



## EL DOMINIO APICAL DE LA CHAPERONINA GROEL INMOVILIZADO EN MEMBRANAS DE CELULOSA CATALIZA EL REPLEGAMIENTO DE ENZIMAS DESNATURALIZADAS.

Abimael Cruz-Migoni, Marisa Sámano-Banda, Lucero Ramon-Luing y Jaime Ortega-López.  
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. Av. IPN 2508, México DF, CP 07360.  
Tel. 50613800 ext. 4381. Fax 57473313. abimaelc@prodigy.net.mx.

*Palabras clave: Dominio apical de GroEL, cuerpos de inclusión, membranas de celulosa.*

**Introducción.** *Escherichia coli* es el sistema de expresión más utilizado en la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, la mayoría de las proteínas no se pliegan adecuadamente y se depositan en agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión (CI). Para recuperar la proteína activa, los CI se solubilizan con agentes desnaturantes, para posteriormente removerlos y permitir su replegamiento. Dentro del gran número de estrategias utilizadas, el replegamiento cromatográfico es uno de los sistemas con mayor potencial debido a su fácil automatización y factible escalamiento (1). En un trabajo previo se realizó la fusión traduccional del dominio apical de la chaperonina GroEL ( $AD_{GroEL}$ ) con un dominio de unión a celulosa ( $CBD_{Cex}$ ) de *Cellulomonas fimi* y se demostró que la proteína recombinante ( $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$ ) proveniente de la fracción soluble (FS) ayuda al replegamiento de la enzima rodanasa sin requerir ATP (2). Sin embargo, también en este caso, la proteína recombinante se expresó mayoritariamente en CI ( $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$  (CI)). Para probar si la proteína  $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$  (CI) recupera su afinidad por celulosa y ayuda al replegamiento de proteínas desnaturadas, en el presente trabajo se implementó un sistema de replegamiento cromatográfico con esta proteína inmovilizada a membranas de celulosa (3).

**Metodología.** Para la producción de  $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$  se utilizó una cepa *E. coli* transformada con el plásmido pET-38 b[+]-AD. El paquete celular, se recuperó, lavó y lisó. Los CI se recuperaron por centrifugación y se solubiliaron con amortiguador 8 M de urea. Posteriormente, se diluyeron hasta 1 M de urea y se inmovilizaron en una columna empacada con 32 membranas de tela de algodón de 1 cm de diámetro. Para el replegamiento asistido se inmovilizaron a estas membranas 0.254 y 0.127  $\mu$ moles de  $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$  (CI) y se inyectaron 100 y 80  $\mu$ l a concentraciones de 1 y 3.4  $\mu$ M de rodanasa y lactato deshidrogenasa (LDH) desnaturadas respectivamente. Como control se utilizó la proteína proveniente de la fracción soluble (FS). El replegamiento espontáneo se realizó bajo las mismas condiciones pero sin el minichaperon inmovilizado. La actividad específica de cada fracción se determinó dividiendo la actividad enzimática (rodanasa o LDH) entre el área bajo la curva del pico de elución (3). El porcentaje de plegamiento se determinó considerando la actividad específica de la enzima nativa como el 100%.

**Resultados y discusión.** La proteína  $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$  (CI) fue solubilizada con 8M de urea y después de diluirla hasta 1M, se purificó e inmovilizó a membranas de celulosa en un

solo paso sin requerir ligandos químicos. Utilizando una columna de 1 cm de diámetro empacada con 32 de estas membranas, se logró un replegamiento del 35 y 22 % de rodanasa y LDH desnaturadas respectivamente contra solamente un 10% del replegamiento espontáneo (Figura 1). Los resultados de este trabajo mostraron que la proteína  $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$ (CI) recupera su actividad de minichaperon y asiste el replegamiento de proteínas en forma similar a la proteína proveniente de la fracción soluble. El replegamiento cromatográfico en una columna de membranas de celulosa no presenta grandes caídas de presión, es reutilizable y susceptible de escalar, por lo que representa una opción viable para el replegamiento de proteínas desnaturadas provenientes de cuerpos de inclusión.

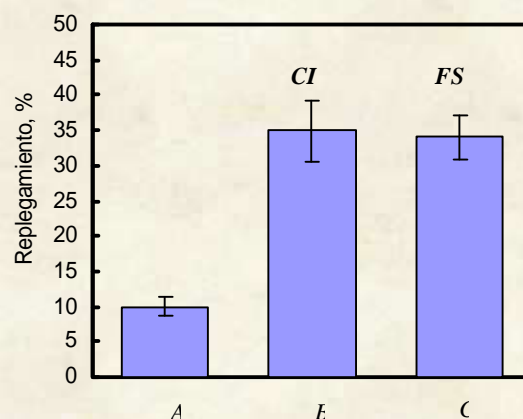


Fig. 1. Replegamiento cromatográfico de rodanasa asistido por  $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$  (CI y FS) inmovilizado en una columna de membranas de celulosa. Replegamiento espontáneo (A). Replegamiento de rodanasa asistido por  $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$  proveniente de CI (B) y proveniente de FS (C).

**Conclusiones.** La proteína de fusión  $AD_{GroEL}-CBD_{Cex}$  proveniente de CI fue capaz de asistir el replegamiento de rodanasa y LDH en forma similar a la proteína en su conformación nativa.

**Agradecimiento.** Al financiamiento de CINVESTAV-IPN y del CONACYT (Proyecto 40387-Z). Beca CONACYT 184033.

**Bibliografía.** 1. Vallejo, L. y Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*. Vol (3):11.  
2. Ramon-Luing, L. (2002). Tesis de maestría, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, *Cinvestav*.  
3. Cruz-Migoni, A. (2005). Tesis de maestría, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, *Cinvestav*.