



REPLEGAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE RODANASA Y LDH ASISTIDO POR EL DOMINIO APICAL INMOVILIZADO EN CELULOSA

Lucero A. Ramón Luing, Beatriz Xoconostle Cázares, Roberto Ruíz Medrano y Jaime Ortega López.
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV IPN. Av. IPN 2508, México D. F., C. P. 07360.
Tel: 50613800 ext. 4381 Fax: 50613313. jortega@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: replegamiento cromatográfico, rodanasa, LDH.

Introducción. Una gran mayoría de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* no se pliegan adecuadamente y se acumulan en cuerpos de inclusión, su replegamiento es una etapa necesaria para recuperar su actividad biológica. Altamirano y col. (1) demostraron que el dominio apical de la chaperonina GroEL, libre o inmovilizado a una matriz insoluble, cataliza el replegamiento de algunas proteínas sin requerir ATP. El dominio apical inmovilizado puede empacarse en una columna y reutilizarse. Este proceso es factible de llevarse a escala preparativa o industrial, pero su escalamiento depende en gran parte de los costos en su preparación. En un trabajo realizado previamente (2) se realizó una fusión traduccional del dominio apical de GroEL (AD_{GroEL}) con un dominio de unión a celulosa (CBD_{Cex}) de *Cellulomonas fimi* y se encontró que el dominio apical fusionado al CBD_{Cex} e inmovilizado en celulosa asiste el replegamiento en lote de la rodanasa desnaturalizada.

En el presente trabajo se reporta los resultados obtenidos en el replegamiento cromatográfico de las enzimas rodanasa y lactato deshidrogenasa (LDH) asistido por AD_{GroEL} - CBD_{Cex} inmovilizado en celulosa.

Metodología. Se determinó la relación de celulosa-resina de filtración en gel para la separación de la proteína y el desnaturalizante. Se partió de una relación de 40:60 de Sigmacell Cellulose Type 50 (Sigma) como soporte de inmovilización y para la filtración en gel BioGel P-6 distribuidos homogéneamente. La calibración de la columna se realizó con soro albúmina bovina y con las enzimas rodanasa (purificada de hígado de bovino) y LDH (Sigma). La LDH se desnaturalizó bajo las condiciones reportadas por Teshima y col. (3) y el replegamiento se realizó en el amortiguador NaH_2PO_4 , 100 mM, pH 7.0; DTT, 1 mM y EDTA, 0.5 mM. La relación molar minichaperon: enzima: fue de 13:1 (90 nmoles: 6.84 nmoles). La rodanasa se desnaturalizó bajo las condiciones reportadas por Mendoza y col. (4), el replegamiento se realizó en el amortiguador KH_2PO_4 , 100 mM; $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, 50 mM, pH 7.8, C_2H_6OS , 50 mM. La relación molar minichaperon: enzima: fue de: 21:1 (90 nmoles: 4.3 nmoles). Como control se realizó el replegamiento sin el minichaperon inmovilizado para ambas enzimas. Para la evaluación del replegamiento se determinó la actividad enzimática de cada enzima.

Resultados y discusión. En la figura 1 se muestra el perfil cromatográfico de un experimento típico de replegamiento

de la enzima rodanasa. El primer pico corresponde a la enzima renaturalizada y el segundo corresponde a la absorbancia del desnaturalizante y probablemente trazas de la enzima desnaturalizada. Se efectuaron corridas consecutivas, 5 para rodanasa y 6 para LDH, en todas el perfil fue similar. Datos similares se obtuvieron para LDH.

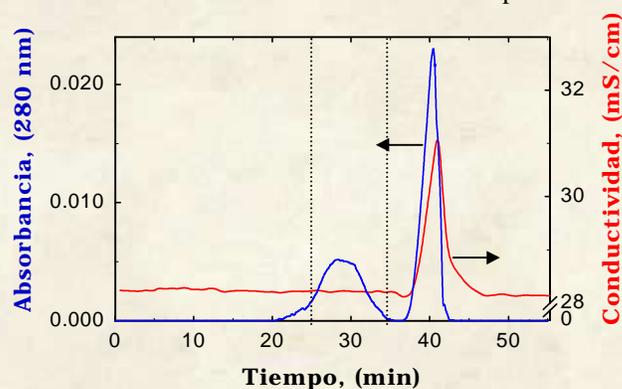


Fig. 1. Replegamiento cromatográfico de rodanasa. Perfil de elución del replegamiento asistido por la proteína AD_{GroEL} - CBD_{Cex} inmovilizada. La cromatografía se resolvió con un flujo isocrático de 0.3 ml/min. Las líneas discontinuas indican la fracción con mayor actividad enzimática.

Conclusiones. El replegamiento cromatográfico obtenido en este trabajo para las enzimas rodanasa y LDH fue de al menos el doble con respecto al espontáneo e igual o superior al reportado en la literatura (3, 4).

Agradecimiento. Al apoyo económico del CINVESTAV-IPN y del CONACYT (Proyecto 40387-Z), así como la beca para realizar estudios de Doctorado otorgada a LARL.

Bibliografía. 1. Altamirano, M. M., Golbik, R., Zahn, R., Buckle, A. M., y Fersht, A. R. (1997). Refolding chromatography with immobilized mini-chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 3576-3578.
2. Ramón, L. L., Ruíz, M. R., Xoconostle, C. B., y Ortega, L. J. (2004). Expresión, purificación e inmovilización del producto de fusión del dominio apical de la chaperonina GroEL con el dominio de unión a celulosa. *Biotecnología*. 9 (1): 38-45.
3. Teshima, T., Kohda, J., Kondo, A., Taguchi, H., Yohda, M. y Fukuda, H. (2000). Preparation of *Thermus thermophilus* Holo-chaperonin-immobilized microspheres with high ability to facilitate protein refolding. *Biotech. and Bioeng.* 68 (2): 184-188.
4. Mendoza, J. A., Rogers, E., Lorimer, G. H., y Horowitz, P. M. (1991). Chaperonins facilitate the *in Vitro* folding of monomeric mitochondrial rhodanese. *J. Biol. Chem.* 266: 13044-13049.