

LAS CINÉTICAS DE REPLEGAMIENTO DE LISOZIMA ASISTIDO POR EL DOMINIO APICAL DE GroEL SE PUEDEN DESCRIBIR POR UN MODELO DE TRES ESTADOS

Luz María Aldaz Martínez, Jaime Ortega López.

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, México D.F. C.P. 07360. Teléfono 57473800 Ext. 4381
kyxzyz@gmail.com

Replegamiento asistido, Lisozima, DA_{GroEL}

Introducción. Las proteínas expresadas de forma heteróloga en *E. coli* frecuentemente forman agregados insolubles e inactivos denominados cuerpos de inclusión (CI). Los CI son aislados, solubilizados, y después sometidos a un proceso de replegamiento en el cual la proteína recupera su estructura nativa y funcional. A nivel de laboratorio se ha demostrado que el replegamiento cromatográfico asistido por chaperones moleculares tiene un gran potencial para su uso a nivel industrial (1), por lo que es deseable contar con herramientas que faciliten su escalamiento. Un modelo matemático combinado con la estimación experimental de algunos parámetros, es una herramienta que puede ahorrar tiempo y costos de investigación en el proceso de escalamiento. Para la descripción de los procesos de plegamiento no asistido de proteínas se ha planteado un modelo simple (Fig 1), en el que se forma un intermediario de plegamiento (I) a partir del cual la proteína puede pasar a un estado nativo activo (N) o a un estado agregado inactivo (A), con una constante de plegamiento k_N y una de agregación K_A , (2,3).



Figura 1. Modelo de plegamiento de proteínas de tres estados.

El objetivo de este trabajo es determinar si la cinética de replegamiento de lisozima asistido por el Dominio Apical de la chaperonina GroEL (DA_{GroEL}) de forma libre o inmovilizado en celulosa se puede describir y predecir por un modelo simple de tres estados.

Metodología. Las cinéticas de replegamiento espontaneo o asistido por el DA_{GroEL} , de diferentes concentraciones de lisozima se realizaron manteniendo una relación molar 1:1, a 125 rpm y 10% de glicerol. Los datos obtenidos fueron normalizados y ajustados mediante Origin 7.0.

Resultados y discusión. La figura 2 muestra las cinéticas de replegamiento espontaneo y asistido de 25 $\mu\text{g/mL}$ de lisozima. Los símbolos muestran los datos experimentales y la línea punteada el ajuste a modelo de tres estados. Se observa claramente que las cinéticas de replegamiento se ajustan mejor al modelo que considera a las reacciones de plegamiento de primer orden y a la

s de agregación de segundo orden, como limitantes del replegamiento. Los resultado obtenidos al replegar 50 $\mu\text{g/mL}$ de lisozima fueron similares y muestran que aun aumentando la concentración lisozima, el factor "fi" ($f_{i\text{asistido}}/f_{i\text{espontaneo}}$) es mayor a 1 lo que indica que el DA_{GroEL} es capaz de evitar la agregación y favorecer el replegamiento (cuadro1).

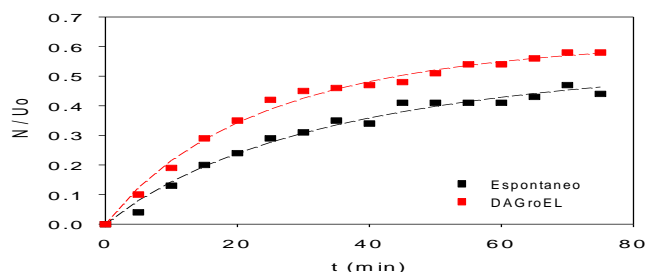


Figura 2. Cinéticas de replegamiento espontaneo y asistido de lisozima por DA_{GroEL} a 25 $\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 1. Parámetros del replegamiento espontaneo y asistido.

Replegamiento	N/U	k_N	K_A	$f_{i(kN/K_A)}$	f_i'	r^2
Lisozima			25 $\mu\text{g/mL}$			
Espontaneo	0.46	0.018	1.41	0.013		0.98
Asistido	0.58	0.028	1.60	0.018	1.39	0.99
Lisozima			50 $\mu\text{g/mL}$			
Espontaneo	0.43	0.033	2.09	0.016		0.98
Asistido	0.48	0.047	2.54	0.019	1.18	0.98

Conclusiones. Las cinéticas de replegamiento de lisozima asistido por el DA_{GroEL} se ajustan un modelo simple de tres estados.

Agradecimiento. A CONACYT por el financiamiento mediante el proyecto P49987-Z y la beca 210612.

Bibliografía.

- Antonio-Pérez, A. 2007. Replegamiento oxidativo de proteínas modelo asistido por chaperones moleculares. Tesis de Maestría Depto. De Biotec. y Bioing. CINVESTAV-IPN.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.-H., Buchner, J. 1991. Protein aggregation in vitro and in vivo: A quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Nat. Biotech.*, 9(9), pp. 825-829
- Xiao-Yan, D., Yan H., Yan S. 2004. Refolding kinetics of denatured-reduced lysozyme in the presence of folding aids. *J. Biotech.* 114, pp. 135-142.



Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



VII Simposio Internacional de
Producción de Alcoholes y Levaduras