

ESTUDIO DE LA RENATURALIZACIÓN *in vitro* DE LA FOSFATASA ALCALINA DE *Escherichia coli* Y SU RELACIÓN CON EL POTENCIAL REDOX.

Luis Rodolfo Vizcaíno Meza, Angélica Meneses-Acosta, Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich
Instituto de Biotecnología UNAM

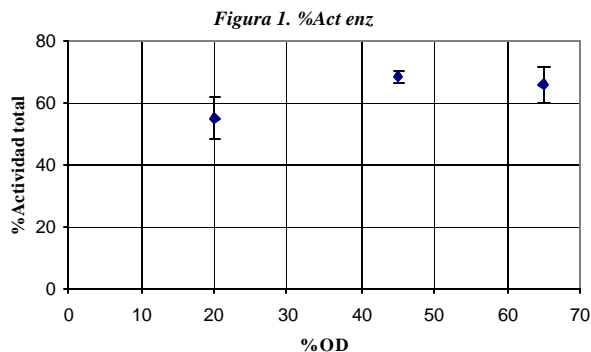
Av. Universidad 2001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos

Fax 01 (777) 3 138811, tonatiuh@ibt.unam.mx

Palabras clave: enlace disulfuro, potencial de óxido-reducción, fosfatasa alcalina.

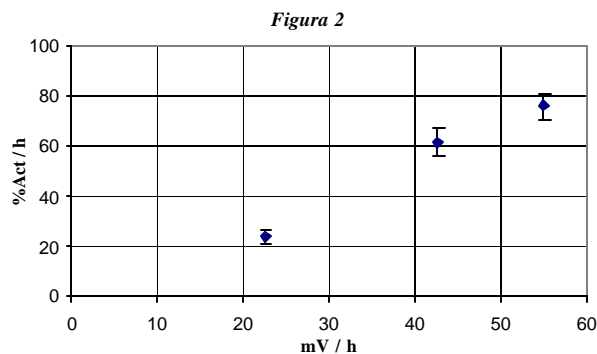
Introducción. La mayoría de las proteínas recombinantes formadas en organismos procariotes como *E. coli* son inactivas debido a que forman agregados insolubles en agua llamados cuerpos de inclusión. En los cuerpos de inclusión, las cisteínas de las proteínas recombinantes pueden formar enlaces disulfuro inter e intramoleculares como consecuencia de un mal plegamiento. En el proceso de plegamiento de las proteínas los enlaces disulfuro estabilizan intermediarios (1) y el potencial redox juega un papel determinante en la formación de enlaces disulfuro (2). El objetivo de este proyecto es determinar la relación entre el potencial redox y el proceso de renaturalización de la fosfatasa alcalina.

Metodología. En un minireactor agitado (250 mL de trabajo) se agregó fosfatasa alcalina (7.5 unidades) de *E. coli* (Sigma-Aldrich) se llevó a cabo la reducción agregando mercaptoetanol hasta una concentración final de 25 mM en el reactor posteriormente se oxidó con oxígeno a una temperatura de 37 °C y un pH de 10.4. El sistema de reacción consiste en la fosfatasa alcalina y la solución amortiguadora (glicina, 7.5 g/L; MgCl₂, 95.2 mg/L; ZnCl₂, 136.3 mg/L; NaHCO₃, 3.7 g/L y CuSO₄, 159.54 mg/L). Se midieron pH, oxígeno disuelto (OD), y potencial redox con sus respectivos electrodos y se utilizó un programa para adquirir los datos. Se midió la actividad enzimática mediante el método colorimétrico. Se utilizó el método de Ellman para la medición de la concentración de tioles (3).



Resultados y discusión. Antes de reducir la enzima se bajó el OD hasta 2% y después se agregó 440 μ L de mercaptoetanol para favorecer un ambiente más reductor posteriormente se favoreció la oxidación elevando y controlando el OD hasta un valor determinado y se observó el comportamiento de la actividad enzimática, de la concentración de tioles y del

potencial redox. La actividad enzimática máxima alcanzada (figura 1) no se vio influenciada en el proceso de renaturalización pero la velocidad de elevación del potencial redox y la velocidad de recuperación se relacionaron de forma logarítmica (figura 2) lo que nos indica un patrón en el porcentaje de renaturalización con respecto al potencial redox al menos en ese intervalo. Otro aspecto por investigar es si el control del potencial redox tiene un efecto sobre la renaturalización de la enzima. La concentración de tioles también se relacionó con el proceso de renaturalización de la enzima (datos no mostrados).



Conclusiones. Se pudo establecer una relación entre potencial redox, el estado de renaturalización de fosfatasa alcalina y la concentración de tioles. Aunque la relación es limitada debido al intervalo, es nuestro primer acercamiento al estudio de la relación entre el potencial redox y el proceso de renaturalización y nos abre un campo de estudio en el plegamiento de proteínas.

Agradecimiento.

Proyecto CONACyT NC-230. Beca CONACyT 165002

Bibliografía.

- 1.- Creighton, T. 1995. Disulphide-coupled protein folding pathways. *Phil Trans R. Soc. Lond.* 348 (B): 5-10
- 2.- Schafer, F.Q.; Buettner, G. R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathionedisulphide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30 (11): 1191-1212.
- 3.- Goeghegan, K. F. 1996. Chemical Modification of Proteins *Current Protocols in Protein Science:* (15.1.13).