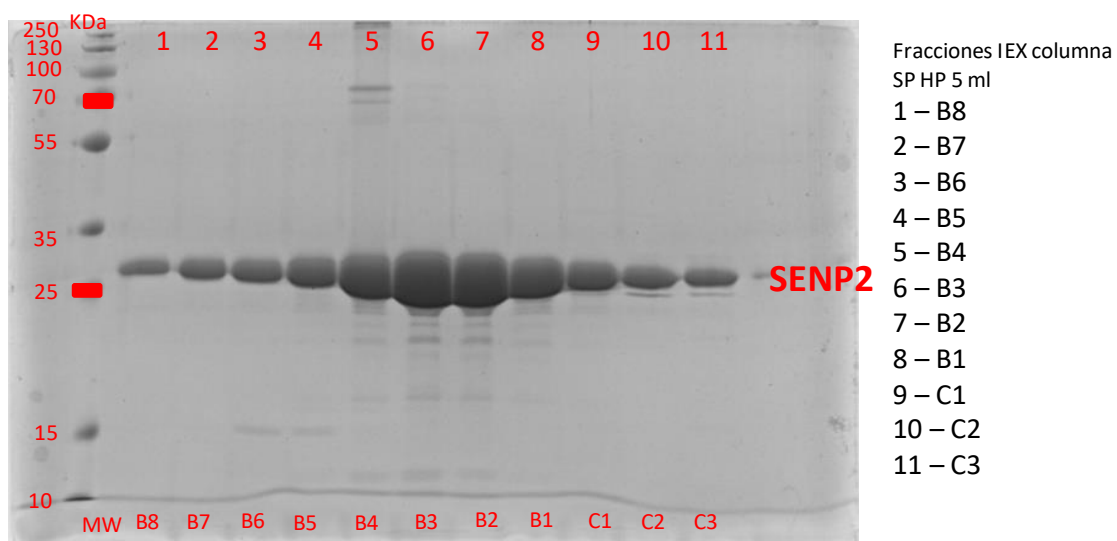


Figura 30. Gel SDS-PAGE obtenido para el SENP2 en IEX con columna SP HP 5 mL tras el CAMBIO 1.3.

Finalmente, se calcula el rendimiento obtenido en el caso de la proteasa SENP2 que se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5. Mg de SENP2 obtenidos por litro de cultivo en cada procedimiento.

| | Mg obtenidos por litro de cultivo |
|------------------------------|---|
| Procedimiento laboratorio | 18,05 |
| CAMBIO1.1 | 9,8 |
| CAMBIO1.2 | 21,43 |
| CAMBIO1.3 | 16,31 |

De los tres cambios realizados al SENP2, aunque en el tercer caso se obtiene una mayor concentración, es en el segundo cambio donde se obtienen más mg por L, y por ello el rendimiento es mayor y este es el procedimiento elegido para el SENP2.

Por otro lado, realizando la purificación en intercambio catiónico, se obtiene un pico de proteína y no sale en el “flowthrough” como ocurre en el primer procedimiento del laboratorio. Así, podemos quitarnos interferentes que en el otro caso podrían aparecer. Una ventaja más del cambio realizado al SENP2 es que después de dializar la muestra, ya se obtiene suficiente concentración y no es necesario concentrarla, por tanto, es un paso que se ahorra.

5.3. Ensayos de corte

Para comprobar la actividad de las proteasas purificadas, se han llevado a cabo ensayos de corte para eliminar las etiquetas de proteínas recombinantes. Para ello se han conseguido por un lado una muestra de proteína ridl unida a GST para cortar con TEV y por otro lado una muestra de proteína retrómero (compuesta por VPS-35, VPS-29 y VPS-26) donde VPS-26 está unida a SUMO para cortarlo con SENP2.

Los ensayos se han llevado a cabo en los ratios proteasa (TEV o SENP2):proteína (ridl o retrómero) 1:10, 1:100 y 1:1000 utilizando proteasas obtenidas a diferente concentración, y se han dejado actuando a 4°C toda la noche. Al día siguiente las muestras se han corrido en un gel SDS-PAGE.

La Figura 31 muestra el resultado obtenido para el TEV. En la primera calle, se muestra la proteína ridl unida a GST que cae alrededor de 158 KDa. Las siguientes 3 calles muestran las 3 proteasas purificadas utilizadas para hacer los ensayos. De la calle 5 a la 13 se muestra el cambio obtenido al cortar la proteína con el TEV. El peso molecular de GST es de 28 KDa, por tanto, las

calles 5-13 muestran la pérdida de esos 28 KDa y cómo el ridl queda a una altura de 130 KDa, es decir, a la altura de su peso original.

En el caso de SENP2 Figura 32 el corte se ve más claro, ya que en la primera calle se observa la VPS-29 unida al SUMO a la altura de 55 KDa. Al cortar con el SENP2, las calles 5-13 muestran la pérdida del SUMO y cómo la VPS-29 cae a unos 40 KDa. En este gel también se ve la diferencia a variar el ratio proteasa:proteína utilizado, es decir, los restos de SUMO-VPS-29 (calles 5-13) son menores al utilizar un ratio de 1:10 que al utilizar un ratio de 1:1000. El gel también muestra la VPS-35 a la altura de 70 KDa y VPS-29 a la altura de 20 KDa.

Estos ensayos confirman la actividad de las proteasas para cortar etiquetas de proteínas recombinantes aun cuando la concentración es baja y se confirma que los cambios introducidos no afectan a las proteasas.

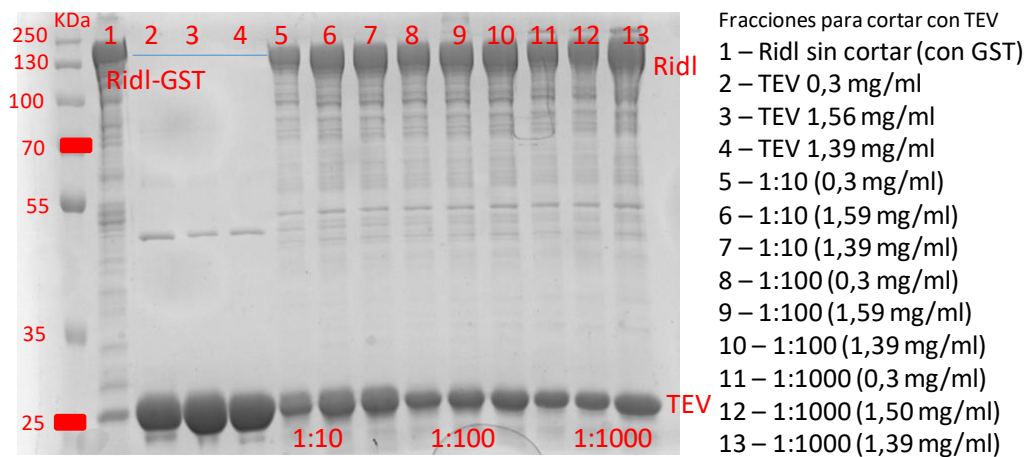


Figura 31. Fracciones para cortar con TEV.

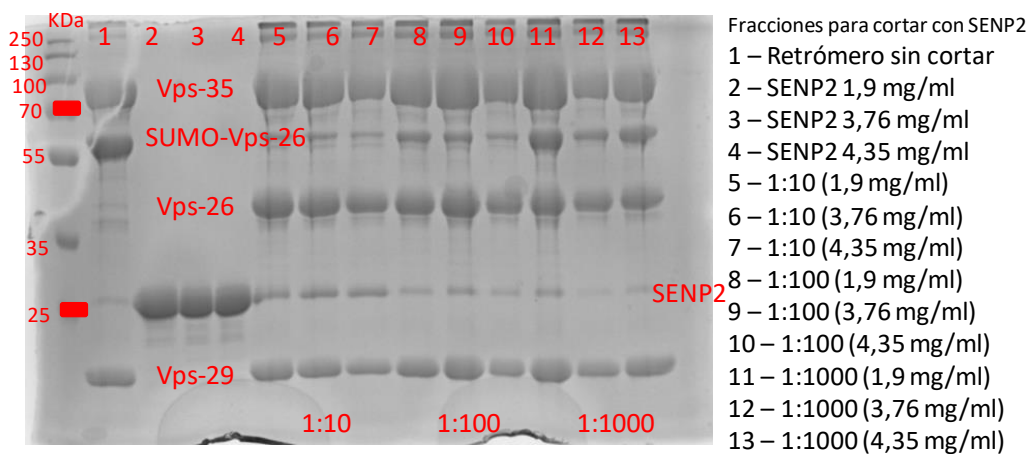


Figura 32. Fracciones para cortar con SENP2.

5. Conclusiones

Tras realizar varios cambios a las proteasas TEV y SENP2 para mejorar los procedimientos establecidos en el laboratorio, se han introducido una serie de mejoras que han optimizado el método en ambos casos.

El nuevo procedimiento de TEV en función de los resultados obtenidos es el siguiente:

El pellet de 4L crecido a partir del glicerol en BL21 se disuelve en 100 mL de tampón de lisis (50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 20 mM imidazol y 1 mM DTT, pH 8) al que se le añaden inhibidores de proteasas para evitar la degradación de la proteína, y DNAsas para romper los enlaces fosfodiéster del DNA y reducir así la viscosidad de la muestra. La muestra se sonica para romper las células realizando 12 pulsos de 10 segundos a una amplitud del 60%, dejándolo 59 segundos en "off". El lisado se centrifuga durante 40 minutos en un rotor 25.50 a 22500 rpm a 4°C y se recoge la fracción soluble.

A continuación, se realiza una cromatografía de afinidad de níquel. Para ello, se añaden unos 10 mL de resina Ni-NTA a una columna vacía que se acondiciona lavándola con agua destilada, 1M de imidazol para eliminar el exceso de iones de Ni⁺² libres, otra vez agua destilada para eliminar cualquier resto de imidazol que haya podido quedar y finalmente tampón de lisis. La resina se recoge en un bote junto con la muestra, la cual se mantiene en agitación durante una hora a 4°C para que se produzca la interacción por afinidad. Pasada la hora, el contenido se vuelca en la resina vacía y todo lo que no se pega "flowthrough" se recoge en un vaso de precipitado. Seguidamente se lava la resina con 400 mL de tampón de lisis, para eliminar impurezas, y a continuación con 50 mL de tampón de lavado, para bajarle la cantidad de sal (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5). La muestra se eluye con 100 mL de tampón de elución (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 10% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5) donde se aumenta la cantidad de imidazol para eluir la muestra de la resina.

Tras este paso el SENP2 se deja dializando toda la noche en una membrana de 10 KDa, donde se inserta la proteasa (tampón diálisis: 50 mM TRIS-HCl, 50 mM NaCl, 20% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5). Al día siguiente se le aplica la cromatografía de intercambio iónico.

Los experimentos de intercambio iónico se llevan a cabo en el ÄKTA con un detector de UV, columna HiTrap SP HP 5 ml (GE, Healthcare) y un flujo constante de 5 ml/min. El análisis espectroscópico se lleva a cabo a 280 nm y se trabaja en un gradiente de sal aumentando la concentración del tampón B de la siguiente manera: 15 VC 0-50% B, 5 VC 50-100% B y 2 VC 100% B.

Previo al análisis, el equipo es equilibrado para dejarlo en las condiciones iniciales en las que se va a llevar a cabo la separación. Para ello se utilizan 20 ml de tampón A (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 20% glicerol, 1 mM DTT, pH 7,5), 20 ml de tampón B (50 mM Tris-HCl 7,5, 1 M NaCl, 20% glicerol, 1 mM DTT) y otra vez 20 ml de tampón A.

Para la inyección de la muestra, se prepara un superloop de 150 mL donde se cargan los 100 mL obtenidos de muestra tras dializarla. Al termina la separación se toman las fracciones pertenecientes al pico de la proteasa que se han recogido en un rack de 96 pocillos para correrlas en un gel SDS-PAGE con el objetivo de identificar y seleccionar las fracciones más limpias y abundantes para seguir con la cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la cromatografía de exclusión por tamaño, como el loop utilizado tiene sólo 5 mL, las fracciones obtenidas tras la cromatografía de intercambio iónico son concentradas en concentradores de 10000 MWCO hasta obtener 5 mL. Esta cromatografía también se lleva a cabo en el AKTA™, con una columna Superdex 75 16/60 (GE, Healthcare) y un flujo constante de 1 ml/min. Las fracciones de proteasa obtenidas se recogen, la absorbancia en el nanodrop y la muestra se reparte en alíquotas de 500 µL.

El nuevo procedimiento de SENP2 en función de los resultados obtenidos es el siguiente:

El pellet de 4L crecido a partir del glicerol en BL21 se disuelve en 150 mL de tampón de lisis (20 mM TRIS-HCl, 350 mM NaCl, 20 mM imidazol y 1 mM DTT, pH 8). Este se pasa por el disruptor celular, y después se le añaden inhibidores de proteasas para evitar la degradación de la proteína, y DNAsas para romper los enlaces fosfodiéster del DNA y reducir así la viscosidad de la muestra. El lisado se centrifuga durante 40 minutos en un rotor 25.50 a 22500 rpm a 4°C y se recoge la fracción soluble.

A continuación, se realiza una cromatografía de afinidad de níquel. Para ello, se añaden unos 4 mL de resina Ni-NTA a una columna vacía que se acondiciona lavándola con agua destilada, 1M de imidazol para eliminar el exceso de iones de Ni⁺² libres, otra vez agua destilada para eliminar cualquier resto de imidazol que haya podido quedar y finalmente tampón de lisis. La resina se recoge en un bote junto con la muestra, la cual se mantiene en agitación durante una hora a 4°C para que se produzca la interacción por afinidad. Pasada la hora, el contenido se vuelca en la resina vacía y todo lo que no se pega “flowthrough” se recoge en un vaso de precipitado. Seguidamente se lava la resina con 200 mL de tampón de lisis, para eliminar impurezas. La muestra se eluye con 30 mL de tampón de elución (20 mM Tris-HCl, 350 mM NaCl,

400 mM Imidazol, 1 mM DTT, pH 7,5) donde se aumenta la cantidad de imidazol para eluir la muestra de la resina, y se pasa a la cromatografía de intercambio iónico.

Los experimentos se llevan a cabo en el ÄKTA con un detector de UV y con la columna HiTrap SP HP 5 ml (GE, Healthcare) y un flujo constante de 5 ml/min. El análisis espectroscópico se lleva a cabo a 280 nm y se trabaja en un gradiente de sal aumentando la concentración del tampón B de la siguiente manera: 20 VC 0-50% B, 10 VC 50-100% B.

El equipo se equilibra previamente para dejarlo en las condiciones iniciales en las que se va a llevar a cabo la separación. Para ello se utilizan 20 ml de tampón A (25 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, pH 7,5), 20 ml de tampón B (25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5) y otra vez 20 ml de tampón A.

Para la inyección de la muestra, los 30 ml obtenidos tras eluir el SENP2 se llevan a 66 ml con el tampón A para bajarle la sal. La muestra precipita y se centrifuga 10 minutos a 4500 rpm a 4°C. Una vez centrifugada, se carga en el superloop y se inyecta en el sistema cromatográfico. Las fracciones de proteasa se recogen y se dializan toda la noche en una membrana de 10 KDa a 4°C (50 mM Tris-HCl 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM DTT). Al día siguiente la muestra se recoge, absorbancia se mide en el nanodrop y la proteasa se reparte en aliquotas de 500 µL.

Por otro lado, mediante los ensayos de corte ha quedado confirmada la actividad de las proteasas a la hora de cortar las etiquetas de proteínas recombinantes y se ha visto que los cambios introducidos no afectan a las proteasas.

Referencias

- (1) Banki, M. R.; Gerngross, T. U.; Wood, D. W. Novel and Economical Purification of Recombinant Proteins : Intein-Mediated Protein Purification Using in Vivo Polyhydroxybutyrate (PHB) Matrix Association. **2005**, 1387–1395.
- (2) Miladi, B.; Bouallagui, H.; Dridi, C.; El, A.; Boeuf, G.; Di, P.; Dufour, F.; Elm, A. A New Tagged-TEV Protease : Construction , Optimisation of Production , Purification and Test Activity. *Protein Expr. Purif.* **2011**, 75 (1), 75–82.
- (3) Lichty, J. J.; Malecki, J. L.; Agnew, H. D.; Michelson-horowitz, D. J.; Tan, S. Comparison of a Y Nity Tags for Protein Puri W Cation. **2005**, 41, 98–105.
- (4) Abyntek. Tags para la purificación de proteínas recombinantes <https://www.abynetek.com/tags-purificacion-de-proteinas-recombinantes/> (accessed May 15, 2022).
- (5) Pedersen, J.; Lauritzen, C.; Madsen, M. T.; Dahl, S. W. Removal of N-Terminal Polyhistidine Tags from Recombinant Proteins Using Engineered Aminopeptidases. **1999**, 400, 389–400.
- (6) Ko, C.; Ostermeier, M.; Lin, S. Dual Column Approach for the Puri Fi Cation of Zinc Fi Nger Proteins by Immobilized Metal a Ffi Nity Chromatography. **2018**, 73 (June), 204–210.
- (7) Aldrich, S. Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography (IMAC) <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-docum> (accessed Jun 5, 2022).
- (8) Abyntek. Guía de proteasas para la eliminación de tags <https://www.abynetek.com/proteasas-para-la-eliminacion-de-tags/> (accessed May 15, 2022).
- (9) Sanchez, M. I.; Ting, A. Y. Directed Evolution Improves the Catalytic Efficiency of TEV Protease. *Nat. Methods* **2020**, 17 (February).
- (10) Nautiyal, K.; Kuroda, Y. Full Length Article A SEP Tag Enhances the Expression , Solubility and Yield of Recombinant TEV Protease without Altering Its Activity. *N. Biotechnol.* **2018**, 42 (February), 77–84.
- (11) Suh-lailam, B. B.; Hevel, J. M. Efficient Cleavage of Problematic Tobacco Etch Virus (TEV

-)- Protein Arginine Methyltransferase Constructs. *Anal. Biochem.* **2009**, *387* (1), 130–132.
- (12) Raynes, J. K.; Domigan, L. J.; Pearce, F. G.; Gerrard, J. A. Immobilization of Tobacco Etch Virus (TEV) Protease on a High Surface Area Protein Nano Fiber Scaffold. **2018**.
- (13) Cesaratto, F.; Burrone, O. R.; Petris, G. Tobacco Etch Virus Protease : A Shortcut across Biotechnologies. *J. Biotechnol.* **2016**, *231*, 239–249.
- (14) Copeland, T. D.; Waugh, D. S. The P10 Specificity of Tobacco Etch Virus Protease. **2002**, *294*, 949–955.
- (15) Chen, X.; Pham, E.; Truong, K. TEV Protease-Facilitated Stoichiometric Delivery of Multiple Genes Using a Single Expression Vector. **2010**, *19*, 2379–2388.
- (16) Mirecka, A.; Morawiec, Z.; Wozniak, K. Genetic Polymorphism of SUMO-Specific Cysteine Proteases – SENP1 and SENP2 in Breast Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **2016**, 817–823.
- (17) Fu, J.; Yu, H. I.; Chiu, S.; Mirando, A. J.; Maruyama, E. O.; Cheng, J. Disruption of SUMO-Specific Protease 2 Induces Mitochondria Mediated Neurodegeneration. **2014**, *10* (10).
- (18) Xiao, N.; Li, H.; Yu, W.; Gu, C.; Fang, H.; Peng, Y.; Mao, H.; Fang, Y.; Ni, W.; Yao, M. SUMO-Specific Protease 2 (SENP2) Suppresses Keratinocyte Migration by Targeting NDR1. *For.* **2** (280).
- (19) Baumann, P. Systematic Purification of Salt-Intolerant Proteins by Ion-Exchange Chromatography : The Example of Human α -Galactosidase A. **2015**, 195–207.
- (20) Nombre, E. L.; Intercambio, C. D. E. Cromatografía de Intercambio Iónico.
- (21) Lambrecht, M. A.; Rombouts, I.; Kelst, L. Van; Delcour, J. A. Impact of Extraction and Elution Media on Non-Size Effects in Size Exclusion Chromatography of Proteins. **2015**, *1415*, 100–107.
- (22) Fekete, S.; Ganzler, K.; Guillarme, D. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Critical Evaluation of Fast Size Exclusion Chromatographic Separations of Protein Aggregates , Applying Sub-2 μ m Particles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *78–79*, 141–149.
- (23) Agilent Technologies. Guía Práctica de Agilent Sobre Cromatografía de Exclusión Por Tamaño Para El Análisis de Biomoléculas. 2015.

- (24) Kennelly, P. J.; Rodwell, V. W.; Describir, A.; Ip, Y.; Kennelly, P. J.; Rodwell, V. W. *Bioquímica Ilustrada*. **2022**, 1–15.
- (25) Zhang, Y.; Yu, D.; Dai, J.; Wang, X.; Zhu, Z. A Method for Rapid and Sensitive Negative Staining of Proteins in SDS-PAGE Using 2 , 7 -Dichlorofluorescein. **2017**, *201600346*, 1–6.