

### ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS DsbA-CBD<sub>Cex</sub>, DsbC-CBD<sub>Cex</sub> Y D.A.GroEL-CBD<sub>Cex</sub> EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES EXTREMAS.

Aurora Antonio Pérez, Jaime Ortega López. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, México D.F. haxasso@yahoo.com.mx

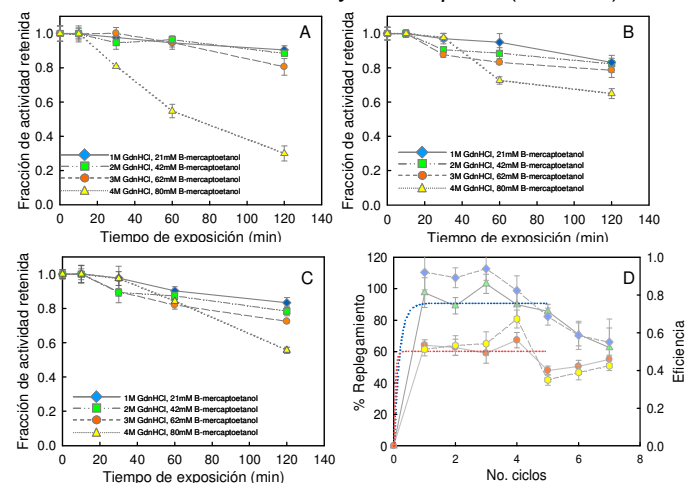
*Palabras clave: Condiciones desnaturalizantes, inmovilización, replegamiento oxidativo*

**Introducción.** Para aumentar los rendimientos en el replegamiento de proteínas recombinantes expresadas como cuerpos de inclusión se ha demostrado, que el empleo de catalizadores del plegamiento y de la formación de enlaces disulfuro, acoplados a sistemas cromatográficos son eficientes, reusables y potencialmente aplicables a escala de producción. Sin embargo, la limitante de éste método denominado “replegamiento cromatográfico asistido”, es el costo extra que involucra la preparación de estos biocatalizadores y su estabilidad operacional (1,2). Con el objetivo de evaluar una alternativa de purificación e inmovilización aplicable a gran escala se fusionó el dominio apical de GroEL, y las oxidoreductasas DsbA y DsbC al modulo de unión a celulosa CBD<sub>Cex</sub> de *Cellulomonas fimi*. Estas proteínas fusionadas al CBD<sub>Cex</sub>, se purificaron e inmovilizaron a celulosa en una sola etapa y asistieron de forma eficiente el replegamiento oxidativo de lisozima tanto en lote como en forma cromatográfica (3). Para determinar la estabilidad de este sistema de replegamiento cromatográfico asistido, en el presente trabajo, se evaluó la funcionalidad de D.A.GroEL-CBD<sub>Cex</sub>, DsbA-CBD<sub>Cex</sub> y DsbC-CBD<sub>Cex</sub> al exponerlos a condiciones desnaturalizantes severas.

**Metodología.** Los biocatalizadores se inmovilizaron en celulosa y fueron expuestos a diferentes concentraciones de GdnHCl/β-Me, durante 10-120 minutos; después se removió la mezcla GdnHCl/β-Me, y las matrices de replegamiento “tratadas” se emplearon en ensayos de replegamiento oxidativo de lisozima. Por otra parte se preparó la columna catalítica con o sin los biocatalizadores inmovilizados la cual se empleo durante 8 ciclos de replegamiento de una muestra de lisozima desnaturalizada 6M GdnHCl y 120mM β-Me (condiciones extremas). Se determinó la actividad enzimática de lisozima en cada muestra y la fracción (0-1.0) o el % de replegamiento se determinó en función de la actividad correspondiente a la lisozima nativa.

**Resultados y discusión.** En la Fig. 1 se muestran las curvas que describen la disminución de la actividad de los biocatalizadores por la exposición a GdnHCl/β-Me. Después de 120 min de incubación. A 4M/80mM GdnHCl/β-Me D.A.GroEL-CBD<sub>Cex</sub>, conserva tan solo 0.29 de su actividad (panel A), mientras que DsbA-CBD<sub>Cex</sub> (panel B) y DsbC-CBD<sub>Cex</sub> (panel C) conservan hasta un 0.7 de su capacidad de replegamiento inicial. Sin embargo cuando los tres biocatalizadores son expuestos a tiempos cortos o condiciones de 2M/42mM GdnHCl/β-Me solo pierden 0.1-0.15 de su actividad catalítica. En la

columna catalítica los tres biocatalizadores se mantuvieron inmovilizados a la matriz de replegamiento y conservaron su funcionalidad hasta por cinco ciclos de replegamiento con una eficiencia del 0.9 contra un 0.5 del sistema espontáneo, aún cuando la lisozima inyectada se encontraba en 6M GdnHCl y 80mM β-Me (Panel D).



**Fig. 1. Estabilidad de los biocatalizadores del replegamiento en condiciones desnaturalizantes.** Actividad remanente de los biocatalizadores inmovilizados en celulosa en función de la exposición a GdnHCl/β-Me. Panel A: D.A.GroEL-CBD<sub>Cex</sub>. Panel B: DsbA-CBD<sub>Cex</sub> y Panel C: DsbC-CBD<sub>Cex</sub>. Panel D: Cinética del replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima durante 7 ciclos, desarrollado en forma asistida por DsbA-CBD<sub>Cex</sub>, DsbC-CBD<sub>Cex</sub>, D.A.GroEL-CBD<sub>Cex</sub>, expresada como % de replegamiento asistido (▲) o espontáneo (●) y Eficiencia del replegamiento asistido (◆) o espontáneo (●).

**Conclusiones.** DsbA-CBD<sub>Cex</sub>, DsbC-CBD<sub>Cex</sub>, y D.A.GroEL-CBD<sub>Cex</sub> permanecen inmovilizados y estables a las condiciones desnaturalizantes que se emplean en el sistema de replegamiento cromatográfico oxidativo.

**Agradecimiento.** A CONACyT por el financiamiento mediante el proyecto P49987-Z y la beca 10458.

#### Bibliografía.

- Misawal S, Kumagai I. Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Peptide Sci* 1999;51(4): 297-307.
- Jhamb K, Jawed A, Sahoo DK. Immobilized chaperones: A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body proteins. *Process Biochem* 2008;43: 587-97.
- Antonio-Pérez, A. 2007. Replegamiento oxidativo de proteínas modelo asistido por chaperones moleculares. Tesis de Maestría DBB. CINVESTAV-IPN.