



EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y REPLEGAMIENTO DE LA MOMP RECOMBINANTE DE *Chlamydia trachomatis*

Claudia Flores Pucheta², Gustavo Zardeneta¹, Luis De La Maza¹ y Jaime Ortega-López²
¹Patología, Universidad de California, Irvine. ²Biología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN, México DF CP 07360
cflores@cinvestav.mx

Palabras clave: *Chlamydia trachomatis*, Major Outer Membrane Protein, Replegamiento asistido,

Introducción. *Chlamydia trachomatis* es la bacteria patógena responsable de una de las principales infecciones de transmisión sexual (ITS) a nivel mundial. Esta bacteria se establece intracelularmente lo que evita la detección inmunológica mientras permanece en la célula huésped provocando que los casos se presenten asintomáticos (1). Está reportado que la MOMP (Major Outer Membrane Protein) es estructural e inmunogénicamente la proteína dominante del complejo proteico de la membrana externa en *Chlamydia*. Durante la infección esta proteína es responsable de la generación de anticuerpos en el huésped (2), de ahí el interés sobre ésta proteína para desarrollar una vacuna contra esta ITS (3). Sin embargo, obtener cantidades significativas de MOMP nativa a partir de *Chlamydia* resulta costoso y complicado, por ello es de gran interés producir la proteína recombinante y llevarla a su estructura nativa a través de pruebas de replegamiento *in vitro* asistido por chaperones moleculares

El objetivo de este trabajo fue expresar, purificar y replegar la MOMP recombinante (MOMP_r) de *Chlamydia trachomatis*.

Metodología. Células de *E. coli* BL21 (DE3) se transformaron con la construcción *pET45b-MOMP*. La cepa de expresión seleccionada se cultivó en medio TB a 37° C y 200 rpm hasta que alcanzó 0.6 DO_{600nm}. La inducción se inició con la adición de IPTG 1 mM, después de 22 h de cultivo se colectó la biomasa. La proteína recombinante se recuperó a partir de la fracción insoluble como se describe en (4) y los cuerpos de inclusión CI se solubilizaron en urea 8 M. Se purificó por cromatografía de exclusión molecular en una columna empacada de 25x66 (Sephacryl S-500 HR, Sigma-Aldrich) a 1 mL/min. El amortiguador de equilibrio y elución fue Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, NaCl 200 mM, EDTA 10 mM, DTT 0.2 mM y Z3-14 0.05%. Las fracciones obtenidas en cada etapa se prepararon con amortiguador de Laemmli 4x (DTT 50mM) y se analizaron por SDS-PAGE al 10%. La proteína se almacenó a 4° C hasta su uso en los ensayos de plegamiento. Para los ensayos de replegamiento asistido se usaron el Dominio Apical de GroEL y las disulfuro oxidoreductasas DsbA y DsbC libres o inmovilizadas a celulosa de acuerdo a lo reportado en (5) y adicionando a todos los amortiguadores 0.2% del detergente dodecil maltosido.

Resultados. Se identificó una banda de 42 KDa (Fig. 1, carril I) correspondiente al monómero de la MOMP_r y se localizó en la fracción insoluble (Fig. 1, carril FI) en cuerpos de inclusión. En un solo paso de purificación por exclusión molecular se obtuvo el monómero plegado con la pureza deseada. El rendimiento fue de 33.5 mg/L. Los ensayos de replegamiento permitieron recuperar la estructura cuaternaria de la MOMP_r durante la primera hora de interacción, sin embargo esta fue inestable ya que a las 24 h el trímero no fue observable. Por lo anterior se propone emplear mezclas de fosfolípidos y detergente para estabilizar el trímero formado.

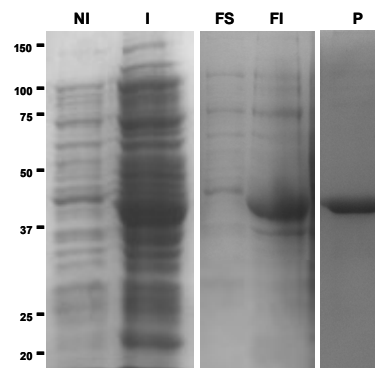


Fig. 1. Expresión y purificación de MOMP_r. SDS-PAGE al 10%. NI No inducido, I Inducido, FS Fracción soluble, FI Fracción insoluble y P Proteína purificada.

Conclusiones.

Se purificó la MOMP_r en un solo paso cromatográfico y aunque se obtuvo la estructura cuaternaria de la proteína, esta fue inestable.

Agradecimiento. Agradecemos el apoyo del CINVESTAV y el financiamiento de los proyectos UC-MEXUS-UCM-46606 (LDLM y JOL) y CONACYT 128694 (JOL).

Bibliografía.

1. Fraiz J. y Jones R. (1988). *Ann. Rev. Med.* 39:357-370
2. Caldwell, H. y Perry L. (1982). *Infect. Immun.* 38:745-754.
3. Forsbach V., Simnacher U., Pfrepper K., et. al. (2010). *Clin. Microbiol. Infect.* 16:1237-1244
4. Sun G., Pal S., Sarcon A., Kim S., et. al. (2007). *J. Bacteriol.* 189(17):6222-6235
5. Antonio A. y Ortega J. (2010) GroEL Apical Domain, DsbA and DsbC immobilized in cellulose assisted the chromatographic oxidative refolding of lysozyme. *14th International Biotechnology Symposium and Exhibition.* University of Bologna. Rimini, Italia, 14-18 Sep 2010.