

EXPRESION, PURIFICACION Y CRISTALIZACION DE LA INVERTASA EXTRACELULAR DE *Zymomonas mobilis*

Jazmín M. Vásquez-Bahena, Alejandro Santiago-Hernández, Jesús Vega-Estrada, M. Carmen Montes-Horcasitas, y M. Eugenia Hidalgo-Lara

*Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV. Av. IPN No. 2508 San Pedro Zacatenco. CP 07360. México D. F. Fax (55)5061-3313. E-mail: ehidalgo@cinvestav.mx

Palabras clave: invertasa,,*Zymomonas mobilis*, cristalización.

Introducción. La invertasa (3.2.1.26) hidroliza la sacarosa liberando glucosa y fructosa, los cuales además de tener un amplio uso en la industria alimenticia son fuentes principales de carbono y energía para organismos procariotes y eucariotes. Esta ha sido aislada de bacterias, hongos y plantas de las cuales han encontrado diferentes isoenzimas con diferentes propiedades bioquímicas y localizaciones subcelulares. A pesar de ser una de las primeras enzimas descubiertas, fue hasta el 2004 (1) cuando se determinó la estructura de una invertasa de la familia 32. La invertasa extracelular de *Z. mobilis* (INVB) es la única invertasa clasificada en la familia 68 puesto que sólo guarda alrededor de 20% o menos de homología con las invertasas de la familia 32 y no ha sido determinado su estructura tridimensional.

El objetivo de este trabajo fue el expresar, purificar y cristalizar la invertasa INVB de *Z. mobilis*.

Metodología. Se amplificó mediante PCR el ORF de INVB a partir del ADN genómico de *Z. mobilis* CDBB-B 603 (CINVESTAV, México). El fragmento amplificado se clonó en el vector de expresión pET30 Ek/LIC para dar lugar a la construcción denominada *invBpetK*. INVB se expresó en células de *Escherichia coli* BL21(DE-3), estas se lisaron y centrifugaron. El sobrenadante obtenido es la fase soluble y a partir de este se purificó INVB en tres pasos subsecuentes de cromatografía: afinidad a níquel, intercambio aniónico e interacción hidrófoba, utilizando MonoQ y metil sefarosa como resinas, respectivamente. Las condiciones de cristalización fueron investigadas con el método de la gota colgante usando primero, 2 matrices de muestra con 50 ensayos cada uno y posteriormente se optimizaron.

Resultados y discusión. Para obtener grandes cantidades de proteína necesarias en los ensayos de cristalización, así como facilitar los pasos de purificación, se obtuvo la invertasa en forma recombinante. Para generar esta proteína heteróloga en *E. coli* se amplificó el ORF de *invB* a partir del DNA genómico de *Z. mobilis* y clonó direccionalmente en un vector independiente de ligación pET-30 Ek/LIC. Los productos de amplificación se analizaron mediante un electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y la secuencia amplificada fue verificada mediante un secuenciador (3100 Genetic analyzer, USA). Una vez obtenida la construcción denominada *invBpetK*, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21(DE3). La expresión se hizo creciendo las células de *E. coli* e induciendo la síntesis de la proteína heteróloga con IPTG 1mM. El éxito de la clonación y la expresión fue comprobado mediante la medición de actividad en la fase soluble.

La invertasa recombinante INVB se purificó por cromatografía de afinidad a níquel, aprovechando la cola de 6His en el extremo N- terminal, las cuales son adicionadas a partir de secuencias codificadas el vector pET30 Ek/LIC. Sin embargo, fueron necesarias dos etapas más de purificación para eliminar proteínas contaminantes: intercambio aniónico e interacción hidrófoba. En la figura 1 se muestra la expresión de la INVB recombinante así como su purificación por arriba del 95%.

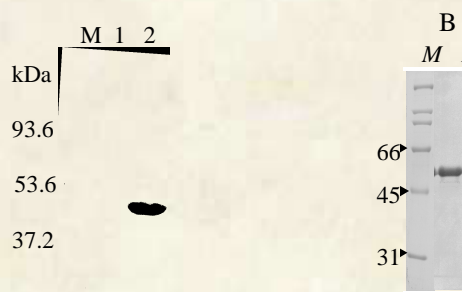


Fig. 1. Expresión y purificación de INVB recombinante (A) M: marcadores de PM, 1: células no inducidas, 2: células inducida. (B) M: marcadores, 1: INVB purificada

En los ensayos de cristalización se ubicaron condiciones propicias para la formación de cristales de buen tamaño y una de precipitado microcristalino en tartrato de Na-K entre 0.4-0.5 M a pH 7.3 a una concentración de 5 mg/ml a 20°C. Actualmente, se continúa trabajando con otras condiciones encontradas del primer tamizaje.

Conclusiones y perspectivas. Se logró clonar, expresar y purificar la invertasa recombinante INVB de *Z. mobilis*. Se encontraron condiciones que favorecen la formación de cristales de la invertasa INVB, los cuales serán analizados por su capacidad para difractar un haz de rayos X. Estos estudios están enfocados hacia la determinación de la estructura 3-D de INVB por cristalografía de rayos X.

Agradecimiento. Este proyecto ha sido financiado por el CINVESTAV y el CONACyT (158288).

Bibliografía.

1. Alberto F., Bignon C., Sulzenbacher G., Henrissat B., Czjzek M. (2004) The Three-dimensional Structure of Invertase (- Fructosidase) from *Thermotoga maritima* Reveals a Bimodular Arrangement and an Evolutionary Relationship between Retaining and Inverting Glycosidases. *J. Biol. Chem.* 279(18):18903-18910.
2. Yanase H, Iwata M, Kita K, Kato N, Tonomura K. (1995) Purification, crystallization, and characterization of the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis*. *J Ferment Bioeng.* 79(4):367-36.