



REPLEGAMIENTO OXIDATIVO ASISTIDO POR DsbA, DsbC y D.A._{GroEL} INMOVILIZADOS EN CELULOSA

Aurora Antonio Pérez, Tania Rivera Hernandez, Jaime Ortega López. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería.

CINVESTAV-IPN. Av. IPN # 2508, San Pedro Zacatenco, CP 07360 México, DF. Fax 5061-3313.
haxasso@yahoo.com.mx

Palabras clave: replegamiento oxidativo, lisozima, biocatalizadores.

Introducción: La formación de cuerpos de inclusión (CI), abaten los rendimientos obtenidos en la producción de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*. Las proteínas de CI requieren de un proceso de replegamiento (espontáneo ó asistido), para la recuperar su estructura nativa; sin embargo, algunas proteínas como la hGH e insulina, además de plegarse, requieren de la formación de sus enlaces disulfuro. En el “replegamiento oxidativo” se han empleado con éxito catalizadores del plegamiento (D.A._{GroEL}), y de la formación de enlaces disulfuro (DsbA y DsbC); acoplados a sistemas cromatográficos (1); sin embargo, su aplicación a mayor escala, esta limitada por los costos involucrados en la inmovilización de estas proteínas. Se ha demostrado que los módulos de afinidad a celulosa (CBD) son una alternativa de purificación e inmovilización económica y aplicable a gran escala en la preparación de estos biocatalizadores (2).

En éste trabajo, se evaluó la funcionalidad de las proteínas D.A._{GroEL}, DsbA y DsbC fusionadas al CBD_{Cex} de *Cellulomonas fimi*, en un sistema de replegamiento oxidativo empleando lisozima como proteína modelo.

Metodología: Se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación de las secuencias *dsbA* y *dsbC*. Los fragmentos amplificados se subclonaron en el vector pET 38-b(+). Las proteínas de fusión DsbA-CBD_{Cex} y DsbC-CBD_{Cex} y D.A._{GroEL}-CBD_{Cex}, se expresaron y purificaron por cromatografía de afinidad a níquel o de interacción hidrofóbica. Las proteínas purificadas, se adicionaron en forma libre ó inmovilizadas en celulosa cristalina, en ensayos de replegamiento oxidativo de lisozima previamente reducida y desnaturizada. Por otra parte, para abatir la interacción inespecífica de la lisozima desnaturizada con la celulosa, ésta se saturó con CBD_{Cex}, una vez inmovilizados los biocatalizadores (“celulosa saturada”). La evaluación del replegamiento de lisozima se llevó a cabo monitoreando su actividad enzimática en función del tiempo de replegamiento.

Resultados y Discusión: En el replegamiento oxidativo de lisozima en forma libre asistido por D.A._{GroEL}-CBD_{Cex}, DsbC-CBD_{Cex} y DsbA-CBD_{Cex} se recuperó 75%, 93% y 98% de actividad enzimática respectivamente, superando en todos los casos al replegamiento espontáneo (Fig. 1, panel A). El replegamiento asistido por dos o tres biocatalizadores en forma libre tuvo rendimientos menores, que el asistido por un solo biocatalizador y sus cinéticas mostraron una ligera tendencia sigmoide, sugiriendo efectos cooperativos y/o competitivos (Fig. 1, panel B). Todos los ensayos de replegamiento asistidos por DsbA-CBD_{Cex}, tuvieron los mejores rendimientos, sugiriendo que el “paso limitante” es la formación de los enlaces disulfuro en el replegamiento de lisozima. Los rendimientos del replegamiento asistidos por los

biocatalizadores inmovilizados en celulosa fueron menores que los obtenidos en forma libre (Fig. 1, panel B), este efecto sugiere que la inmovilización en celulosa disminuye el replegamiento de la lisozima tanto por la interferencia en su interacción específica con los biocatalizadores como las interacciones inespecíficas de lisozima con la celulosa. Las interacciones inespecíficas se disminuyeron saturando la celulosa con el CBD_{Cex}, lo cual incrementó los rendimientos de replegamiento (Fig. 1, panel B).

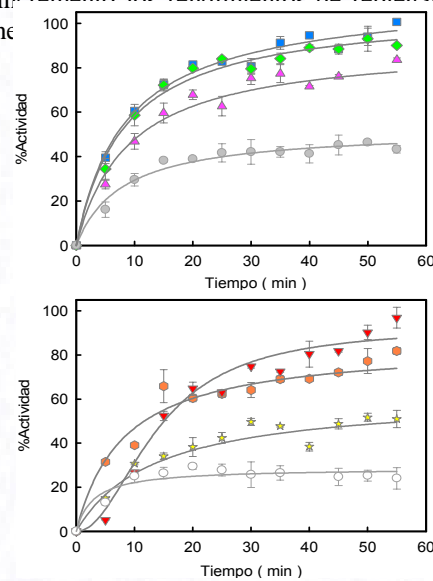


Fig 1.- Replegamiento oxidativo de lisozima

Panel A: Replegamiento en forma libre, asistido por: DsbA-CBD_{Cex} (■); DsbC-CBD_{Cex} (◆); D.A._{GroEL}-CBD_{Cex} (▲); replegamiento espontáneo (●). **Panel B:** Replegamiento de lisozima asistido por los tres biocatalizadores simultáneamente. Inmovilizados en: celulosa (★); “celulosa saturada” (●); forma libre (▼); replegamiento espontáneo en presencia de celulosa saturada (○).

Conclusión: Las proteínas D.A._{GroEL}-CBD_{Cex}, DsbA-CBD_{Cex} y DsbC-CBD_{Cex} asistieron el replegamiento oxidativo de lisozima y pueden ser utilizadas en el desarrollo de un sistema de replegamiento oxidativo cromatográfico a gran escala.

Agradecimiento: Agradecemos al CONACYT por el financiamiento del proyecto 40387-Z y al CINVESTAV-IPN.

Bibliografía:

- (1) De Bernardez, C. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. in Structural Biol.*, 9: 157-163.
- (2) Ramón-Luig, L.A. et al. (2006). One-step purification and immobilization in cellulose of the GroEL apical domain fused to a carbohydrate-binding module and its use in protein refolding. *Biotech. Letters*, 28: 301-307.