

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

Unidad Zacatenco
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

**Replegamiento oxidativo cromatográfico de
proteínas recombinantes, asistido por chaperones
moleculares**

Tesis que presenta:

Aurora Antonio Pérez

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias en Biotecnología

Director de Tesis:

Dr. Jaime Ortega López

México, D.F.

Septiembre 2012

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de Proteínas (Laboratorio 23) del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional de México (IPN), bajo la dirección del Dr. Jaime Ortega López, con la asesoría de la Dra. Claudia Benitez Cardoza, de la Dra. Angélica Meneses Acosta, de la Dra. Ma del Carmen Montes Horcasitas y del Dr. Rodolfo Marsch Moreno en el período comprendido de septiembre 2007 a septiembre 2012.

Este trabajo de investigación se realizó con el apoyo financiero del CONACyT donativos 40387-Z y 128694, así como también contó con el financiamiento del ICyTDF proyecto PIFUTP08-108. Para el cumplimiento del programa de Doctorado en Ciencias en el período septiembre 2007 - agosto 2011 se contó con la beca (10458) otorgada por el CONACyT. Del periodo septiembre 2011 - septiembre 2012 se contó con la beca (BM11-133) por parte del ICyTDF.

Este trabajo está dedicado a aquellas personas que constantemente me han hecho pensar, reflexionar y actuar a través de su ejemplo e insuperable apoyo.

A mis padres Matilde Pérez Pastrana y José Antonio Cruz.

A mis nuevos ejemplos Elsa Muñoz González y Roberto López González

A mis hermanos Alicia, José, Lilia, Silvia, Elvia y Norma.

A mis nuevos hermanos Hilda, Alfonso y Roberto.

A mis otros nuevos hermanos Elsa, Erika, Enrique, Roberto.

A mis sobrinos Adriana, Aranza y Leo.

A mis nuevos sobrinos Irving y Sebastián

Pero sobretodo a mis dos grandes amores Gerardo y Gerardito.

Agradecimientos

No tengo palabras elocuentes para poder expresar mi agradecimiento al Dr. Jaime Ortega, ya que sin cada una de sus enseñanzas este trabajo no hubiese sido posible. Pero sobretodo quiero agradecer que me ofreciera constantemente su confianza y apoyo, no sólo a nivel académico si no a todos niveles. Gracias por dejarme formar parte y sentirme parte de su segunda familia, es decir de su grupo de investigación.

Particularmente quiero agradecer a la Dra. Angelica Meneses Acosta, ya sin su dedicación y atinados comentarios desde la carrera yo no me hubiese metido a este proyecto que en más de una forma ha sido enriquecedor.

Gracias Dra. Por Agradezco a la Dra. Ma. Del Carmen Montes, a la Dra. Claudia Benitez y al Dr. Rodolfo Marsch por sus comentarios y consejos que constantemente enriquecieron y mejoraron la calidad del presente trabajo.

Gracias Claudia Ivonne Flores, Maru Zúñiga y Silvia Zúñiga por su apoyo en la organización, mantenimiento y administración del laboratorio. Sin duda alguna su labor es clave para el adecuado desarrollo del trabajo que llevamos a cabo en el laboratorio 23.

Lucy, Olga, Gerardo, Ivonne, Ariana, Ruben, Viri, gracias por su apoyo, paciencia, alegría y ejemplo. En fin, por su compañerismo en cada momento que compartimos fuera y dentro del laboratorio.

Paula, Carolina, Lulu, Olga, Ana, gracias chicas por estar ahí en las buenas y en las malas. Porque en definitiva, sin esas risas este periodo no hubiese sido tan agradable.

También agradezco a mis queridos amigos Norma (Lili), Elsa, Janet, Nancy, Indira, Igor, Teho y Agus, aunque no estemos en contacto diario me brindan su amistad y apoyo traspasado las barreras del tiempo y del espacio.

Un profundo agradecimiento a todas aquellas personas que me apoyaron de la manera menos esperada y la más útil. Gracias Familia López Muñoz, en especial a Roberto López González y Elsa Muñoz González por permitirme formar parte de su familia y por apoyarme en el cuidado y educación de lo más valioso que tengo en mi vida.

Índice General

1.0.-RESUMEN	1
2.0. INTRODUCCION	
2.1.-Expresión de proteínas recombinantes.....	3
2.2.-Cuerpos de inclusión.....	4
2.3.-Renaturalización de proteínas recombinantes.....	5
2.4.-Replegamiento.....	8
2.4.1.-Replegamiento oxidativo.....	9
2.5-Alternativas operacionales de replegamiento.....	15
2.5.1.-Replegamiento por dilución.....	15
2.5.2.-Replegamiento por recambio de amortiguador a través de métodos con membranas.....	16
2.5.3.-Replegamiento de proteínas recombinantes por procesos cromatográficos.....	16
2.6.- Auxiliares del plegamiento de proteínas.....	19
2.6.1.- Función de las chaperoninas GroEL-GroES.....	20
2.6.2.- Catalizadores de la formación de enlaces disulfuro	21
2.6.3.- Función de DsbA y DsbC.....	21
2.7.-Replegamiento asistido	30
2.7.1.-Replegamiento cromatográfico asistido.....	31
2.7.2.-Replegamiento cromatográfico asistido por DA-CBD.....	32
2.7.3.-Replegamiento oxidativo asistido por DsbA-CBD y DsbC-CBD.....	36
2.8.-Ubicación del trabajo	37
3.0.-JUSTIFICACIÓN	38
4.0.-HIPÓTESIS DE TRABAJO	39
5.0.-OBJETIVOS	40

6.0.-MATERIALES Y MÉTODOS:

6.1.-Proteínas a replegar

6.1.1.-Lisozima.....	41
6.1.2.-Hialuronidasa (rHAsa).....	41
6.1.2.1.- Análisis bioinformático de rHAsa.....	42

6.2.- Preparación de las columnas de replegamiento

6.2.1.- Expresión de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD.....	45
6.2.2.- Purificación de la proteína DA-CBD	46
6.2.3.- Purificación de DsbC-CBD y DsbA-CBD	46
6.2.4.- Análisis de afinidad a celulosa de las proteínas DsbC-CBD y DsbA-CBD.....	47
6.2.5.- Preparación de la isoterma de adsorción.....	48
6.2.6.- Inmovilización de DA-CBD, DsbA-CBD, DsbC-CBD a celulosa	49
6.2.7.-Preparación de la columna a emplear en el replegamiento cromatográfico.....	49

6.3.- Evaluación de las condiciones de operación de la columna en el replegamiento cromatográfico oxidativo de lisozima asistido por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizadas en celulosa.

6.3.1.-Replegamiento de lisozima asistido en dilución.....	50
6.3.2.- Parámetros operacionales del replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima.....	51
6.3.3.- Ensayos de replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima.....	52
6.3.4.- Replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima por lotes consecutivos.....	53
6.3.5.- Análisis de estabilidad de la inmovilización de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD en celulosa.....	54

6.4.- Evaluación de la funcionalidad de los DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, en el replegamiento oxidativo de proteínas recombinantes acumuladas en CI

6.4.1.- Expresión de rHAsa.....	57
6.4.2.- Análisis de solubilidad de rHAsa.....	57
6.4.3.- Purificación de rHAsa.....	58
6.4.4.- Monitoreo del desplegamiento de rHAsa por dicroísmo circular y fluorescencia.....	58
6.4.5.- Replegamiento espontáneo de rHAsa por diálisis.....	61
6.4.6.- Replegamiento asistido de rHAsa por dilución.....	61
6.4.7.- Replegamiento cromatográfico de rHAsa por lotes consecutivos.....	61
6.4.8.- Replegamiento cromatográfico de rHAsa por lotes consecutivos en “ <i>celulosa saturada</i> ”.....	62

6.5.-Metodologías generales

6.5.1. Microorganismos, medios y condiciones de cultivo.....	63
6.5.2.-Extracción de ADN plasmídico.....	64
6.5.3.-Purificación de ADN por método Qiagen.....	64
6.5.4.-Transformación de células de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	65
6.5.5.-Análisis electroforético de las proteínas recombinantes (SDS-PAGE).....	65
6.5.6.-Ensayo de la actividad enzimática de lisozima.....	66
6.5.7.-Ensayo de actividad enzimática de rHAsa.....	66
6.5.8.-ELISA para la cuantificación de rHAsa.....	67
6.5.9.-Ensayo de actividad de rHAsa por zimogramas.....	67

7.0.-R E S U L T A D O S

7.1.- Preparación de las columnas de replegamiento

7.1.1.- Expresión y Purificación.de las proteínas DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD.....	69
7.1.2.- Análisis de afinidad de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD a celulosa.....	69
7.1.3.- Isoterma de Adsorción.....	69

7.2.-Replegamiento cromatográfico oxidativo de lisozima

7.2.1.- Replegamiento cromatográfico	78
7.2.2.- Efecto de la concentración de lisozima en los porcentajes de replegamiento cromatográfico.....	79
7.2.3.- Replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima por lotes consecutivos.....	84
7.2.4. Análisis SDS-PAGE de la matriz de replegamiento después de seis lotes de replegamiento.....	85

7.3.- Estabilidad de la inmovilización a celulosa por medio del CBD

7.3.1.- Estabilidad de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD.....	98
7.3.2.- Estabilidad operativa y de almacenamiento de la columna de replegamiento.....	99

7.4.- Replegamiento oxidativo de proteínas recombinantes acumuladas en CI

7.4.1.- Análisis bioinformático de rHAsa.....	104
7.4.2.- Expresión y purificación de rHAsa	110
7.4.3.-Replegamiento asistido de rHAsa por diálisis y dilución	111
7.4.4.-Replegamiento asistido de rHAsa en columna cromatográfica	119
7.4.5.- Replegamiento cromatográfico de rHAsa por lotes consecutivos.....	119

7.4.6.- Replegamiento cromatográfico de rHAsa por lotes consecutivos en “ <i>celulosa saturada</i> ” con CBD.....	129
7.4.7.- Replegamiento cromatográfico de rHAsa por lotes consecutivos en “ <i>celulosa saturada</i> ” con <i>chaperones</i> ”.....	129
7.4.8.- Curva de desnaturalización de rHAsa por adición de GdnHCl.....	130
7.4.9.- Análisis del espectro de dicroísmo circular de rHAsa replegada.....	131
8.0.-DISCUSIÓN	145
9.0.-CONCLUSIONES	151
10.0.-BIBLIOGRAFÍA	152

Índice de Figuras

Figura 1.- Esquema de la perspectiva energética del plegamiento vs. Agregación.....	11-12
Figura 2.- Estructura 3D y mecanismo de plegamiento de proteínas asistido por GroEL – GroES.....	22-23
Figura 3.- Plegamiento oxidativo de proteínas en periplasma de <i>E. coli</i>	26-27
Figura 4.- Estructura 3D de las proteínas DsbA y DsbC.....	28-29
Figura 5.- Replegamiento asistido.....	33-34
Figura 6.- Estrategia experimental.....	43-44
Figura 7.- Determinación de la relación entre el área bajo la curva y la proteína eluída de la columna de replegamiento cromatográfico.....	55-56
Figura 8. Purificación de las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD.....	71-72
Figura 9.- Unión a celulosa de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD.....	73-74
Figura 10.- Isoterma de adsorción a celulosa de DsbC-CBD.....	75-76
Figura 11.- Replegamiento cromatográfico de lisozima.....	80-81
Figura 12.- Efecto de la concentración de lisozima desnaturalizada en el replegamiento cromatográfico.....	82-83
Figura 13.- Replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima por lotes consecutivos.....	87-88
Figura 14.- Proteína eluída y replegamiento de lisozima en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos.....	89-90
Figura 15.- Eficiencia de replegamiento en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos.....	91-92
Figura 16.- Análisis SDS-PAGE de la matriz de replegamiento después de seis lotes de replegamiento consecutivos.....	94-95
Figura 17.- Esquema teórico de la remoción de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD.....	96-97
Figura 18.- Estabilidad de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD.....	100-101
Figura 19.- Estabilidad operacional y de almacenamiento de la columna de replegamiento.....	102-103
Figura 20.- Alineamiento múltiple de la rHAsa de tarántula.....	106-107
Figura 21.- Modelo de la estructura terciaria de rHAsa.....	108-109

Figura 22.- Expresión de la rHAsa en diferentes genotipos de <i>E. coli</i>	113-114
Figura 23.- Purificación de la proteína rHAsa.....	115-116
Figura 24.- Replegamiento de la rHAsa por diálisis y dilución.....	117-118
Figura 25.- Replegamiento cromatográfico oxidativo de rHAsa en lotes consecutivos.....	121-122
Figura 26.- Proteína eluída y replegamiento de la rHAsa en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivo.....	123-124
Figura 27.- Análisis SDS-PAGE de la matriz de replegamiento después de 8 lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico de rHAsa.....	125-126
Figura 28.- Saturación de la matriz de replegamiento.....	127-128
Figura 29.- Proteína eluída y replegamiento en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos usando celulosa saturada con CBD.....	132-133
Figura 30.- Proteína eluída y replegamiento en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico desarrollados en celulosa saturada con chaperones.....	134-135
Figura 31.- Eficiencia de replegamiento en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos.....	136-137
Figura 32.- Actividad de rHAsa en función del número de lotes.....	138-139
Figura 33.- Replegamiento de rHAsa estimado por fluorescencia.....	140-141
Figura 34.- Espectro de dicroísmo circular de rHAsa.....	142-143

Índice de Tablas

Tabla I.- Expresión en <i>Escherichia coli</i> de proteínas recombinantes terapéuticas.....	6
Tabla II.- Problemas frecuentes en la producción de proteínas heterólogas en <i>E. coli</i> y estrategias aplicadas.....	7
Tabla III.- Aditivos usados en amortiguadores de replegamiento.....	13
Tabla IV.- Replegamiento oxidativo de proteínas provenientes de CI empleando el sistema GSH-GSSG.....	14
Tabla V.- Replegamiento de proteínas por procesos cromatográficos.....	18
Tabla VI.- Replegamiento de proteínas por procesos cromatográficos asistidos.....	35
Tabla VII.- Tabla comparativa de alternativas de inmovilización de chaperones.....	77
Tabla VIII.- Rendimientos de replegamiento de lisozima de las alternativas evaluadas.....	93
Tabla IX.- Características fisicoquímicas de rHAsa.....	105
Tabla X.- Rendimientos de replegamiento de rHAsa determinados por fluorescencia.....	141
Tabla XI.- Rendimientos de replegamiento de rHAsa de las alternativas evaluadas.....	144

Apéndices

Apéndice I: Soluciones	159
-------------------------------------	-----

Apéndice II: Figuras Suplementarias

Figura suplementaria 1.- Curva estándar para la cuantificación de DsbC.....	162
Figura suplementaria 2.- Curva estándar para la cuantificación de rHAsa por ELISA.....	163
Figura suplementaria 3.- Actividad de rHAsa soluble.....	164

Apéndice III: Tablas suplementarias

Tabla suplementaria I.- Parámetros de cada lote del replegamiento oxidativo cromatográfico espontáneo...	165
Tabla suplementaria II.- Parámetros de cada lote del replegamiento oxidativo cromatográfico asistido.....	166
Tabla III.- Tabla compilatoria de los datos de la curva de desnaturalización química por de rHAsa.....	167
Tabla suplementaria IV.- Rendimiento de replegamiento por dilución de rHAsa recombinante.....	168

Apéndice IV: Participación en Congresos	169
--	-----

Apéndice V: Productividad	170
--	-----

Abreviaturas

C*	Concentración de proteína en el equilibrio en el sobrenadante
CBD	Dominio de unión a celulosa de <i>Cellulomonas fimi</i>
CI	Cuerpos de inclusión
DA	Dominio Apical de GroEL
DC	Dicroísmo circular
kd ₁ ,kd ₂	Constantes de disociación de los sitios de alta y baja afinidad respectivamente
P _E	Proteína eluída por la columna de replegamiento cromatográfico
P _I	Proteína inyectada en la columna de replegamiento cromatográfico
q*	Proteína unida a celulosa
Qmax	Capacidad máxima de adsorción
rHAsa	Hialuronidasa de tarántula expresada en forma recombinante en <i>E. coli</i>

1.0.- RESUMEN

Escherichia coli es el sistema de expresión que continúa siendo la primera opción para la producción de proteínas recombinantes cuando la actividad de la proteína no está comprometida por modificaciones postraduccionales. Se encuentran disponibles muchas cepas de *E. coli*, vectores de expresión y condiciones de cultivo optimizados para producir proteínas solubles y correctamente plegadas. Estas estrategias frecuentemente fallan y las proteínas recombinantes se acumulan en agregados proteicos denominados cuerpos de inclusión (CI). Para recuperar su actividad biológica, la proteína debe ser replegada, operación unitaria que representa la mayor limitante en la producción de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*. El replegamiento cromatográfico asistido por auxiliares del plegamiento y de la formación de enlaces disulfuro es una alternativa de replegamiento *in vitro* que mejora significativamente la producción de proteínas biológicamente activas a partir de CI. Sin embargo, su aplicación y desarrollo se ha limitado principalmente por el costo en la preparación de la matriz de replegamiento. Evaluando una alternativa de inmovilización económica y funcional, en este trabajo, el dominio apical de GroEL (DA) y las oxidoreductasas DsbA y DsbC se fusionaron a un dominio de unión a celulosa (CBD). Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD se purificaron, inmovilizaron en celulosa y se acoplaron a un sistema cromatográfico, el cual incrementó los rendimientos del replegamiento de lisozima (proteína modelo) y de una hialuronidasa de tarántula recombinante (rHASa), expresada en *E. coli* como CI. El replegamiento cromatográfico asistido por los chaperones inmovilizados permitió la recuperación del 100% de la actividad de ambas proteínas inyectadas a concentraciones de 2-3 mg/mL, por medio de 6-8 lotes de replegamiento consecutivos, mientras que sin la asistencia de los chaperones sólo se recuperó el 23% y 4% de la actividad de lisozima y rHASa respectivamente. Por otra parte, la inmovilización de DA, DsbA y DsbC en celulosa mostró una alta estabilidad de almacenamiento, perdiéndose tan sólo el 15% de actividad de los chaperones inmovilizado después de 18 meses. Además, de presentar una alta estabilidad operacional bajo condiciones desnaturalizantes extremas. Estos resultados demostraron que el replegamiento cromatográfico asistido por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, inmovilizados en celulosa, puede ser aplicado en el replegamiento oxidativo de proteínas expresadas en *E. coli* en CI.

1.0.- S U M A R Y

The *Escherichia coli* expression system remains the first choice for the production of recombinant proteins when the biological activity is not compromised by posttranslational modification. Many strains of *E. coli*, vectors and culture conditions are available to express recombinant proteins in a soluble and correctly folded conformation. Often these strategies fail, and misfolded recombinant proteins aggregate into inclusion bodies (IB). To recover its biological activity, a recombinant protein must be refolded, a step that has become the major limitation of the *E. coli* expression system. Chromatographic refolding, assisted by immobilized chaperones and foldases, is an *in vitro* refolding protocol that significantly improves refolding yields, yet its application at the bioprocess scale has been limited. Therefore, new cost-efficient alternatives to utilize chromatographic refolding assisted by chaperones and foldases might improve the production of biologically active proteins in *E. coli*. In this work, the GroEL apical domain (AD) and the oxidoreductases DsbA and DsbC fused to a carbohydrate-binding module (CBM) were purified and immobilized on microcrystalline cellulose particles. A column packed with a 60:40 (v/v) mixture of gel filtration media and cellulose particles with immobilized AD DsbA and DsbC significantly improved the chromatographic refolding of lysozyme (model protein) and a hyaluronidase from tarantula expressed as IB (rHAsa). For both proteins, the assisted refolding yield were up to 100% when the injected protein concentration was 2-3 mg/mL by 6-8 consecutive refolding batches were developed, while only 23% of lysozyme activity and 4% of rHAsa activity were recovered without the chaperones assistance. In addition, AD, DsbA and DsbC immobilized on cellulose exhibited significant storage and operational stability under the extreme denaturing conditions used in the chromatographic refolding batches. These results demonstrate that chromatographic refolding assisted by AD, DsbA, and DsbC immobilized on cellulose is suitable for the oxidative refolding of proteins expressed in *E. coli* as IB.

2.0.- INTRODUCCION

2.1.- Expresión de proteínas recombinantes.

A partir de la producción de insulina humana a través de la ingeniería genética desde hace más de 20 años, hemos sido testigos del desarrollo de la aplicación de la tecnología de DNA recombinante para la producción de proteínas, denominadas “proteínas recombinantes”, diversificando así, la obtención de proteínas; incluso de aquellas provenientes de células eucariontes cuyo cultivo es de difícil mantenimiento o en las cuáles la expresión es mínima (Baneyx y col., 2004; Sorensen, 2005). La aplicación de estos sistemas de producción está enfocada principalmente al uso diagnóstico y/o a la terapéutica. El precio actual de la insulina humana recombinante es de 500 USD/g, precio relativamente bajo cuando se compara con el valor comercial de otras proteínas recombinantes, tales como la eritropoyetina humana (850,000 USD/g) y el factor estimulante de colonias granulocíticas (450,000 USD/g) (Tufts CSDD Impact Report, 2008). Debido a las ventajas de este tipo de productos, cada día se suman a la lista nuevas proteínas recombinantes con aplicación terapéutica en fase experimental y de producción (Pavlou y col., 2004).

Escherichia coli es la bacteria más empleada en la producción de proteínas recombinantes (Tabla I), debido a su rápido crecimiento, sencilla manutención y capacidad para expresar grandes cantidades de proteínas heterólogas a bajo costo. Sin embargo, la mayor parte de la proteína expresada, se encuentra en forma de agregados proteicos denominados cuerpos de inclusión (CI), los cuales requieren de un proceso de replegamiento para la recuperación de su forma bioactiva (Misawal y col., 1999; Terpe, 2006). A pesar de las desventajas que presenta este sistema de expresión (Tabla II), *E. coli* sigue siendo un sistema de expresión eficiente y rentable en la producción de proteínas recombinantes de grado terapéutico como son la insulina, hormona de crecimiento e interferón α y β , entre muchos otros ejemplos. Existen diversas estrategias para inducir la producción de proteína soluble y funcional en *E. coli*, en la Tabla II se enumeran algunas (Terpe, 2006; Vera y col., 2007)..

Sin embargo estas estrategias no siempre funcionan por lo que es necesario desarrollar procesos de producción eficientes que permitan obtener proteínas funcionales a partir de los CI. Por lo cual, uno de los principales retos en la producción de proteínas recombinantes terapéuticas en bacterias, es el desarrollo de sistemas eficientes de renaturalización de proteínas heterólogas provenientes de CI (Lee y col., 2006; Eiberle, 2010).

2.2.- Cuerpos de inclusión

Los CI son agregados proteicos de alta densidad, localizados tanto en el citoplasma, como en el espacio periplásmico de *E. coli* durante la sobreexpresión de proteínas recombinantes (Schein, 1989; Panda, 2003). En principio, la agregación de proteínas se explicó través de interacciones no específicas de regiones hidrofóbicas de los péptidos recién sintetizados, no obstante, existen evidencias de que los mecanismos de agregación en bacterias son debidos a la interacción intermolecular dependiente de secuencias específicas (Ventura, 2005). Particularmente, en *E. coli*, la formación de los CI se atribuye a la incapacidad del control de calidad de la maquinaria de plegamiento de la célula hospedera frente a la sobreexpresión de proteínas recombinantes, en donde las proteínas mal plegadas se agregan escapando de la degradación proteolítica (Villaverde, 2003). La expresión de proteínas recombinantes en CI tiene ciertas ventajas operativas, debido a que constituyen más del 30% de la proteína total de la célula y es fácil su separación de las proteínas citoplásmicas solubles, por lo que se pueden purificar a través de un proceso sencillo. Además, su configuración ofrece protección proteolítica durante la expresión y purificación. Por otra parte, los CI representan la única posibilidad de acumulación y recuperación de proteínas heterólogas tóxicas para la célula hospedera (ej., toxinas, proteasas). A pesar de estas ventajas, la renaturalización de proteínas recombinantes acumuladas en CI sigue siendo la mayor limitante en (Jhamb y col., 2008; Eiberle, 2010).

2.3.- Renaturalización de proteínas recombinantes

Numerosos esfuerzos se han sumado para la renaturalización de proteínas expresadas y acumuladas en CI, pero hasta el momento no se ha encontrado un procedimiento universal que responda a este objetivo. La estrategia general para la renaturalización de proteínas acumuladas en CI se puede resumir en tres pasos: purificación y lavado de los CI, solubilización y replegamiento (Middelberg, 2002; Vallejo, 2004). La purificación y lavado de los CI, incluye su recuperación después de la ruptura celular por medio de métodos mecánicos o enzimáticos y una etapa de lavado para eliminación de contaminantes insolubles como proteínas integrales de membrana. Los CI se solubilizan por medio de altas concentraciones de agentes desnaturizantes como la urea (8 M) o GdnHCl (6 M). La finalidad de la adición de estos agentes es interrumpir las interacciones hidrofóbicas inespecíficas produciendo la desagregación de los CI (De Bernardez, 1998; Tsumoto y col., 2003). El resultado de la solubilización de los CI es una proteína sin configuración nativa; que debe llevarse a condiciones que promuevan la formación de su estructura funcional; proceso limitante denominado “*replegamiento*” (De Bernardez, 1998; Middelberg, 2002).

Tabla I.- Expresión en *Escherichia coli* de proteínas recombinantes terapéuticas.

Proteína	Modo de expresión	Nivel de Expresión (% de proteína total)	Producción (mg/L)	Formación de CI
hEGF	Fusión	NE	60	+
Insulina humana	Fusión	20	NE	+
hIFN- β	Directo	NE	20	-
hIFN- γ	Directo	40	NE	+
Prourocinasa humana	Directo	6	NE	+
hGH	Directo	NE	169	+
hGH	Secreción	14	25	-
htPA	Fusión	10	460	+
htPA	Secreción	NE	0.18	-
hTIMP 1	Directo	15	NE	+
hTIMP 2	Fusión	5	NE	+
Calcitonina humana	Fusión	NE	478	+
hG-CSF	Directo	15	2800	+
hbFGF	Directo	NE	1700	-
hHIL 2	Directo	20	700	+
hHIL 6	Directo	20	NE	+
Glucagon humano	Fusión	34.5	42	+
Hirudina	Fusión	18	200	+
Hirudina	Secreción	NE	1000	-
Arginina Desaminasa	Directo	20	400	+

hEGF (Factor de crecimiento epidermal), hIFN (Interferón humano), hGH (Hormona de crecimiento humana), htPA (Activador de plasminógeno humano), hTIMP (Inhibidor de metaloproteínasas humano), hG-CSF (Factor estimulante de granulocitos humano), hbFGF (Factor básico de crecimiento de fibroblastos), hHIL (Interleucina humana), NE (No estimado). Adaptada de Misawal y col., 1999.

Tabla II.- Problemas frecuentes en la producción de proteínas heterólogas en *E. coli* y estrategias aplicadas.

Evidencia	Problema	Soluciones
Muerte celular	Proteína Tóxica. Alta expresión basal.	Restricción y control de la expresión basal. Empleo de un promotor débil. Disminución de temperatura durante la expresión. Disminución de la concentración del promotor.
Formación de cuerpos de inclusión	Sobreexpresión.	Atenuación de la expresión mediante: Empleo de un promotor débil. Disminución de la concentración del promotor. Disminución de temperatura durante la expresión. Disminución del número de copias del plásmido. Fusión a un tag de afinidad de naturaleza hidrofílica. Coexpresión de chaperones. Cambio de sistema de expresión.
Proteínas insolubles (S-S)	Reducción de enlaces disulfuro.	Control del ambiente redox citoplásmico. Acumulación de la proteína en periplasma. Cambio de sistema de expresión.
Sin presencia de actividad	Proteína mal plegada Decremento de actividad por incompatibilidad estructural con el tag de afinidad.	Control del ambiente redox citoplásmico. Acumulación de la proteína en periplasma- Atenuación de la expresión. Cambiar tag de afinidad. Coexpresión de chaperones. Cambio de sistema de expresión.
Sin presencia de la proteína	Proteína truncada. Presencia de codones extraños.	Empleo de un promotor fuerte. Incremento del número de copias del plásmido. Disminución de temperatura durante la expresión. Suministro de tRNAs extraños. Cambio de sistema de expresión.

(Adaptada de Terpe, 2006)

2.4.- Replegamiento

El *plegamiento* se define como la secuencia de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas de puentes de hidrógeno y de enlaces disulfuro que a través de *intermediarios productivos* en un proceso cooperativo formarán la estructura estable y funcional de una proteína, dichas interacciones están dirigidas por la secuencia de aminoácidos de la proteína (Hartl, 1996; Englander y col., 2007).

El *replegamiento* es una operación unitaria donde se propician las condiciones para llevar a cabo el correcto plegamiento de la proteína. El *plegamiento* es un proceso inicialmente unimolecular, es decir, se establecen interacciones intramoleculares siguiendo una reacción de primer orden y de ser necesaria la formación de oligómeros, subsecuentemente se establecerán interacciones intermoleculares ordenadas y consecutivas. Sin embargo, existe la posibilidad de que se establezcan interacciones intermoleculares entre dos o más moléculas de polipéptidos desplegados o bien, entre intermediarios productivos o no productivos del plegamiento, promoviendo la formación de agregados no estructurados o alternativamente, la formación de agregados fibrilares denominados “amiloides” (Figura 1) (Brockwell y col., 2007; Hartl y col., 2009; Thirumalai, 2010). Por lo anterior, en el replegamiento es fundamental propiciar las condiciones de renaturalización y simultáneamente, prevenir las interacciones intermoleculares desordenadas para evitar la formación de agregados que limiten el rendimiento del proceso (Buswell y col., 2002; Gupta y col., 2007).

El replegamiento de las proteínas provenientes de CI a nivel laboratorio y en muchos procesos industriales se desarrolla por medio de la sustitución o dilución controlada del agente desnaturizante adicionado en el proceso de solubilización (urea, GdnHCl), empleando un amortiguador de replegamiento. Este contiene aditivos que propician el pH y el ambiente redox apropiados, además de tener la capacidad de impedir la formación de agregados, como los listados en la Tabla III.

2.4.1.- Replegamiento oxidativo

Al igual que los enlaces peptídicos, los enlaces disulfuro son de naturaleza covalente, por lo que es de suponerse que tienen un impacto trascendental en el plegamiento y estabilidad de las proteínas. Los enlaces disulfuro en proteínas son altamente conservados y su estabilidad es tal, que se pueden romper espontáneamente hasta temperaturas de 100°C o en pH alcalinos (10 -13) (Schmidt, 2007). Proteínas de interés biotecnológico como la insulina o la hormona del crecimiento, contienen enlaces disulfuro que estabilizan su conformación nativa. Una estrategia empleada, para la expresión de este tipo de proteínas en *E. coli*, es conducir su expresión hacia el espacio periplásmico, puesto que ofrece un ambiente oxidativo propicio para la formación de enlaces disulfuro, permite la recuperación de la proteína en forma activa y concentrada. A pesar de las técnicas de manipulación de localización de expresión de proteínas heterólogas, frecuentemente la expresión se lleva a nivel citoplasmático, acumulándose la proteína de interés mayoritariamente en CI (Kiefhaber y col., 1991; Bernardez y col., 1998). Para solubilizar CI con presencia de enlaces disulfuro, además de los agentes desnaturizantes, se adicionan agentes reductores como el DTT, DTE, GSH, 2-β-mercaptoetanol, para reducir los enlaces disulfuro. Para recuperar la estructura nativa de la proteína desplegada y formar los enlaces disulfuro, deben removerse los agentes desnaturizantes y reductores por un amortiguador de replegamiento de naturaleza oxidativa bajo la manipulación controlada de las condiciones de oxido-reducción, en un proceso denominado “*replegamiento oxidativo*” (Kadokura y col., 2003; De Bernardez y col., 1998; Wang y col., 2006).

Existe una gran variedad de métodos bien establecidos y fundamentados con el propósito de regular el replegamiento oxidativo. Entre estas alternativas, se encuentran la reoxidación de la proteína por la presencia de oxígeno molecular y Cu^{2+} . Los rendimientos obtenidos por este método son limitados debido a la escasa solubilidad del oxígeno (Ahmed y col., 1975). Por otra parte se han desarrollado electrodos para llevar la oxidación electroquímica directa de las proteínas reducidas y el reciclado electroquímico de los grupos “*tiólicos*” reducidos que pueden actuar como mediadores redox, por

medio de las reacciones anódicas, en las que el oxígeno es transferido desde el disolvente; la característica principal de este tratamiento es que utiliza la energía eléctrica como vector (Maleky y col., 2009).

También se ha probado que la adición de sistemas de oxido-reducción en el amortiguador de replegamiento favorece la formación de enlaces disulfuro. Los sistemas de oxido-reducción son mezclas de formas oxidadas y reducidas de compuestos de bajo peso molecular que presentan el grupo -SH, entre los cuales se encuentran los pares cisteína/cistina, DTTox/DTTred (ditiolos) y de glutatión oxidado y glutatión reducido (2GSH-GSSG) (tioles aromáticos), entre otros; los cuales proveen el potencial redox adecuado para la formación de los enlaces disulfuro (Lu, 2008). Durante el *replegamiento oxidativo*, existe una competencia entre el plegamiento de las proteínas contra la formación de agregados. Cuando las proteínas se encuentran en estado reducido son inestables y pueden tener expuestos los grupos -SH, por lo que la interacción intermolecular puede favorecer la formación de enlaces disulfuro con los grupos -SH de otras proteínas, generando agregados sumamente estables. La adición de sistemas de oxido-reducción previene la formación de estos agregados al promover el reacomodo ("*shuffling*") de los enlaces disulfuro (Wang y col., 2006; Lu, 2008). Este reacomodo es un proceso de intercambio múltiple de interacción entre los residuos de cisteína presentes en la proteína, durante el cual se forman las diversas combinaciones posibles de enlaces disulfuro de forma unimolecular, hasta encontrar los enlaces disulfuro estables y por lo tanto, el patrón de enlaces disulfuro correcto (Ruoppolo, 1995; De Bernardez y col., 1998). La aplicación del sistema GSH-GSSG a nivel preparativo se muestra en la Tabla IV (Misawal y col., 1999; Vallejo, 2004). Otra alternativa aplicada al replegamiento oxidativo es la formación de enlaces disulfuro controlada por catalizadores enzimáticos.

Figura 1.- Esquema de la perspectiva energética del plegamiento vs agregación.

En el embudo energético, se muestra en color azul las múltiples conformaciones previas a la adquisición de la estructura nativa por medio de interacciones intramoleculares. La violeta muestra las conformaciones resultantes de las interacciones intermoleculares que conducen a la formación de agregados amorfos o estructuras amiloides. Ambas regiones del embudo energético se intercalan. (Adaptada de Hartl, 2009).

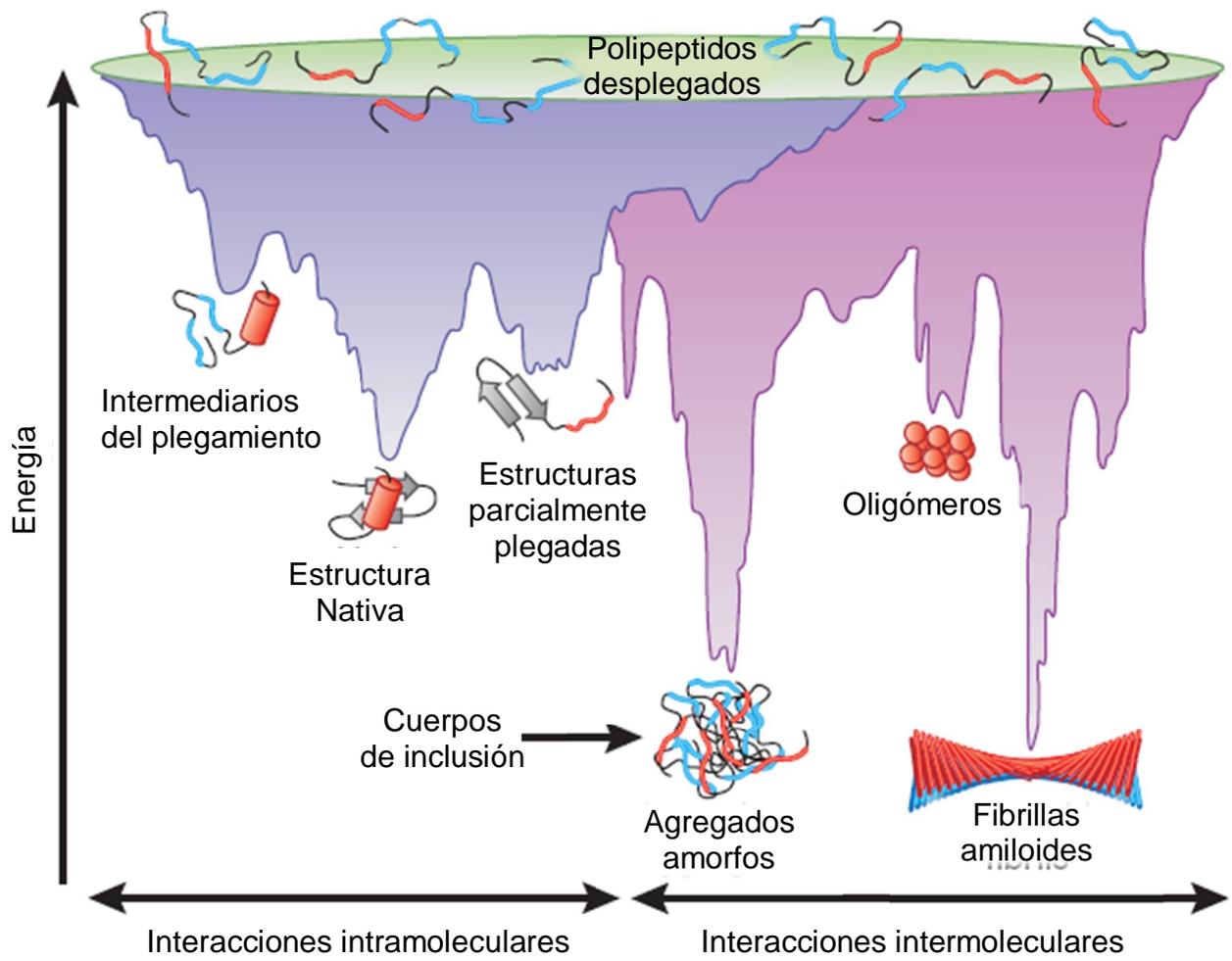


Tabla III.- Aditivos usados en amortiguadores de replegamiento.

Aditivo	Concentración usual
Urea	2 M
Cloruro de guanidina (GdnHCl)	1 M
Arginina	0.5 M
Glicerol	0.4 M
Sacarosa	0.4 M
Laurilmaltosa	0.3 mM
Polietilenglicol (3550 mw)	0.05% w/v
Amortiguador Tris	0.5 M
Triton X 100	10 mM
Acetamida	2 M
n- hexanol	5 mM
Sales (NaCl, Na ₂ SO ₄ , K ₂ SO ₄)	0.5 M

(Adaptada de Middelberg, 2002)

Tabla IV.- Replegamiento oxidativo de proteínas provenientes de cuerpos de inclusión empleando el sistema de oxido reducción GSH-GSSG

Proteína recombinante	Número de enlaces disulfuro	Glutación reducido GSH (mM)	Glutación oxidado GSSG (mM)	pH	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
Fragmento Fab	5	5	0.5	8	10	150
htPA	17	0.5	0.3	8.75	15	24
htPA truncado	9	2	0.2	8.6	20	24
hMCSF	9	0.5	0.1	8.5	4	48
hIL2	1	10	1	8	T ambiente	16
hIL4	3	2	0.2	8	T ambiente	4
hIL6	2	0.01	0.002	8.5	22	16
hTIMP1	6	2	0.2	8	4	16
hTIMP2	3	0.78	0.44	9.75	25	2

htPA (Activador de plasminógeno humano), hTIMP (Inhibidor de metaloproteinasas humano), hG-SF (Factor estimulante de granulocitos humano), hHIL (Interleucina humana). (Adaptada de Misawal y col., 1999).

2.5.- Alternativas operacionales de replegamiento

Se pueden consultar en la base de datos "REFOLD" (<http://refold.med.monash.edu.au/>) una recopilación de más de 600 procedimientos reportados para el replegamiento de proteínas recombinantes, misma que se actualiza constantemente (Chow, 2006). Entre las alternativas a nivel preparativo se encuentran: el replegamiento por dilución, el replegamiento por recambio de amortiguador a través de métodos con membranas y la absorción reversible de las proteínas desnaturizadas a un soporte cromatográfico sólido, todos ellos incluyen la remoción gradual del agente desnaturizante adicionado en el proceso de solubilización (De Bernardez, 1998; Middelberg, 2002).

2.5.1.- Replegamiento por dilución.

El método comúnmente usado en la renaturalización de proteínas provenientes de CI es la dilución de la proteína desnaturizada en amortiguador de replegamiento, el cual contiene aditivos que previenen la formación de agregados. En dicho método se baja la concentración local de proteína por replegar (0.001 mg/mL - 0.1 mg/mL), propiciándose un aislamiento espacial durante el replegamiento y abatiendo la formación de agregados. El replegamiento por dilución es el más usado a nivel industrial en la producción de proteínas recombinantes debido a la simplicidad del proceso. Las bajas concentraciones finales de la proteína en la dilución dificultan la recuperación de la misma. Por otra parte, a nivel operacional el volumen final de los amortiguadores empleados y las dimensiones de los tanques de operación hacen que el proceso de dilución sea ineficiente, costoso, poco escalable y no controlable. En función de las desventajas que presenta el replegamiento por dilución, se han desarrollado estrategias para el aumento de los rendimientos de replegamiento, como son la adición de la proteína a replegar en pulsos (Rudolph y col., 1997) y el reciclado de agregados de procesos de replegamiento por dilución previos (Schelgl y col., 2005). Además, también se ha explorado el empleo

de otras alternativas a la dilución, como los métodos con membranas y la aplicación de procesos cromatográficos aplicables al replegamiento (Middelberg, 2002; Jungbauer y col., 2007).

2.5.2.- Replegamiento por recambio de amortiguador a través de métodos con membranas

La aplicación de membranas en el replegamiento de proteínas está limitada a la remoción del agente desnaturizante por diafiltración. Los CI solubilizados son diafiltrados al contacto con un amortiguador de replegamiento para reducir la concentración del agente desnaturizante y promover un ambiente que propicie y favorezca la reestructuración de las proteínas desnaturizadas hacia su estructura nativa. Por medio de esta estrategia, se reduce exclusivamente la concentración del agente desnaturizante, más no la concentración de la proteína debido a que la membrana no es permeable a ésta (West y col., 1998). No obstante, la formación de agregados no se ve abatida por esta estrategia, ya que no contempla la disminución de las interacciones intermoleculares hidrofóbicas inapropiadas. A nivel operacional presenta diversas desventajas, tales como: tiempo de operación extenso, empleo de grandes volúmenes de amortiguador de replegamiento, además de ser una operación poco escalable y controlable. Se ha reportado también, que parte de los péptidos desplegados logran escapar por los poros de las membranas (De Bernardez, 2001; Li y col., 2004).

2.5.3.- Replegamiento de proteínas recombinantes por procesos cromatográficos

El principal atractivo de los procesos cromatográficos aplicados al replegamiento de proteínas recombinantes, es la capacidad de promover simultáneamente una baja concentración local de proteína por replegar, provocando la separación espacial entre especies del replegamiento, disminuyendo la formación de agregados. Por lo anterior, los procesos cromatográficos permiten el replegamiento a concentraciones de proteína mayores a las tratadas por dilución o con membranas, por lo que tienen gran potencial como alternativa de replegamiento (Jungbauer y col., 2004 y 2007).

Las estrategias de replegamiento de proteínas recombinantes a través de columnas cromatográficas se pueden clasificar en tres categorías:

- 1.-Replegamiento por cromatografía de exclusión molecular.
- 2.-Absorción reversible de la proteína desnaturalizada a un soporte cromatográfico.
- 3.-Replegamiento cromatográfico asistido.

En el replegamiento por cromatografía de *exclusión molecular*, debido a la diferencia entre los tiempos de residencia de la proteína y el agente desnaturalizante se promueve la separación y remoción gradual del agente desnaturalizante, permitiendo el replegamiento de la proteína. Por otra parte, debido a las diferentes propiedades difusivas entre la proteína plegada, intermediarios de replegamiento y proteína desplegada, se inhibe la formación de agregados favoreciendo a la reacción de replegamiento.

En el replegamiento por medio de la inmovilización reversible de la proteína desnaturalizada a un soporte cromatográfico, se han empleado resinas de *intercambio iónico*, afinidad a metales (IMAC) e interacción hidrofóbica. La proteína por replegar es absorbida al soporte cromatográfico, originando un aislamiento espacial entre las especies del replegamiento y evitando interacciones intermoleculares durante la remoción del agente desnaturalizante. Por otra parte, las altas concentraciones de sal empleadas en la elución de la proteína por replegar, abaten interacciones hidrofóbicas que podrían dirigir la formación de agregados y promueven el replegamiento. En la Tabla V se muestra un resumen de las diversas alternativas cromatográficas aplicadas al replegamiento.

Finalmente, la tercera alternativa, el replegamiento cromatográfico asistido, consiste en la inmovilización de auxiliares del plegamiento a un soporte cromatográfico, que permitan a la columna actuar como un reactor catalítico del replegamiento.

Tabla V.- Replegamiento de proteínas por procesos cromatográficos

Proteína	Soporte cromatográfico	Especificaciones
Cromatografía de Exclusión molecular		
Lisozima	Shephacryl S-100	Análisis de la variación de radio globular (Stoke) del sustrato durante el replegamiento.
Inhibidor C1	Superosa	Recuperación y replegamiento simultáneos.
Lisozima recombinante	Sephacryl	Replegamiento a partir de Cl
p GF	Superdex 75 pg	Comparación de la carga máxima de sustrato en el replegamiento por dilución vs. SEC.
Transposasa Tc1A	Superdex 200pg	Separación de agregados, dímeros y monómeros.
Lisozima	Sephacryl S-100	Influencia de T°, pH, viscosidad en el replegamiento.
scFv recombinantes	Superdex 30 pg	Aplicación de gradientes de urea y pH.
Lisozima	Superdex 75	Carga de sustrato superior a 100 mg/mL.
β-lactamasa	Sephacryl S-300	Evaluación de la configuración geométrica.
α-Lactoalbúmina	Superdex	SEC continua con reciclado de agregados.
Lisozima	Sephacryl S-100	Comparación del tipo operación en continuo y por lote.
Cromatografía de intercambio iónico		
Citocromo C, pGH, Ovoalbúmina, PBTI HPV16 E7MS2	CM celulosa, Mono Q DEAE celulosa MonoQ	Estudio comparativo en función de los soportes cromatográficos. Replegamiento a partir de Cl (Solubilización con 0.01 M NaOH).
α-glucosidasa	Fragtogel EMDS036 50 Heparin sepharosa	Fusión de un etiqueta de afinidad policatiónico.
Lisozima	SP sepharosa HP	Gradiente dual de urea y pH.
NS3 (HCV)	DEAE sepharosa	Comparación con otros métodos cromatográficos.
Ciclodextrina glicosiltransferasa	SP sepharosa	Etiqueta de polilisina.
Cromatografía de afinidad a iones metálicos		
fgvWF, hPP, Aequorina	Ni-NTA-agarosa	
Antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hi Trap chelatin column	Replegamiento superior al obtenido por dilución o diálisis.
b-glucosidasa Zm-p60.1	Ni-NTA-agarosa	Replegamiento con ciclos renaturalización/desnaturalización.
Polihidroxialcanoato sintasa	Ni-NTA-agarosa	Gradiente para la remoción de urea.
α-Tocopherol transferasa	HiTrap chelating column	Remoción directa del desnaturalizante.
DevS histidin-cinasa	Ni-NTA-agarosa	Remoción de urea seguido de la aplicación de GSSG-GSH.
Glutamyl-tRNA reductasa	Ni-chelating Sepharosa FF	SEC acoplada para la remoción de agregados.
<i>Tripamosoma brucei</i> exopolyfosfatasa	Ni-chelating Sepharosa FF	Adición de triton X-100 en el amortiguador de replegamiento.

pGF(Factor de crecimiento derivado de plaquetas), scFv(Fragmentos de cadena sencilla de anticuerpos recombinantes), pGH (Hormona del crecimiento de porcino), PBTI(Inhibidor de tripsina pancreática de bovino), HPV16 E7MS2 (Proteína de fusión del virus del papiloma humano), NS3 (HCV) (Proteína no estructural del virus de la hepatitis C), fgvWF (Fragmentos del factor de Von Willebrand factor), hPP (Proteínas prion de humano). Adaptada de Jungbauer 2004.

2.6.- Auxiliares del plegamiento de proteínas

Un sin número de proteínas se pueden replegar espontáneamente *in vitro*, confirmando que la secuencia lineal de aminoácidos de los polipéptidos sustentan toda la información necesaria para la adquisición de la estructura nativa de dichas proteínas (Anfinsen, 1973). Para algunas proteínas, el plegamiento *in vitro* requiere de varios días e incluso hasta semanas; por lo que, para lograr un plegamiento adecuado y eficiente de las proteínas se sugirió la presencia de auxiliares a nivel celular, denominados “*chaperones moleculares*” (Hartl, 1996; Kadokura y col., 2003).

Se define como chaperón a cualquier proteína que interactúa, estabiliza o ayuda a un polipéptido no estructurado a adquirir su conformación nativa, pero sin estar incluida en la estructura funcional final. Las chaperones tienen la función de mediar el plegamiento y/o evitar la interacción y agregación de polipéptidos sintetizados en un ambiente celular donde la concentración de macromoléculas es de aproximadamente 300 mg/mL - 400 mg/mL, en comparación con las bajas concentraciones (0.0001-0.1 mg/mL) de los experimentos de replegamiento *in vitro*.

Los chaperones moleculares aseguran un plegamiento rápido y eficiente de casi el 100% de las proteínas a nivel celular. Los chaperones se encuentran envueltos en diversas funciones celulares, incluyendo el plegamiento *de novo*, en la renaturalización de proteínas desestabilizadas bajo condiciones de estrés ambiental, en el ensamblaje oligomérico, en el transporte intracelular así como también asisten en la degradación proteolítica. Se calcula que *in vivo* aproximadamente el 10% de las proteínas sintetizadas requieren de la asistencia de chaperones moleculares para plegarse adecuadamente bajo condiciones normales de crecimiento y hasta un 30% bajo condiciones de estrés (Ewalt y col., 1997; Vabulas y col., 2006; Hartl y col., 2009).

2.6.1.- Función de las chaperoninas GroEL-GroES

Existe una subclase de chaperones denominadas chaperoninas, cuya característica particular es una estructura cilíndrica conformada por dos anillos de siete o nueve subunidades cada uno, así como también presentan actividad ATPasa. Las chaperoninas son capaces de mediar el plegamiento de proteínas recién sintetizadas de forma ATP-dependiente (Kerner, 2005). GroEL- GroES de *E. coli* es el sistema de chaperoninas más estudiado. GroEL forma parte de la clase Hsp60 y consiste en 14 subunidades con un peso molecular aproximado de 57 kDa cada una, arregladas en dos anillos heptaméricos unidos simétricamente invertidos. GroES, conocida también como co-chaperonina, es una proteína heptamérica de 10 kDa cada monómero (Figura 2). Estudios cristalográficos han revelado que cada subunidad de GroEL está constituida por tres dominios. El dominio ecuatorial, contiene el sitio de unión a ATP, el cual constituye la región de contacto entre los dos anillos heptaméricos. El dominio apical, forma la apertura de la cavidad de GroEL y presenta los residuos hidrofóbicos que interaccionan con los residuos hidrofóbicos del polipéptido desplegado. El dominio intermedio es la bisagra que mantiene unidos al dominio ecuatorial y apical que facilita los cambios conformacionales durante el proceso de plegamiento (Mayhew y col., 1996; Sigler, 1998; Chen, 1999). El mecanismo propuesto para el sistema de GroES-GroEL inicia con la liberación del péptido por parte de las chaperones DnaJ, DnaK, en forma de un intermediario no productivo. Después se acoplan siete moléculas de ATP a las siete subunidades de uno de los anillos de GroEL, donde se ensambla GroES asimétricamente cubriendo la apertura del cilindro, formándose el complejo estable GroEL-7ADP-GroES. Se ha sugerido que la cavidad central de GroEL protege a la proteína desplegada del medio ambiente, evitando la formación de agregados y promoviendo su plegamiento a través de múltiples ciclos de hidrólisis de ATP y la liberación de GroES (Mayhew y col., 1996; Horwich, 2009). En *E. coli* se ha demostrado que la chaperonina GroEL- GroES asiste el replegamiento de hasta un 60% del proteoma (Hartl y col., 2009).

2.6.2.- Catalizadores de la formación de enlaces disulfuro

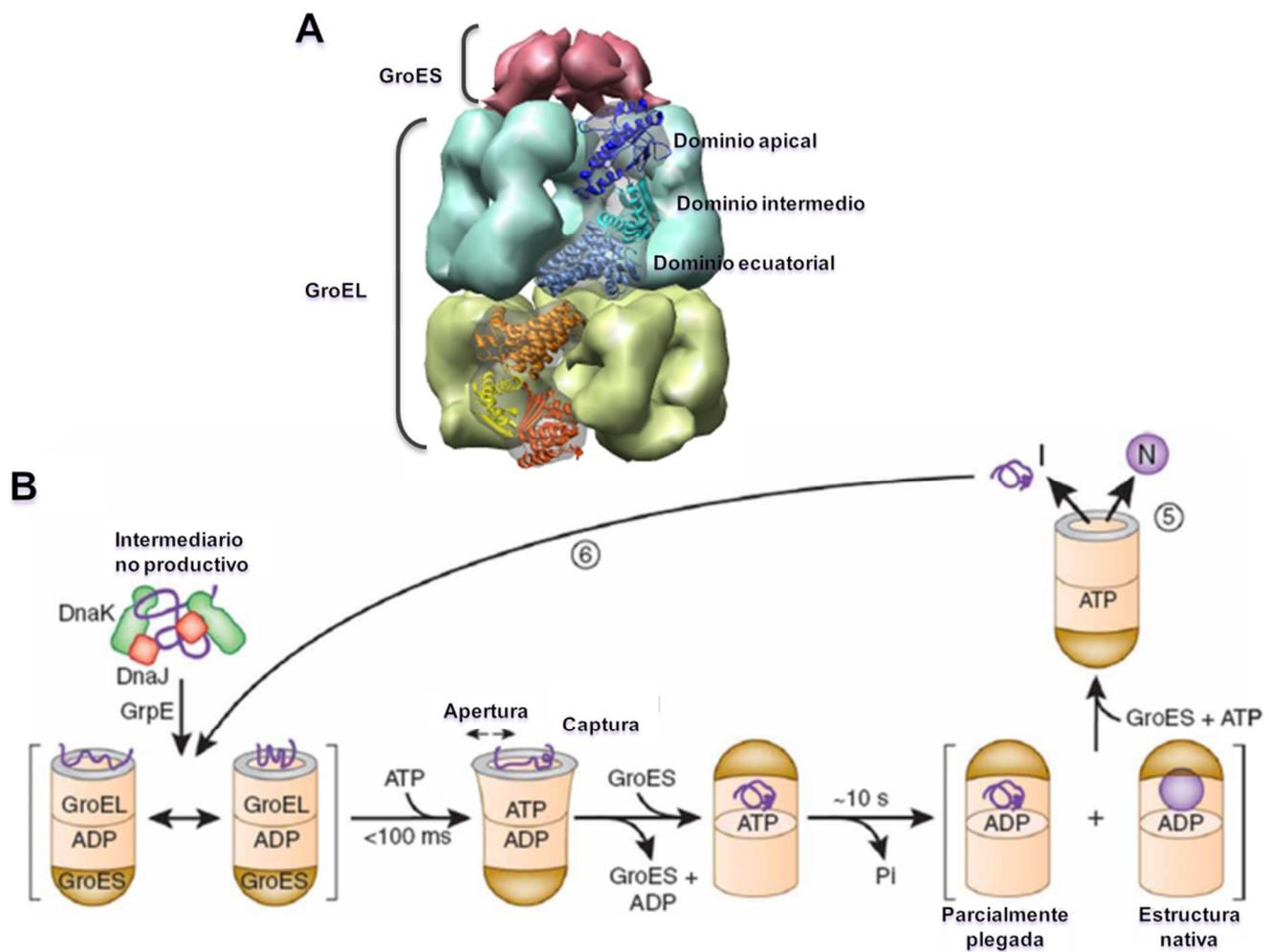
La formación de enlaces disulfuro *in vivo* se lleva a cabo cuando la proteína que ha sido sintetizada en el ambiente reductor del citoplasma es translocada a un ambiente oxidante, como el espacio periplásmico en las bacterias o el retículo endoplásmico de las células eucariotas. En *E. coli* las proteínas responsables de la formación de los enlaces disulfuro son las tiol-disulfuro oxidoreductasas de la familia Dsb (Hiniker y col., 2003; Nakamoto 2004). Las proteínas Dsb forman parte de la familia de las tiorredoxinas y tienen como características principales, la conservación del dominio “tiorredoxin 1” en su estructura tridimensional y una secuencia consenso en su sitio catalítico de dos residuos de cisteínas separados por dos residuos de aminoácidos variables para cada tipo de proteína (Debarbieux y col., 2000). En *E. coli*, se han encontrado cinco disulfuro oxidoreductasas: DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y DsbG, cuya función es la formación y control de la formación de los enlaces disulfuro, así como el mantenimiento de las condiciones de oxido reducción para el funcionamiento de este sistema.

2.6.3.- Función de DsbA y DsbC

DsbA es la proteína encargada de la formación de enlaces disulfuro en las proteínas recién sintetizadas y transportadas al espacio periplásmico. DsbA es una enzima oxidoreductasa monomérica de 21 kDa. Los residuos de cisteína (Cys30-Pro31-His32-Cys33) del sitio activo se encuentran formando un enlace disulfuro inestable en su forma activa, es decir, cuando DsbA se encuentra en estado oxidado. Este enlace disulfuro puede interactuar con uno de los grupos -SH presentes en los residuos de cisteína de las proteínas sustrato para finalmente oxidarlos y formar el enlace disulfuro.

Figura 2.- Estructura tridimensional y mecanismo de plegamiento de proteínas asistido por GroEL – GroES. (A) Estructura de los anillos heptaméricos de la chaperonina GroEL. Se pueden observar los tres dominios que componen al monómero de GroEL, el dominio ecuatorial, dominio de unión y el dominio apical, éste último interacciona con los residuos hidrofóbicos presentes en la superficie de proteínas desplegadas. (B) Mecanismo de plegamiento de proteínas *in vivo* propuesto para el sistema GroEL-GroES.

(Adaptada de <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/tutorials/groel/groel.html> y Hartl 2009).



Entre todas las disulfuro oxidoreductasas, DsbA es la proteína oxidante más fuerte (-120 mV), la cual es capaz de promover la formación de enlaces disulfuro rápidamente *in vivo* e *in vitro* (Nelson y col., 1994; Kadokura y col., 2003). Estudios han revelado que DsbA en su forma oxidada es más flexible y menos estable que en su forma reducida, esto explica su interacción con las proteínas sustrato y su habilidad para liberarse del sustrato en su forma reducida (Vinci y col., 2002). DsbA se mantiene en un estado oxidado gracias a la actividad de la proteína DsbB, que se encuentra integrada a la membrana citoplasmática. La reoxidación de DsbA se debe a la formación de un enlace disulfuro entre el residuo Cys30 de DsbA y Cys 104 de DsbB. El mantenimiento del estado de oxido-reducción de DsbB se encuentra asociado a la cadena respiratoria (Kobayashi, 1997; Hiniker y col., 2003). DsbA forma enlaces disulfuro de manera eficiente; sin embargo, a medida que aumenta la cantidad de residuos de cisteína candidatos a la formación de enlaces disulfuro, aumenta la probabilidad de que el sistema DsbA-DsbB introduzca enlaces disulfuro incorrectos en la proteína, dando como resultado proteínas no funcionales o inestables. Es aquí donde interviene la maquinaria celular de control de formación de enlaces disulfuro, compuesta por DsbC, DsbD y DsbG.

Al aumentar el número de residuos de cisteína, se incrementa la probabilidad de que DsbA introduzca enlaces disulfuro incorrectos. Por ensayos de plegamiento de proteínas con múltiples residuos de cisteína como RNAsa A, BPTI, activador plasminógeno y urocinasa entre otros casos, se observó que la proteína DsbC promueve el rearrreglo de enlaces disulfuro incorrectos (Zapun y col., 1995; Rietsch y col., 1996; Darby, 1998). DsbC es una proteína de 23.4 kDa que regula y controla la formación de puentes disulfuro gracias a su actividad disulfuro isomerasa. DsbC es un homodímero en forma de V cuya hendidura tiene una superficie de naturaleza hidrofóbica (Figura 3). La secuencia de su sitio activo, ubicado en el dominio tiorredoxina, es Cys98-Gly99-Tyr100-Cys101. *In vivo* esta proteína es activa cuando se encuentra reducida y su mantenimiento es función de la proteína DsbD. El residuo Cys 98 está parcialmente expuesto en la hendidura de la V para facilitar la interacción con el sustrato. El péptido sustrato interacciona con la DsbC, permitiendo que el grupo -SH de la Cys 98 ataque una cisteína de un enlace disulfuro dando lugar a la formación de un nuevo enlace disulfuro entre una de

las cisteínas del sustrato y la Cys98, el cual es atacado por las demás cisteínas del sustrato para formar enlaces disulfuro alternativos (McCarthy, 2000; Maskos, 2003). *In vitro*, esta proteína puede actuar como oxidasa (oxidada) o como isomerasa (reducida). Chen y col. (1999) demostraron que DsbC *in vitro* asiste el replegamiento de proteínas que no contienen enlaces disulfuro. Esta actividad de chaperón se ha asociado a la posible interacción de los residuos hidrofóbicos de la proteína desplegada con la superficie hidrofóbica de la hendidura del homodímero (Kadokura y col., 2003).

Figura 3.- Plegamiento oxidativo de proteínas en periplasma de *E. coli*. DsbA introduce los enlaces disulfuro en los polipéptidos recién secretados al espacio periplásmico. DsbA es reoxidada por la proteína transmembranal DsbB. Bajo condiciones aeróbicas, DsbB pasa los electrones a la ubiquinona y se incorporan al oxígeno molecular por medio de su transporte a través de la cadena respiratoria. En condiciones anaeróbicas, DsbB pasa los electrones a la menaquinona y posteriormente a los respectivos aceptores finales de electrones. DsbA puede introducir enlaces disulfuro incorrectos en proteínas con más de dos residuos de cisteína, los cuales son corregidos por DsbC un reacomodo (“reshuffling”). DsbC se mantiene en su estado activo (reducido), por medio de la proteína transmembranal DsbD, la cual recibe los electrones de la thioredoxina citoplásmica.

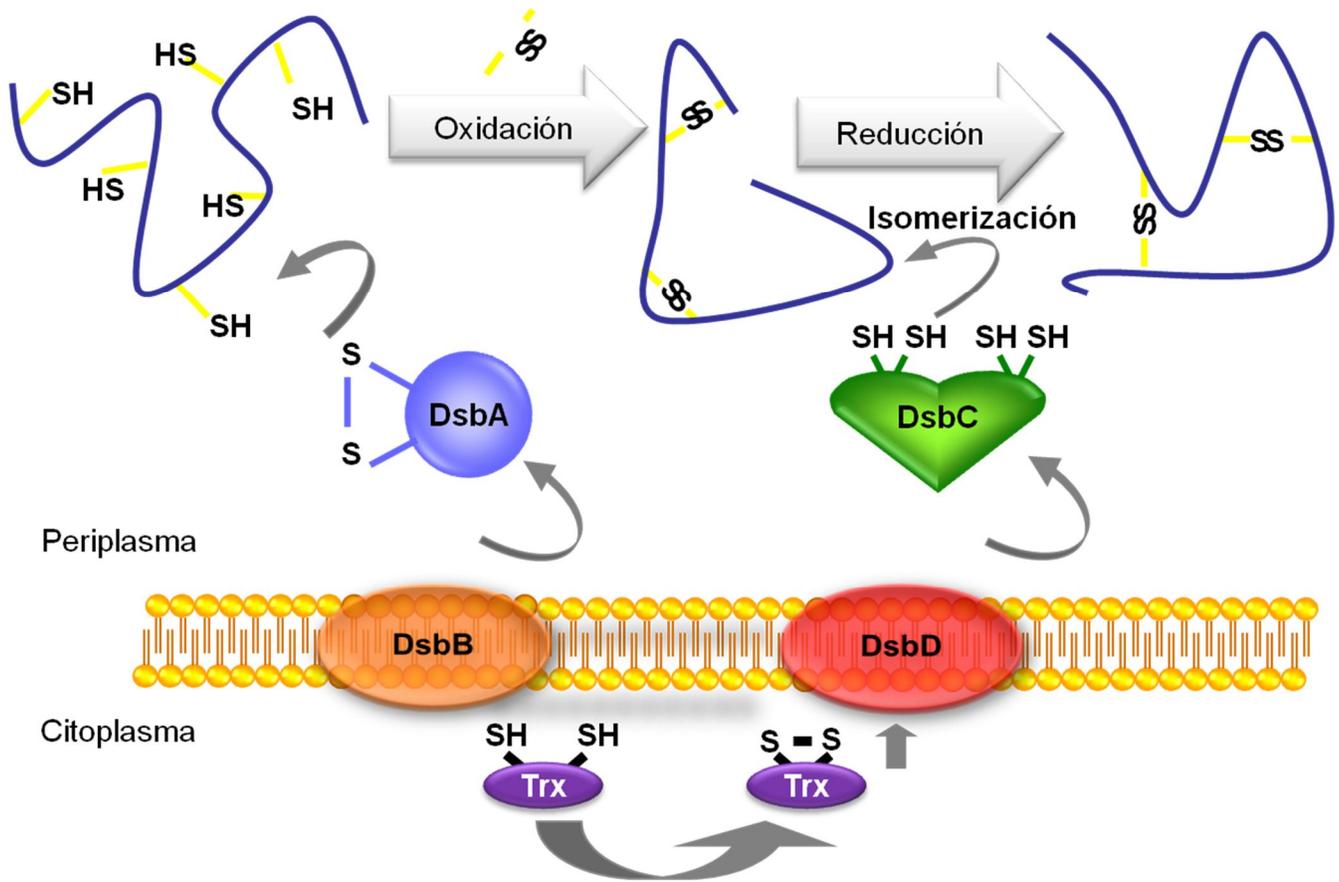
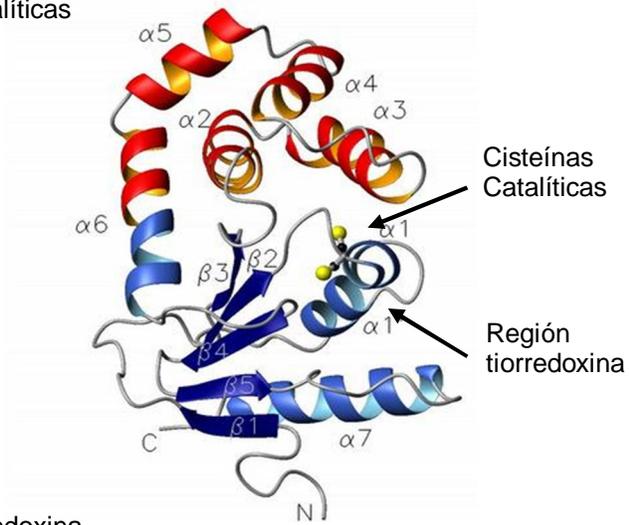


Figura 4.- Estructura 3D de las proteínas DsbA y DsbC. (A) En la estructura de la proteína DsbA se muestra el sitio catalítico CXXC en el dominio tipo tiorredoxina característico de las proteínas de la familia Dsb (Adaptada de Schirra, 1998). (B) La estructura nos muestra un homodímero de la proteína DsbC y la superficie hidrofóbica que se forma en su hendidura. Cada monómero contiene en el extremo amino terminal el dominio de dimerización y un dominio tipo tiorredoxina en C-terminal que contiene el par de cisteínas (esferas amarillas) que conforman el sitio activo CXXC. También contiene una hélice flexible que permite a DsbC ajustarse y poder interaccionar con las proteínas sustrato (Adaptada de Kadokura y col., 2003).

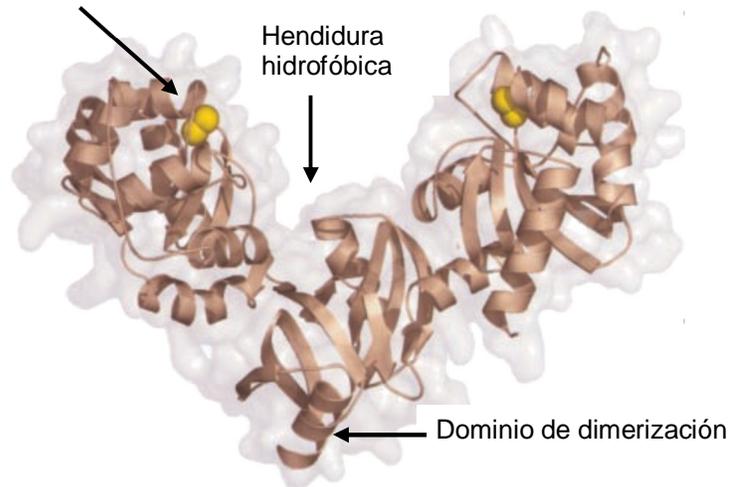
A

Cisteínas catalíticas



B

Región tiorredoxina



2.7.- Replegamiento asistido

El plegamiento de una proteína se desarrolla en forma espontánea ya que está dirigido por la secuencia de sus aminoácidos (Anfinsen, 1975). Adicionalmente, hoy sabemos que el plegamiento de una proteína y la formación de enlaces disulfuro *in vivo*, son procesos altamente eficientes gracias a la presencia de auxiliares del plegamiento a nivel celular, denominados “*chaperones moleculares*” (Fränd, 2000; Kadokura y col., 2003). Los chaperones, previenen la formación de agregados así como reducen la población de intermediarios del replegamiento, conduciendo hacia la vía de replegamiento más eficiente y energéticamente favorable, asegurando el replegamiento de proteínas *in vivo* (Kerner, 2005) (Figura 5). Con la finalidad de emular las ventajas del replegamiento *in vivo*, se han aplicado las capacidades catalíticas de estos chaperones en el replegamiento de proteínas *in vitro*, método conocido como *replegamiento asistido* (Jungbauer y col., 2004; Jhamb y col., 2008).

La capacidad catalítica de diversos chaperones moleculares ha sido probada en ensayos *in vitro* en solución. Por otra parte, se ha demostrado que la inmovilización de los chaperones moleculares incrementa su eficiencia debido a que una mayor cantidad de componentes activos pueden ser unidos a un soporte sólido, que en solución, además de llevarse a cabo la interacción con el sustrato en forma controlable. Además, los chaperones en forma inmovilizada aumentan su estabilidad y por lo tanto, pueden ser reusados un mayor número de veces. Además, la inmovilización permite la integración de procesos “downstream” de la producción de proteínas recombinantes. Con las ventajas anteriormente mencionadas, el empleo de los chaperones moleculares es más atractivo en forma inmovilizada y acoplados a sistemas cromatográficos (Jungbauer y col., 2004; Jham y col., 2008).

Como en toda alternativa existen ventajas y desventajas, algunos autores afirman que la introducción de chaperones moleculares en sistemas de replegamiento requiere la adición de ATP a los sistemas de replegamiento asistido (Preston y col., 1999; Dong y col., 2000). Esta afirmación es válida en función del tipo de catalizador empleado. También se ha analizado que en función del soporte

cromatográfico empleado, puede o no puede existir compatibilidad entre las condiciones de elución con las de inmovilización de los auxiliares del replegamiento. Por lo que en nuestro grupo de trabajo se desarrolló una estrategia de inmovilización resistente a condiciones desnaturalizantes extremas (Ramón-Luing, 2006; Antonio, 2007). Por otra parte, se ha expuesto que es necesaria la misma cantidad de auxiliares del replegamiento que de proteína a replegar, sin embargo, en el presente trabajo, se demostró que modificando el tipo de operación de una columna de replegamiento no es necesaria la misma cantidad de catalizador que de sustrato “total” por tratar. A pesar de las desventajas anteriormente mencionadas, el replegamiento asistido es en ocasiones la única alternativa para el replegamiento de proteínas recombinantes con características estructurales complejas o con numerosos enlaces disulfuro (De Bernardez y col., 1998; Dong y col., 2002).

2.7.1.- Replegamiento cromatográfico asistido

En 1991, Mendoza desarrolló el primer ensayo de replegamiento por dilución y asistido por GroEL, el cual consistió en la formación de complejos estables entre GroEL y rodanasa. Por otra parte, Altamirano y col. (1998), reportaron que tan sólo el dominio apical de GroEL (DA) unido covalentemente a agarosa conservó su actividad de chaperonina y empacado en una columna facilitó el plegamiento de ciclofilina A y de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) sin requerir ATP. A esta técnica se le dio el nombre genérico de “*Replegamiento cromatográfico asistido*”. El replegamiento cromatográfico tiene un amplio potencial, debido a su fácil escalamiento y automatización (Li y col., 2004; Wang y col., 2005). En la Tabla VI se resumen diversos trabajos de replegamiento cromatográfico asistidos por chaperones moleculares inmovilizados. En estos trabajos se utilizaron diversas alternativas de inmovilización, entre ellas podemos encontrar afinidad a níquel, ligandos químicos o técnicas tradicionales de inmovilización. Estas estrategias llegan a ser ineficientes por la incompatibilidad entre los amortiguadores empleados en la inmovilización, lavado y replegamiento, así como el costo para la preparación de la matriz de replegamiento), lo cual limita la aplicación de chaperones en sistemas de replegamiento cromatográfico a una escala más allá del laboratorio.

2.7.2.- Replegamiento cromatográfico asistido por DA-CBD

Una de las alternativas operacionalmente atractiva es la inmovilización de proteínas a matrices de celulosa mediante el empleo del dominio de unión a celulosa (CBD, Cellulose Binding Domain). Particularmente el CBD de *C. fimi*, se ha usado como módulo de afinidad en sistemas de expresión génica, en los cuales puede ser colocado tanto en el extremo N- o C- terminal, para purificar enzimas y anticuerpos por cromatografía de afinidad, así como también en la inmovilización de proteínas de fusión a matrices de celulosa (Tomme, 1995). Entre las ventajas que representa el empleo del CBD para la inmovilización de proteínas es la estabilidad y especificidad de su afinidad a celulosa, aún en concentraciones de 4 M de urea y en un amplio intervalo de pH (3.5 - 9.5). En el laboratorio de Biotecnología de Proteínas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, se ha estudiado la inmovilización de proteínas a matrices de celulosa mediante el empleo del dominio de unión a celulosa CBD. Ramón-Luing y col., (2006) demostraron que el dominio apical de GroEL, fusionado de manera traduccional al dominio de unión a celulosa CBD (DA-CBD) se puede purificar e inmovilizar a celulosa de manera simultánea. El DA-CBD inmovilizado a celulosa y acoplado a una cromatografía de exclusión molecular fue capaz de replegar a la enzima rodanasa desnaturalizada de manera eficiente. El replegamiento de rodanasa aumentó hasta 20 veces al utilizar la proteína DA-CBD inmovilizada en celulosa en un sistema cromatográfico, en comparación con el rendimiento obtenido en ensayos de replegamiento por dilución.

Figura 5.- Replegamiento asistido. En los embudos energéticos representativos de un replegamiento espontáneo y asistido, se pueden observar diferencias en las cinéticas del replegamiento. La formación de agregados puede ocurrir a partir de los intermediarios de plegamiento o por medio de la inestabilidad del estado nativo que conduce a la formación de especies parcialmente plegadas, las cuales normalmente, *in vivo*, se previenen por la acción de chaperones moleculares. En el replegamiento asistido, los chaperones modulan la interacción de las interacciones no covalentes y reactividad entre los grupos thiol. Dicha modulación es reflejada en disminución del número de trampas energéticas de la superficie del embudo energético correspondiente al replegamiento asistido. (Adaptada de Buchner y Moroder, 2009).

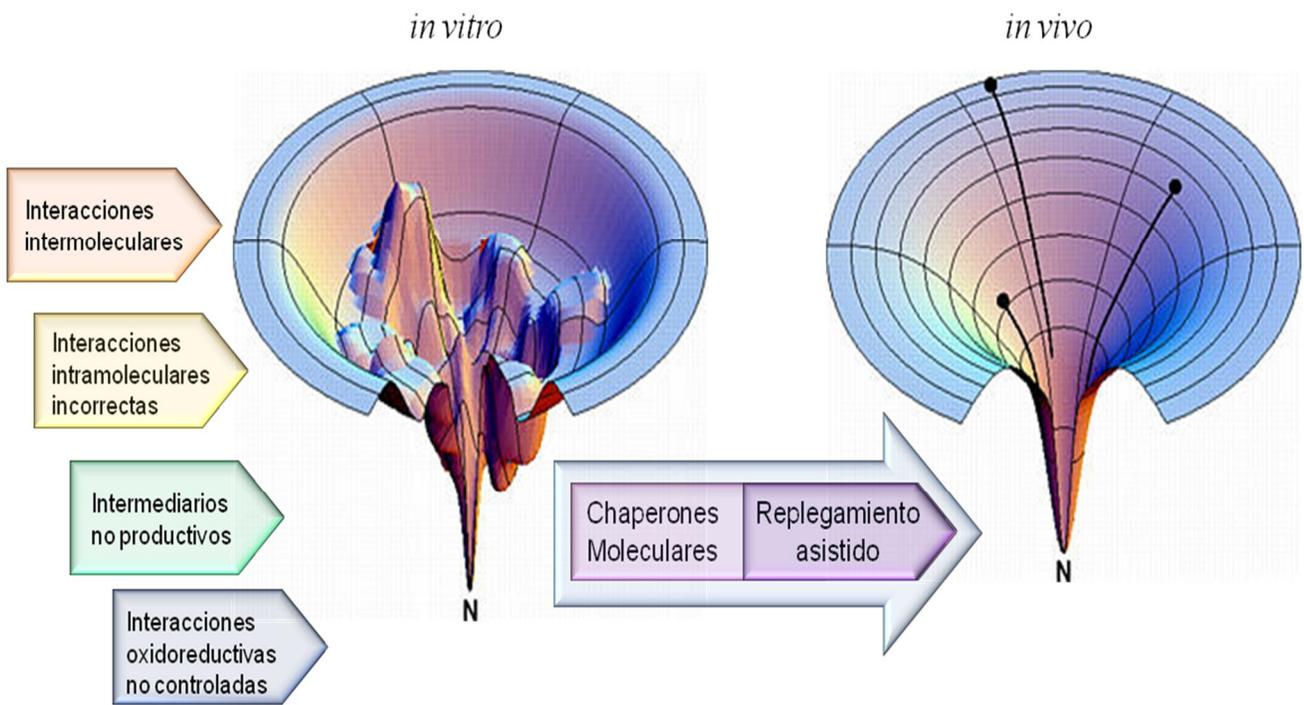


Tabla VI.- Replegamiento de proteínas por procesos cromatográficos asistidos

Proteína	Chaperón	Inmovilización	Actividad recuperada	Especificaciones
TUB Glutamina sintetasa	GroEL-GroES	IgG ligada a Proteina A	30 – 40 %	Retención de agregados en la columna cromatográfica, absorción no específica, la presencia de los anticuerpos inhibió la interacción entre GroEL con GroES ó ATP (Phadtare y col., 1994).
Glicerol deshidrogenasa Lactato deshidrogenasa Citrato sintasa	GroEL-GroES	Vidrio poroso (Prosep-9 CHO)	60 – 87 %	Intermitencia de la alimentación de ATP y manipulación de los flujos de elución, incrementando los rendimientos en 2-3 veces, que los obtenidos por dilución. (Preston,1999).
Lisozima	GroEL	Gel de agarosa	90 – 100 %	Evaluación del efecto de la concentración de urea en el flujo de elución (Dong y col., 2000).
Ciclofilina A IGPS mutantes	ADGroEL	Sepharosa 4B activada con CnBr	84 – 100 %	Se probó el funcionamiento del DA (Zahn y col., 1996).
Ciclofilina A Glucosamina 6P desaminasa, indol 3-glicerol fosfato sintasa	ADGroEL	Ni-NTA, Sepharosa 4B activada con CnBr	87 %	Empleo de etiqueta de histidinas (Altamirano y col., 1997).
Interferón γ humano recombinante	ADGroEL	Ni-NTA	100 %	La columna tuvo reusabilidad de cuatro lotes de replegamiento, la relación molar fue de 5:1 chaperón:sustrato (Gao y col., 2003).
Interferón γ humano recombinante	ADGroEL	Sepharosa FF activada con NHS	74 %	Columna de replegamiento reusable en 10 ocasiones con pérdida del 25% de actividad renaturalizante (Guan y col., 2006).
Rodanasa	ADGroEL	Celulosa Cristalina	34 %	Aumentó el porcentaje replegamiento al doble del ensayo espontáneo. Fusión del CBD para conferir afinidad a celulosa a AD. Integración de procesos (Ramón-Luing y col., 2007).
Toxina CN5 de escorpión	ADGroEL, PDI y PPI	Sepharosa FF activada con NHS	100 %	Replegamiento oxidativo de una proteína con 4 enlaces disulfuro y un enlace cis peptidil-prolina. Es necesaria la adición simultánea de los tres chaperones (Altamirano y col.,1999).
Ribonucleasa Lisozima	PDI	Agarosa activada con CnBr	85 – 98 % 90 – 100 %	Baja concentración de PDI para el desarrollo del replegamiento. (Morjana y col., 1994).
Gliceraldeido 3-phosphato deshidrogenasa GAPDH	PDI	Sepharosa activada con CnBr	ND	PDI, presenta actividad de chaperon, PDI inmovilizada no interactúa con GAPDH tetrámerica, sólo con sus monómeros (Muronetz y col., 1998).
Fragmentos de la cadena sencilla de anticuerpos recombinantes.	GroEL,DsbA, DsbC	Agarosa activada con CnBr	40 %	Sustitución de sistema redox y PEG por medio de la adición de chaperones moleculares (Tsumoto y col., 2003).

(Adaptada de Jungbauer, 2004, 2007 y Li, 2004)

2.7.3.- Replegamiento oxidativo asistido por DsbA-CBD y DsbC-CBD

Para ampliar esta metodología desarrollada por Ramón Luig y col., (2006) a un sistema de replegamiento que catalice la formación de enlaces disulfuro, las oxidoreductasas DsbA y DsbC se fusionaron al CBD de *Cellulomonas fimi*. Las proteínas de fusión denominadas DsbA-CBD y DsbC-CBD, se expresaron y se secretaron al medio de cultivo, del cual inicialmente se purificaron por medio de cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de afinidad a níquel.

Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD individualmente o en combinaciones, asistieron el replegamiento oxidativo de lisozima superando en todos los casos al rendimiento de replegamiento obtenido en forma espontánea. En forma libre se alcanzaron 75, 93 y 98% de replegamiento de lisozima con DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD respectivamente.

Las cinéticas de replegamiento obtenidas en los ensayos asistidos por dos o tres chaperones en forma libre mostraron una tendencia sigmoideal, lo cual sugiere efectos cooperativos o de competencia entre el DA-CBD y DsbC-CBD o con DsbA-CBD. Todos los ensayos asistidos por DsbA-CBD tuvieron los mejores rendimientos de replegamiento, sugiriendo que el “*paso limitante*” en el replegamiento de lisozima es la formación de los enlaces disulfuro. Los rendimientos de replegamiento de los ensayos asistidos por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizados en celulosa fueron menores que los obtenidos en forma libre, este efecto sugiere que la inmovilización en celulosa disminuye el replegamiento de la lisozima, tanto por la interferencia en su interacción específica con los chaperones, como las interacciones inespecíficas con la celulosa. Las interacciones inespecíficas se disminuyeron saturando la celulosa con el CBD, lo cual incrementó los rendimientos de replegamiento. Los resultados de este trabajo demostraron que las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD pueden ser utilizadas en el desarrollo de un *sistema de replegamiento oxidativo cromatográfico* a gran escala, que catalice la formación de los enlaces disulfuro de proteínas recombinantes de alto valor agregado.

2.8.- Ubicación del trabajo

Cuando se emplean bacterias como organismos productores, la renaturalización de proteínas recombinantes provenientes de CI a nivel preparativo e industrial, particularmente de aquellas proteínas cuya estructura o función depende de la formación de enlaces disulfuro, es un problema actual de la industria biotecnológica, que requiere del estudio de sistemas de replegamiento eficientes y viables de escalar más allá del laboratorio. El replegamiento oxidativo de proteínas, incorporando la capacidad catalítica de las disulfuro oxidoreductasas DsbA y DsbC, conjuntamente con el DA ha demostrado ser un sistema eficiente y su implementación en una columna cromatográfica es un reto con gran potencial de escalamiento y automatización. En este trabajo se implementó un sistema de replegamiento cromatográfico oxidativo, empleando a las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, inmovilizadas a membranas de celulosa y combinando sus funciones en la renaturalización de proteínas recombinantes que requieren de la formación de enlaces disulfuro. Se establecieron las condiciones de operación, así como la secuencia y proporcionalidad molar de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD adecuados para el sistema de replegamiento cromatográfico oxidativo.

El sistema de replegamiento cromatográfico oxidativo asistido por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, se evaluó empleando a la lisozima como proteína modelo y se validó empleando a la proteína hialuronidasa recombinante (rHAsa) proveniente de CI.

3.0.- JUSTIFICACIÓN

Los bajos rendimientos de producción de proteínas recombinantes funcionales expresadas en *E. coli* a nivel industrial, se debe en gran parte, a la falta de un sistema de replegamiento adecuado. En el caso particular de proteínas cuya estructura funcional depende de la formación de enlaces disulfuro, el control de las condiciones de oxido-reducción no garantizan un replegamiento eficiente, por lo que, la evaluación del empleo del DA conjuntamente con proteínas disulfuro oxidoreductasas (DsbA y DsbC) inmovilizadas a una matriz de celulosa mediante el CBD, podrían conducir a un sistema eficientemente de replegamiento oxidativo cromatográfico de estas proteínas.

4.0.-HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, inmovilizadas a una matriz de celulosa y acopladas a un sistema de replegamiento cromatográfico oxidativo, asistirán la renaturalización de proteínas recombinantes provenientes de CI, cuya estructura dependa de la formación de enlaces disulfuro, obteniendo mejores rendimientos de replegamiento a los obtenidos por dilución.

5.0.- OBJETIVOS

5.1.- General:

Implementar un sistema de replegamiento cromatográfico oxidativo, empleando a las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, inmovilizadas en celulosa, en la renaturalización de proteínas recombinantes que requieran de la formación de enlaces disulfuro.

5.2.- Específicos:

- Evaluar las condiciones de operación de la columna en el replegamiento cromatográfico oxidativo de lisozima asistido por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizadas en celulosa.
- Evaluar la funcionalidad de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, en el replegamiento oxidativo de proteínas recombinantes acumuladas en CI.

A) Por ensayos de replegamiento por dilución.

B) Por replegamiento cromatográfico oxidativo.

6.0.- MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental para el desarrollo y cumplimiento de los objetivos planteados en el proyecto se muestra en la Figura 6.

6.1.- Proteínas por replegar

6.1.1.- Lisozima.

La lisozima es una de las proteínas más utilizadas como modelo para estudiar el plegamiento de proteínas, tanto para entender su mecanismo, como para el desarrollo de procesos (De Bernardez y col., 1998; Dong y col., 2000; Buswell y col.,2002). La lisozima es un buen modelo para evaluar un sistema de replegamiento oxidativo debido a que su estructura funcional depende de la formación de cuatro enlaces disulfuro, la determinación de su actividad enzimática es sencilla (Gorin y col., 1971) y se encuentra comercialmente disponible con un grado de pureza adecuado. Adicionalmente, la gran cantidad de información disponible de estudios de replegamiento oxidativo con lisozima como proteína modelo permitieron comparar nuestros resultados, demostrando así la funcionalidad de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD en ensayos de replegamiento por dilución (Antonio-Pérez, 2007). La lisozima se desnaturalizó en una solución GdnHCl 6 M y β -mercaptoetanol 80 mM o DTT 20 mM, durante 4 h, a las concentraciones para replegar (0.025 - 3.0 mg/mL). 1 mL de esta solución se inyectó directamente a la columna de replegamiento.

6.1.2.- Hialuronidasa (rHAsa)

Las hialuronidasa (HASas) son enzimas que degradan ácido hialurónico. La degradación de ácido hialurónico está involucrada en la patogénesis bacteriana, la dispersión de toxinas y venenos, en la fertilización y en la progresión de cáncer (Kreil, 1995; Markovic-Housley, 2000; Senff-Riberiro y col., 2008). Diversos estudios han demostrado que las HASas pueden ser usadas con fines terapéuticos

en diversos ámbitos, como el quirúrgico, oftalmológico, oncológico, dermatológico entre otros. (Menzel y col., 1998; Goolsby y col., 2006; Girish y col., 2007) Adicionalmente, la identificación y caracterización de inhibidores de HASas es relevante para el desarrollo de agentes antitumorales, antimicrobianos, antivenenos, antiarrugas o antiedad, así como supresores de alergias o inflamación (Lokeshwar y col., 2008; Botki y col., 2004; Dunn y col., 2010). En base a las diversas aplicaciones de las hialuronidasas, la secuencia que codifica para la HASa presente en el veneno de tarántula (*Brachypelma vagans*), se clonó en un vector de expresión bacteriano que nos fue amablemente proporcionado por el laboratorio del Dr. Alejandro Alagón del IBT-UNAM. La hialuronidasa de tarántula recombinante (rHASa) se expresó en *E. coli* y se acumuló en CI. La rHASa, nos permitió validar el funcionamiento de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD en el replegamiento de proteínas recombinantes acumuladas en CI.

6.1.2.1.- Análisis Bioinformático de rHASa.

La secuencia de aminoácidos de la rHASa se utilizó para la determinación de sus características fisicoquímicas (Tabla IX). por medio de ProtParam, programa disponible en <http://expasy.org>.

Se desarrolló un alineamiento múltiple de la secuencia de rHASa contra hialuronidasas y glicosilhidrolasas. Cada uno de los alineamientos se realizó en BLASTP y las secuencias analizadas que se alinearon por Clustal W donde se identificaron las regiones conservadas y variables. Por medio de PSIPRED v3.0, disponible en <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>, se desarrolló la predicción de la estructura secundaria. Para desarrollar el modelado por homología, finalmente se eligió la secuencia de la hialuronidasa del veneno de abeja, el cual se analizó por Deep View y se modeló por SWISS MODEL.

Figura 6.-Estrategia experimental. Diagrama de la estrategia experimental. La primera etapa se enfocó en la preparación y análisis del soporte de celulosa con DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD inmovilizados, así como su acoplamiento a un sistema cromatográfico. En la segunda se estandarizaron las variables y modo de operación del sistema de replegamiento cromatográfico asistido, empleando a lisozima como proteína modelo. Finalmente, la tercera etapa correspondió a la validación de la funcionalidad del sistema cromatográfico asistido por DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD, mediante el replegamiento de la rHAsa de tarántula expresada en *E. coli* y acumuladas en CI.



6.2.- Preparación de columnas del replegamiento

6.2.1.- Expresión de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD

Las clonas positivas pET-38b(+)-dsbC y pET-38b(+)-dsbA se crecieron en 5 mL de medio 2TY con kanamicina (0.030 mg/mL), se incubó a 37 °C por 16 h. Posteriormente a la recuperación de estas células se llevó a cabo la lisis alcalina para la extracción de ADN plasmídico. Para la expresión de las proteínas DsbC-CBD y DsbA-CBD se transformaron células competentes de *E. coli* de las cepas BL21(DE3), BL21(pLys), HMS174 y HMS174(pLys), con el ADN plasmídico obtenido de las clonas anteriormente mencionadas. Las clonas se guardaron en stocks con glicerol al 10% a -70 °C. La inducción a nivel preparativo de las proteínas CBD_{Cex}, DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD se realizó de acuerdo a las instrucciones del manual del sistema pET (Novagen). La producción de la proteína DA-CBD se realizó utilizando una cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pET 38 b(+)-DA (Ramón-Luing y col., 2006). Las proteínas DsbC-CBD y DsbA-CBD se produjeron por medio de las células BL21(DE3) previamente transformadas y analizadas. La expresión se desarrolló en un fermentador, conteniendo 2 L de medio 2TY complementado con 0.030 mg de kanamicina/mL, bajo las siguientes condiciones: 1 vvm de aireación (volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto), 250 rpm y 37 °C. La inducción se realizó adicionando IPTG 1 mM cuando la densidad óptica a 600 nm fue de aproximadamente 1.0. El crecimiento continuó por 16 h a 25 °C para la inducción de la proteína DA-CBD y 37 °C para las proteínas DsbC-CBD y DsbA-CBD. En la producción del CBD, se utilizaron células químicamente competentes BL21(DE3) transformadas con el vector pET-38b(+), el cual contiene la secuencia codificante para el dominio de unión a celulosa CBD. Las células se crecieron en matraces de 1 L conteniendo 200 mL de medio 2TY a 37 °C y 250 rpm. Cuando el cultivo alcanzó la densidad óptica de 0.95 a 600 nm, se adicionó IPTG 0.5 mM para la inducción, el cultivo se desarrolló bajo las mismas condiciones durante 16 h.

6.2.2.- Purificación de la proteína DA-CBD

La purificación de la proteína DA-CBD se realizó siguiendo el protocolo reportado por Ramón-Luing y col., (2006). El paquete celular producido en 2 L de cultivo (descrito anteriormente), se recuperó por centrifugación y se resuspendió en amortiguador de interacción de cromatografía de afinidad a níquel (Ni Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Biosciences). Posteriormente, se lisó por adición de lisozima (2 mg/mL) y sonicación. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min a 4 °C con el fin de remover restos celulares. El sobrenadante (extracto proteico soluble) se utilizó para la purificación de la proteína DA-CBD. por medio de cromatografía de afinidad a Ni. La proteína se eluyó por medio de un gradiente del 20 al 80% entre los amortiguadores de unión A (Tris 20 mM, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM pH 8.0) y de elución B (NaCl 300 mM, Tris 20 mM, Imidazol 500 mM pH 8.0) a 1 mL/min y a 4°C. Finalmente las fracciones correspondientes a DA-CBD se concentraron hasta 0.8 mg/mL por medio de ultrafiltración y la proteína se almacenó en Tris-HCl 10 mM, DTT 2 mM, pH 8.0 y glicerol al 50 %.

6.2.3.- Purificación de DsbC-CBD y DsbA-CBD

DsbC-CBD y DsbA-CBD fueron expresadas y purificadas bajo la misma estrategia. El medio de cultivo obtenido de la fermentación de 2 L, se precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% por 3 h a 4 °C, las proteínas precipitadas se recuperaron por medio de centrifugación a 13,000 rpm por 30 min y se resuspendieron en 125 mL de amortiguador de interacción de HIC ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M, Tris HCl 20 mM, PMSF 0.1 mM, pH 8.0). Una vez resuspendidas se volvió a centrifugar para eliminar los precipitados.

Para la recuperación de la fracción soluble, la pastilla celular (6.5 g) se resuspendió en amortiguador de interacción de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se lisó con lisozima (2 mg/mL) y sonicación. A la fracción soluble se le adicionó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para obtener una concentración igual a la del amortiguador de interacción de HIC. El medio de cultivo concentrado y

clarificado, así como la fracción soluble, se sometieron a HIC: se utilizó una columna de 1.5 cm de diámetro por 15 cm de altura, la cual contenía 14.0 mL de resina Macro Prep Methyl Support (Bio-Rad) equilibrada con el amortiguador de interacción de HIC. La proteína interaccionó con la resina y se realizó un lavado con amortiguador de lavado HIC para eliminar contaminantes, finalmente se eluyó con el amortiguador de elución HIC (NaCl 200 mM, Tris HCl 20 mM, PMSF 0.1 mM; pH 8.0). La cromatografía se resolvió con un flujo de 1 mL/min a 4 °C.

En la purificación de la fracción soluble, el eluido de la HIC se trató con una cromatografía de afinidad a níquel. Se utilizó una columna de 1 cm de diámetro por 10 cm de altura empacada con 8 mL de resina de afinidad a níquel (Ni Sepharose 6 Fast Flow, Amersham Biosciences). La proteína se eluyó por medio de un gradiente entre los amortiguadores de unión A y de elución B (ver Apéndice I) del 0 al 80% de B a 1 mL/min, seguida de una alimentación al 100% de B al mismo flujo. Las fracciones correspondientes a DsbA-CBD o DsbC-CBD, se concentraron y almacenaron conjuntamente con la proteína recuperada del medio de cultivo por medio de la cromatografía de interacción hidrofóbica. Por medio de diafiltración se eliminó el imidazol y se concentró la proteína, a través de recambio del amortiguador de elución al 57% por el amortiguador de almacenamiento (ver Apéndice I). Finalmente, se determinó la concentración con el kit BCA Protein Assay (Pierce), utilizando como estándar la seroalbúmina bovina (BSA). Se adicionó un volumen de glicerol al 50% a la proteína concentrada y se almacenó a -20 °C.

6.2.4- Análisis de afinidad a celulosa de las proteínas DsbC-CBD y DsbA-CBD

La capacidad de unión a celulosa de las proteínas de fusión se determinó por interacción con celulosa cristalina. Se pesaron 25 mg de Sigmacell Cellulose Type 50, la cual se hidrató con agua filtrada y se equilibró con 4.5 mL de amortiguador de unión a celulosa (ver Apéndice I). Se centrifugó entre cada adición de 1.5 mL de amortiguador de unión a celulosa. La celulosa tratada se hizo interactuar con 1 mL de las proteínas purificadas durante 10, 20, 30, 60 y 120 min a 4 °C. Los ensayos de interacción

se centrifugaron por 5 min a 10,000 rpm para separar la fracción proteica que no se unió a la celulosa. La celulosa se lavó tres veces con 1 mL de amortiguador de lavado de afinidad a celulosa (ver Apéndice I) para interacciones inespecíficas. La celulosa se preparó para el análisis electroforético adicionando 90 μ L de amortiguador de Laemmli, 5 μ L de azul de bromofenol y 5 μ L de β -mercaptoetanol.

6.2.5- Preparación de la isoterma de adsorción.

Se pesaron 25 mg de celulosa (~50 μ L), se les adicionó 1.5 mL agua destilada por 10 min para hidratarla y se equilibraron con 4.5 mL de amortiguador de interacción a celulosa (ver Apéndice I), se centrifugó a 6000 rpm entre cada adición de 1.5 mL de amortiguador de unión a celulosa. Los tubos con celulosa tratada se hicieron interactuar con 1 mL DsbC-CBD a diferentes concentraciones desde (0.009 - 1.85 mg/mL) durante 4 h a 4 °C. Los ensayos de interacción se centrifugaron durante 5 min a 10,000 rpm con la finalidad de desechar la fracción proteica que no se unió a la resina. La resina se lavó tres veces con 1 mL de amortiguador de lavado de afinidad a celulosa (ver Apéndice I) para eliminar a las proteínas que interactuaron inespecíficamente. Las muestras de la interacción se prepararon para el análisis por SDS-PAGE adicionando 100 μ L de amortiguador de Laemmli, 5 μ L de azul de bromofenol y 5 μ L de β -mercaptoetanol. Los geles, una vez teñidos con azul de Coomassie, se analizaron con el programa Quantity One para determinar el número pixeles correspondiente a la proteína unida a la resina Sigmacell Cellulose Type 50. Previamente se estandarizó una curva tipo de densitometría, elaborada con la proteína DsbC-CBD, de la cual se corrieron muestras a diferentes concentraciones (0.005 - 2 mg/mL) en geles de SDS-PAGE al 13% (Apéndice II, Figura 1). Por otra parte, la proteína no unida a la resina se cuantificó estimando el número de pixeles y la Absorbancia a 280 nm de los sobrenadantes de la interacción y de los lavados. Una vez determinada la concentración de proteína unida a la resina (q) y la proteína que no interactuó (C*) se graficó C* vs q. La curva resultante se ajustó al tipo de isoterma correspondiente al modelo de Lagmuir para la

determinación de la capacidad máxima de adsorción (Q_{max}) y la constante de disociación (K_d) por medio del programa Sigma Plot versión 9.0 (Systat software).

6.2.6.- Inmovilización de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD en celulosa

Se hidrató la cantidad necesaria de celulosa para los ensayos por dilución o en columna cromatográfica, con agua destilada durante 10 min y se equilibró con amortiguador de interacción a celulosa (ver Apéndice I). Posteriormente, se llevó a cabo la interacción con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, previamente purificados, adicionando el volumen necesario para mantener la relación molar de 1:1 de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD respecto a la concentración de lisozima desnaturalizada (0.25 - 3 mg/mL) o rHAsa (0.03– 2.8 mg/mL) a tratar. La interacción se hizo a 4°C durante 4 h. El volumen de la celulosa con los chaperones inmovilizados se estimó en función de la relación celulosa-resina y configuración geométrica de la columna.

6.2.7.- Preparación de la columna por emplear en el replegamiento cromatográfico.

Se empleó una columna (1.5 cm X 15 cm) empacada con 12 mL de una mezcla de Sigmacell Cellulose Type 50 y BioGel p-6 fino $65 \pm 20 \mu\text{m}$ en una relación 40:60, mezcladas en forma homogénea. Para el replegamiento cromatográfico asistido, la celulosa se hizo interactuar con una mezcla de los tres chaperones, a una relación molar 1:1 respecto al sustrato. Para los ensayos de replegamiento cromatográfico asistido con celulosa saturada, la celulosa se hizo interactuar con una mezcla de las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD de 44 mg totales de proteína para tener 3.66 mg de chaperones por mL de soporte cromatográfico (a saturación). La distribución de las proteínas en el lecho cromatográfico fue aleatoria. La columna se equilibró en amortiguador de replegamiento adicionado con 1 M de urea. La saturación de la celulosa con el CBD, se comprobó por medio de análisis de SDS-PAGE de la “*celulosa saturada*” y de los efluentes de la interacción de saturación.

6.3.- Evaluación de las condiciones de operación de la columna en el replegamiento cromatográfico oxidativo de lisozima asistido por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizadas en celulosa.

6.3.1.- Replegamiento de lisozima asistido en dilución

Se realizaron ensayos de replegamiento asistido por dilución para evaluar el efecto de las condiciones redox y la estabilidad de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, además de poder comparar estos resultados con los obtenidos en el replegamiento cromatográfico asistido. Se prepararon alícuotas con 25 mg de celulosa, la cual se hidrató con agua destilada por 10 min y se equilibró con amortiguador de interacción a celulosa (ver Apéndice I) y se adicionaron los microlitros necesarios de las soluciones de los chaperones, para mantener la relación molar de 1:1 de chaperones respecto a lisozima desnaturalizada (0.025 mg/mL). También se llevó a cabo la interacción con las mezclas de 2 chaperones y 3 chaperones durante por 4 h a 4 °C. El volumen estimado de la celulosa con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizados fue de 50 μ L, por lo que a éste se le adicionaron 1.435 mL de amortiguador de replegamiento. De esta forma DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizados en celulosa se almacenaron a 4 °C. El ensayo de replegamiento se llevó a cabo por medio de la adición de 15 μ L de lisozima desnaturalizada (2.5 mg/mL) a las alícuotas anteriormente preparadas, dando un volumen final del ensayo de 1.5 mL con una concentración final de lisozima de 0.25 mg/mL. La dilución se mantiene a 25 °C con agitación constante para evitar la sedimentación de la celulosa. Se tomaron muestras cada 5 min durante 1 hora, donde el ensayo de replegamiento era centrifugado a 13,000 rpm por 20 s separándose la celulosa del sobrenadante. Del sobrenadantes se tomaron 50 μ L y se analizó su actividad. El control de este ensayo consistió en hacer el seguimiento del replegamiento de lisozima en presencia de celulosa (25 mg) sin chaperones inmovilizados. Se tomó como 100% de replegamiento a la actividad enzimática específica de la lisozima sin desnaturalizar (nativa).

6.3.2.- Parámetros operacionales del replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima

Para el replegamiento cromatográfico oxidativo de lisozima, asistido por DA-CBD DsbA-CBD, DsbC-CBD se partió de las condiciones desarrolladas por Ramón-Luing (2006). El sistema consistió en una columna cromatográfica empacada con 12 mL de lecho cromatográfico constituido por una mezcla de Sigmacell Cellulose Type 50 (con o sin los chaperones inmovilizados) y BioGel P-6 en una relación 40:60. Esta configuración proporcionó las condiciones necesarias para la separación ideal de la proteína y el agente desnaturizante (Ramón-Luing, 2006). Por lo tanto, se estandarizó la operación del sistema considerando que en nuestro caso se inmovilizaron hasta tres chaperones (DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD), cuyas interacciones con la proteína por replegar pudieran modificar los perfiles de migración de la misma. También se realizaron ensayos de replegamiento a diferentes concentraciones de proteína lisozima desde la concentración evaluada en los ensayos por dilución (0.025 mg/mL) hasta 5 mg/mL, para medir el efecto de la concentración de lisozima inyectada en el sistema.

Por otra parte, esta evaluación se complementó empleando diferentes composiciones del amortiguador de replegamiento, flujos de elución (0.1-1.0 mL/min) y analizando su efecto en el replegamiento. El equipo empleado para los ensayos de replegamiento (Bio Logic HR Work station, BioRad) cuenta con un sistema de bombas que permite formar gradientes lineales, a través de esta herramienta se pudo manipular las condiciones redox y la composición del amortiguador de replegamiento que promovieron en el interior de la columna la condiciones optimas para el replegamiento de la proteínas empleadas en este estudio.

6.3.3.- Ensayos de replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima

El replegamiento cromatográfico se realizó con el mismo amortiguador de replegamiento (Amortiguador A) y otro adicionado con urea 2 M (Amortiguador B). Los experimentos, se llevaron a cabo en el Bio Logic HR Work station (BioRad) a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C).

La lisozima se desnaturalizó en una solución GdnHCl 6 M y β -mecaptoetanol 80 mM a 2.7 mg/mL y se diluyó a 0.5 mg/mL. El replegamiento cromatográfico se realizó con el amortiguador de replegamiento (Amortiguador A) y otro adicionado con urea 2 M (Amortiguador B). La cromatografía se resolvió a un flujo de 0.2 mL/min con una duración de 120 min, durante los cuales se inyectó a la columna 5 mL de amortiguador de replegamiento (Fase I: Equilibrio), seguido de un gradiente de 0% a 50% del amortiguador de replegamiento adicionado con urea 2 M, desarrollado en 2 mL (Fase II: Gradiente), después se inyectó 1 mL de la lisozima desnaturalizada (Fase III: Inyección), seguido de un flujo isocrático de amortiguador de replegamiento al 50% B (Fase IV: Elución). Para la evaluación del replegamiento se determinó la actividad enzimática específica. La actividad se determinó con 10 μ L de muestra, de cada una de las fracciones donde se observó la elución de la proteína replegada. Debido a que el amortiguador de replegamiento contiene arginina a una concentración 0.4 M, hubo interferencia con los métodos de cuantificación de proteínas, por lo que, para estimar la actividad específica y porcentaje de replegamiento, se determinó el área bajo las curvas correspondientes al perfil de elución de concentraciones conocidas de lisozima nativa 1, 0.66, 0.5, 0.4 y 0.33 mg/mL. El área bajo la curva se determinó con el programa Sigma Plot versión 9.0 (Systat software) y mediante regresión lineal se calculó la concentración a la cual eluyó la lisozima nativa en los ensayos de control. En la Figura 7 se muestran los controles para la determinación de la concentración y actividad de lisozima, cuando la lisozima nativa pasa a través de nuestro sistema de replegamiento. En el panel A se muestran los perfiles de elución de la proteína, perfiles que se ajustaron a una curva de calibración, la cual se integró para definir un área que se empleará como

unidad arbitraria para la determinación de la concentración de la proteína eluída en cada uno de los ensayos de replegamiento y en el panel B se muestra la curva tipo que correlaciona la concentración de la proteína con el área bajo la curva. El porcentaje de replegamiento, se determinó considerando a la actividad específica de la proteína nativa como el 100% de replegamiento. La eficiencia de replegamiento se estimó por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia} = \frac{(P_E)}{(P_I)} * \frac{(\%R)}{(100\%)} \quad (\text{Ec. 1.0})$$

P_E = Concentración de proteína eluída por el sistema de replegamiento cromatográfico

P_I = Concentración de proteína inyectada en el sistema de replegamiento cromatográfico

$\%R$ = porcentaje de replegamiento

6.3.4.- Replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima por lotes consecutivos

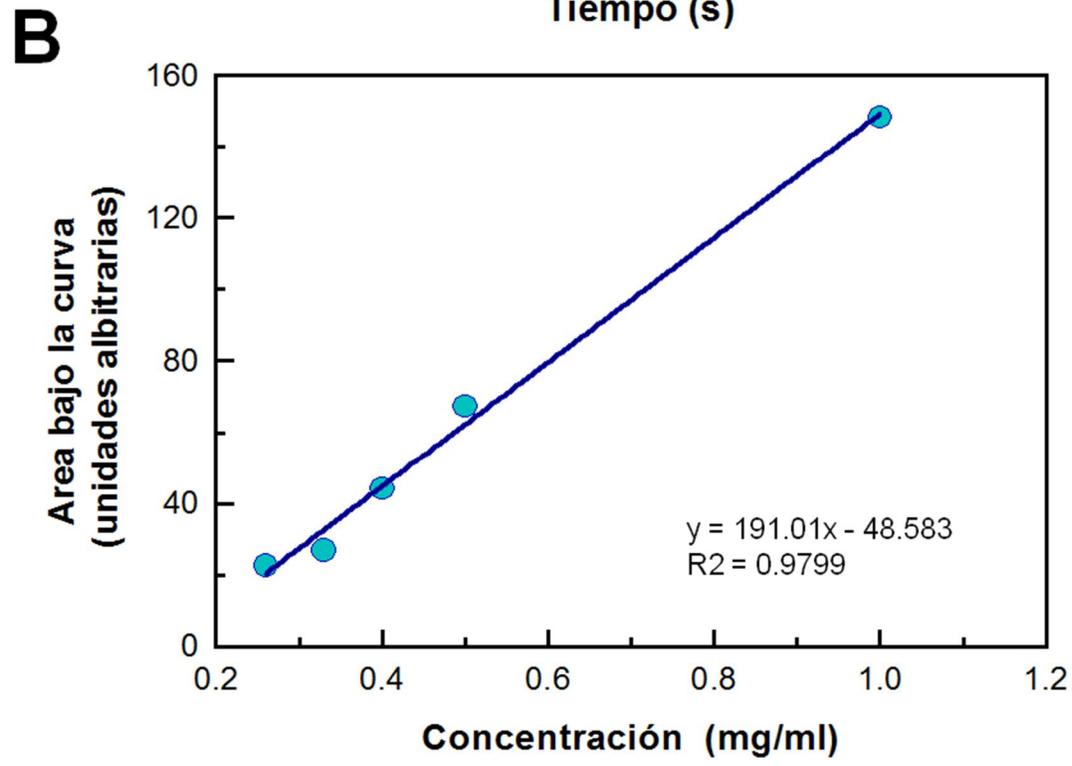
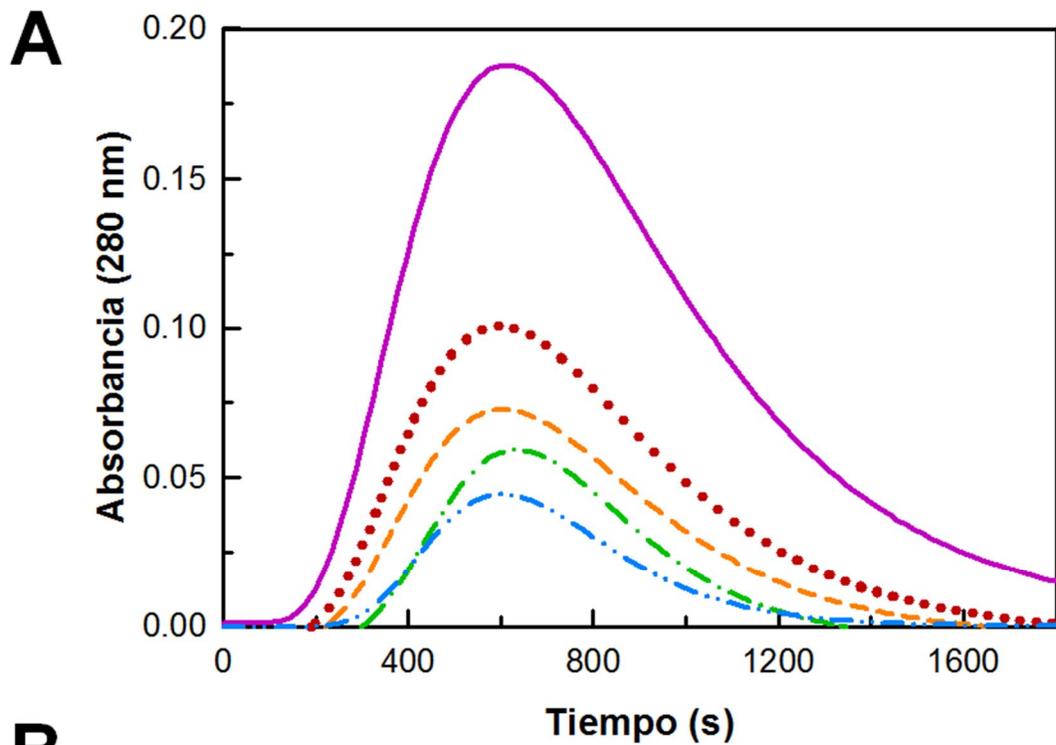
La lisozima se desnaturalizó bajo las condiciones descritas anteriormente. La cromatografía se resolvió a un flujo de 0.3 mL/min, a través de seis lotes consecutivos. El primer lote de replegamiento, se constituyó de las cuatro fases previamente descritas (equilibrio, gradiente, inyección y elución); sin embargo, el segundo lote inicia con la inyección de otro 1 mL de lisozima desnaturalizada seguido de un flujo isocrático de amortiguador de replegamiento B al 50% (Fase IV: Elución) durante 60 min después de los cuales se inyecta nuevamente 1 mL de lisozima desnaturalizada. Es decir, se desarrolló la inyección de 1 mL lisozima desnaturalizada (3 mg/mL) a los 60, 120, 190, 265, 340 min, marcando el inicio de cada uno de los seis lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico. La determinación de la concentración de proteína se estimó por medio del área bajo la curva del perfil de elución de la proteína, bajo la estrategia previamente descrita.

6.3.5.- Análisis de la estabilidad de la inmovilización de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD en celulosa

Para evaluar la estabilidad de la inmovilización de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD, se desarrollaron diversos ensayos de replegamiento de lisozima por dilución y se determinó la pérdida de su actividad al interactuarse con agentes desnaturizantes (GdnHCl/ β -mercaptoetanol: 1 M/21 mM, 2 M/42 mM, 3 M/62.5 mM, 4 M/80 mM, durante 5 min, 10 min, 30 min, 1 h y 2 h). La estabilidad funcional de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD se expresó en unidades del 0-1.0, donde se considerará 1.0 al máximo porcentaje de replegamiento obtenida en los ensayos bajo condiciones normales (Antonio-Pérez, 2007).

Para evaluar la estabilidad operacional, las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD se inmovilizaron en celulosa y se mezclaron con BioGel 6-P (BioRad), se empacaron en una columna cromatográfica y se equilibraron en amortiguador de replegamiento. Después se inyectó en la columna 1 mL (0.5mg/mL) de lisozima desnaturizada y reducida, y se hicieron ensayos de replegamiento cromatográfico por lotes consecutivos. Después de cada lote la columna se desempacó, la matriz de replegamiento se mezcló y se tomaron muestras para determinar la proteína inmovilizada después de cada lote de replegamiento cromatográfico. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE y densitometría. Posteriormente, la columna se reempacó para desarrollar el siguiente lote de replegamiento cromatográfico y se determinó su actividad de replegamiento obtenido en cada lote. Por otra parte, se evaluó la estabilidad en condiciones de almacenamiento. Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD se inmovilizaron en celulosa y se mezclaron con BioGel P-6 (BioRad). Esta matriz de replegamiento se equilibró con PBS 1X pH. 7.0, se agregó glicerol al 50% y se almacenó a -20 °C durante 18 meses. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de almacenamiento. Se les determinó la proteína unida y actividad de replegamiento. Para la estabilidad operacional y de almacenamiento se tomó como el 100% a los valores iniciales de proteína inmovilizada y porcentaje de replegamiento alcanzados por los chaperones recién inmovilizados.

Figura 7.- Determinación de la relación entre el área bajo la curva y la proteína eluída de la columna de replegamiento cromatográfico. Para la determinación de la proteína eluída en los ensayos de replegamiento cromatográfico se inyectaron a la columna de replegamiento muestras de 1 mL de lisozima nativa a diferentes concentraciones (0.33 mg/mL – 1.0 mg/mL) en cada caso al pico de elución se le determinó el área bajo la curva y se correlacionó con la concentración de la proteína inyectada (A) Perfil cromatográfico de 0.33 mg (línea “guión-doble punto”), 0.4 mg (línea “guión-punto”), 0.5 mg (línea discontinua), 0.66 mg (línea punteada), 1.0 mg (línea continua) de lisozima nativa inyectada a la columna. (B) Correlación del área bajo la curva en función de la proteína inyectada .



6.4.- Evaluación de la funcionalidad de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, en el replegamiento oxidativo de proteínas recombinantes acumuladas en cuerpos de inclusión

6.4.1.- Expresión de rHAsa

Se hizo la extracción de pQUE60-HAsa por lisis alcalina. Con el objetivo de expresar a rHAsa en forma soluble se transformaron células competentes de *E. coli* de las cepas BL21(DE3), BL21 (star), HMS174 y Rosetta gami, con el ADN plasmídico obtenido. Las clonas se guardaron en stocks con glicerol al 10% a -70 °C. Se indujo la proteína rHAsa en matraces de 125 mL conteniendo 40 mL de medio 2TY adicionado con ampicilina (0.030 mg/mL) y kanamicina (0.025 mg/mL) bajo las condiciones y con las clonas anteriormente mencionadas. La inducción se desarrolló por 16 h. Se separó el medio de cultivo y el paquete celular por centrifugación a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C.

6.4.2.- Análisis de solubilidad de rHAsa

La solubilidad de la proteína rHAsa se analizó por SDS-PAGE de las fracciones soluble e insoluble citoplásmicas. La preparación de las fracciones se desarrolló de acuerdo a las instrucciones del manual del sistema pET (Novagen). El paquete celular recuperado por centrifugación, se resuspendió en 4 mL de una solución fría Tris-HCl 20 mM y NaCl 10 mM; pH 7.5, después se adicionó lisozima hasta una concentración final de 0.1 mg/mL y se incubó a 37 °C por 30 min. Posteriormente, se lisaron las células por sonicación en frío con un sonicador de punta por 3 lotes de 20 s. El lisado celular se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min para separar la fracción soluble de la insoluble. Se tomaron 25 µL del sobrenadante (fracción soluble) y se mezclaron con 25 µL de amortiguador de Laemmli, con β-mercaptoetanol y azul de bromofenol para su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 13 %. Para el análisis de los CI, el paquete insoluble obtenido por la centrifugación anterior, se lavó dos veces con una solución de SDS al 1 %. Se tomó una fracción del

paquete insoluble y se disolvió en 50 μ L de amortiguador de Laemmli, con β -mercaptoetanol y azul de bromofenol para su posterior análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 13 %.

6.4.3.- Purificación de rHAsa.

En el análisis de solubilidad de rHAsa, se observó que la mayor parte de la proteína expresada se acumuló en CI, a partir de los cuales se purificó la rHAsa. Los CI (1.54g de masa húmeda correspondiente a CI) se lavaron tres veces con amortiguador de lavado (ver Apéndice I) y se recuperaron por centrifugación. Finalmente, se solubilizaron en 5 mL de amortiguador de desnaturalización de rHAsa (ver Apéndice I). Los CI de rHAsa solubilizados se cargaron en una columna cromatográfica empacada con 286 mL Shephacryl 200, la cual había sido previamente equilibrada en amortiguador desnaturalizante de rHAsa para ser sometidos a una cromatografía de filtración en gel en condiciones desnaturalizantes. La cromatografía de filtración en gel se resolvió por medio de un flujo isocrático de 0.25 mL por minuto. Las fracciones correspondientes al pico de elución se analizaron por SDS-PAGE y las fracciones correspondientes a rHAsa se concentraron y almacenaron a 4 °C para su posterior replegamiento en lote o en columna cromatográfica.

6.4.4.- Monitoreo del desplegamiento de rHAsa por medio de dicroísmo circular y fluorescencia.

Con la rHAsa renaturalizada y activa se desarrolló una curva de desnaturalización por adición de GdnHCl (0 - 6 M), se hizo el seguimiento por fluorescencia y dicroísmo circular.

Para la obtención del espectro de dicroísmo circular se trabajó en el laboratorio de Bioquímica de Proteínas de la Dra. Claudia Benitez Cardoza (Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN). Se empleó un espectropolarímetro JASCO J815, celdas de 0.1 cm de paso óptico y 0.087 mg de

rHAsa/mL. Los datos se analizaron en el portal de DICROWEB (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>).

Para hacer la correlación de la actividad de la rHAsa replegada y la emisión de fluorescencia en diferentes estadios del replegamiento (Royer, 2006), se desarrolló una curva de desnaturalización por adición de GdnHCl (0 – 6 M) y se monitoreó por fluorescencia. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en el fluorómetro FluoroMax-3 (Horiba), las muestras analizadas contenían 0.0435 mg de rHAsa /mL y GdnHCl (0 – 6 M) con incrementos de 0.25 M para cada punto. Se midió la emisión de 300 a 450 nm por medio de tres barridos, con 295 nm como longitud de onda de excitación para medir exclusivamente la emisión de fluorescencia por triptófanos, con apertura de emisión y de excitación de 1 nm. Cada espectro de absorción se trató con el programa Sigma Plot versión 9.0 (Systat software) para la normalización de la longitud de onda máxima por medio de la regresión a la ecuación de Weibull de cinco parámetros, en todos los casos la regresión correspondió a un r^2 mayor a 0.9948.

Los datos obtenidos se trataron de acuerdo a N. Pace y M. Scholtz (1997) para la determinación de la fracción desplegada. El desplegamiento de una proteína se puede describir a través del siguiente modelo de reacción, considerando dos estados:



Donde “F” representa el estado plegado y “U” el desplegado, k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad del plegamiento y desplegamiento respectivamente, las cuales definen a la constante de equilibrio.

$$“K” = k_1/k_{-1} \quad (\text{Ec. 2.1.})$$

Las curvas de transición son un reflejo de la cantidad de proteína plegada o desplegada en una muestra, las fracciones de proteína plegada o desplegada se definen como (f_u y f_f) y se pueden obtener en cada punto de la curva de transición (curva de desnaturalización). En cada espectro de emisión se obtuvo un máxima longitud de onda (344 nm - 358 nm), estos valores fueron definidos como “Y”, el cual está compuesto por un elemento de fracción plegada (“ Y_F ”) y otro de proteína desplegada (“ Y_U ”), la proporción de estos elementos depende de la cantidad de GdnHCl presente en la mezcla, su sumatoria es igual a la ecuación (Ec. 3.2). Los valores de Y_U y Y_F , se obtuvieron por la extrapolación lineal a cualquier concentración de GdnHCl, a través de la regresión lineal de las regiones de pre-transición y post-transición de la curva de desnaturalización obtenida (Figura 12).

Se define que:

$$F_U = [F]/[F]+[U] \quad (\text{Ec. 3.0})$$

$$F_F = [U]/[F]+[U] \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Cuya sumatoria es:

$$F_U + F_F = 1 \quad (\text{Ec. 3.2})$$

“Y” se define como:

$$Y = F_F Y_F + F_U Y_U \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Por lo tanto, a través de Ec. 3.2 y 3.3, obtenemos que la fracción F_U (fracción desplegada) es:

$$F_U = \frac{Y - Y_F}{Y_U - Y_F} \quad (\text{Ec.3.4})$$

La constante de equilibrio se define a través de:

$$K_U = \frac{F_U}{1 - F_U} \quad (\text{Ec. 3.5})$$

Sustituyendo 3.4 en 3.5 obtenemos que:

$$K_U = \frac{(Y_F - Y)}{(Y - Y_U)} \quad (\text{Ec. 3.6})$$

Con K_U del proceso es posible calcular la ΔG a partir de la expresión:

$$\Delta G = -RT \ln K_U \quad (\text{Ec. 3.7})$$

6.4.5.- Replegamiento espontáneo de rHAsa por diálisis

Se tomaron 3 mL de la rHAsa desnaturalizada y purificada para replegarse espontáneamente a través de dos diálisis consecutivas a 4 °C. En la primera diálisis se utilizaron 200 mL del amortiguador de replegamiento adicionado con GdnHCl 2 M por 12 h. Se tomaron 500 μ L de proteína para medir actividad por el método turbidimétrico. En la segunda diálisis se utilizaron 200 mL del amortiguador de replegamiento adicionado con β -mercaptoetanol 40 mM durante 16 h. Finalmente la proteína se almacenó a 4 °C. Con esta proteína se realizaron zimogramas para la determinación de su actividad.

6.4.6.- Replegamiento asistido de rHAsa por dilución

Una vez desnaturalizada y purificada la rHAsa proveniente de cuerpos se inclusión con una concentración de 2.7 mg/mL, se diluyó 100 ó 200 veces en amortiguador de replegamiento con 1 M de urea y con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD para mantener una relación molar 1:1 con el polipéptido sustrato, se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) a 25 °C por 3 h y se analizó su actividad por zimogramas.

6.4.7.- Replegamiento cromatográfico de rHAsa

Los experimentos de replegamiento cromatográfico se desarrollaron en el Bio Logic HR Work station (BioRad), a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). La rHAsa se desnaturalizó en una solución de GdnHCl 6 M y β -mercaptoetanol 80 mM, la concentración final de la rHAsa desnaturalizada y reducida fue de 1.5 mg/mL. 1 mL de esta solución se inyectó directamente a la

columna de replegamiento. El replegamiento cromatográfico se resolvió con el mismo amortiguador de replegamiento previamente reportado. La cromatografía se resolvió a un flujo de 0.2 mL/min, a través de ocho lotes replegamiento cromatográfico consecutivos, bajo la estrategia operacional desarrollada para el replegamiento de lisozima. La estimación de los porcentajes y eficiencia de replegamiento, se realizó mediante la determinación de la actividad enzimática de rHAsa por medio de zimogramas y por curvas de transición monitoreadas por fluorescencia. La concentración de rHAsa presente en el flujo de elución de cada lote de replegamiento se cuantificó a 280 nm. El coeficiente de extinción de la rHAsa estimado es $116770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

6.4.8.- Replegamiento oxidativo cromatográfico de rHAsa por lotes consecutivos en celulosa saturada.

En los experimentos de replegamiento cromatográfico de rHAsa por lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos, se observó que la proteína parcialmente plegada era retenida en el interior de la columna interaccionando con la superficie libre del soporte cromatográfico. A partir de este resultado se planteó desarrollar el replegamiento en una columna previamente saturada con CBD, para bloquear las interacciones inespecíficas entre la rHAsa con la superficie libre y expuesta de la celulosa. Las columnas de replegamiento preparadas con “*celulosa saturada*” se utilizaron para desarrollar los ensayos de replegamiento de rHAsa bajo el procedimiento previamente descrito.

La rHAsa desnaturalizada y reducida empleada en estos ensayos tuvo una concentración de 2.5 mg/mL. 1 mL de la solución de rHAsa desnaturalizada se inyectó directamente a la columna de replegamiento. El replegamiento cromatográfico se realizó en las columnas con *celulosa saturada*, ya sea con el CBD (*saturación espacial*) o con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD (*saturación funcional*). Los experimentos se realizaron en el Bio Logic HR Work station (BioRad), a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). La cromatografía se resolvió a un flujo de 0.3 mL/min, a través de ocho

lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico, bajo el mismo esquema operacional utilizado en el replegamiento de lisozima.

6.5.- METODOLOGÍAS GENERALES

6.5.1.- Microorganismos, medios y condiciones de cultivo

Las células de *E coli* DH5 α -T1 “One Shot” se utilizaron durante la clonación de los fragmentos *dsbC* y *dsbA* en el vector de clonación (pCR-Blunt-TOPO II), también se utilizaron células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes para la propagación de los vectores que se utilizaron como DNA molde para la reacción de PCR de *dsbA* y *dsbC*, así como para la propagación del DNA plasmídico de las construcciones obtenidas en la subclonación de *dsbC* y *dsbA* en el vector pET 38 b (+). Para la expresión de las proteínas DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD se utilizaron células *E. coli* BL21 (DE3). Para la conservación de las cepas se empleó medio LB, conteniendo los antibióticos requeridos, kanamicina (0.030 mg/mL) y/o ampicilina (0.050 mg/mL). Las cepas se propagaron a 37 °C a 200 rpm por 12 h. Finalmente se almacenaron a -70 °C con glicerol al 10%. La propagación de biomasa para la extracción de ADN plasmídico, se llevó a cabo en tubos de ensayo conteniendo 5 mL de medio LB complementado con el antibiótico requerido, kanamicina (0.030 mg/mL) y/o ampicilina (0.050 mg/mL), las cepas se incubaron a 37°C a 200 rpm por 16 h. La propagación de las cepas, para los ensayos de expresión y solubilidad, se desarrolló en tubos de ensaye conteniendo 5 mL o en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio 2TY a 37 °C, 250 rpm por 16 h, adicionado con 0.030 mg/mL de kanamicina.

6.5.2.- Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó con el método de lisis alcalina (Sambrook y col., 2001) utilizando cultivos de 5 mL. Se recuperó la biomasa por centrifugación a 13,000 rpm durante 2 min, el paquete celular se resuspendió en 150 μ L de amortiguador de resuspensión frío (ver apéndice) y se adicionaron 300 μ L de amortiguador de lisis fresco (ver Apéndice I). Se mezcló suavemente y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Después se le adicionaron 250 μ L de amortiguador de neutralización frío (ver Apéndice I) y se incubó durante 5 min a 4 °C. El lisado celular se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante al cual se le adicionó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (SIGMA), en relación 1:1 (vol:vol), mezclándose vigorosamente. La emulsión obtenida se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo y se le adicionaron 0.7 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min a 4 °C. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70 %, la fase líquida se eliminó por decantación y la pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, se resuspendió en 50 μ L de agua estéril grado inyectable y se almacenó a -20 °C.

6.5.3.- Purificación de ADN por método Qiagen

El método de purificación consistió en adicionar tres volúmenes de amortiguador Qiagen por 1 volumen de ADN y se mezcló suavemente. La mezcla se transfirió a una columna Qiagen de 1 mL conteniendo una membrana de fibra de vidrio acoplada a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL para recibir el filtrado y se centrifugó a 6,000 rpm durante 1 minuto, se volvió a agregar el filtrado para centrifugar nuevamente. En la segunda centrifugación se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 300 μ L de solución de lavado (ver Apéndice I) y se centrifugó a 3500 \times g por 1 minuto. Para secar la columna se eliminó el sobrenadante y se centrifugó a 6,000 rpm por 30 s. Finalmente, se eluyó el

ADN “puro” con 40 μL de agua estéril por medio de centrifugación a 13,000 rpm por 2 min. La concentración y pureza del ADN se determinó por medio de la medición de la Absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro HP 8453.

6.5.4.- Transformación de células de *E. coli* por choque térmico

Se añadieron 2 μL de los plásmidos pET 38 b(+)-DA, pET 38 b(+)-DsbA, pET 38 b(+)-DsbC, o pQUE 60-HAsa a alícuotas de 50 μL de células competentes BL21(DE3), para las tres primeras construcciones y BL21(DE3), BL21(star), HMS174, Rosetta gami, Rosetta 2, para la última construcción, respectivamente. Las células se incubaron durante 30 min en hielo y se les aplicó choque térmico por 30 s a 42 °C, inmediatamente se transfirieron al hielo y se les añadió 250 μL de medio LB sin antibióticos; el tubo se incubó en forma horizontal a 37 °C, 200 rpm durante 1 h. Finalmente, las células se sembraron en placas de medio LB sólido con una concentración de 0.03 mg/mL de kanamicina para las tres primeras construcciones y con ampicilina (0.03 mg/mL) y kanamicina (0.025 mg/mL) para la construcción pQUE 60-HAsa. Se sembraron placas con 50 μL ó 100 μL del cultivo, incubándose a 37 °C por 16 h. Se cultivaron estas colonias en medio líquido para su análisis y propagación.

6.5.5.- Análisis electroforético de las proteínas recombinantes (SDS-PAGE)

El análisis de los péptidos recombinantes se desarrolló por la técnica descrita por Coligan y col. (1995). Los análisis electroforéticos se llevaron a cabo en geles de poliacrilamida al 13 %. Las muestras se prepararon de la siguiente forma: se tomaron 22.5 μL de la muestra, 22.5 μL de amortiguador de Laemmli más 5 μL de azul de bromofenol y 5 μL de β -mercaptoetanol y se desnaturalizaron las proteínas por ebullición durante 5 min.

6.5.6.- Ensayo de la actividad enzimática de lisozima

Los ensayos enzimáticos de lisozima se llevaron a cabo midiendo la velocidad de disminución de Absorbancia a 450 nm; efecto resultante de la lisis del microorganismo *Micrococcus lysodeikticus* (Shugar, 1952). Para la determinación de la concentración mínima necesaria de lisozima, cuya actividad pudiese ser monitoreada, el ensayo enzimático se realizó con diferentes concentraciones de lisozima desde 2.5 mg/mL hasta 0.01 mg/mL. El ensayo consiste en un volumen de 1.5 mL, de los cuales 1.45 mL corresponden a una suspensión células liofilizadas de *M. lysodeikticus* (SIGMA) resuspendidas en amortiguador de fosfatos pH 7.0, cuya Absorbancia inicial se monitoreó por 20 s, posteriormente se le adicionaron 0.05 mL de solución de lisozima a 0.025 mg/mL, se monitoreó la disminución de la Absorbancia por segundo (AU450/s) durante 180 s.

6.5.7.- Ensayo de actividad enzimática de rHAsa

La actividad de rHAsa se midió a través del método turbidimétrico de Dorfman y col., (1948). En el cual se define como una unidad reductora de turbidez (TRU) a la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 1 μ mol de sustrato por minuto a 25 °C. En este ensayo se cuantifica la cantidad de ácido hialurónico residual posterior a la reacción enzimática. Se empleó un amortiguador de NaCl 0.15 M y fosfatos 0.1 M pH 5.8. Como sustrato se empleó 0.4 mg de al ácido hialurónico/mL disuelto en amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 5.8. Como solución reveladora se empleó cetilpiridinium al 10 %, el cual precipita al ácido hialurónico residual (propiciando turbidez). Con estos reactivos se construyó una curva de 10 puntos con soluciones constituidas por 100 μ L solución de ácido hialurónico (volumen constante), 0-50 μ L de rHAsa y 50-0 μ L de amortiguador de fosfatos pH 5.8 de manera complementaria para sumar en total 150 μ L de volumen de reacción. Se incubaron los tubos por 20 min a temperatura ambiente y después se hirvieron por 5 min para inactivar la enzima y se añadieron

500 μL de cetilpiridinium al 10 %. Se dejó incubando por 10 min; finalmente, se leyeron las reacciones a 540 nm.

6.5.8.- ELISA para la cuantificación de rHAsa

La rHAsa purificada se diluyó en amortiguador de carbonatos (ver Apéndice I) a diferentes concentraciones (2.7×10^{-3} – 2.7×10^{-8} mg/mL), 40 μL de cada dilución se incubaron por 16 h en una placa de 96 pozos. Se llevaron a cabo tres lavados de 5 min con 200 μL PBS-Tween 20 al 0.05 %, 0.015 M NaCl, el sobrenadante se desechó en cada lavado. Después se bloqueó la placa con PBS-Tween 20 al 0.05% adicionado con BSA al 0.5% durante 2 h a 37 °C y se lavaron los pozos para eliminar cualquier interacción inespecífica, de igual forma que el lavado descrito anteriormente. Se hizo interactuar el anticuerpo anti rHAsa a una dilución 1:1500 en PBS-Tween 20 al 0.05 %, durante 2 h a 37 °C, posterior a la interacción del primer anticuerpo se lavaron los pozos. Para revelar la placa se empleó un anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (BioRad) a una dilución 1:3000 y se incubó la placa 2 h a 37 °C. Se reveló con el Kit Fosfatase Alcaline ELISA, (BioRad).

6.5.9.- Ensayo de actividad de HAsa por zimogramas

La determinación de la actividad de rHAsa a través de zimogramas se desarrolló de acuerdo al protocolo Coligan y col., (1995). La modificación de este método consistió en copolimerizar ácido hialurónico en el gel separador (SDS-PAGE) a una concentración final de 0.5 mg/mL. Las muestras por analizar se prepararon con amortiguador de Laemmli sin β -mercaptoetanol, además de omitirse el calentamiento por ebullición de las muestras. Los geles se corrieron a 70 V en hielo. Después de la electroforesis, el gel se incubó en 50 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.1M pH5.8, 0.15 M NaCl y 5% de tritón X-100 dos veces durante una hora. Después se incubó en 50 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M pH5.8, 0.15 M NaCl y 0.05% de tritón X-100 por una hora y finalmente con

50 mL de amortiguador de fosfato de sodio 0.1M pH5.8, 0.15M NaCl por 10 min. El gel se lavó dos veces por 15 min con 50 mL de 0.015 M Tris-HCl pH 7.95, esta solución se dejó incubando en cámara húmeda por toda la noche. El gel se tiñó por 5 h con formamida 5 %, isopropanol 20% y Tris-HCl 0.015 M pH 7.95 y "Stains all" (BioRad) 0.1 %, se cubrió con papel aluminio y se destiñó con formamida 5 %, isopropanol 20% y Tris-HCl 0.015 M pH 7.95.

7.0.- RESULTADOS

7.1.- Preparación de las columnas de replegamiento

7.1.1.- Expresión y Purificación.de las proteínas DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD

Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD se expresaron y se purificaron de acuerdo a los protocolos previamente establecidos por Ramon-Luing (2006) y Antonio-Pérez (2007), respectivamente. Los rendimientos obtenidos fueron de 18.25 mg/mL para DA-CBD, 18.4 mg/L para DsbC-CBD y 19.0 mg/L para DsbA-CBD. El análisis por SDS-PAGE de las proteínas purificadas se muestra en la Figura 8.

7.1.2.- Análisis de afinidad de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD a celulosa

De acuerdo a la metodología descrita, DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD se hicieron interactuar con celulosa y las muestras tomadas a diferentes tiempos se analizaron por SDS-PAGE como se muestra en la Figura 9. Se puede observar claramente que a los 5 min de interacción la proteína adicionada (Figura 9A) se unió a totalmente a la resina Sigmacell Cellulose Type 50, ya que en los sobrenadantes de las interacciones no se aprecia ninguna banda de proteína (Figura 9B). Estos resultados denotan la simplicidad y rapidez con la que se prepara la matriz de replegamiento.

7.1.3.- Isoterma de Adsorción

Para conocer la capacidad de absorción de la resina Sigmacell Cellulose Type 50 a las condiciones de inmovilización, se determinó la isoterma de adsorción de DsbC-CBD como muestra representativa de las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD (Figura 10). Como se puede observar, los valores experimentales de q vs C^* (símbolos) presentaron un buen ajuste ($r^2 > 0.99$) a una isoterma tipo

Langmuir con dos sitios de unión (Ec 4.0) con valores de: $Q_{\max 1} = 5.8 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{celulosa}}$, $Kd_1 = 0.003 \text{ mg/mL}$, $Q_{\max 2} = 17.0 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{celulosa}}$ ya $Kd_2 = 0.6 \text{ mg/mL}$. de unión

$$q^* = \frac{(Q_{\max 1} \cdot C^*)}{(Kd_1 \cdot C^*)} + \frac{(Q_{\max 2} \cdot C^*)}{(Kd_2 \cdot C^*)} \quad (\text{Ec. 4.0})$$

Donde:

q^* = proteína unida a celulosa.

$Q_{\max 1}$ = Capacidad máxima de adsorción al sitio de mayor afinidad.

$Q_{\max 2}$ = Capacidad máxima de adsorción al sitio de baja afinidad.

C^* = Concentración de proteína en el equilibrio en el líquido sobrenadante en el equilibrio.

Kd_1 y Kd_2 = Constantes de disociación de los sitios de alta y baja afinidad respectivamente.

Basados en estos resultados, la Q_{\max} total de las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD al Sigmacell Cellulose Type 50 a las condiciones de inmovilización son de $22.8 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{celulosa}}$ o $31.50 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{mL}_{\text{celulosa}}$, asumiendo que la densidad de la celulosa seca es de 1.38 mg/mL (Oyeniyi y col., 2012). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Creagh y col., (1996), en el análisis de la unión del CBD a celulosa microcristalina. Dicha capacidad de unión es mayor a la reportada para otras alternativas de inmovilización de chaperones como es la inmovilización por afinidad a níquel por medio de la etiqueta de histidinas o bien por sepharosa químicamente activada (Tabla VII).

Figura 8. Purificación de las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD. Perfil electroforético de las proteínas purificadas, DsbA-CBD (Carril 1), DsbC-CBD (Carril 2), DA-CBD (Carril3). El carril (M) corresponde al marcador de peso molecular. Las proteínas DsbA-CBD y DsbC-CBD se expresaron y se secretaron al medio de cultivo. Finalmente, se purificaron por cromatografía de interacción hidrofóbica y de afinidad a níquel (Antonio y col., 2007). El DA-CBD se purificó por cromatografía de afinidad a níquel (Ramón-Luing y col., 2006).

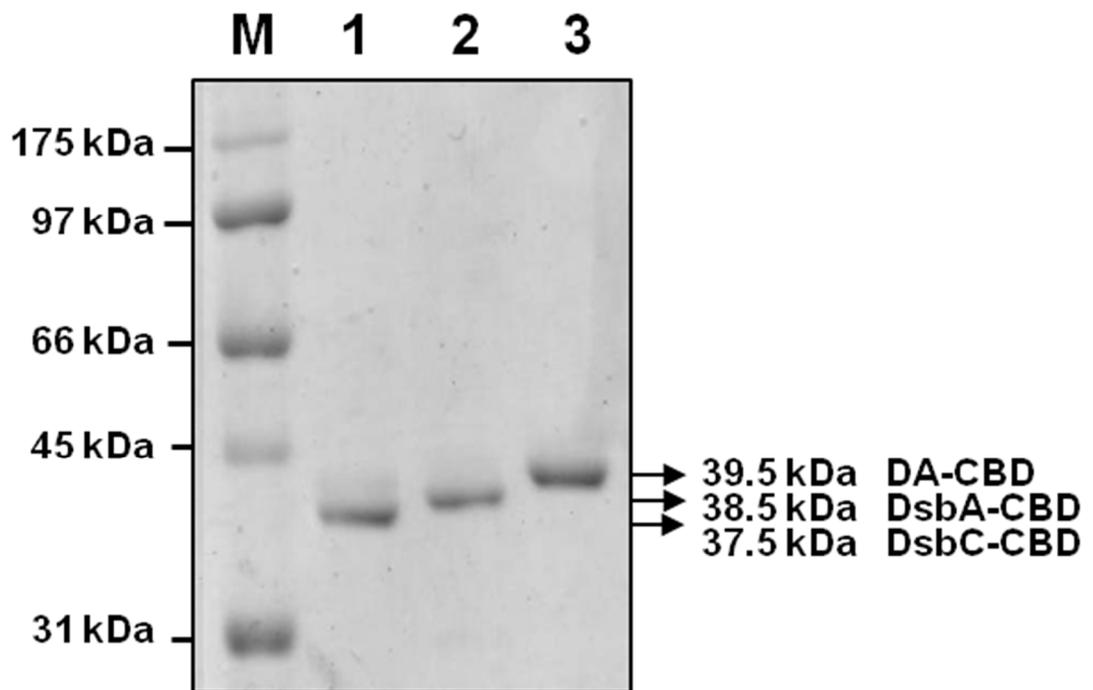
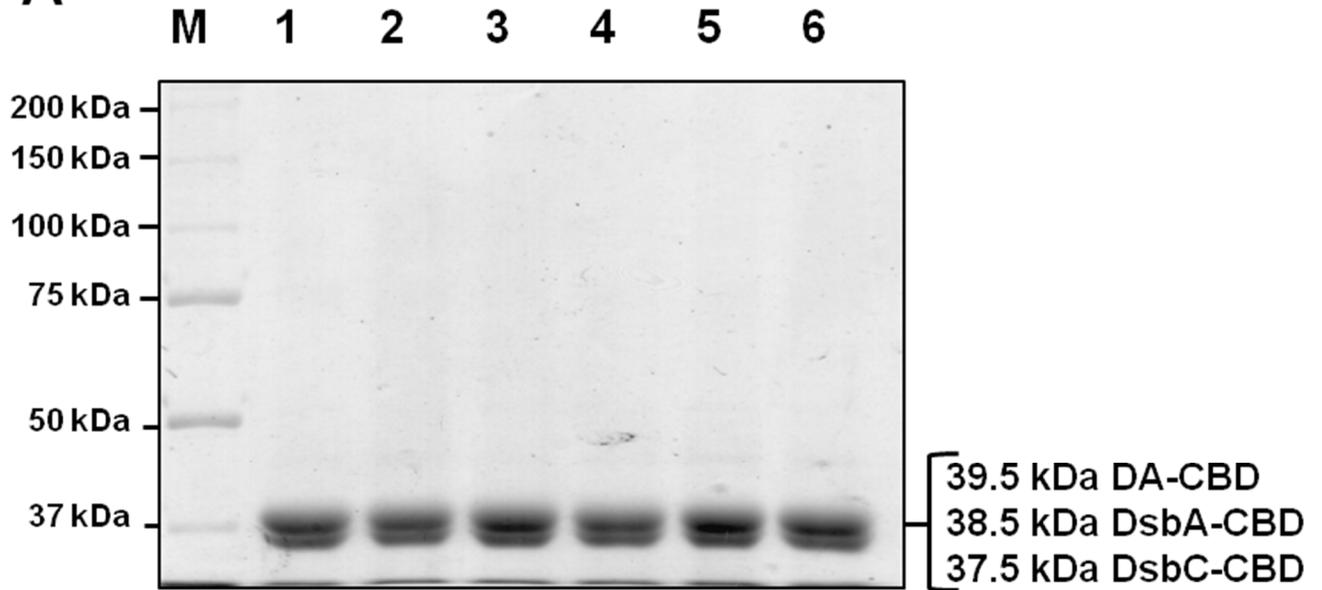


Figura 9.- Unión a celulosa de DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD. Perfil electroforético de la proteína unida a partículas de Sigmacell Cellulose Type 50 (A) y la proteína remanente en el sobrenadante (B) después de 5 min (Carril 1), 10 min (Carril 2), 30 min (Carril 3), 1 h (Carril 4), 2 h (Carril 5), 4 h (Carril 6) de interacción a 4 °C. En ambos casos, el carril (M) corresponde al marcador de peso molecular.

A



B

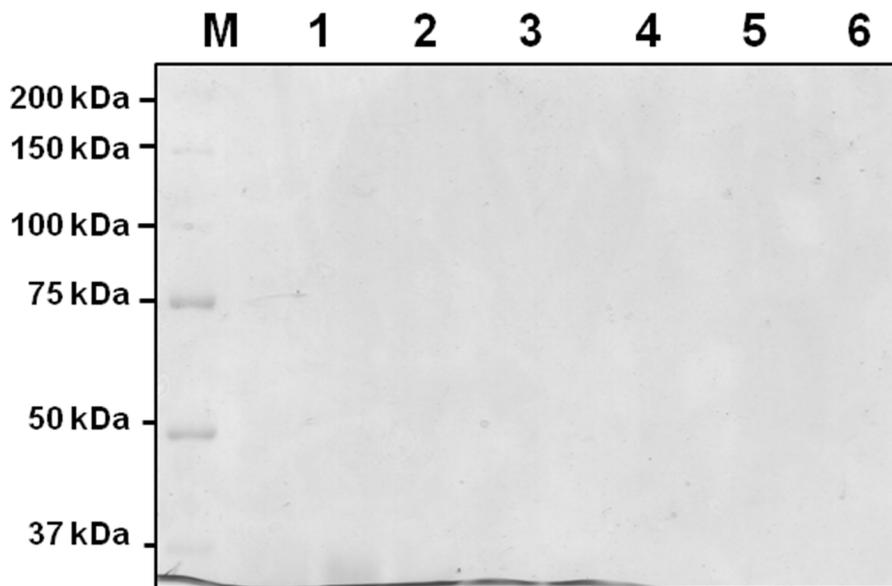


Figura 10.- Isotherma de adsorción a celulosa de DsbC-CBD.

Muestras de 1 mL de DsbC-CBD a concentraciones crecientes de proteína se interaccionaron con 25 mg de celulosa (Sigmacell Cellulose Type 50) durante 4 h a 4° C. La proteína unida a celulosa se determinó por la diferencia en la concentración antes y después de la interacción o por el análisis densitométrico de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomasie. Los símbolos (▼) representan la proteína unida a la celulosa (q) en función de la proteína remanente después de la interacción (C*). La línea corresponde al ajuste no lineal de los datos experimentales a un modelo de isoterma de Langmuir con dos sitios de unión de diferente afinidad usando el programa Sigma-Plot versión 9.0.

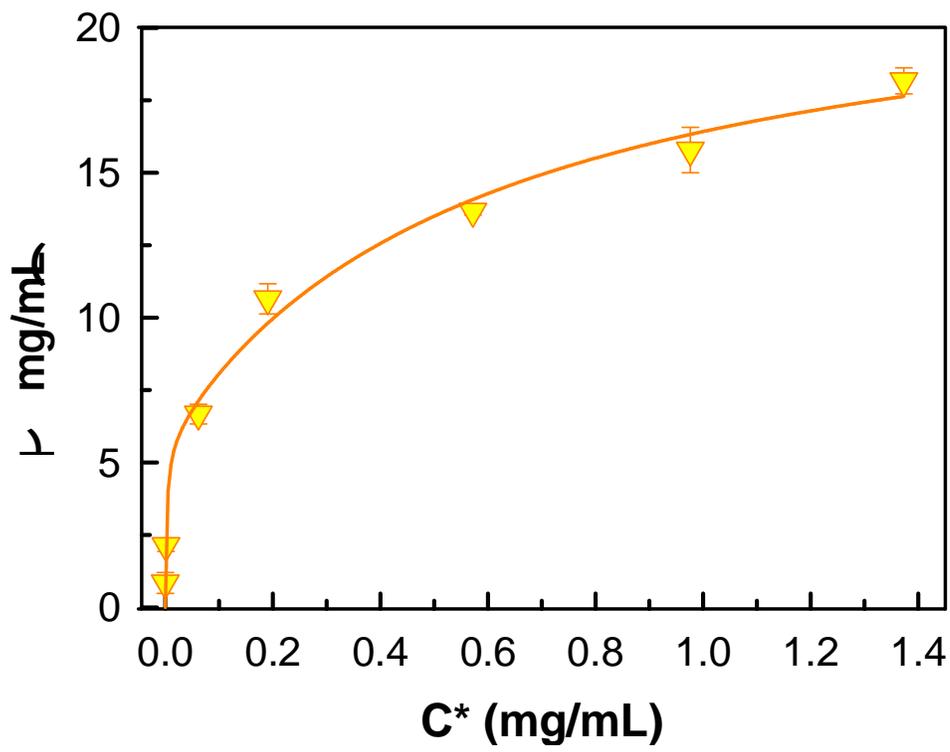


Tabla VII.- Tabla comparativa de alternativas de inmovilización de chaperones

Inmovilización	Q_{max}	Estabilidad	Reusos	Referencias
Formyl-Cellulofine gel NaBH ₃ CN- activada	48 mg proteína/g _{gel}	3 M – 6 M GdnHCl 10 mM DTT	10	Dong X. Y., 1999
Sepharose 4B CNBr-activada	10 mg proteína/mL _{gel}	3 M - 6 M GdnHCl 10 mM DTT	-	Altamirano, 1997,
Sepharose NHS activada	10 mg proteína/mL _{gel}	6 M GdnHCl 1 mM β-mercaptoetanol	10	Altamirano, 1999, Tsumoto 2002, Guan 2000
6His-Ni-NTA	6 mg proteína/mL _{gel}	1 M - 8 M Urea 1-10 mM DTT	-	Altamirano 1997 Gao, 2006
Fusión al CBD	31.5 mg proteína/mL _{gel}	6 M GdnHCl 120 mM β-mercaptoetanol	8	Éste trabajo

7.2.- Replegamiento cromatográfico oxidativo de lisozima

7.2.1.- Replegamiento cromatográfico

En la Figura 11 se muestra el perfil electroforético de un lote de replegamiento cromatográfico de lisozima, donde se aprecian dos picos en la señal de Absorbancia a 280 nm. Sólo el primer pico (1), presentó actividad con y sin asistencia de los chaperones. El segundo pico de Absorbancia (2) se traslapa con la señal de conductividad. Las fracciones correspondientes a los picos de elución se analizaron por SDS-PAGE al 13% (Recuadro de la Figura 11), sólo en el primer pico se comprobó la presencia de la lisozima eluída; mientras que ninguna banda se observó en el perfil electroforético del segundo pico, sugiriendo que el segundo pico corresponde a la perturbación de la Absorbancia por la alta concentración del agente desnaturizante. Una vez comprobada la separación del agente desnaturizante y la proteína por replegar, se hicieron por triplicado los ensayos de replegamiento cromatográfico de lisozima. Cada lote de replegamiento tuvo una duración de aproximadamente 50 min y el tiempo de residencia fue de 28 a 31 min aproximadamente. Particularmente, se presentó un desfase de 1.5 min entre los perfiles de elución de los ensayos de replegamiento asistido y sin asistencia de los chaperones, el cual se atribuyó a la retención temporal de la lisozima en el sistema al interaccionar con los chaperones. Se obtuvo un 60% de replegamiento en el ensayo de replegamiento cromatográfico asistido de lisozima, mientras que sin asistencia de los chaperones sólo se obtuvo un 18% de replegamiento. En todos los ensayos, sólo una fracción de la proteína fue eluída de la columna, sugiriendo que la proteína desplegada o parcialmente desplegada permanecía unida a la matriz de replegamiento. Posteriormente, se investigó el efecto de la concentración de la proteína en el rendimiento de replegamiento.

7.2.2.- Efecto de la concentración de lisozima en el porcentaje de replegamiento cromatográfico

Se realizaron los ensayos de replegamiento cromatográfico de lisozima a distintas concentraciones de sustrato desnaturalizado. Se observó un decremento en los rendimientos de replegamiento a medida que se incrementaba la concentración de la proteína inyectada en el sistema de replegamiento asistido y sin asistencia de los chaperones (Figura 12). Por ejemplo, cuando la lisozima fue inyectada al sistema a 0.5 mg/mL se recuperó el 100% de su actividad, mientras que sólo se recuperó el 18% cuando la concentración de la proteína se incrementó 10 veces y se inyectó en la columna de replegamiento asistido. En función de estos resultados y suponiendo una retención del sustrato en el interior de la columna, se planteó operar el sistema de replegamiento cromatográfico en lotes consecutivos con la finalidad de incrementar los rendimientos de replegamiento. Este modo de operación nos sirvió para analizar si la inyección de nueva proteína desnaturalizada y reducida en cada lote de replegamiento propiciaba una competencia por los chaperones entre las especies totalmente desplegadas y las parcialmente plegadas, favoreciendo la elución de las proteínas correctamente plegadas.

Figura 11.- Replegamiento cromatográfico de lisozima. Una columna (BioRad) (1.5 X 15 cm) se empacó con 12 mL de una mezcla de homogénea decelulosa con o sin chaperones (DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD) inmovilizados y BioGel P-6 en relación 40:60 (v/v). Después de equilibrar la columna con Buffer de replegamiento (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 1 mM, GSSG 0.4 mM, GSH 2 mM, Arg 0.4 M, PMSF 0.1 M, Urea 2.0 M, pH 8.0), se inyectó 1 mL de lisozima desnaturalizada y reducida (3.0 mg/mL) y se resolvió a un flujo de 0.3 mL/min. Perfil de elución del replegamiento cromatográfico de lisozima. Las líneas continua y discontinua corresponden a la señal de Absorbancia a 280 nm del replegamiento asistido y sin asistencia de los chaperones respectivamente. Las líneas punteada y guion-doble punto corresponden a la conductividad (mS/cm) del replegamiento de lisozima asistido y sin asistencia de los chaperones respectivamente. El recuadro muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones correspondientes a los picos de elución (1 y 2) del replegamiento asistido (i) y sin asistencia de los chaperones (ii).

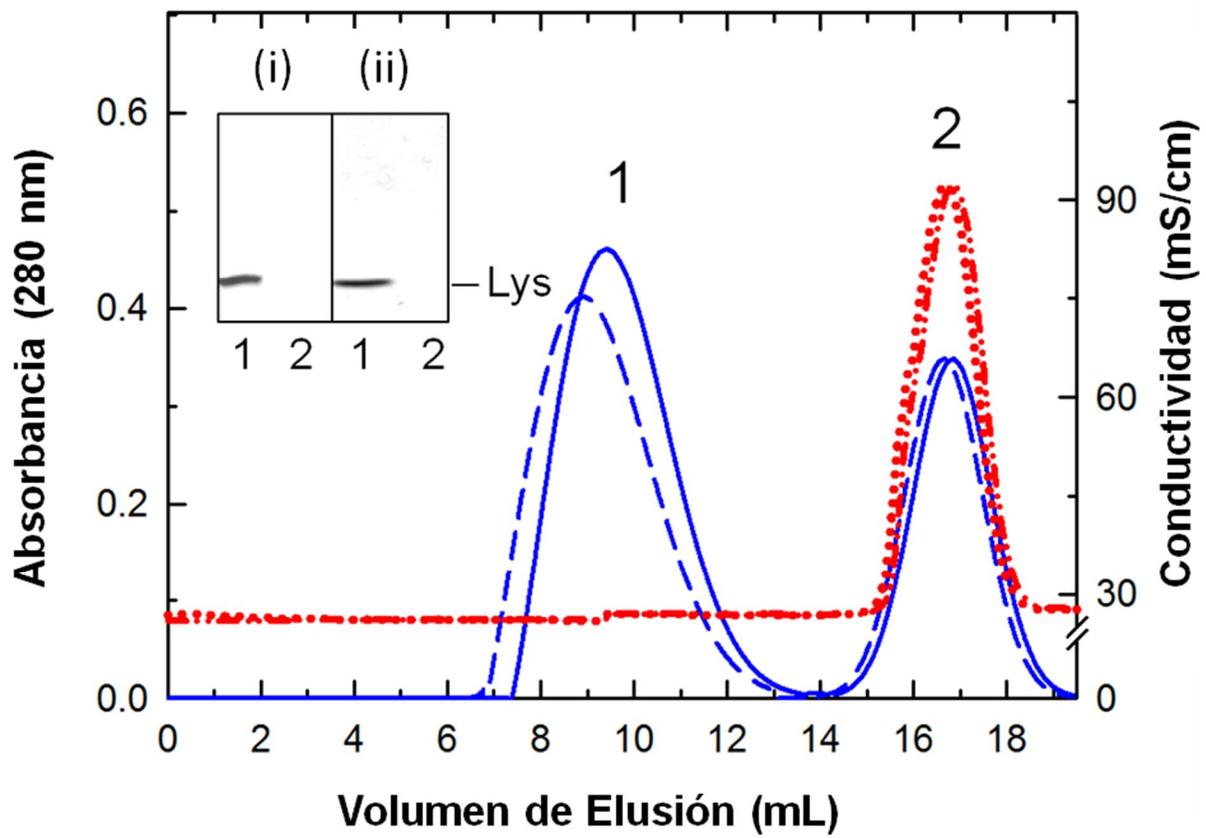
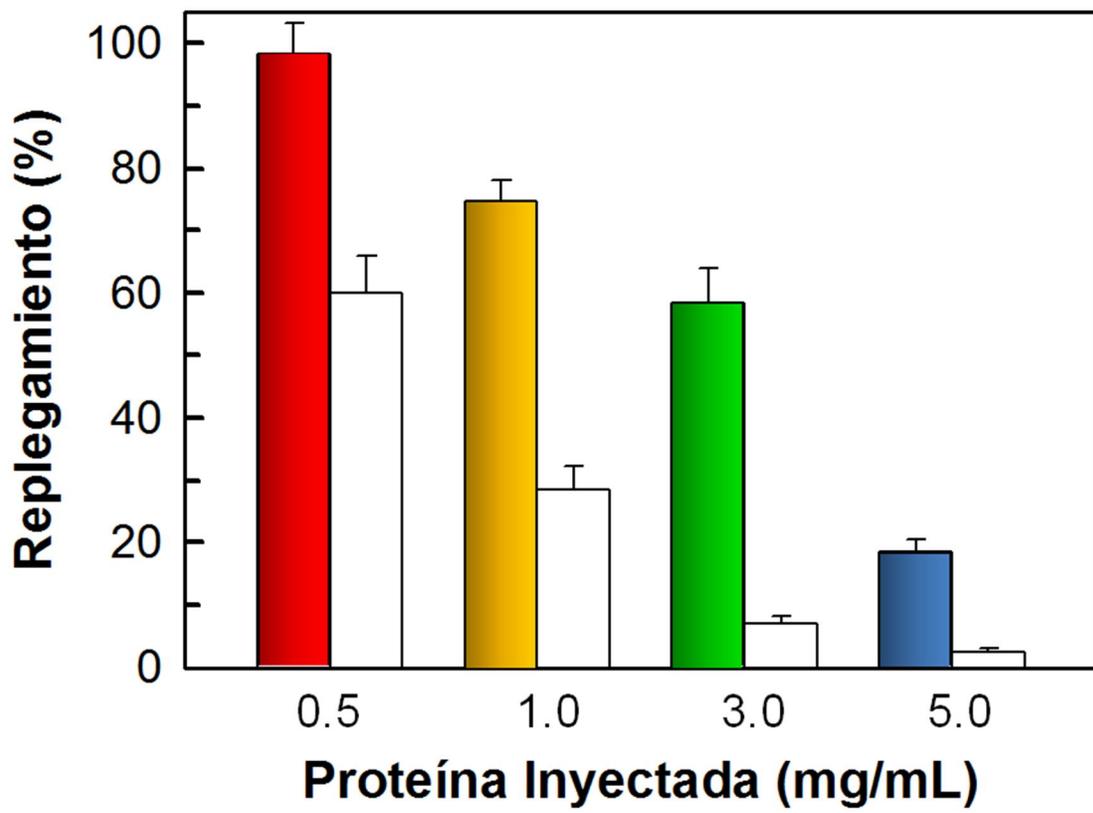


Figura 12.- Efecto de la concentración de lisozima desnaturalizada en el replegamiento cromatográfico. Muestras de 1 mL de lisozima desnaturalizada y reducida a diferentes concentraciones (0.5 – 3.0 mg/mL) se inyectaron a columnas de replegamiento con o sin chaperones inmovilizados similares a la descrita en la Figura 12 (una para cada concentración) y se estimó el porcentaje de replegamiento asistido (barras llenas) y sin asistencia de los chaperones (barras vacías) tomando como 100% la actividad de la lisozima nativa.



7.2.3.- Replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima por lotes consecutivos

Suponiendo una retención del sustrato en el interior de la columna, se planteó operar el sistema de replegamiento cromatográfico en lotes consecutivos con la finalidad de propiciar una competencia por los chaperones entre las especies parcialmente desplegadas y las totalmente desplegadas ingresadas en el sistema por la inyección de lisozima desnaturalizada y reducida en cada lote de replegamiento y así favorecer la elución de las proteínas correctamente plegadas. Por otra parte, se buscó incrementar los rendimientos de replegamiento, ya que esta estrategia operativa nos permitiría la manipulación de una mayor cantidad de proteína.

En la Figura 13 se muestra un cromatograma representativo de seis lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico asistido. En donde se pueden distinguir claramente dos picos en la señal de Absorbancia a 280nm. El primer pico corresponde la proteína eluída-replegada (1) y el segundo a la señal emitida por el GdnHCl 6 M (2). No obstante, para corroborar dicha hipótesis, las muestras correspondientes a los picos de elución se analizaron por SDS-PAGE. En la Figura 13B se pudo observar la presencia de una banda de 14.3 kDa, con un peso molecular correspondiente a lisozima, así como también se observa un incremento de la intensidad de la banda a medida que se incrementa el número de lotes de replegamiento. En el perfil electroforético del segundo pico de elución no se observó ninguna banda de proteína, lo que demuestra que DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD no son eluídos durante seis lotes de replegamiento desarrollados bajo las condiciones de operación establecidas.

El análisis de la proteína eluída en cada uno de los lotes de replegamiento cromatográfico (Figura 14A) mostró que el 17% de la proteína inyectada en el sistema fue liberada en el primer lote, su elución se incrementó hasta el 93% en el cuarto lote de replegamiento y llegó hasta el 115% a final de los seis lotes consecutivos de replegamiento asistido. La cantidad de proteína eluída en los primeros lotes, sugiere que una fracción de la proteína parcialmente desnaturalizada permanece unida a la

celulosa o a DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD. Después, dichas especies son desplazadas por la lisozima desnaturalizada y reducida recién inyectada al sistema en cada lote. A estas fracciones se les determinó la actividad enzimática por turbidimetría y se obtuvieron valores de actividad específica para así determinar el porcentaje de replegamiento. Los porcentajes de replegamiento obtenidos en el sistema asistido y sin asistencia de los chaperones son consistentes con los resultados de proteína eluída (Figura 14B). El sistema espontáneo a partir del tercer lote se mantuvo constante en 23% de replegamiento mientras que el caso asistido mostró una tendencia claramente creciente desde el 11.3 al 79% de replegamiento de lisozima desde el primer hasta el sexto lote. De acuerdo a la ecuación (Ec. 1.0), multiplicando la fracción de actividad recuperada por la fracción de proteína recuperada se determinó la eficiencia de replegamiento, cuyos valores fueron de hasta 1.18 para el sistema asistido, en comparación con el 0.18 del sistema sin asistencia de chaperones (Figura 15). En el Apéndice III, se muestran las Tablas suplementarias I y II, donde se reportan con detalle las cantidades de proteína inyectada, eluída y acumulada por el sistema de replegamiento cromatográfico espontáneo y asistido respectivamente. En la Tabla VIII se presenta un resumen de los porcentajes de replegamiento de lisozima adquiridos en cada una de las estrategias empleadas.

7.2.4.- Análisis SDS-PAGE de la matriz de replegamiento después de seis lotes de replegamiento consecutivos

Como anteriormente se ha mencionado, se supone que las especies desplegadas o parcialmente plegadas son retenidas por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD en el interior de la columna de replegamiento. Esta retención puede ser abatida por el desplazamiento de estas especies al inyectar lisozima desnaturalizada en cada lote, operando la columna cromatográfica en forma consecutiva. Para corroborar esta hipótesis se analizó la matriz de replegamiento por SDS-PAGE después de seis lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico de lisozima. Las muestras se tomaron de la punta, de en medio y del fondo de la matriz de replegamiento empacada en la columna cromatográfica (Figura 16). A lo largo del lecho cromatográfico se detectaron dos bandas (carriles 3 -

5). La banda de ~38 kDa corresponde a los chaperones inmovilizados y la banda de ~14.5 kDa corresponde a la lisozima. En el perfil electroforético del efluente del sexto lote, sólo se observa la banda correspondiente a lisozima, es decir los chaperones no son eluidos del sistema durante seis lotes. No obstante, la intensidad de la banda de los chaperones es mayor conforme aumenta la profundidad del lecho cromatográfico; por lo que, sólo las proteínas que se encuentran inmovilizadas en las primeras capas de la matriz de replegamiento son afectadas por las altas concentraciones de los agentes desnaturizantes. Sin embargo, a lo largo de la columna dichos agente se diluyen gradualmente hasta una concentración que no afecta la inmovilización de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD e inclusive, a mayor profundidad se desarrolla la reabsorción de los chaperones en la superficie de la celulosa. En la Figura 17, se presenta un esquema teórico de la remoción de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD; no obstante, es necesario analizar este fenómeno de remoción para la evaluación de la estabilidad operativa de la columna.

Figura 13.- Replegamiento oxidativo cromatográfico de lisozima por lotes consecutivos. (A)

Perfil de elución representativo de seis lotes consecutivos de replegamiento de lisozima. La columna de replegamiento se empacó y se equilibrio como se describe en la Figura 11. Después, 1mL (3mg/mL) de lisozima desnaturalizada y reducida se inyectó en la columna de replegamiento en seis lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico y se resolvió con amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 1 mM, GSSG 0.4 mM, GSH 2 mM, Arg 0.4 M, PMSF 0.1 M, Urea 2.0 M, pH 8.0) a un flujo isocrático de 0.3 mL/min. La línea continua corresponde a la señal de Absorbancia a 280nm, mientras que la línea discontinua corresponde a la señal de conductividad (mS/cm). (B) Análisis por SDS-PAGE de la lisozima eluída en cada lote de replegamiento (Carril 1) y del segundo pico de absorción a 280 nm (Carril 2).

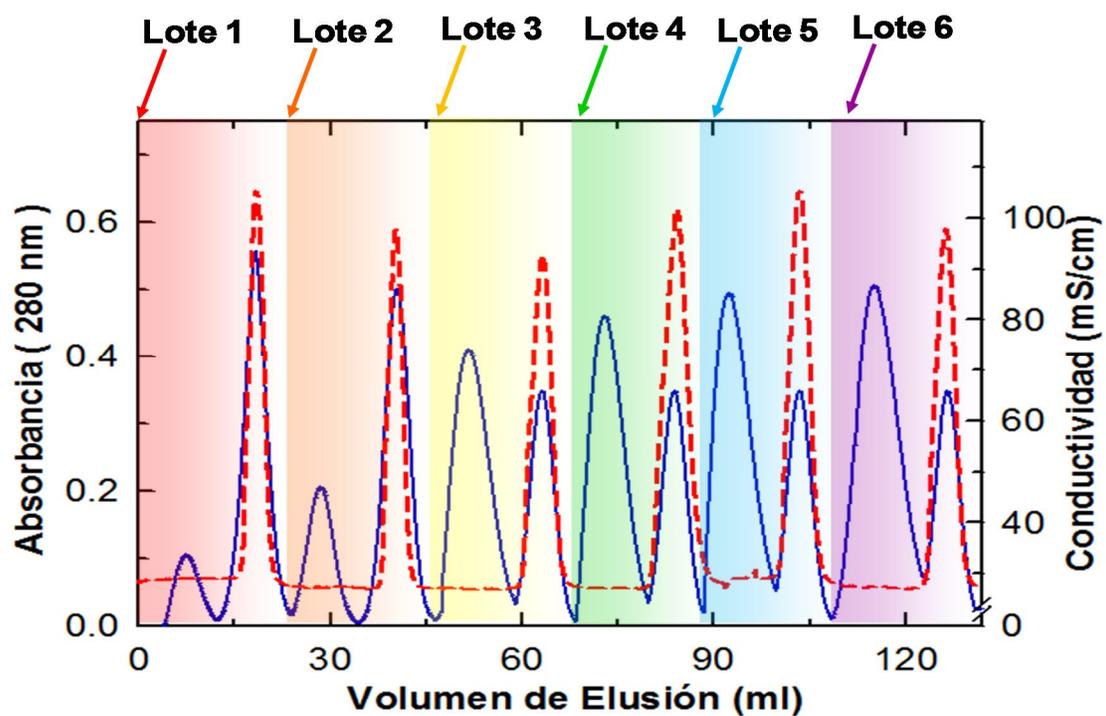
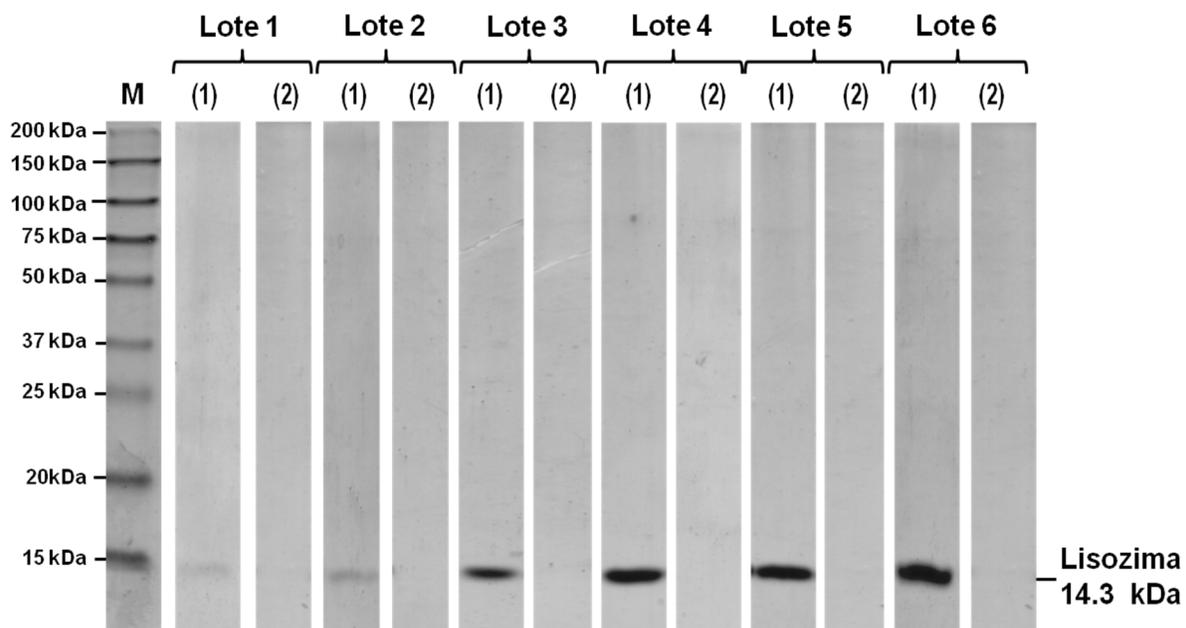
A**B**

Figura 14.- Proteína eluída y replegamiento de lisozima en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos. La columna de replegamiento fue empacada, equilibrada como se describe en la Figura 11. Después, 1 mL (3mg/mL) de lisozima desnaturalizada y reducida se inyectó en la columna de replegamiento en seis lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico y se resolvió con amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 1 mM, GSSG 0.4 mM, GSH 2 mM, Arg 0.4 M, PMSF 0.1 M, Urea 2.0 M, pH 8.0) a un flujo isocrático de 0.3 mL/min. (A) La lisozima eluída de la columna de replegamiento cromatográfico asistido (línea punteada, ▲) y sin asistencia de los chaperones (línea discontinua, ●) se determinó durante 6 lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico. La proteína inyectada en cada ciclo (3.0 mg) se estableció como 100 %. (B) Porcentaje de replegamiento obtenido en cada lote de replegamiento asistido (línea punteada, ◆) y sin asistencia de los chaperones (línea discontinua, ●). La actividad específica de la lisozima nativa se tomó como 100%. Las barras representan el error estándar de al menos tres experimentos.

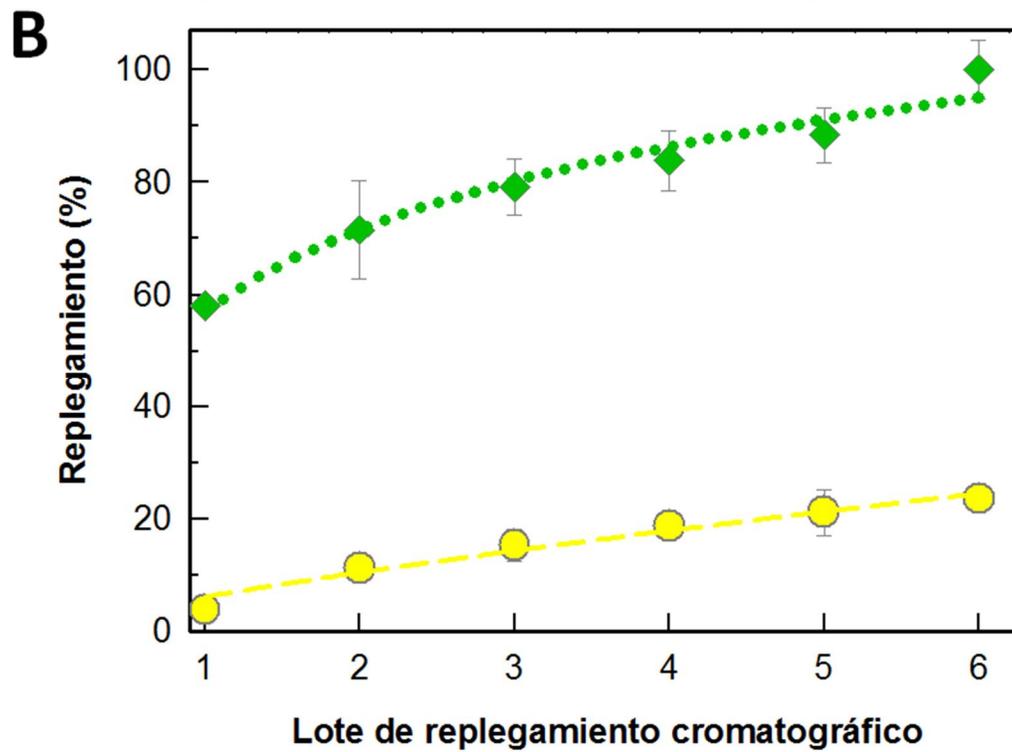
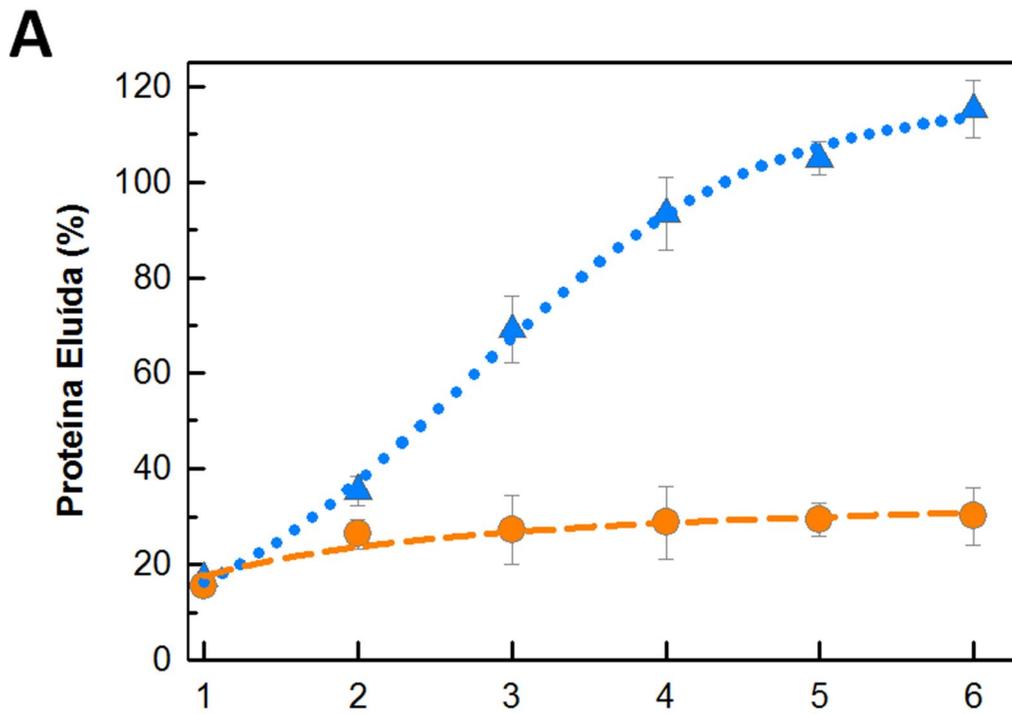


Figura 15.- Eficiencia de replegamiento en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos. La eficiencia de cada lote de replegamiento cromatográfico consecutivo asistido (línea punteada, ■) y sin asistencia de los chaperones (línea discontinua, ●) se estimó por medio de los valores de la proteína eluída y el replegamiento de cada lote (Figura 14) aplicados a la ecuación (Ec. 1.0), donde $E_R = 1.0$, corresponde a la elución de la misma cantidad de proteína inyectada (3.0 mg) a la columna y la actividad correspondiente a la proteína nativa.

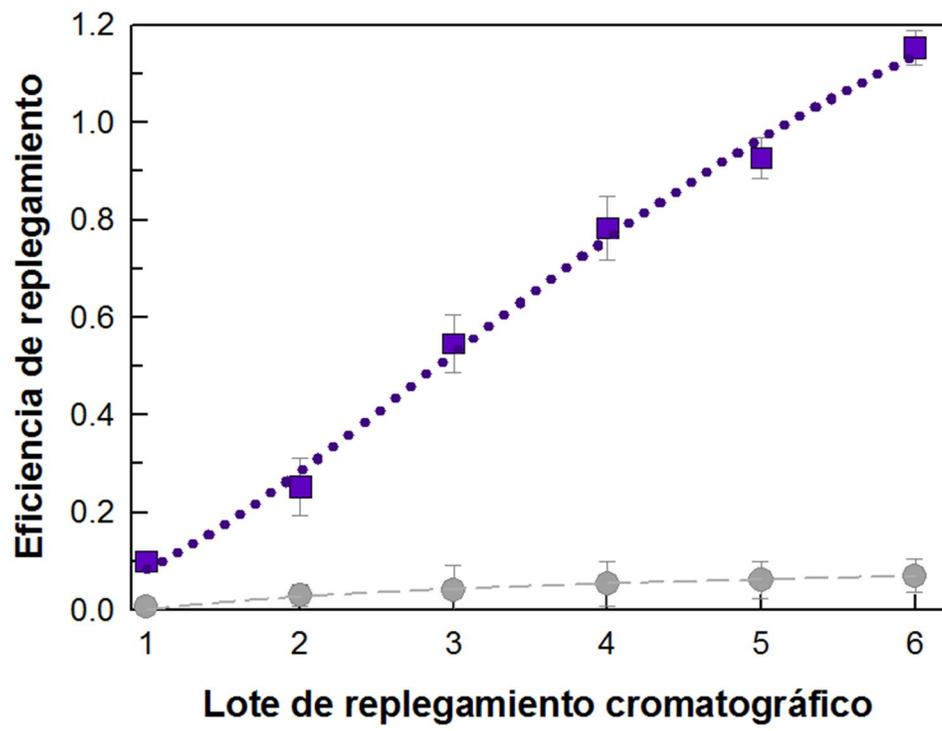


Tabla VIII.- Rendimientos de replegamiento de lisozima de las alternativas de replegamiento evaluadas

Estrategia de Replegamiento	Proteína total tratada (mg)	% R Espontáneo	% R Asistido	Observaciones
Dilución	0.05	42	98	Duración de 1 h. Remoción de los chaperones en membranas de celulosa por centrifugación
Cromatográfico	0.5	60	100	Duración de 1 h. Retención del sustrato en la columna de replegamiento.
Cromatográfico por lotes consecutivos	18.0	21	64-100	Duración de 6.5 h. Se abatió la retención del sustrato por la adición continua de sustrato desnaturalizado.

Figura 16.- Análisis SDS-PAGE de la matriz de replegamiento después de seis lotes de replegamiento consecutivos. Una mezcla equimolar de las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD (Carril 1) se interaccionó con celulosa, las proteínas inmovilizadas en celulosa (Carril 2) se mezclaron con BioGel 6-P (BioRad), se empacaron en una columna cromatográfica, al cual se equilibró con amortiguador de replegamiento. Después se desarrollaron seis lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico de lisozima y se tomaron muestras representativas del límite superior (carril 3), de la mitad (carril 4) y del fondo (carril 5) del lecho cromatográfico para determinar la proteína inmovilizada en celulosa. En el carril 6 se muestra la lisozima replegada por este método.

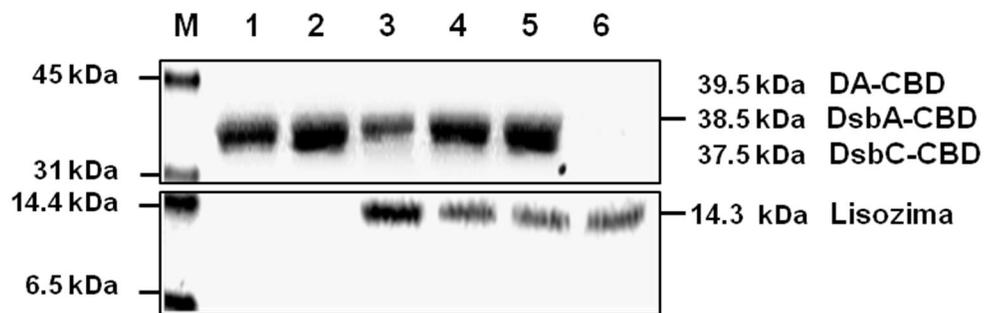
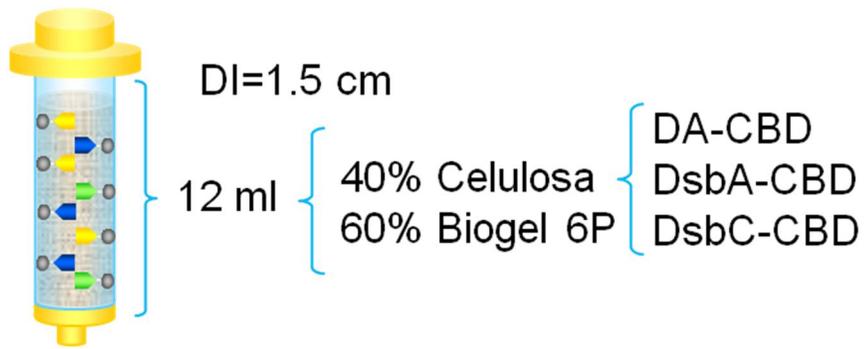
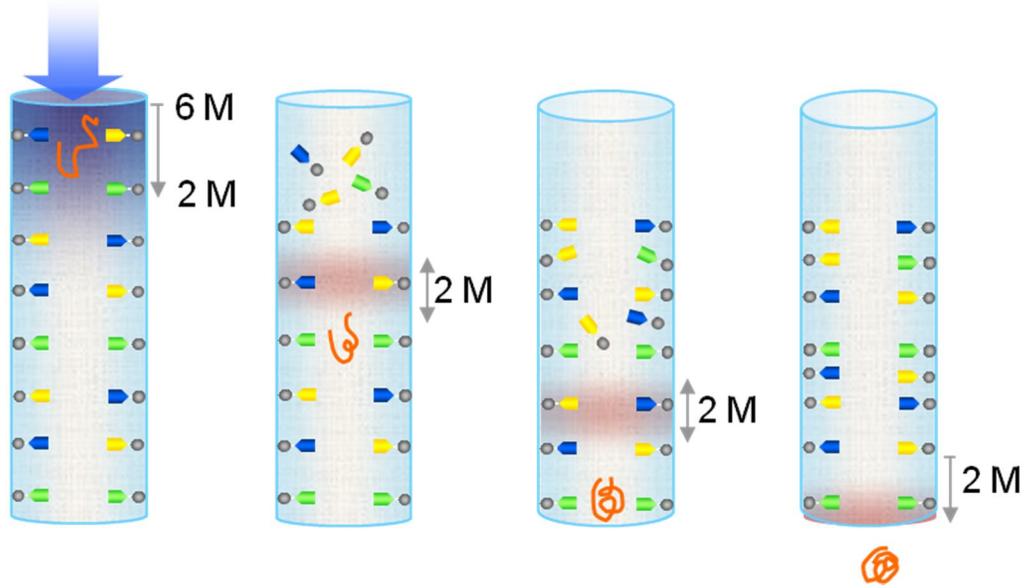


Figura 17.- Esquema teórico de la remoción de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD. Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizadas en celulosa son removidas gradualmente por el contacto con los agentes desnaturizantes presentes en la muestra de proteína desnaturizada y reducida. El grado de remoción está en función de la profundidad del lecho cromatográfico en las columnas de replegamiento.



GdnHCl



7.3.- Estabilidad de la inmovilización por medio del CBD

7.3.1.- Estabilidad de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD ante condiciones desnaturalizantes

En la Figura 18 se muestran las curvas que describen la disminución de la actividad DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD en forma individual por la exposición a condiciones desnaturalizantes extremas. En el panel A se presentan los resultados correspondientes a la proteína DA-CBD, en la gráfica del panel A se observa que al ser expuesta a GdnHCl 4 M y β -mercaptoetanol 80 mM, pierde actividad drásticamente, conservando tan solo el 29%. Sin embargo, al ser expuesta a 1 M/21 mM, 2 M/42 mM y 3 M/62.5 mM de GdnHCl/ β -mercaptoetanol, hasta por 2 h, la actividad remanente de DA-CBD fue del 90 al 80% (en el caso más extremo). En el panel B, se observan los resultados de la estabilidad de la proteína DsbA-CBD, la cual al ser expuesta a GdnHCl 4 M y β -mercaptoetanol 80 mM durante 2 h conservó el 64% de su actividad y cuando fue expuesta a 1 M/21 mM y 2 M/42 mM GdnHCl/ β -mercaptoetanol perdió sólo el 17%. Los resultados para la estabilidad de la proteína DsbC-CBD (Figura 18C) fueron similares a los obtenidos para DsbA-CBD conservando el 73% de su actividad inicial aún en condiciones extremas.

Se hicieron geles de poliacrilamida para evaluar si efectivamente esta disminución en los porcentajes de replegamiento se debió a la inestabilidad estructural de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD bajo estas condiciones o bien, se debieron a que los chaperones se desprendían de la celulosa. Como se puede observar en el recuadro el panel A, la proteína DA-CBD es lavada del sistema a concentraciones de 3 M de GdnHCl y 62.5 mM β -mercaptoetanol, cuando es expuesta por 2 h. En el caso de las proteínas DsbA-CBD y DsbC-CBD ocurrió el mismo evento, pero hasta una concentración de 4 M de GdnHCl y 80 mM β -mercaptoetanol.

7.3.2.- Estabilidad operativa y de almacenamiento de la columna de replegamiento asistido por DA-CBD DsbA-CBD y DsbC-CBD

Una vez establecidas las condiciones operacionales para desarrollar el replegamiento cromatográfico de lisozima, se analizó la estabilidad de la columna empacada con la matriz de replegamiento en función del número de lotes de replegamiento de lisozima. Se determinó la concentración de proteína remanente en la columna cromatográfica después de la exposición de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD a condiciones desnaturizantes propiciadas por la inyección de lisozima desnaturizada en GdnHCl 6 M y β -mercaptoetanol 80 mM durante ocho reusos. Por análisis densitométrico se estimó que tan sólo el 8% de la proteína inmovilizada fue removida del sistema. Se correlacionó la concentración de la proteína remanente y su capacidad de replegamiento. En la Figura 19A se muestran los rendimientos de replegamiento obtenidos en cada uno de los reusos. Estos resultados nos indicaron que la columna de replegamiento permanece estable y funcional durante ocho reusos, indicando una alta estabilidad de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD a nivel operativo. Por otra parte, también se evaluó la estabilidad de almacenamiento de la matriz de replegamiento. La Figura 19B muestra la cantidad de proteína unida a la celulosa después de 3, 6, 12 y 18 meses de almacenamiento a -20°C . Sorprendentemente, después de un año más del 90% permaneció inmovilizada y su actividad de replegamiento prácticamente no se vio afectada. Inclusive, después de 18 meses, la actividad de la matriz de replegamiento fue mayor al 80%. Estos resultados indican que la inmovilización de la DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD fue estable bajo estas condiciones de almacenamiento, lo cual permitirá almacenar las columnas de replegamiento hasta un año sin sufrir cambios significativos en su capacidad de replegamiento.

Figura 18.- Estabilidad de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD Replegamiento de lisozima asistido por DA-CBD (A), DsbA-CBD (B) o DsbC-CBD (C) inmovilizadas en celulosa en función del tiempo de incubación en Tris_HCl, pH 8.0. conteniendo 4 M GdnHCl y 80 mM β -mercaptoetanol (\blacktriangledown), 3 M GdnHCl y 63 mM β -mercaptoetanol (\blacklozenge), 2 M GdnHCl y 42 mM β -mercaptoetanol (\blacksquare), 1 M GdnHCl y 21 mM β -mercaptoetanol (\bullet). El replegamiento inicial se tomó como 100 %. Al final de cada experimento se determinó la proteína unida a celulosa mediante SDS-PAGE (inserto), en la inmovilización (Carril I) y después de 2 h de incubación en TrisHCl pH 8.0 conteniendo 1 M GdnHCl y 20 mM β -mercaptoetanol (Carril I), 2 M GdnHCl y 40 mM β -mercaptoetanol (Carril II), 3 M GdnHCl y 60 β -mercaptoetanol (Carril III), 4 M GdnHCl y 80 mM β -mercaptoetanol (Carril IV).

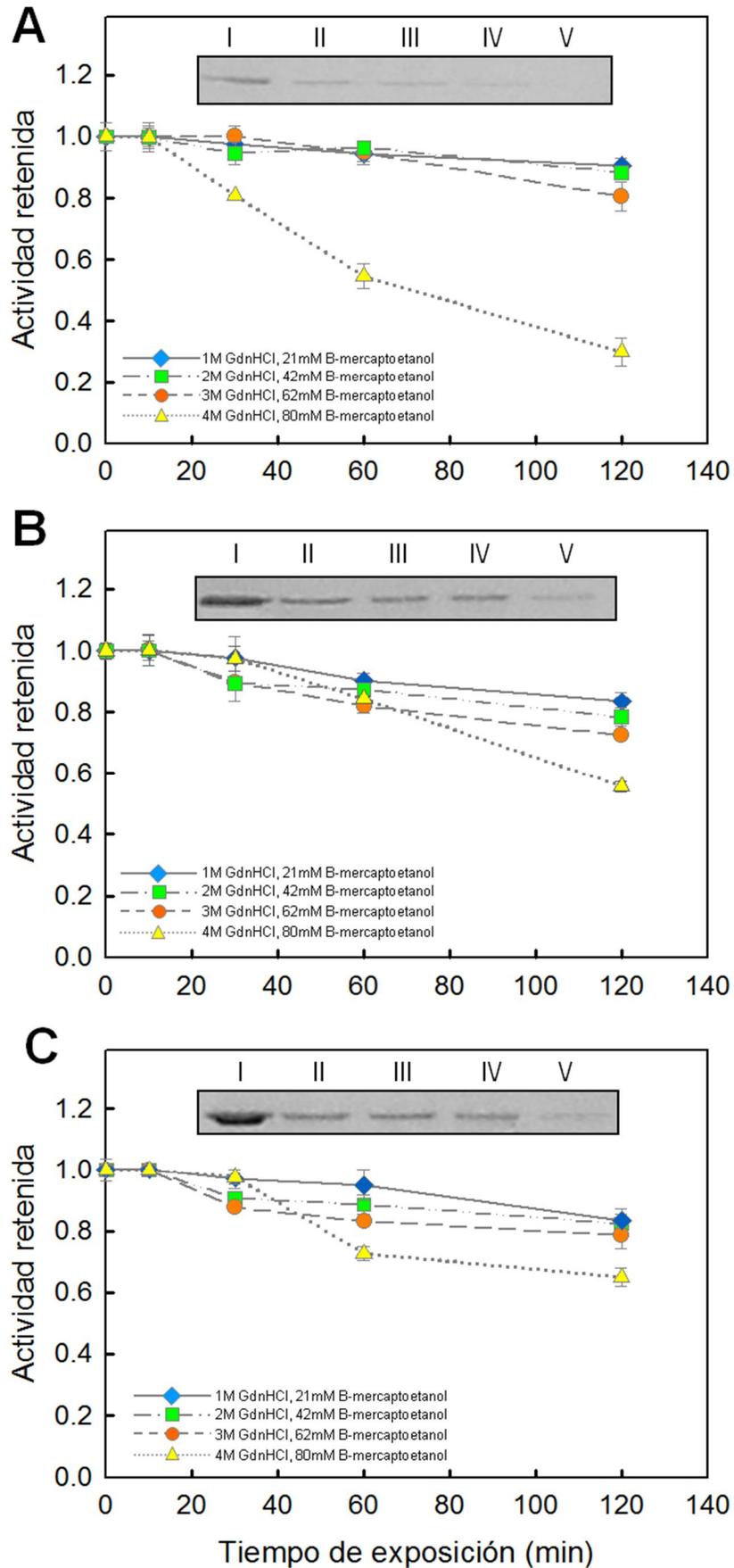
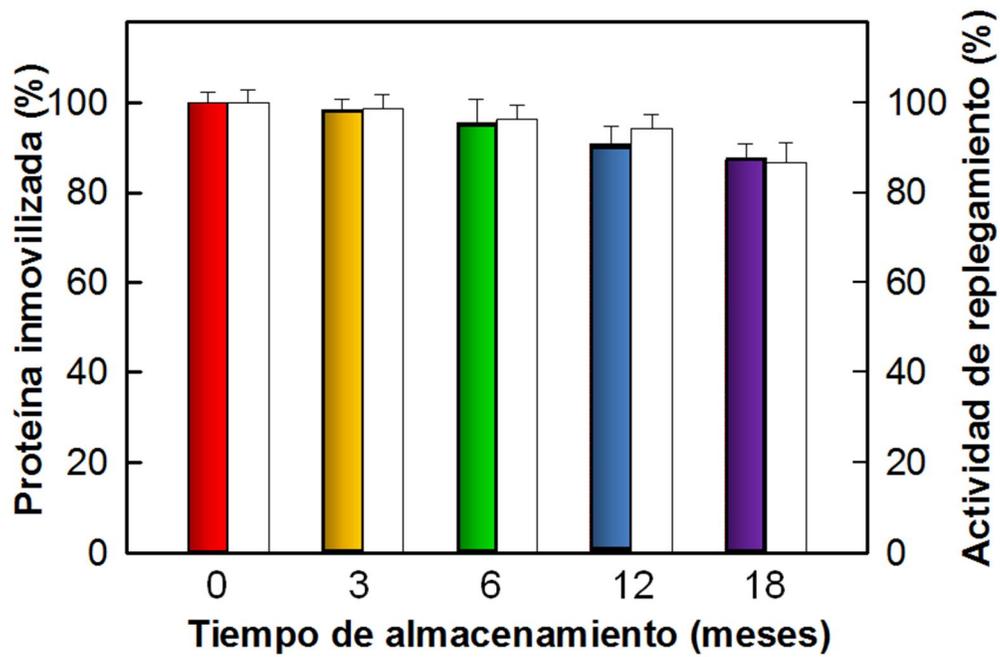
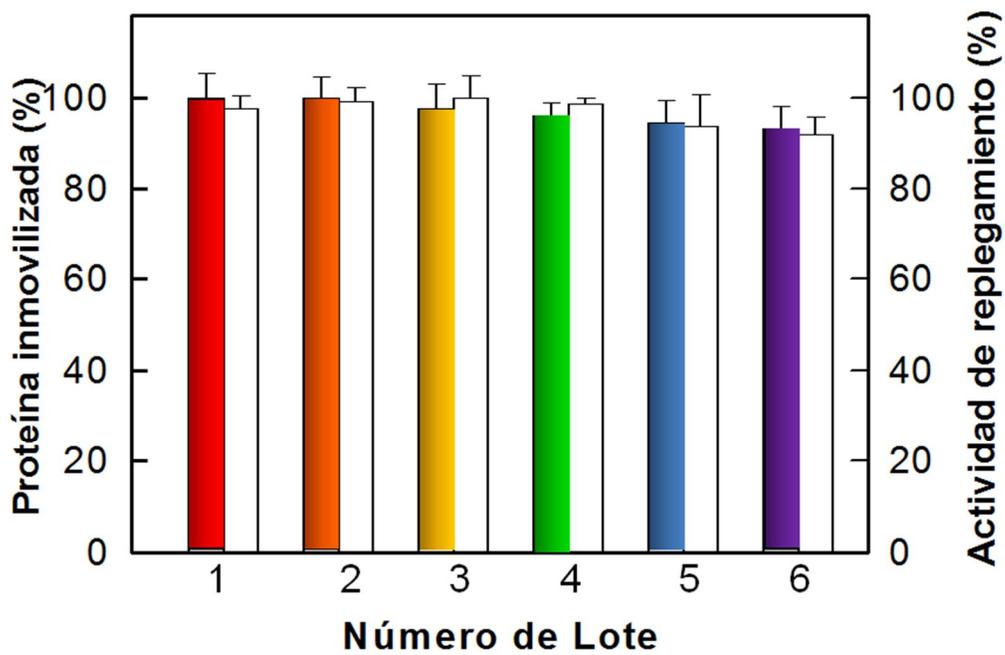


Figura 19.- Estabilidad operacional y de almacenamiento de la columna de replegamiento. (A)

Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD se inmovilizaron en celulosa y se mezclaron con BioGel 6-P (BioRad) y se empacaron en una columna cromatográfica, la cual se equilibró con amortiguador de replegamiento. Después 1 mL (0.5mg/mL) de lisozima desnaturalizada y reducida se inyectó en la columna y se desarrollaron ensayos de replegamiento cromatográfico oxidativo por lotes consecutivos. Después de cada lote la columna se desempacó, la matriz de replegamiento se mezcló y se tomaron muestras representativas para determinar la proteína inmovilizada en celulosa después de cada lote de replegamiento cromatográfico (barras llenas). Posteriormente la columna se reempacaba para desarrollar el siguiente lote de replegamiento cromatográfico y se determinó su actividad de replegamiento obtenido en cada lote (barras vacías). (B) Las proteínas DA-CBM, DsbA-CBM y DsbC-CBD se inmovilizaron en celulosa y se mezclaron con BioGel P-6 (BioRad). Esta matriz de replegamiento se equilibró con PBS 1X pH. 7.0, 50 % glicerol y se almacenó a -20 °C durante 18 meses. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de almacenamiento. Se les determinó la proteína unida (barras llenas) y su actividad de replegamiento (barras vacías), tomando como el 100 % los valores iniciales (tiempo 0) de proteína y de replegamiento asistidos por DA-CBD, DsbA-CBD, DsbC-CBD inmovilizados en celulosa.

A**B**

7.4.- Replegamiento oxidativo de proteínas recombinantes acumuladas en CI.

7.4.1.- Análisis bioinformático de rHAsa

La secuencia de aminoácidos de la rHAsa se utilizó para la determinación de sus características fisicoquímicas (Tabla IX) por medio del software ProtParam, disponible en <http://expasy.org>.

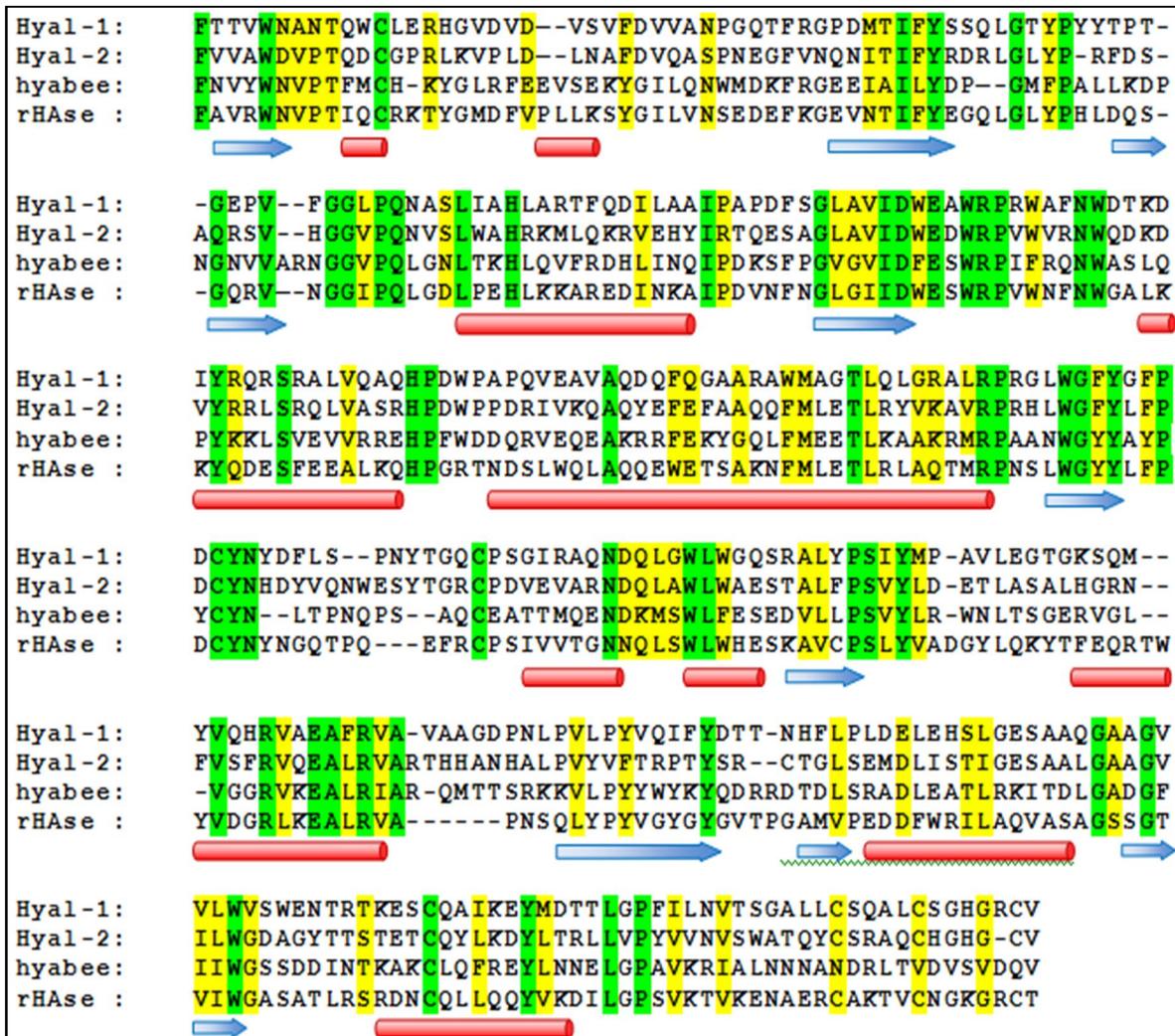
Se desarrolló un alineamiento múltiple de la secuencia de rHAsa contra hialuronidasas y glicosilhidrolasas. Las secuencias de hialuronidasa humana 1 involucrada en crecimiento tumoral y angiogénesis (Hyal-1, ExpDB:2pe4A), hialuronidasa humana 2 de esperma (Hyal-2, ExpDB:2jj8A) y hialuronidasa del veneno de abeja (hyabee, ExpDB:1fcuA) tuvieron mayor identidad (33 - 36%) con rHAsa. Inicialmente cada uno de los alineamientos se realizó en BLASTP y las secuencias analizadas se alinearon por CLUSTAL W donde se identificaron las regiones conservadas y variables. En la Figura 20 se presenta la homología de rHAsa con las secuencias analizadas por medio de las cuales se predijo la proporcionalidad de la estructura secundaria (PSIPRED v3.0, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Para desarrollar el modelado por homología, finalmente se eligió la secuencia de la hialuronidasa del veneno de abeja, la cual se analizó por Deep View y se modeló por SWISS MODEL. A pesar de tener una similitud de tan sólo el 36% entre la secuencia de la rHAsa y la hialuronidasa del veneno de abeja, SWISS MODEL fue capaz de obtener un modelo de la estructura terciaria de rHAsa (Figura 21). De acuerdo al modelo obtenido y al alineamiento múltiple se predijo una proporcionalidad de la estructura secundaria de rHAsa del 33.2% de α -hélice, 15% para β -plegada y 51.8% de *random coil*. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por medio del espectro DC de las muestras de rHAsa replegada por medio de la columna de replegamiento cromatográfico asistido por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD para corroborar la recuperación de su estructura nativa.

Tabla IX. Características bioquímicas de rHAsa

Características*	
Número de aminoácidos	425
Cargados (+)	47
Cargados (-)	44
Aminoácidos sin carga	79 %
Hidrofóbicos	33 %
Triptófanos	15
Prolinas	15
Coeficiente de extinción	116770 M ⁻¹ cm ⁻¹
Índice de inestabilidad	32.25
Índice alifático	72.21

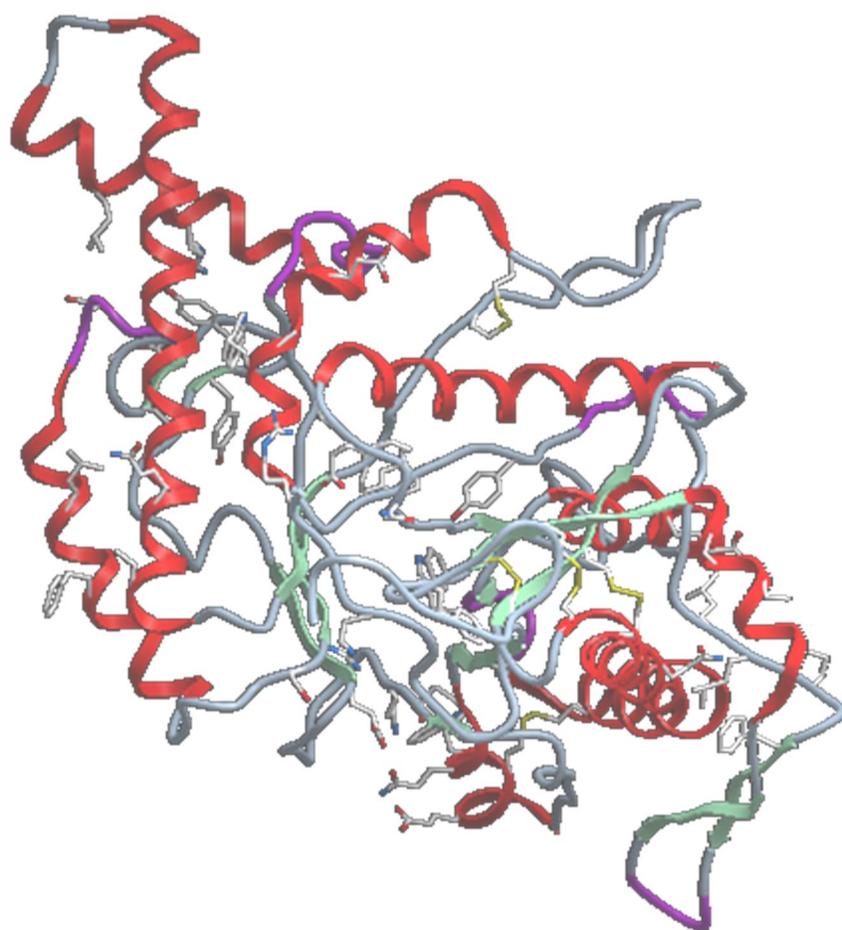
*Valores obtenidos con el programa Prot Param.

Figura 20.- Alineamiento múltiple de la rHAsa de tarántula. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de rHAsa de tarántula con las secuencias de aminoácidos de hialuronidasa humana 1 (Hyal-1, ExpDB:2pe4A), hialuronidasa humana 2 de esperma (Hyal-2, ExpDB:2jj8A) y hialuronidasa del veneno de abeja (Hyal bee, ExpDB:1fcuA). Se señalan en verde los aminoácidos totalmente conservados y en amarillo los parcialmente conservados. Los aminoácidos correspondientes a estructuras α -hélice se marcan en la parte inferior con cilindros de color rojo y las β -plegadas con flechas de color azul. El alineamiento múltiple se analizó por Deep View, a partir del cual se desarrolló el modelado por SWISS MODEL y se determinó la siguiente composición de la estructura secundaria de rHAsa: 33.2 % α -hélice, 15 % β -plegada y 51.8 % *random coil*.



α -hélice	β -plegada	random coil
33.2%	15.0%	51.8%

Figura 21.- Modelo de la estructura terciaria de rHAsa. Modelo de la estructura 3D obtenido por modelado por homología usando el servidor SWISS MODEL utilizando como molde a la hialuronidasa del veneno de abeja (ExPDB:1fcuA). En rojo se muestran las α -hélices, en verde las β -plegadas y en gris las estructuras *random coil*. En amarillo se muestran los enlaces disulfuro presentes en la estructura de rHAsa.



7.4.2.-Expresión y purificación de rHAsa

En la Figura 22 se muestra el resultado del análisis por SDS-PAGE de la expresión de la rHAsa, por medio de los extractos proteicos totales de los diferentes genotipos de *E. coli*, en los cuales se observó una banda diferencial entre los extractos proteicos totales de los tiempos no inducido y después de inducción. La banda diferencial fue de aproximadamente 47 kDa, tamaño esperado para la proteína rHAsa. En los carriles de ambas figuras (22A y 22B) se observa la acumulación mayoritaria de la proteína rHAsa en forma de CI (carriles 4, 8, 12, 16). Particularmente en los genotipos BL21(DE3), BL21(star) y rosetta 2 también se encuentra una banda del mismo tamaño presente en la fracción citoplásmica soluble (carriles 3,7,15). La confirmación de que la banda observada a 47 kDa en los perfiles electroforéticos de las fracciones solubles correspondían a la proteína rHAsa se llevó a cabo por medio de zimogramas de la proteína rHAsa (Figura suplementaria 3, Apéndice II). La fracción soluble de BL21(DE3), BL21(star) y rosetta 2, fue de nuestro interés para emplearla como control de actividad, dicroísmo circular y espectros de fluorescencia, sin embargo, no fue posible estandarizar un protocolo de purificación con el cual se recuperaría suficiente proteína para desarrollar los ensayos control. La proteína rHAsa acumulada en CI se empleó en los ensayos de replegamiento. Los CI se disolvieron inicialmente con el amortiguador de desnaturalización empleado con lisozima (Urea 8 M, DTT 20 mM), aunque estas condiciones desnaturalizantes no fueron suficientes para la solubilización total de la muestra. El resultado fue una solución con apariencia viscosa, que difícilmente favorecería el flujo de la misma a través de una columna cromatográfica. En función de estos resultados se sustituyó la urea 8 M por GdnHCl 6 M, aún bajo estas condiciones, los CI no se solubilizaron totalmente. Finalmente se evaluó el efecto de diversas concentraciones de β - mercaptoetanol (20 - 120 mM). Los CI se solubilizaron por completo, resultando en una solución con apariencia homogénea y acuosa cuando se emplearon GdnHCl 6 M y 80 mM β -mercaptoetanol.

A pesar de que la rHAsa expresada a través del vector pQE 60 facilitaría su purificación a través de cromatografía de afinidad a níquel, no se pudo estandarizar un protocolo bajo este esquema. Considerando que la expresión de proteínas recombinantes en CI conduce a la presencia de un menor número de proteínas contaminantes se llevó a cabo una cromatografía de filtración en gel para la purificación de la proteína rHAsa. En la Figura 23A se muestra el perfil de elución de la cromatografía de filtración en gel (Shephacryl 200), en la cual sólo se observó un pico de elución. Las fracciones correspondientes se analizaron por SDS-PAGE al 13%, dónde se confirmó la eliminación de la mayoría de las proteínas contaminantes (Figura 24B, carril 3).

7.4.3.-Replegamiento asistido de rHAsa por diálisis y dilución

Se desarrolló una diálisis en un factor de recambio de 1:200 bajo una configuración escalonada. La primera diálisis se llevó a cabo en amortiguador de replegamiento adicionado con urea 2 M durante 16 h a 4 °C. La segunda diálisis se desarrolló con el amortiguador de replegamiento suplementado con β -mercaptoetanol 0.30 mM sin urea durante 16 h a 4 °C. Desde el inicio se agregó L-Arginina (0.4 M) en el interior de la bolsa de diálisis para evitar la formación de agregados. La rHAsa replegada a través de este método mostró una actividad del 46% (140845 TRU) comparada con la actividad que registró el veneno de tarántula (300030 TRU) (gráficas no incluidas). La muestra recuperada se analizó por SDS-PAGE (Figura 24A) y su actividad fue analizada por zimogramas (Figura 24B).

Los ensayos de replegamiento asistido por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, también se desarrollaron por dilución 1:100 en amortiguador de replegamiento adicionado con las tres proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD en solución. Se hizo la determinación de actividad de rHAsa de las muestras por ensayos turbidimétricos, entonces se observó que existía interferencia en ellos, probablemente por la adición indirecta del glicerol presente en el amortiguador de almacenamiento de los chaperones. La actividad analizada por zimogramas se presenta en la Figura 24C. En el carril 1 se muestra la actividad correspondiente al ensayo sin asistencia de los chaperones, donde rHAsa no

presentó actividad. En los carriles 2 - 4 se observa la actividad de rHAsa recuperada por la asistencia de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD. Después de 2 h se recuperó un 24.75% cuando los DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD se adicionaron en una relación molar 1:1 con rHAsa a 0.0034 mg/mL. En otra serie de experimentos se evaluó el efecto del enriquecimiento del amortiguador de replegamiento con urea. A una concentración 1 M el porcentaje de replegamiento se incrementó hasta un 36% (datos no mostrados). Es importante resaltar que la proteína rHAsa recombinante fue activada a pesar de la incapacidad de *E. coli* de incorporar glicosilaciones.

Figura 22.- Expresión de la rHAsa en diferentes genotipos de *E. coli*. Análisis SDS-PAGE al 13 % de la expresión de la proteína rHAsa en los genotipos de *E. coli*. (A) BL21(DE3) y BL21 (star) y (B) HMS174 y Rosetta 2: proteína total antes (carriles 1, 5) y después de inducción (carriles 2, 6), fracción soluble (carriles 3, 7) y fracción insoluble (carriles 4, 8) respectivamente. En ambos geles el carril (M) corresponde al marcador de peso molecular.

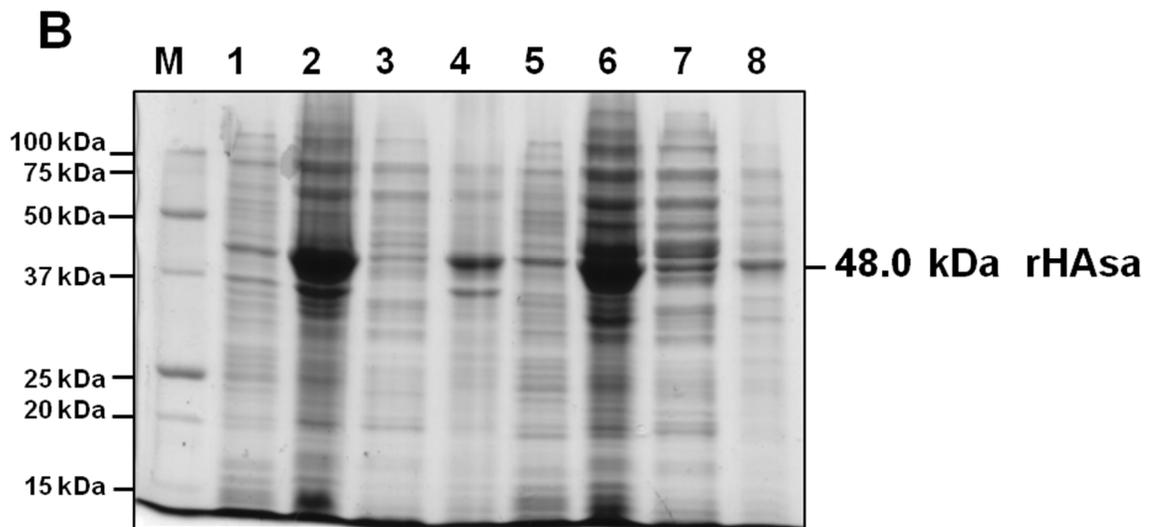
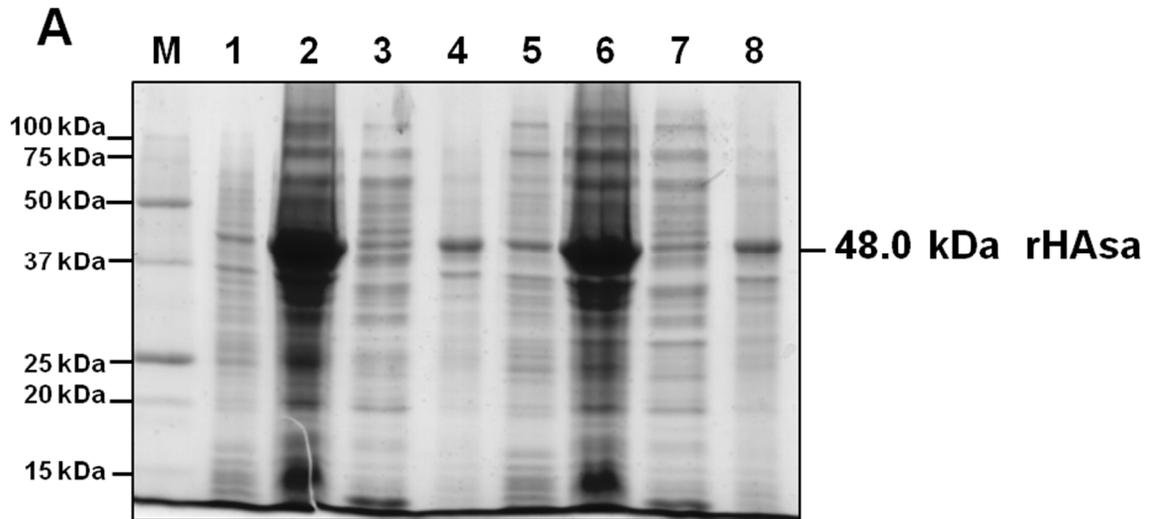


Figura 23.- Purificación de la proteína rHAsa. La proteína rHAsa se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) y se acumuló principalmente en la fracción insoluble. Los CI se solubilizaron en 6 M GdnHCl y 120 mM de β -mercaptoetanol y la rHAsa se purificó por una cromatografía de filtración en gel bajo condiciones desnaturizantes (6 M GdnHCl y 120 mM de β -mercaptoetanol) en una columna empacada con 286 mL de Shephacryl 200. (A) Perfil de elución de la proteína rHAsa. La línea continua corresponde a la Absorbancia a 280nm y la línea punteada corresponde a la señal de conductividad (mS/cm). (B) Perfil electroforético (SDS-PAGE al 15%) de la fracción insoluble (carril 1), CI (carril 2) y rHAsa purificada (carril 3). El carril (M) corresponde al marcador de peso molecular.

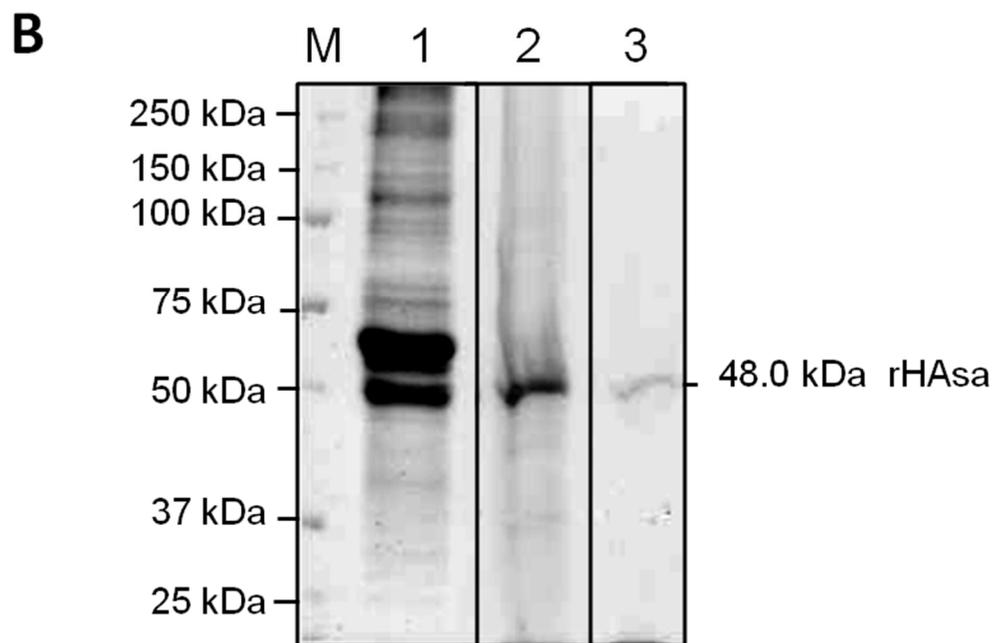
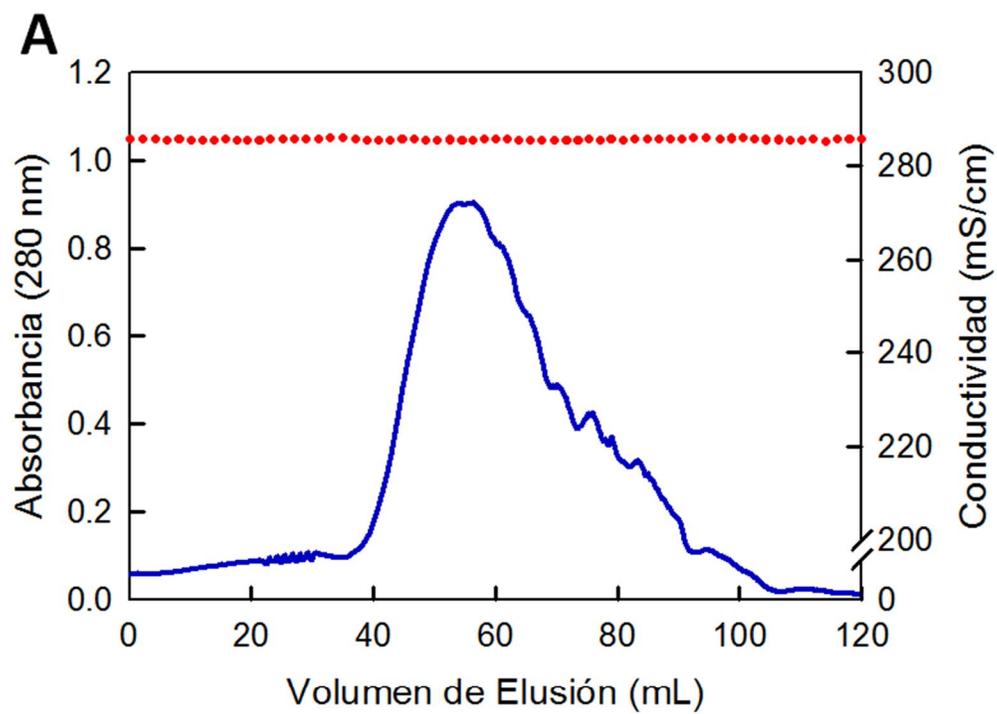
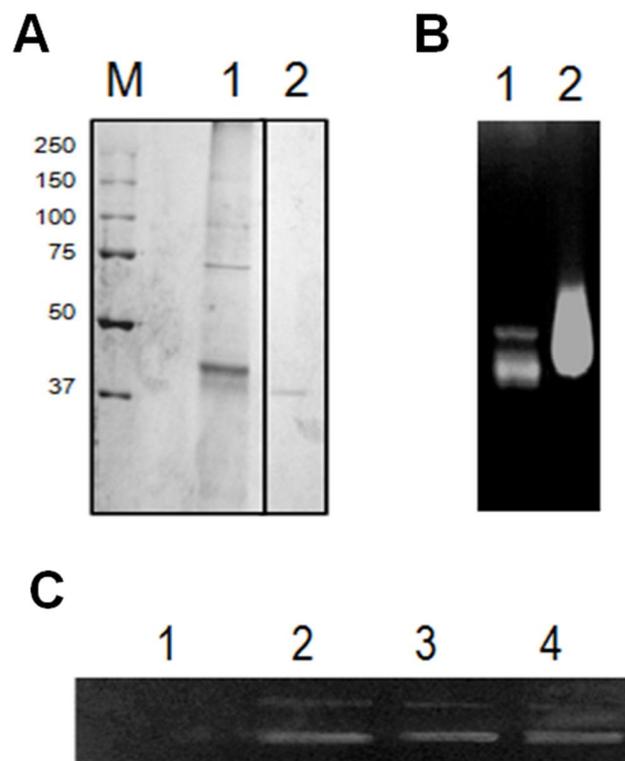


Figura 24.- Replegamiento de la rHAsa por diálisis y dilución. La rHAsa purificada por filtración en gel se dializó a 4 °C contra el amortiguador de replegamiento (Tris-HCl 0.1 M, EDTA 1 mM, GSSG 0.4 mM, GSH 2 mM, Arg 0.4 M, PMSF 0.1 M, Urea 2.0 M, pH 8.0) y se determinó su actividad mediante zimogramas. (A) Perfil electroforético (B) zimograma del veneno de tarántula (Carril 1), de rHAsa después de 36 h de diálisis (Carril 2). Por otra parte la rHAsa purificada por filtración en gel, se diluyó 200 veces en amortiguador de replegamiento con 1 M de urea y DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD en una relación molar 1:1. Los ensayos se mantuvieron en agitación constante (150 rpm) a 25 °C por 3 h. Cada 30 min se tomaron muestras para determinar su análisis por zimograma. (C) Actividad recuperada después de 120 min de incubación en buffer de replegamiento sin chaperones (Carril 1) y después de 30 (Carril 2), 60 (Carril 3) y 120 min (Carril 4) con DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD.



7.4.4.-Replegamiento asistido de rHAsa en columna cromatográfica

Inicialmente se siguieron las condiciones obtenidas para el replegamiento de lisozima, con la diferencia de que se inyectó rHAsa a 0.5 mg/mL en cada lote. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados. En el sistema sin asistencia de los chaperones no se observó actividad de rHAsa. En el replegamiento cromatográfico asistido de rHAsa en lote con la inyección de 0.5 mg/mL se recuperó el 4.47% de su actividad. De acuerdo a los resultados obtenidos, se sospechó de la retención total de la proteína, por lo que se decidió continuar con la estrategia de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos a una mayor concentración de rHAsa.

7.4.5.- Replegamiento cromatográfico asistido de rHAsa por lotes consecutivos

En la Figura 25 se puede observar un cromatograma característico correspondiente a la operación de la columna de replegamiento en ocho lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico. Nuevamente observamos el incremento de la concentración de proteína eluída por el sistema en función del número de lote (Figura 26A). Las fracciones correspondientes a cada pico de elución de proteína se analizaron por zimogramas. Se observó que el mejor rendimiento de replegamiento (31%) se obtuvo en el sexto lote de replegamiento, mientras que en el caso espontáneo no se observó ninguna actividad (Figura 26B). No obstante, la cantidad de proteína eluída por el sistema sin asistencia de los chaperones, fue de menos del 7% de rHAsa inyectada (0.130 - 0.120 mg/mL); mientras que en el caso asistido la elución de la proteína no supera la liberación del 21%. En la Figura 27, se muestra el análisis por SDS-PAGE del soporte cromatográfico después de los ensayos de replegamiento. Se observó la interacción entre rHAsa y las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC- CBD (carriles 2 - 5). En contraste, en el carril 1 sólo se observó la banda correspondiente a la rHAsa, sugiriendo una interacción inespecífica entre rHAsa y el soporte cromatográfico. Por lo que se planteó llevar a cabo experimentos con una columna previamente saturada con CBD o con los chaperones para bloquear las interacciones inespecíficas entre la rHAsa con la superficie libre y

expuesta de la celulosa. La saturación de la celulosa se desarrolló interaccionando la celulosa con las proteínas CBD o con AD-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD a concentraciones mayores a la $Q_{m\acute{a}x}$ estimada por la isoterma de absorción (Figura 10) y bajo la estrategia descrita previamente por Antonio y col., 2007. En la Figura 28 se pueden observar los perfiles electroforéticos de la matrices de replegamiento saturadas con CBD (Carril 1) o con AD-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD (Carril 3).

Figura 25.- Replegamiento cromatográfico oxidativo de rHAsa por lotes consecutivos. Perfil cromatográfico de 8 lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico de rHAsa. La línea continua corresponde a la Absorbancia a 280 nm y la línea punteada a la conductividad (Ms/cm). Las flechas indican el inicio de un nuevo lote de replegamiento cromatográfico. En cada lote se inyectó 1 mL (2.5 mg/mL) de rHAsa desnaturalizada y reducida a una columna (1.5 x 15 cm) empacada con 12 mL de matriz de replegamiento similar a las descritas en la Figura 11. La cromatografía se resolvió a un flujo isocrático de 0.3 mL/min con Tris-HCl 0.1 M, EDTA 1 mM, GSSG 0.4 mM, GSH 2 mM, Arg 0.4 M, PMSF 0.1 M, Urea 2.0 M; pH 8.0.

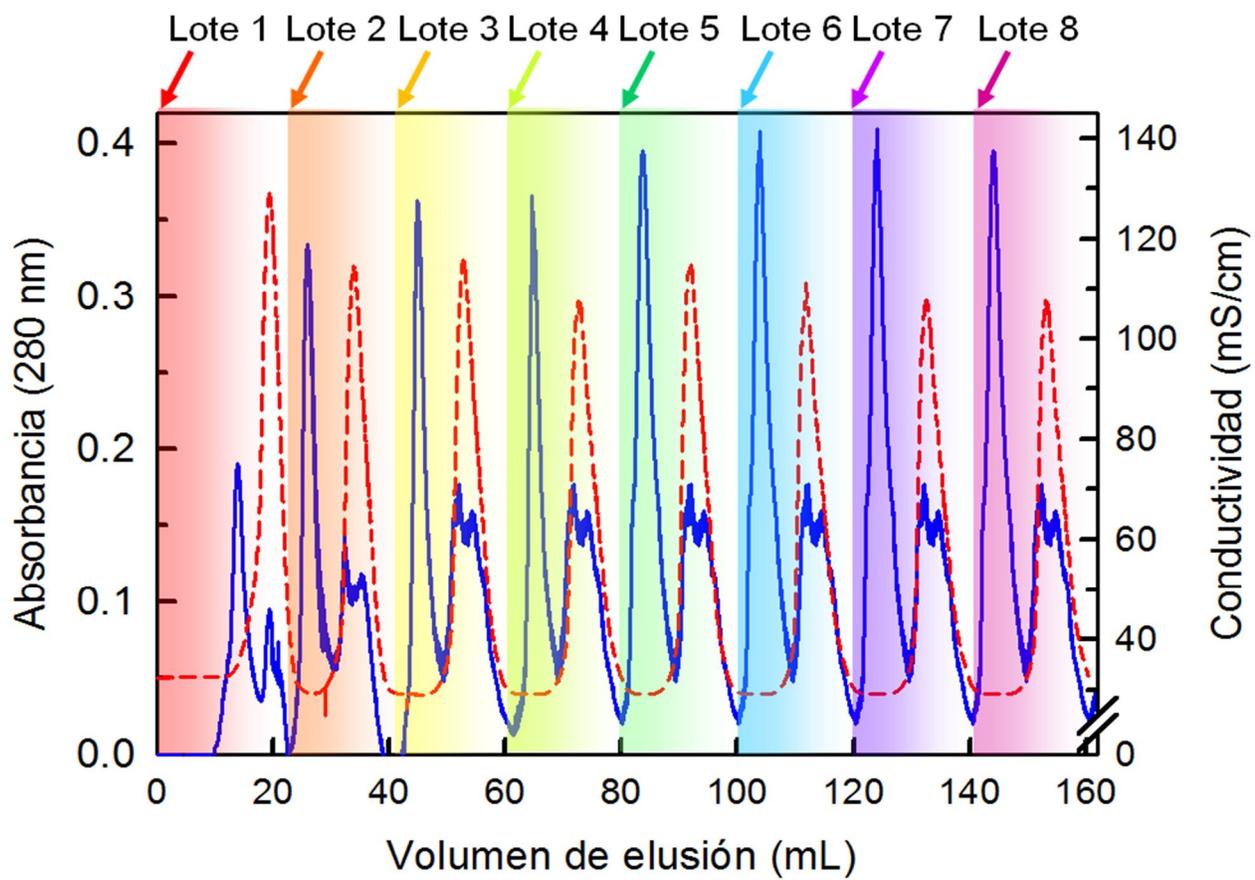


Figura 26.- Proteína eluída y replegamiento de la rHAsa en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivo. La columna de replegamiento fue operada bajo la estrategia estandarizada para el replegamiento de lisozima a diferencia de que se inyectó 1 mL de rHAsa desnaturalizada y la cromatografía se resolvió a 0.25 mL/min. (A) Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de elución de la rHAsa replegada y se determinó por medición a 280 nm y BSA, la concentración de rHAsa eluída de la columna de replegamiento cromatográfico asistido (línea discontinua, ▲) y sin asistencia de los chaperones (línea punteada, ●). La proteína inyectada inicialmente en cada ciclo (2.5 mg/mL) se tomó como el 100%. (B) A las fracciones correspondientes a rHAsa se les determinó actividad específica y se calculó el porcentaje de replegamiento obtenido en cada lote de replegamiento asistido (línea discontinua, ▲) y sin asistencia de los chaperones (línea discontinua, ●). La actividad específica de rHAsa nativa se estableció como el 100% de replegamiento. Las barras representan el error estándar de al menos tres experimentos.

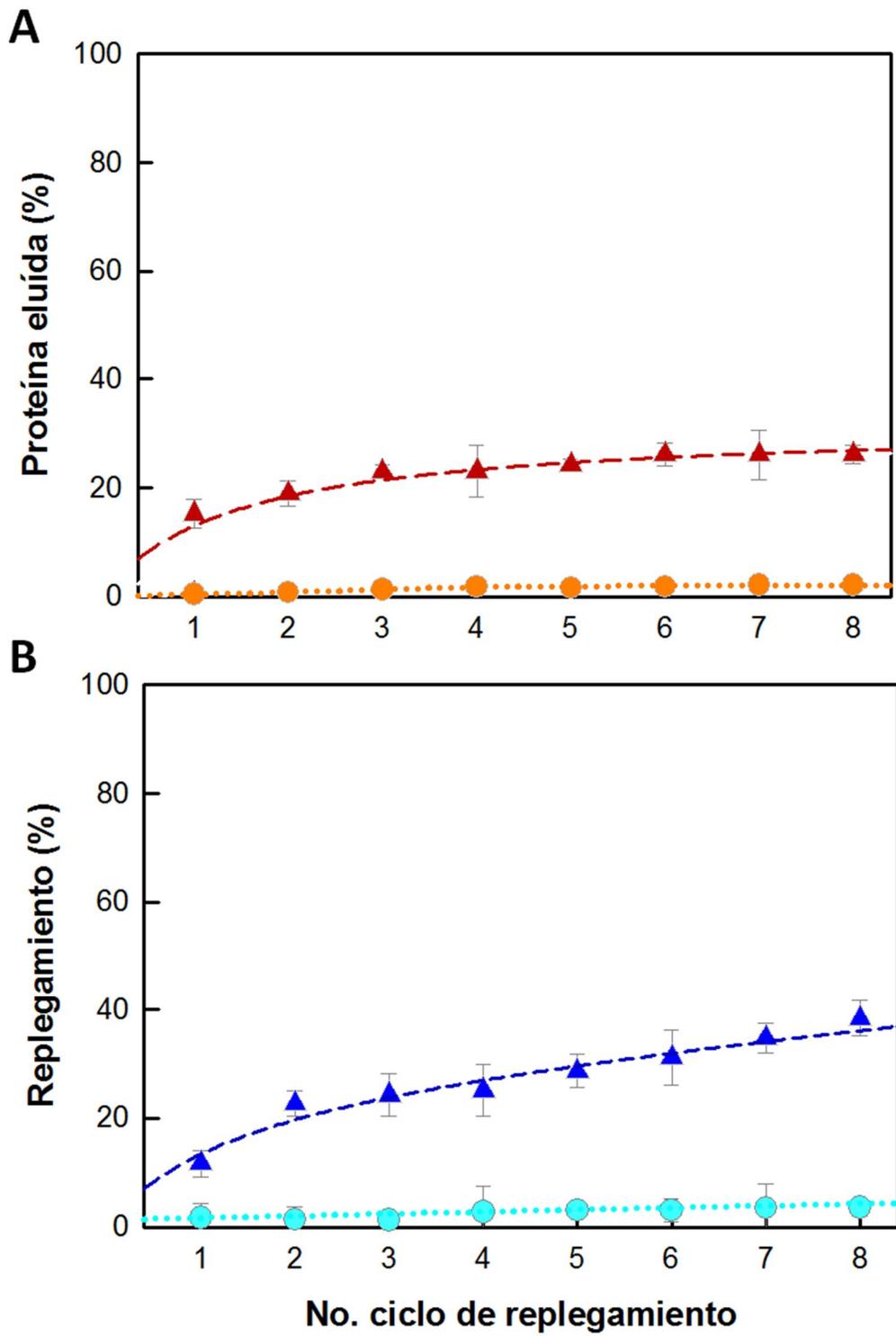


Figura 27.- Análisis SDS-PAGE de la matriz de replegamiento después de 8 lotes consecutivos de replegamiento cromatográfico de rHAsa. Después del replegamiento cromatográfico de rHAsa por 8 lotes consecutivos, se analizó la matriz de replegamiento por SDS-PAGE. (A) Perfil electroforético de la resina a 1.5 cm (1), 3.0 cm (2), 4.5 cm (3), 6.0 cm (4) y 7.5 cm (5) de profundidad de lecho cromatográfico.

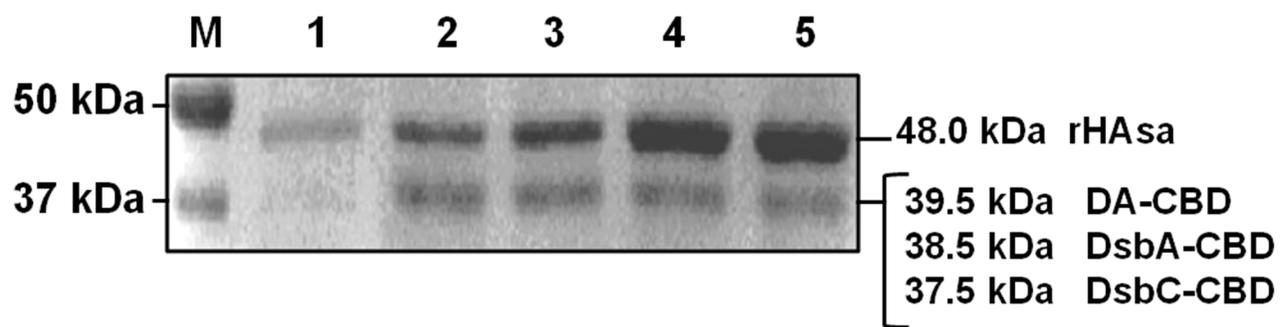
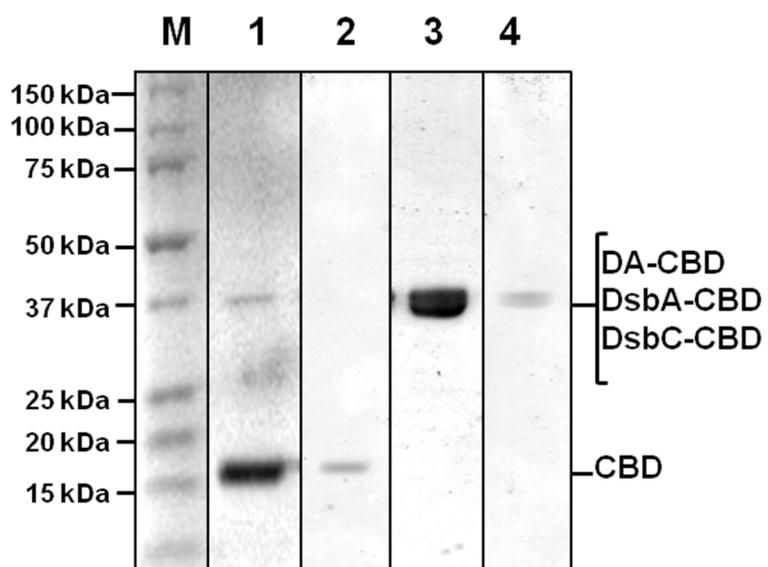


Figura 28.- Saturación de la matriz de replegamiento. Para evitar las interacciones inespecíficas entre rHAsa y la celulosa (Sigmacell Type 50) se saturó la matriz de replegamiento con CDB (Carril 1) o con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD (Carril 3), por medio de la interacción a concentraciones de proteínas mayores a la Q_{max} reportada. Una vez saturadas las columnas, se analizaron los sobrenadantes de las interacciones del CBD (Carril 2) y de los chaperones (Carril 4). El carril (M) corresponde al marcador de peso molecular.



7.4.6.- Replegamiento cromatográfico de rHAsa por lotes consecutivos en “*celulosa saturada*” con CBD

En los ensayos de replegamiento con “*celulosa saturada*” se observó el incremento constante de la proteína replegada en la elución. No obstante, la cantidad de proteína liberada por el sistema se estabiliza y permanece constante alrededor del 70% en los últimos lotes de replegamiento, observándose que el sistema llegó a un estado estacionario en el balance de materia (Figura 29A) . En el caso de la columna de replegamiento saturada con CBD y sin la presencia de chaperones se observó una retención constante de rHAsa de alrededor del 95% de la proteína. De acuerdo a los valores obtenidos por densitometría, se observó que el sistema espontáneo obtuvo un rendimiento del 4% de replegamiento, mientras que la recuperación de actividad en el sistema asistido fue de 5.7% en el primer lote hasta un 46.8% en el octavo lote. Sin embargo, de acuerdo a la actividad recuperada y a la curvatura que se presenta en la evolución del replegamiento, se observa una tendencia creciente de replegamiento (Figura 29B).

7.4.7.- Replegamiento cromatográfico de rHAsa por lotes consecutivos en *celulosa saturada* con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD

En el sistema saturado con chaperones, en el cuarto lote de replegamiento la cantidad de rHAsa liberada igual a la cantidad inyectada al principio del lote y del quinto al octavo lote, esta cantidad de proteína aumenta hasta un 120% (Figura 30A). El porcentaje de actividad recuperada en función del número de lotes de replegamiento se presenta en la Figura 30B. En el tercer lote de replegamiento iguala al máximo obtenido en el sistema saturado con el CBD y aumenta hasta llegar al 100% de actividad en el séptimo lote de replegamiento.

En la Figura 31 se presenta la tendencia de la eficiencia de replegamiento en función del número de lotes para el sistema de replegamiento cromatográfico asistido por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD

en el soporte saturado con CBD y en el saturado con chaperones. Observándose que la estrategia con los mejores resultados en la de la saturación total con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD. En la Tabla XI se presenta un resumen comparativo de los resultados globales obtenidos en el replegamiento de rHAsa bajo las diversas estrategias de replegamiento aplicadas.

7.4.8.- Curva de desnaturalización de rHAsa por adición de GdnHCl

En la Figura 32 se muestra la comparación de los zimogramas obtenidos por las diferentes estrategias de saturación probadas, dónde también se observa el incremento de la actividad en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico. En los zimogramas, se empleó el veneno de tarántula como control de actividad. Sin embargo, era necesario obtener un control de actividad de la proteína de origen recombinante, puesto que las glicosilaciones pueden o no potencializar la actividad rHAsa. Por tal razón, una muestra de rHAsa replegada por dilución se desplegó por la adición de GdnHCl, para dar una concentración final de 0.25 hasta 6 M y se analizó su desplegamiento por fluorescencia. Conforme se adquirieron los espectros de emisión, se observó un desplazamiento de la máxima longitud de onda de 344 nm a bajas concentraciones de GdnHCl hasta llegar a 358 nm con GdnHCl 6 M. En la Figura 33 se presenta la curva de desnaturalización química por exposición a GdnHCl. En la Tabla suplementaria III (Apéndice III) se muestran los valores de la longitud de onda máxima para cada punto analizado (λ_{max}) y los valores de Y_U (componente de proteína desplegada) y Y_F (componente de proteína plegada) para la obtención de la fracción desplegada (F_U). Con esta curva se equiparó la fluorescencia emitida por las muestras de replegamiento cromatográfico y en función de ésta se proporcionó un valor de porcentaje de desplegamiento obtenido para validar el porcentaje de replegamiento determinado por zimogramas. En función de los porcentajes de replegamiento estimados por fluorescencia, para cada lote de replegamiento desarrollado en la columna saturada con chaperones, se puede aseverar que la rHAsa eluída recuperó su estructura nativa (Tabla X). Para validar este análisis, se realizó el análisis de esta rHAsa por DC.

7.4.9.-Análisis de rHAsa replegada por Dicroísmo circular

Se tomó una muestra de rHAsa replegada al 100%, rendimiento obtenido por lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos desarrollados en celulosa saturada con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD y se analizó por DC para validar los porcentajes de replegamiento y determinados por zimogramas, así como también, nos proporcionó información estructural de la rHAsa. El espectro de DC obtenido para la rHAsa activa se presenta en la Figura 23. Los datos obtenidos se trataron para el análisis del espectro por DICROWEB a través del programa K2D, en donde se obtuvo la proporcionalidad de estructura secundaria (Figura 34). De acuerdo con el espectro de DC, la rHAsa está constituida en un 30% de α -hélice, 16% de β -plegada y 54% de *random coil*. Resultados que coinciden con las características estructurales secundarias estimadas por el análisis de la secuencia de rHAsa (Figura 20).

Figura 29.- Proteína eluída y replegamiento en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos usando celulosa saturada con CBD.

La columna de replegamiento se saturó con CBD y se operó bajo la estrategia estandarizada para el replegamiento de lisozima a diferencia de que se inyectó 1 mL de rHAsa desnaturalizada y la cromatografía se resolvió a 0.25 mL/min. (A) Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de elución de la rHAsa replegada y se determinó por medición a 280 nm y BSA la concentración de rHAsa eluída de la columna de replegamiento cromatográfico asistido (línea discontinua, ▲) y sin asistencia de los chaperones (línea punteada, ●). La proteína inyectada inicialmente en cada ciclo (2.5 mg/mL) se tomó como el 100%. (B) A las fracciones correspondientes a rHAsa se les determinó actividad específica y se calculó el porcentaje de replegamiento obtenido en cada lote de replegamiento asistido (línea discontinua, ▲) y sin asistencia de los chaperones (línea punteada, ●). La actividad específica de rHAsa nativa se estableció como el 100% de replegamiento. Las barras representan el error estándar de al menos tres experimentos.

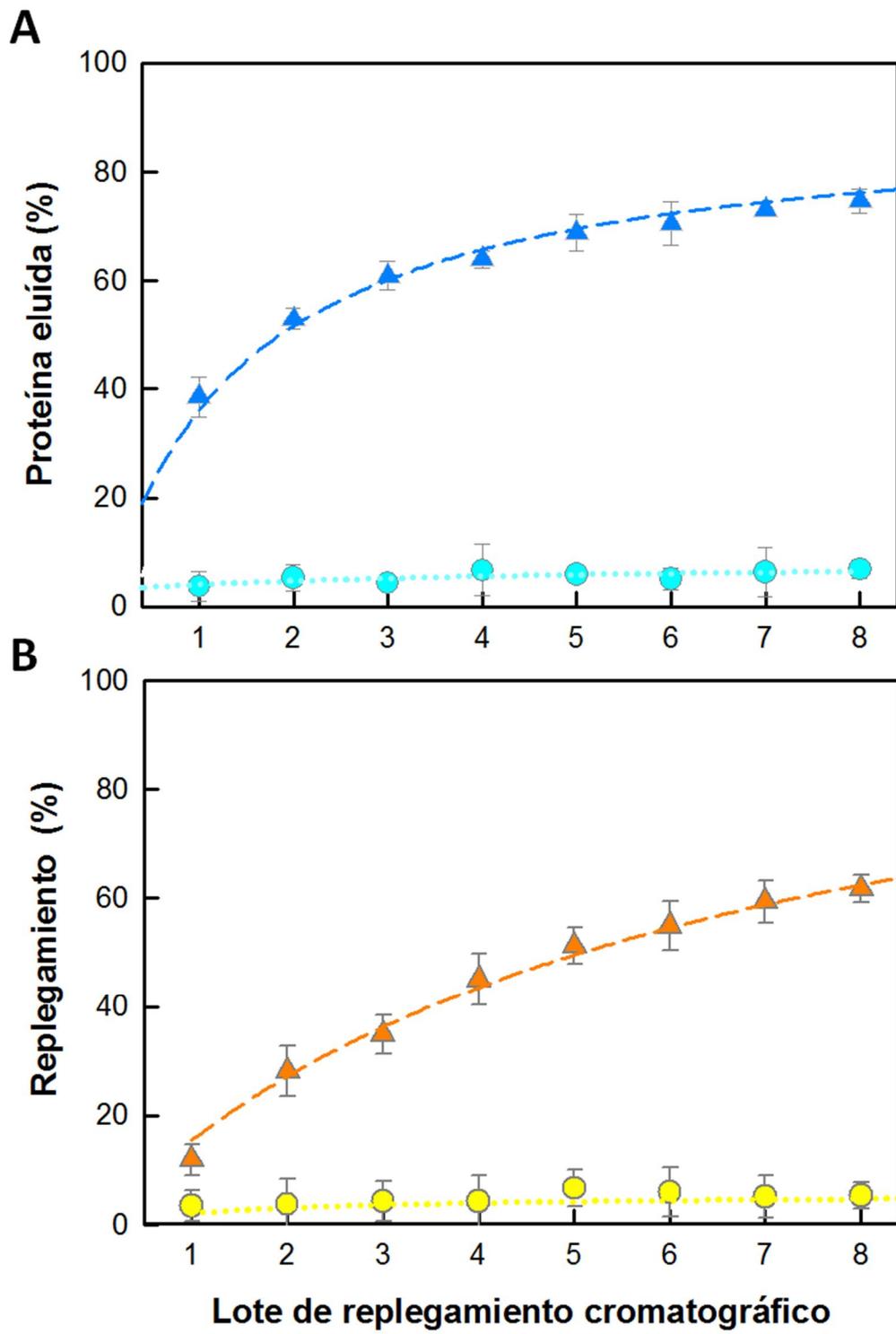


Figura 30.- Proteína eluída y replegamiento en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico desarrollados en celulosa saturada con chaperones. La columna empacada con celulosa saturada con chaperones fue operada bajo la estrategia estandarizada para el replegamiento de lisozima a diferencia de que se inyectó 1 mL de rHAsa desnaturalizada y la cromatografía se resolvió a 0.25 mL/min. Se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de elución de la rHAsa replegada y se determinó la concentración por medición a 280 nm y BSA. (A) rHAsa eluída del sistema de replegamiento empleando celulosa saturada con chaperones (línea continua, ◆). Como control se presenta el rendimiento obtenido por la matriz de replegamiento saturada únicamente con CBD sin presencia de chaperones (línea punteada, ●). La proteína inyectada inicialmente en cada ciclo (2.5 mg/mL) se tomó como el 100%. (B) Porcentaje de replegamiento obtenido en cada lote de replegamiento empleando celulosa saturada con chaperones (línea continua, ◆), de igual forma se compara contra el porcentaje de replegamiento obtenido por la matriz de replegamiento saturada únicamente con CBD sin presencia de chaperones (línea punteada, ●). La actividad específica de rHAsa nativa se estableció como el 100% de replegamiento. Las barras representan el error estándar de al menos tres experimentos.

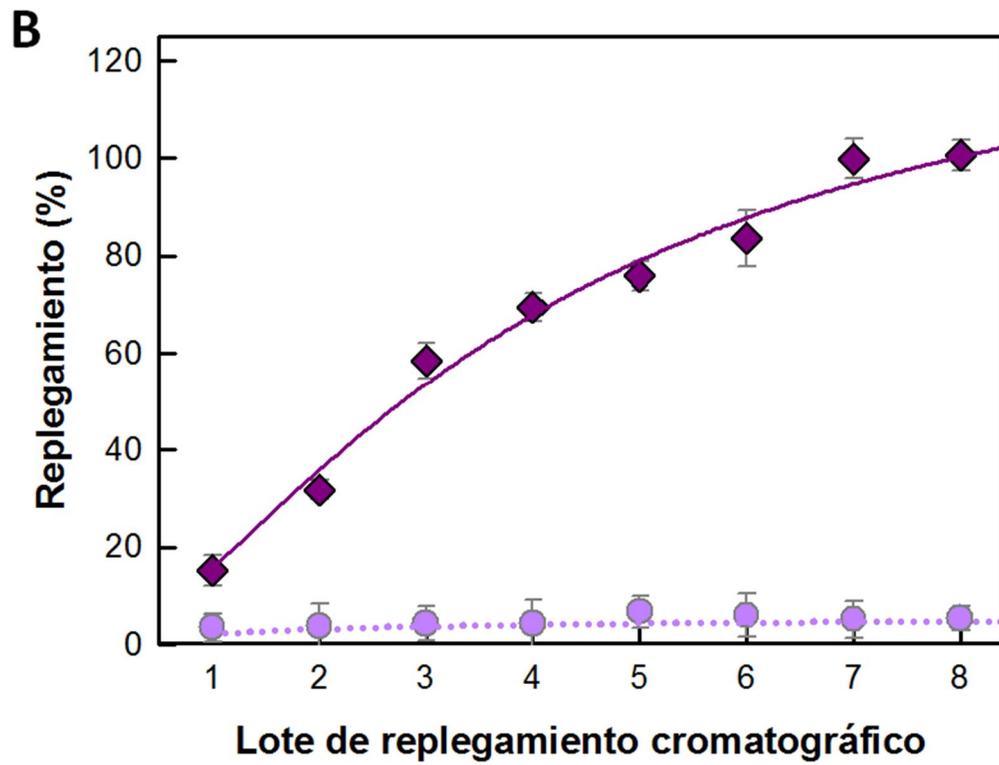
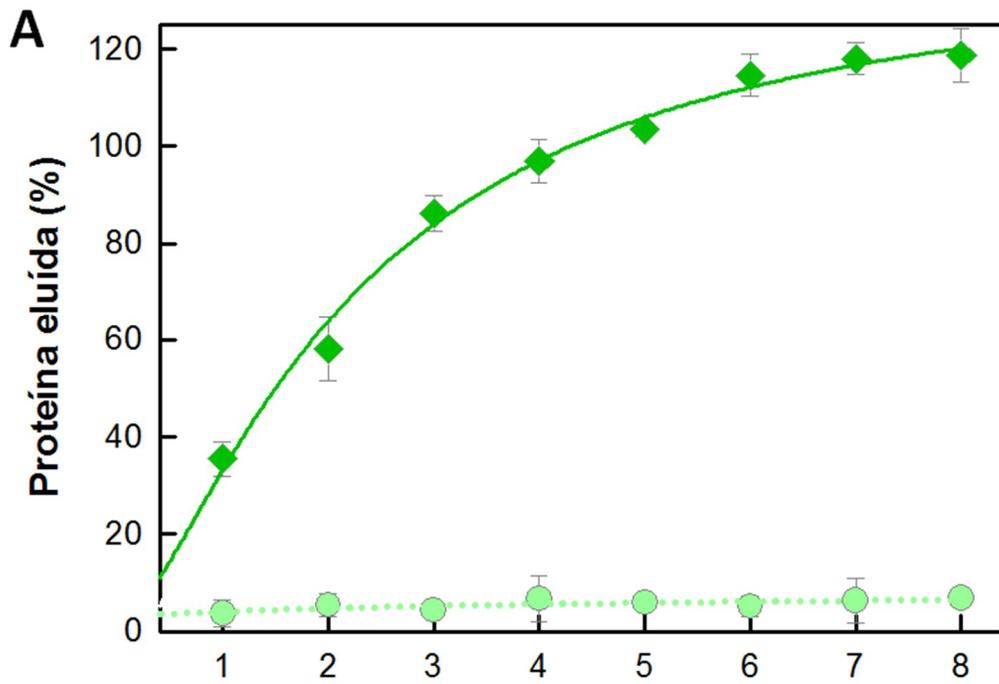


Figura 31.- Eficiencia de replegamiento en función del número de lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos. La rHAsa se replegó bajo la estrategia estandarizada para el replegamiento de lisozima a diferencia de que se inyectó 1 mL de rHAsa desnaturalizada y la cromatografía se resolvió a 0.25 mL/min. La eficiencia de cada lote de replegamiento cromatográfico asistido desarrollado en celulosa saturada con CDB (línea discontinua, ▲), en celulosa saturada con chaperones (línea continua, ◆) y sin asistencia de los chaperones en celulosa saturada con CBD (línea punteada, ●), se estimó por medio de los valores de la proteína eluída y el replegamiento de cada lote (Figura 29 y 30) aplicados a la ecuación (Ec. 1.0), donde, $E_R = 1.0$, corresponde a la elución de la misma cantidad de proteína inyectada (2.5 mg) a la columna y la actividad correspondiente a la proteína nativa.

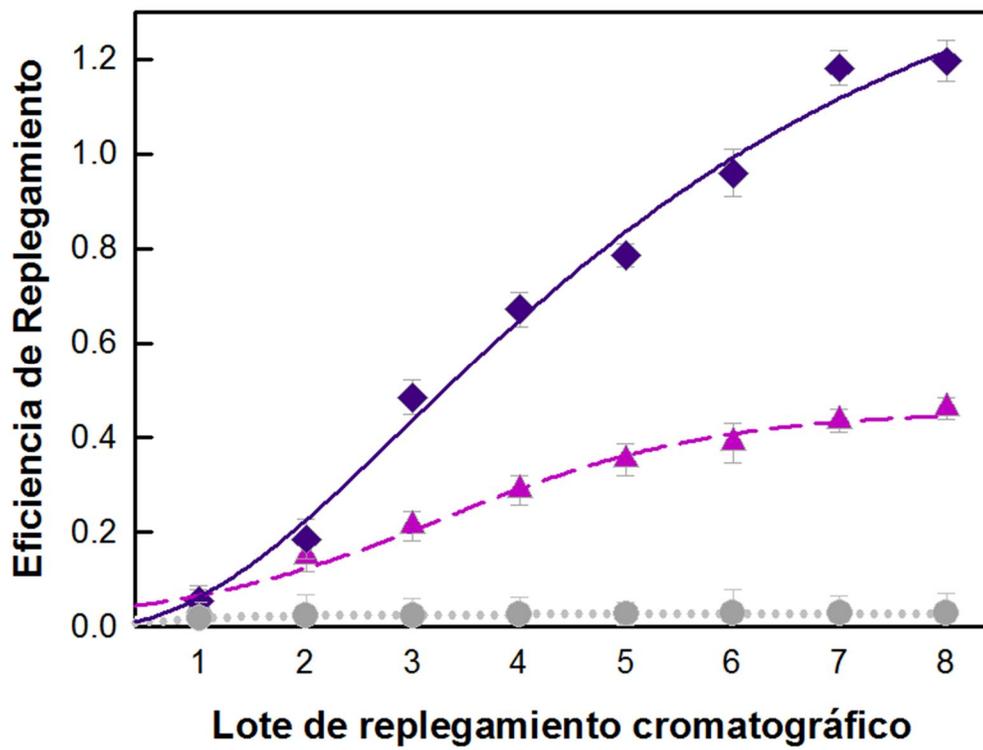


Figura 32.- Actividad de rHAsa en función del número de lotes. Zimogramas correspondientes a la actividad de rHAsa recuperada en cada lote de replegamiento cromatográfico. Los ensayos de replegamiento se desarrollaron en matrices de replegamiento sin saturar: (A) sin chaperones y (B) con chaperones; saturadas con CBD: (C) sin chaperones y (D) con chaperones; saturadas con chaperones (E). En el carril control, se muestra la actividad correspondiente al veneno de tarántula, en los carriles 1-8 la actividad correspondiente a los picos de elución de la proteína rHAsa en el lote 1 al lote 8, respectivamente.

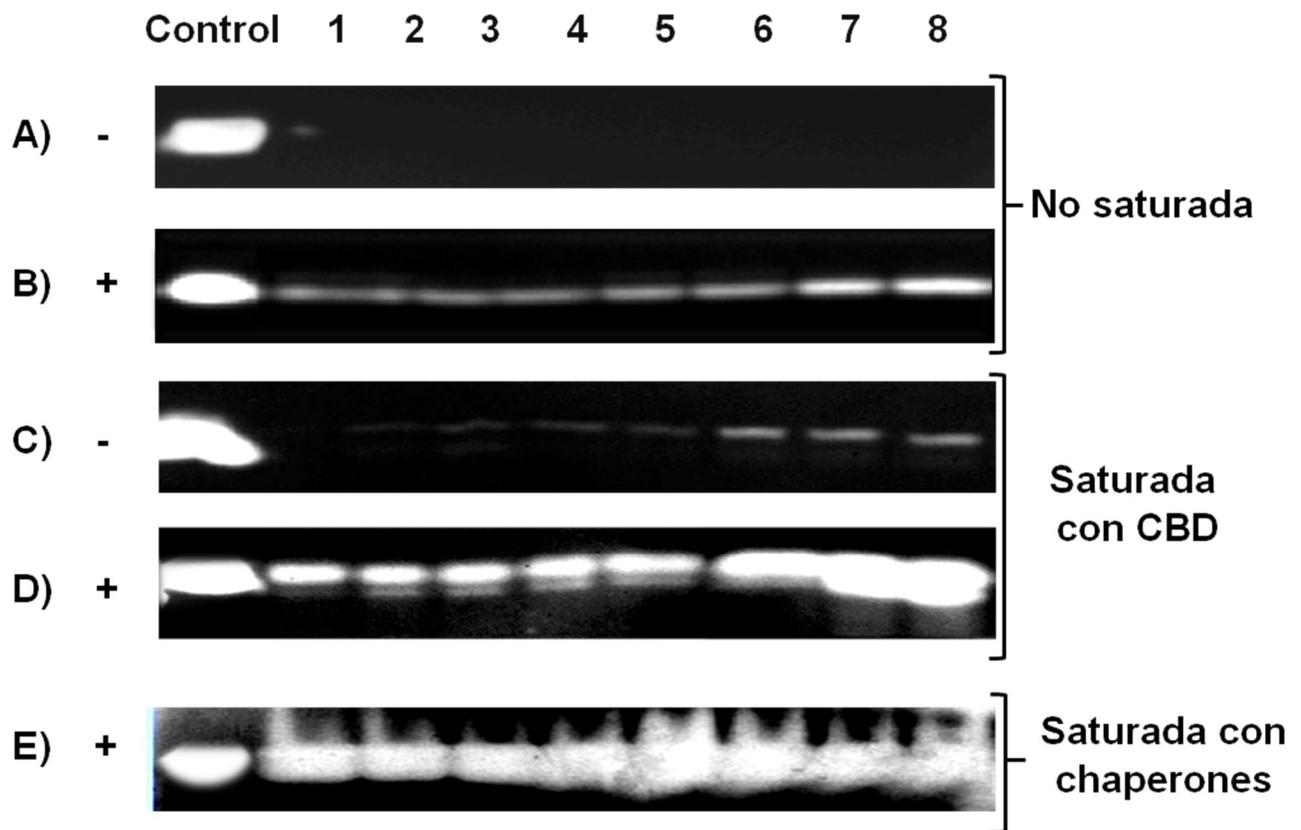


Figura 33.- Replegamiento de rHAsa estimado por fluorescencia. De la columna empacada con celulosa saturada con chaperones se recolectaron las fracciones correspondientes al pico de elución de la rHAsa replegada y se les determinó su porcentaje de replegamiento (Tabla X) por medio de la interpolación de la $\lambda_{\text{máx}}$ de sus espectros de fluorescencia, en la curva de desplegamiento de rHAsa por adición de GdnHCl. Se llevó a cabo el monitoreo del desplegamiento de rHAsa (0.0435 mg/mL) por la adición de GdnHCl de 0 M a 6 M. Los espectros de emisión de fluorescencia (300 - 400 nm) se obtuvieron en el fluorómetro FluoroMax-3 (Jobyn Ibone, Horiba) a una excitación de 280 nm. Posteriormente se llevo a cabo el cálculo de las fracciones de proteína plegada (Y_U) y desplegada (Y_F) para la estimación del % de desplegamiento y replegamiento.

Tabla X.- Rendimientos de replegamiento de rHAsa determinados por fluorescencia

No. ciclo	λ_{\max} (Y)	%D	%R
1	345.2	9.1	90.9
2	345.0	7.4	92.6
3	344.8	5.5	94.5
4	344.8	5.5	94.5
5	344.4	1.8	98.2
6	344.2	0	100
7	344.2	0	100
8	344.2	0	100

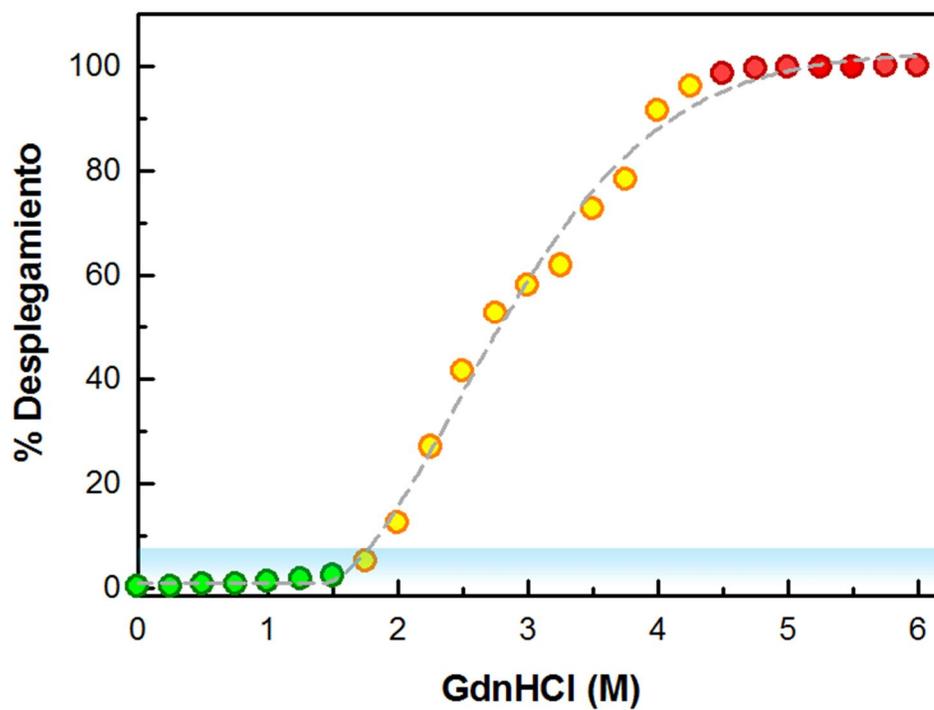
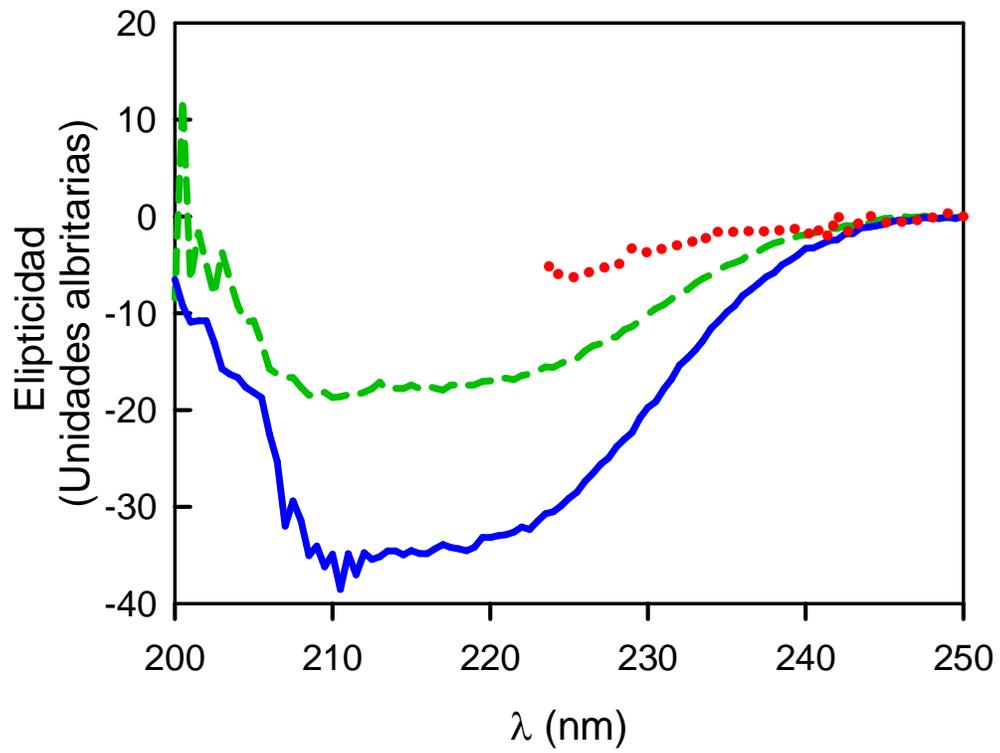


Figura 34.- Espectro de dicroísmo circular de rHAsa. Espectro de dicroísmo circular de rHAsa replegada (100 % de actividad en zimogramas) mediante el replegamiento cromatográfico asistido con chaperones. Para la obtención del espectro de dicroísmo circular se usó un espectropolarímetro JASCO J815 con celdas de 0.1 cm de grosor de paso óptico y 0.087 mg/mL de proteína. Los datos fueron analizados por el portal de DICROWEB disponible en <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>.



α -hélice	β -plegada	<i>random coil</i>
30 %	16 %	54 %

Tabla XI.- Rendimientos de replegamiento de rHAsa en cada alternativa evaluada

Estrategia de Replegamiento	Proteína total tratada (mg)	% R Espontáneo	% R Asistido	Observaciones
Diálisis	0.006	36.9	---	Duración de 38 h. Con triple cambio de amortiguador.
Dilución	0.002	6.75	24.75	Duración de 1h. Remoción de los chaperones en membranas de celulosa por centrifugación
Cromatográfico	2.8	0	4.75	Duración de 1h. Retención del sustrato en la matriz de replegamiento por interacción con superficie libre de celulosa
Cromatográfico por lotes consecutivos	16	0	31	Duración de 8 h Retención del sustrato en la matriz de replegamiento por interacción con superficie libre de celulosa, no abatible por efectos de competencia.
Cromatográfico por lotes consecutivos en columnas saturadas con CBD	20	4	12 - 46.8*	Duración de 8 h. Se abatió la retención del sustrato por saturación con CBD. *Actividad determinada por zimogramas.
Cromatográfico por lotes consecutivos en columnas saturadas con chaperones	20	3	13.4-100*	Duración de 9 h. Se abatió la retención del sustrato por saturación con chaperones. *Actividad determinada por zimogramas

8.0.-DISCUSIÓN

El replegamiento es una operación unitaria de gran importancia en la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, los rendimientos de replegamiento son del 1 al 8%. Explorando alternativas que incrementen dichos rendimientos, se ha demostrado que el empleo de chaperones acoplados a sistemas cromatográficos son eficientes, reusables y potencialmente aplicables a escala de producción. No obstante, la limitante de este método, es el costo extra que involucra la preparación de la columna de replegamiento y su estabilidad operacional. El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicabilidad de las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizadas a celulosa en un sistema de replegamiento cromatográfico. Se usó lisozima para la estandarización operativa del sistema y rHAsa acumulada en CI para validar su funcionalidad en el replegamiento de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* como CI.

Una de las características deseables en un sistema de replegamiento asistido, es la simplicidad de la preparación del soporte a emplear. En nuestro caso, una de las principales ventajas de la fusión de los chaperones al CBD es la purificación e inmovilización en un solo paso, que de llevarse a escala industrial, permitiría la integración de procesos. Por otra parte, de acuerdo a la isoterma de absorción en Sigmacell Cellulose Type 50, la capacidad de unión máxima (Q_{max}) es mayor a la reportada para inmovilización en níquel o por interacciones covalentes en Sepharosa (Tabla VII). Considerando lo anterior, la preparación de la matriz de replegamiento, por medio de la inmovilización en celulosa a través del CBD es económica, rápida y sencilla en comparación a otras estrategias de inmovilización empleadas para el replegamiento cromatográfico de proteínas recombinantes (Altamirano y col., 1997; Altamirano y col., 1999; Dong y col., 2000; Gao y col., 2003; Guan y col., 2006).

Otra característica necesaria de los sistemas de replegamiento asistido es una alta estabilidad de inmovilización, que conlleve a la reutilización o uso continuo del sistema. Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizados y contenidos en las columnas de replegamiento almacenadas

a -20 °C conservaron su actividad hasta por 18 meses. Estos resultados nos indican que las columnas de replegamiento pueden ser preparadas con anterioridad y emplearse hasta un plazo no mayor a dicho periodo. Por medio de estos resultados se ha comprobado la alta estabilidad de la inmovilización de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD en condiciones de almacenamiento. Sin embargo, la estabilidad primordial es la estabilidad operativa, es decir, en contacto con agentes desnaturalizantes. Analizando las curvas de estabilidad de DA-CBD, DsbA-CBD o DsbC-CBD, se observó que la actividad de los chaperones no fue afectada en forma significativa y los perfiles electroforéticos mostraron que DA-CBD, DsbA-CBD o DsbC-CBD no son removidos del sistema cuando son expuestos a GdnHCl 6 M y β -mercaptoetanol 80 mM durante 1 h. No obstante, se analizó la estabilidad de la columna de replegamiento, la cual perdió sólo un 15% de actividad después de ocho reusos, pérdida de actividad proporcional a la remoción del 8% de la proteína inmovilizada (Figura 19). Gao y col., (2003) emplearon en el replegamiento de interferón γ humano recombinante una columna con chaperones inmovilizados a una relación molar de 5:1 chaperón:sustrato, la columna fue reusada durante cuatro lotes de replegamiento. Guan en el 2006, recuperó el 74% de actividad de lisozima empleando una columna de replegamiento reusable en 10 ocasiones con pérdida del 25% de actividad renaturalizante. Además, es importante mencionar que la unión a celulosa por medio del CBD no es afectada por altas concentraciones de DTT o β -mercaptoetanol empleados en la solubilización de los CI a diferencia de la inmovilización por afinidad a Ni (Altamirano y col., 1997; Gao y col., 2003). Con estos resultados se demostró que la columna de replegamiento es estable, eficiente y funcional a pesar de ser directamente expuesta a GdnHCl 6 M y β -mercaptoetanol 80 mM. En conjunto su estabilidad operacional y de almacenamiento superan a la estabilidad de otros métodos de inmovilización previamente reportados (Tabla VII).

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue probar la eficiencia de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD en el replegamiento de proteínas de CI tanto en ensayos de replegamiento por dilución como en el sistema cromatográfico. Los ensayos de replegamiento por dilución de lisozima asistidos

por DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD fueron previamente estudiados (Antonio y col., 2012). Los resultados obtenidos en este estudio dieron pie a la estandarización de diversas variables de replegamiento empleadas en el presente trabajo, tales como: composición del amortiguador de replegamiento, relación molar óptima entre péptido:chaperones, estrategia de inmovilización; además de esclarecer conceptos teóricos del replegamiento asistido. Cabe señalar que uno de los principales retos de este trabajo era demostrar la aplicación de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD en el replegamiento de una proteína expresada en CI. Nuestro caso de estudio fue el replegamiento de rHAsa. Del análisis bioinformático se obtuvo que a nivel estructural rHAsa cuenta con 15 prolinas, residuo cuya α -amina es una amina secundaria, que perturba la organización estructural secundaria por impedimentos estéricos, aumentando el número de parches hidrofóbicos expuestos, lo cual conduce a una cinética de replegamiento compleja (Hartl y col., 2009) adicional a la complejidad otorgada por el patrón de enlaces disulfuro previsto. A pesar de las complejidades estructurales, DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD auxiliaron eficientemente el replegamiento de rHAsa y después de 2 h recuperaron un 36% de su actividad, mientras que no se recuperó actividad sin asistencia de los chaperones. Es importante resaltar que la rHAsa presentó actividad a pesar de la ausencia de glicosilaciones que muy probablemente están presentes en su forma nativa. Con estos resultados se demostró que DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD son capaces de asistir eficientemente el replegamiento de proteínas de CI.

La forma más eficiente para potencializar las ventajas del empleo de chaperones es inmovilizándolos y acoplándolos a sistemas cromatográficos (Jungbauer y col., 2007). De acuerdo a los rendimientos obtenidos, el replegamiento de lisozima desarrollado en un solo lote cromatográfico es 25 e inclusive 75 veces más eficiente que el replegamiento por dilución con y sin asistencia de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD, respectivamente. No obstante, a medida que se incrementó la concentración de proteína inyectada en el sistema disminuyó el porcentaje de replegamiento, con y sin asistencia de los chaperones (Figura 12). También se observó que en todos los casos sólo una fracción de la proteína a replegar era eluída de la columna de replegamiento, sugiriendo la retención de polipéptidos

desplegados o parcialmente plegados. Buscando una estrategia para evitar la retención de las especies parcialmente plegadas o desplegadas en el interior de la columna, se planteó operar el sistema de replegamiento por lotes consecutivos. Este modo de operación tuvo doble propósito: (1) propiciar la competencia por los chaperones entre las especies desplegadas y las parcialmente plegadas, para favorecer la elución de las proteínas correctamente plegadas y (2) evaluar la reutilización de la columna de replegamiento y su efecto en los porcentajes de replegamiento.

En el replegamiento por lote cromatográficos consecutivos de lisozima y de rHAsa se observó un aumento de la proteína eluída en función del número de lotes. Sin embargo, la proteína liberada en los primeros ciclos no superaba a la proteína inyectada al inicio de cada lote de replegamiento. Estos resultados sugieren que los intermediarios parcialmente plegados permanecieron interaccionando específicamente con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD o inespecíficamente con la celulosa y que sólo se eluyó la proteína correctamente plegada. Al inyectar más lisozima o rHAsa desnaturalizada, éstas compiten con la proteína que se encuentra parcialmente plegada en el interior de la columna y la desplazó favoreciendo su replegamiento y liberación del sistema. En cada lote aumenta la población de intermediarios parcialmente plegados hasta alcanzar un estado estacionario en el quinto lote para ambos casos, posteriormente el porcentaje de replegamiento se mantuvo constante, tanto para lisozima, como para rHAsa. Esta hipótesis se ve reflejada en el aumento progresivo de la proteína y por consecuencia en el aumento del porcentaje de replegamiento en función del número de lotes. La aplicación de este modo de operación nos permite refutar acerca del empleo excesivo de los auxiliares del replegamiento, como una desventaja de los sistemas de replegamiento asistido (Jhamb 2008). En otras palabras, es posible replegar una mayor cantidad de sustrato sin necesidad de inmovilizar la misma cantidad de auxiliares del replegamiento en el sistema, más aún, cuando se trata de una inmovilización estable permitiendo la reutilización prolongada aún en condiciones extremas.

Por otra parte, en el replegamiento de rHAsa en lotes cromatográficos consecutivos, la retención de rHAsa en la columna sin chaperones fue del 95% y con chaperones fue del 23%. Al analizar la matriz

de replegamiento asistido, se observó la retención de la proteína rHAsa aún sin la presencia de DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD a 1.5 cm de profundidad del lecho cromatográfico, es decir la rHAsa interactuó inespecíficamente con la celulosa (Figura 27). En función de estos resultados, se planteó desarrollar el replegamiento en una columna previamente saturada con CBD para bloquear las interacciones inespecíficas entre la rHAsa con la superficie libre y expuesta de la celulosa (Antonio y col., 2012). La saturación con CBD aumentó tres veces la liberación de proteína respecto a la liberada de la columna sin saturar. El aumento del porcentaje de replegamiento fue proporcional al aumento de proteína eluída (Figura 30). Los resultados anteriores demostraron que la estrategia de saturación con CBD evita la retención de sustrato por la superficie libre del soporte cromatográfico, pero no se desarrolla un ambiente que promueva la renaturalización de proteínas, por tal motivo, se desarrolló una saturación con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD.

En los ensayos de replegamiento con *celulosa saturada* con chaperones se observó que en el quinto lote se liberó el 100% de la proteína inyectada en el sistema y se incrementó hasta el 120% en el octavo lote (Figura 31). El excedente del 20% se debe a la acumulación de rHAsa en la columna cromatográfica, fenómeno observado en los ensayos de replegamiento de lisozima. El porcentaje de replegamiento en los lotes iniciales del sistema saturado con CBD y con chaperones, fueron similares. Aunque en la columna saturada con chaperones el porcentaje de replegamiento adquirido en el tercer lote igualó al máximo obtenido en el sistema saturado con el CBD y aumentó hasta llegar al 100% de actividad en el séptimo lote de replegamiento. Al analizar la matriz de replegamiento usada en este ensayo, se observó que la rHAsa retenida por el soporte cromatográfico presentó actividad. En este caso, se demostró que la retención por interacción con los chaperones es selectiva, ya que sólo permite la liberación de proteína totalmente replegada. Esta hipótesis fue apoyada por el análisis de los espectros de fluorescencia de la rHAsa eluída de la columna saturada con chaperones. La rHAsa tiene 15 triptófanos en su secuencia de aminoácidos, los cuales mostraron espectros de absorción hacia λ menores cuanto la estructura no presentaba un desplegamiento mayor al 10%. A medida que la rHAsa se fue desplegando, los triptófanos fueron expuestos a un ambiente polar,

desplazando el espectro de emisión a λ mayores (Figura 33). De acuerdo a éste análisis las muestras tuvieron un de un 6 a un 0% de desplegamiento, es decir, la rHAsa eluída por la columna recuperó su estructura nativa. Cabe resaltar que en la curva de desplegamiento se observa más de un estado de transición y se requerirán más estudios a nivel fisicoquímico-estructural para conocer el mecanismo de plegamiento-desplegamiento de rHAsa. No obstante, esta curva facilitó la evaluación de los porcentajes de replegamiento y validó los resultados de actividad analizados por zimogramas. Además, el análisis del espectro de DC de la proteína replegada en este sistema mostró una proporcionalidad de su estructura secundaria casi igual a la predicha por análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa.

Diversos autores han probado el empleo de sistemas asistidos en el replegamiento de proteínas de origen recombinante expresadas como CI, trabajos que proyectan más allá del replegamiento de una proteína modelo, la resolución de un problema real con resultados admirables (Karadimitris, 2000; Chen 2005, Guan 2006, Chen 2010). No obstante, nuestro trabajo se encuentra a la altura de éstos precedentes. Además de presentar ventajas como emplear un soporte cromatográfico económico, purificación e inmovilización simultáneas que conducen a una sencilla y rápida preparación de las columnas de replegamiento, así como, manifestar una estabilidad en condiciones desnaturalizantes y reductoras extremas durante su reutilización (ocho veces) y el manejo de una mayor cantidad de sustrato (2.5 – 3.0 mg/mL) con rendimientos de replegamiento mayores al 90%.

9.0.- CONCLUSIONES

- ✓ Se implementó un sistema de replegamiento cromatográfico oxidativo, empleando a las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizadas en celulosa. Así como se evaluaron sus condiciones de operación, comprobándose la practicidad, eficiencia, reutilización y estabilidad del sistema, empleando lisozima como proteína modelo.
- ✓ Las proteínas DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD inmovilizadas en celulosa y acopladas al sistema cromatográfico operado en lotes de replegamiento cromatográfico consecutivos, asistieron eficientemente el replegamiento rHAsa proveniente de CI. Empleando la matriz de replegamiento saturada con DA-CBD, DsbA-CBD y DsbC-CBD después de ocho lotes de replegamiento consecutivos se recuperó el 100% de la actividad enzimática total de rHAsa recombinante.

9.0.-Bibliografía:

Anfinsen C.B., (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 181:223–230

Ahmed A.K., Schaffer S.W., and Wetlaufer D.B., (1975). Nonenzymatic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J. Biol. Chem.*, 250:8477-82.

Altamirano M.M., Buckle A.M., Fersht A.R., (1997). Refolding chromatography with immobilized minichaperons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3576-78.

Altamirano M., Possani L.D., y Fersht A.R., (1999). Oxidative refolding chromatography: folding of the scorpion toxin Cn5. *Nat. Biotechnol.* 17: 187-191.

Antonio-Pérez. (2007). Replegamiento oxidativo de proteínas modelo asistido por chaperones moleculares. Tesis de Maestría. Depto. De Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN, México.

Batas B., Chaudhuri J.B., (1999). Considerations of sample application and elution during size-exclusion chromatography-based protein refolding. *J. Chromatogr. A*, 864: 229–236

Baneyx F, Mujacic M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*, 22: 1399 – 1408.

Brockwell D.J., Radford S.E., (2007). Intermediates: ubiquitous species on folding energy landscapes? *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17: 30–37.

Botzki, A.; Rigden, D.J.; Braun, S.; Nukui, M.; Salmen, S.; Hoehstetter, J.; Bernhardt, G.; Dove, S.; Jedrzejewski, M.J.; Buschauer, A., (2004). Ascorbic acid. 6-hexadecanoate, a potent hyaluronidase inhibitor. X-ray structure and molecular modeling of enzyme-inhibitor complexes. *J. Biol. Chem.*, 279:45990–97.

Buswell A.M., Middelberg A.P., (2002). Critical Analysis of Lysozyme Refolding Kinetics. *Biotechnol. Prog.*, 18(3):470-75.

Creagh A.L., Ong E., Jervis E., Kilburn D.G., Haynes C.A., (1996). Binding of the cellulose-binding domain of exoglucanase Cex from *Cellulomonas fimi* to insoluble microcrystalline cellulose is entropically driven. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93:12229-34.

Chen L. (1999). The crystal structure of a GroEL/peptide complex: Plasticity as a basis for substrate diversity. *Cell*, 99:757–768.

Chen J. (1999) Chaperone Activity of DsbC. *Biol. Chem.*, 274 (28):19601-05.

Chen, H.M., (2005). Refolding and activation of recombinant N-carbamoyl-D-aminocid amidohydrolase from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Proc. Biochem.*, 40:2135–2141.

- Chen, Y., (2010). High productivity refolding of an inclusion body protein using pulsed-fed size exclusion chromatography. *Proc. Biochem.*, 45: 1570-1576.
- Chow, M.K., (2006). The REFOLD database: a tool for the optimization of protein expression and refolding. *Nucleic Acids Res.*, 34: D207–D212.
- Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W., Wingfield, P. T. (Eds.), *Curr. Protocols Prot. Sci.*, John Wiley & Sons, New York 1995, 1, 10.5.11.
- Darby, N.J., (1998). Contributions of substrate binding to the catalytic activity of DsbC. *Biochem.*, 37:783–791.
- Debarbieux L. and Beckwith J., (2000). On the Functional Interchangeability, Oxidant versus Reductant, of Members of the Thioredoxin Superfamily. *J. Bacteriol.*, 182(3):723–727.
- De Bernardez C., (1998). Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 9: 157-163.
- De Bernardez, C., Hevehan, D., Szela, S., Maachupalli-Reddy, J., (1998). Oxidative renaturation of hen egg white lysozyme. Folding vs. Aggregation. *Biotechnol. Prog.*, 14:47–54.
- De Bernardez C., (2001). Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 12:202–207.
- Dong X.Y., Yang H., Sun Y., (2000). Lysozyme refolding with immobilized GroEL column chromatography. *J. Chromatogr. A*, 878:197–204.
- Dong X.Y., Yang H., Sun Y. (2002). Cooperative effect of artificial chaperones and guanidinium chloride on lysozyme renaturation at high concentrations. *Biotechnol. Prog.*, 18(3)663–65.
- Dorfman A., Ott M. I., (1948). Turbidimetric method for the assay of hyaluronidase. *J. Biol. Chem.* 172, 367–375.
- Dunn, A.L., Heavner, J.E., Racz, G., Day, M., (2010). Hyaluronidase: A review of approved formulations, indications and off-label use in chronic pain management. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 10: 127–131.
- Eiberle, M. K., (2010). Technical refolding of proteins: Do we have freedom to operate? *Biotechnol. J.* 5(6):547–59.
- Englander, S.W., Mayne, L. & Krishna, M.M., (2007). Protein folding and misfolding: mechanism and principles. *Quem. Rev. Biophys.*, 40:287–326.
- Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A. (1997). *In vivo* observation of polypeptide flux through the bacteria chaperonin system. *Cell*, 90:491–500.

Frand A.R., Cuozzo J.W., (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol.*, 10: 203–210.

Gao Y-G, Guan Y-X, Yao S-J, Cho M-G., (2003). On-column refolding of recombinant human interferon-g with an immobilized chaperone fragment. *Biotechnol. Prog.*, 19:915–20.

Girish, K.S., Kemparaju, K., (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sci.*, 80:1921–43.

Goolsby, T.V., Lombardo, F.A., (2006). Extravasation of Chemotherapeutic Agents: Prevention and Treatment. *Semin. Oncol.*, 33:139–143.

Gorin G., Wang S.F., Pavlou L., (1971). Assay of lysozyme by its lytic action on *Micrococcus lysodeikticus* cells. *Anal. Biochem.*, 39: 113–127.

Guan Y.X., Fei Z.Z., Luo M., Jin T., Yao S.J. (2006). Chromatographic refolding of recombinant human interferon gamma by an immobilized shot GroEL 191- 345 column. *J. Chromatogr. A*, 1107:192–7.

Gupta T. A., Hall C. K. and Voegler A. C., (1998). Effect of denaturant and protein concentrations upon protein refolding and aggregation: A simple lattice model. *Prot. Sci.*, 7: 2642–52.

Hartl, F.U., (1996), Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571–9.

Hartl, F. U., Hayer-Hartl M., (2009). Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Structl. Mol. Biol.*, 16(6): 574–81.

Hiniker A., Bardwell J.C., (2003). Disulfide bond isomerization in Prokaryotes. *Biochem.*, 42(5): 1179–85.

Horwich, A. L., (2009). The GroEL/GroES cis cavity as a passive anti-aggregation device. *FEBS Lett.*, 583: 2654–2662.

Jhamb K., Jawed A., Sahoo D.K., (2008). Immobilized chaperones: A productive alternative to refolding of bacterial inclusion body proteins. *Proc. Biochem.*, 43: 587–97.

Jungbauer A., Kaar W., (2007). Current status of technical protein refolding. *J. Biotechnol.*, 128: 587–96

Jungbauer A., Kaar W, Schelg R., (2004). Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15:487–94.

Kadokura H., Katzen F., Beckwith J., (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annl. Rev. Biochem.*, 72: 111–35.

Karadimitris, A., (2000). "Human CD1d–glycolipid tetramers generated by *in vitro* oxidative refolding chromatography " *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 98(6):3294–98.

- Kerner, M. J., (2005). "Proteome-wide Analysis of Chaperonin-Dependent Protein Folding in Escherichia coli. *Cell*, 122(29):209–220.
- Kiefhaber T., Rudolph R., Kohler H.H., Buchner J., (1991). Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *BioTechnology*, 9:825–829
- Kreil, G., (1995). Hyaluronidases - A group of neglected enzymes. *Prot. Sci.*, 4:1666-69.
- Kobayashi T., (1997). Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA–DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing Escherichia coli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:11857–62.
- Kuppusamy, U. R., Das N. P., (1991). Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*, 47:1196-200.
- Lee G.H., Cooney D., Middelberg A.P.J., (2006). The economics of inclusion bodies processing. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 29:2:73-90.
- Li M., Su Z., Jansonb J.C., (2004). *In vitro* protein refolding by chromatographic procedures. *Prot. Exp. Purif.*, 33: 1–10.
- Lokeshwar, V.B., Selzer, M.G., (2008). Hyaluronidase: Both a tumor promoter and suppressor. *Semin. Cancer Biol.*, 18:281–7.
- Lu, D., (2008). Dynamic redox environment-intensified disulfide bond shuffling for protein refolding *in vitro*: Molecular simulation and experimental validation." *J. Phys. Chem. B*, 112(47): 15127–33.
- Markovic-Housley, Z., (2000). Crystal Structure of Hyaluronidase, a Major Allergen of Bee Venom. *Structure*, 8:1025-35.
- Maskos, K., (2003). DsbA and DsbC-catalyzed oxidative folding of proteins with complex disulfide bridge patterns *in vitro* and *in vivo*. *J. Mol. Biol.*, 325:495-513.
- Mayhew, M., Da Silva, A., Martin, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hartl, U. F., (1996). Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature*, 379: 420-426.
- Maleki, N., Safavi, A., Sedaghati, F. and Tajabadi, F., (2009). Simultaneous electrochemical determination of glutathione and glutathione disulfide at a nanoscale copper hydroxide composite carbon ionic liquid electrode. *Anal. Biochem.*, 369:149– 153
- McCarthy, A. A., (2000). Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from Escherichia coli. *Nat. Struct.Mol.Biol.*, 7(3):196-199.

- Mendoza J. A., Rogers E., Lorimer G. H., Horowitz P. M. (1991)., Chaperonins facilitate the *in vitro* folding of monomeric mitochondrial rhodanese. *J. Biol. Chem.*, 266: 13044-49.
- Menzel, E.J.; Farr, C., (1998). Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: Biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett.*, 131: 3–11.
- Middelberg APJ., (2002). Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.*, 20(10): 437-43.
- Misawal S, Kumagai I. (1999). Refolding of therapeutic proteins produced in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Peptide Sci.*, 51(4): 297-307.
- Morjana NA, Gilbert HF. (1994) Catalysis of protein folding by agarose-immobilized protein disulfide isomerase. *Prot. Expr. Purif.*, 5:144–8.
- Muronetz VI, Zhang NX, Bulatnikov IG, Wang CC., (1998). Study on the interactions between protein disulfide isomerase and target proteins, using immobilization on solid support. *FEBS Lett.*, 426(1):107–10.
- Nakamoto, H., (2004). Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochem. Biophys. Acta* 1694: 111–119.
- Nelson J.W., Creighton T. E., (1994). Reactivity and Ionization of the Active Site Cysteine Residues of DsbA, a Protein Required for Disulfide Bond Formation *in vivo*. *Biochem.*, 33 (19): 5974–5983.
- Oyeniya Y.J., Itiola O.A., Int. J., (2012). The physicochemical characteristic of microcrystalline cellulose, derived from sawdust, agricultural waste products. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 4:197–200.
- Pace N., Scholtz M., (1997). Measuring the conformational stability of a protein. *Protein Structure, A Practical Approach*, T.E. Creighton (Ed.). Oxford University Press, New York : 299–321
- Panda AK., (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 85:43–93.
- Pavlou A.K., Reichert J.M., (2004). Recombinant proteins therapeutics succes rate, market trends and values to 2010. *Nat. Biotechnol.* 22:1513–19.
- Phadtare S, Fisher MT, Yarbrough LR., (1994). Refolding and release of tubulins by a functional immobilized groEL column. *Biochem. Biophys. Acta*, 1208:189–92.
- Preston N.S., Baker D.J., Bottomley S.P., Gore M. G., (1999). The production and characterization of an immobilized chaperonin system. *Biochem. Biophys. Acta*, 1426(1):99–109.
- Ramón-Luing L.A., Cruz-Migoni A., Ruiz-Medrano R., Xoconostle-Cázares B., Ortega-López J., (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. *Biotechnol. Lett.*, 28: 301–7.

Ramón-Luing L.A. 2006. Implementación de un sistema de replegamiento cromatográfico. Tesis de Doctorado. Depto. de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN, México.

Rietsch, A., Belin, D., Martin, N., and Beckwith, J., (1996). An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 13048–53.

Rinas U., Hoffmann F., Betiku E., Estape D., Marten S. (2007). Inclusion body anatomy and functioning of chaperone mediated *in vivo* inclusion body disassembly during high-level recombinant protein production in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 127(2): 244–57.

Ruoppolo, M., (1995). Refolding by Disulfide Isomerization: The Mixed Disulfide between Ribonuclease T1 and Glutathione as a Model Refolding Substrate. *Biochem.*, 34: 9380–9388.

Rudolph, R., Fisher, S. Process for obtain renatured proteins. U.S. Patent 4, 933,494.1997

Royer, C.A., (2006). Probing Protein Folding and Conformational Transitions with Fluorescence *Chem. Rev.* 106(5): 1769–1784.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ed. 2, 1989).

Schein, C.H., (1989). "Production of soluble recombinant proteins in bacteria." *Nat. Biotechnol.* 7:234–238.

Schlegl, R. Tscheliessning, A., Necina, R., Wandl, R., Jungbauer, A., (2005). Refolding of proteins in a CSTR. *Chem. Eng. Sci.*, 60: 5770-5780.

Schmidt B., Hogg P.J., (2007). Search for allosteric disulfide bonds in NMR structures. *BMC Struct. Biol.*, 7:49.

Senff-Ribeiro, A.; Henrique da Silva, P.; Chaim, O.M.; Gremski, L.H.; Paludo, K.S.; Bertoni da Silveira, R.; Gremski, W.; Mangili, O.C.; Veiga, S.S. (2008). Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles* genus) venom toxins. *Biotechnol. Adv.*, 26:210–218.

Sigler, P. B., (1998). Structure and function in GroEL-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biochem.*, 67:581–608.

Sörensen H. P., (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.*, 115:113–128.

Shugar D., (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochem. Biophys. Acta*, 8:302–9.

Terpe K., (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72:211–222.

- Thirumalai, D., (2010). Theoretical Perspectives on Protein Folding. *Ann. Rev. Biophys.*, 39:159–183.
- Tomme, P., (1995). Comparison of a Fungal (Family I) and Bacterial (Family II) Cellulose-Binding Domain. *J. Bacteriol.*, 177(15): 4356–4363.
- Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., Tsumoto A., (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Prot. Exp. Purif.*, 28:1–8
- Tufts CSDD Impact Report. Cost to develop new biotech products is estimated to average \$1.2 billion. 2006 Vol.8 No.6.
- Vallejo, L. F., (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb. Cell Fact.*, 3:11–22).
- Vabulas R.M. & Hartl F.U., (2005). Protein synthesis upon acute nutrient restriction relies on proteasome function. *Science*, 310:1960–1963
- Ventura S., (2005). Sequence determinants of protein aggregation: tools to increase protein solubility. *Microb Cell. Fact.*, 4:11.
- Vera A, González-Montalbán N., Arís A., Villaverde A., (2007). The conformational quality of insoluble recombinant proteins is enhanced at low growth temperatures. *Biotechnol. Bioeng.*, 96:1101–06.
- Villaverde A., (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.*, 25:1385–95.
- Vinci F., Couprie J., Pucci P., Quéméneur E., Moutiez M., (2002). Description of the topographical changes associated to the different stages of the DsbA catalytic cycle. *Prot. Sci.*, 11(7):1600–12.
- Wang S.S.S., Chang C.K., Peng M.J., (2006). Effect of glutathione redox system on lysozyme refolding in size exclusion chromatography. *Food Bioprod. Proc.*, 84:18–27.
- West S.M., Chaudhuri J.B., Howell J.A., (1998). Improved Protein Refolding Using Hollow-Fibre Membrane Dialysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 57(5): 590–599.
- Zahn R., Buckle A.M., Perrett S., Johnson C.M., Corrales F.J., Golbik H.,(1996). Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93(26):15024–9.
- Zapun A., Missiakas D., Raina S., Creighton T.E., (1995). Structural and Functional Characterization of DsbC, a Protein Involved in Disulfide Bond Formation in *Escherichia coli*. *Biochem.*, 34(15):5075–89

METODOLOGÍAS GENERALES

Extracción de ADN plasmídico

Amortiguador de resuspensión

Tris- HCl pH8.0 50 mM

EDTA 10 mM

Amortiguador de lisis

NaOH 200 mM

SDS 1 %

Amortiguador de neutralización

KCH₂COOH pH 5.5 3.0 M

Preparación de células competentes

Amortiguador TFB1

RbCl 100 mM

MnCl₂ 50 mM

KC₂H₃O₂ 30 mM

CaCl 10 mM

Amortiguador TFB2

MOPS 10 mM

RbCl 10 mM

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Afinidad a celulosa

Amortiguador de interacción

TrisHCl 20 mM

NaCl 20 mM

pH 7.5

Amortiguador de lavado

TrisHCl 20 mM

NaCl 0.8 M

pH 7.5

Amortiguador de elución

PEG 100%

Cromatografía de interacción hidrofóbica**Amortiguador de interacción HIC**

(NH₄)₂SO₄ 1M
Tris HCl 20 mM
PMSF 0.1 mM
pH 8.0

Amortiguador de lavado HIC

NaCl 1 M
Tris HCl 20 mM
PMSF 0.1 mM
pH 8.0

Amortiguador de elución HIC

NaCl 200 mM
Tris HCl 20 mM
PMSF 0.1 mM
pH 8.0

Cromatografía de afinidad a níquel**Amortiguador A (Amortiguador de unión)**

NaH₂PO₄ 20 mM
Imidazol 10 mM
NaCl 200 mM
PMSF 0.01 mM
pH 7.5

Amortiguador B (Amortiguador de elución)

NaH₂PO₄ 20 mM
Imidazol 500 mM
NaCl 200 mM
PMSF 0.01 mM
pH 7.5

Amortiguador de almacenamiento (-20°C)

PBS pH 7.5, con glicerol al 50% v/v

REPLEGAMIENTO

Amortiguador de desnaturalización (lisozima)

TrisHCl	50 mM
DTTred	100 mM
Urea	8 M
EDTA	1 mM

Amortiguador de desnaturalización (rHAsa)

TrisHCl	50 mM
β -mercaptoetanol	80 mM
GdnHCl	6 M

Amortiguador de replegamiento

Tris-HCl	0.1 M
EDTA	1 mM
GSSG	0.4 mM
GSH	2 mM
L-Arg	0.4 M
PMSF	0.1 M
pH	8.0

Amortiguador de replegamiento suplementado con urea

Tris-HCl	0.1 M
EDTA	1 mM
GSSG	0.4 mM
GSH	2 mM
L-Arg	0.4 M
PMSF	0.1 M
Urea	2.0 M
pH	8.0

Apéndice II: Figuras Suplementarias

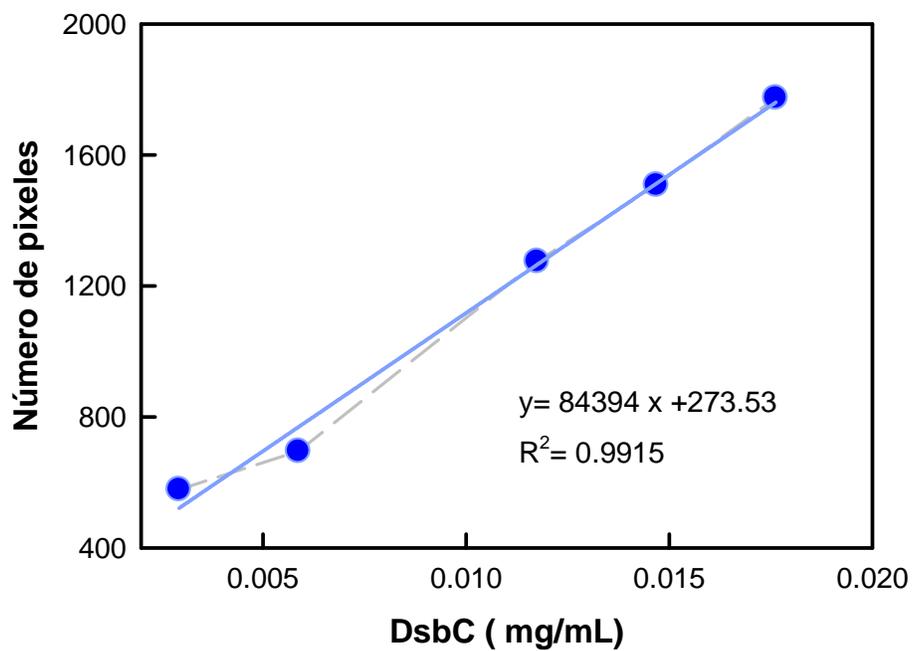


Figura suplementaria 1.- Curva estándar para la cuantificación de DsbC-CBD para la construcción de la isoterma de absorción.

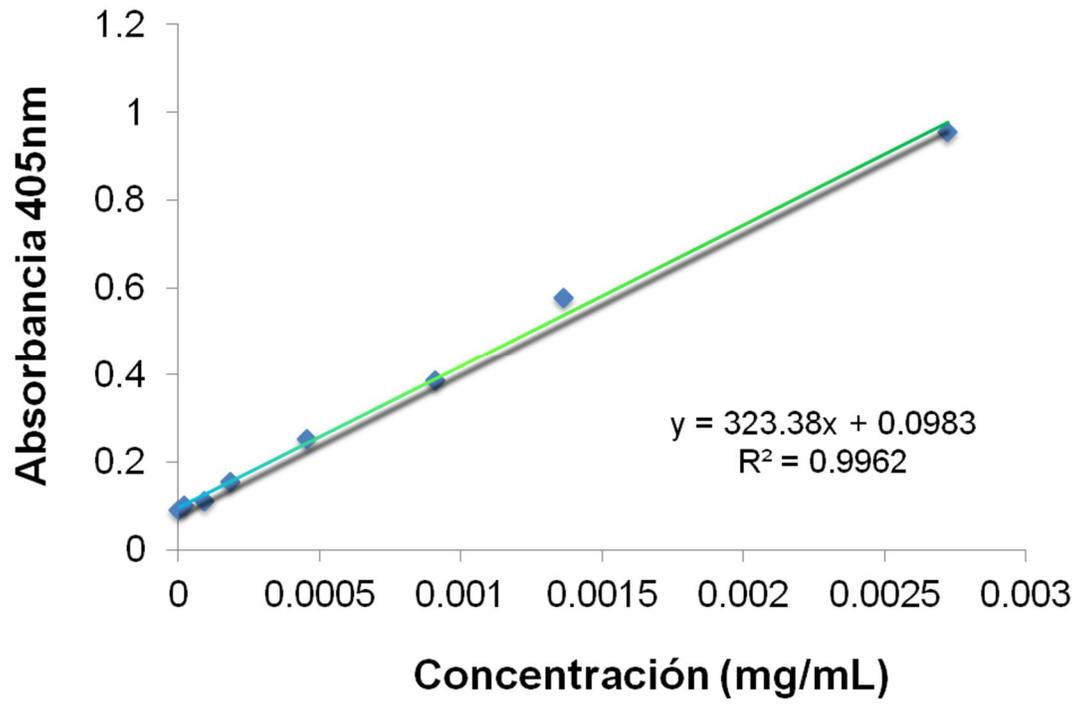


Figura suplementaria 2.- Curva estándar para la cuantificación de rHAsa por ELISA.

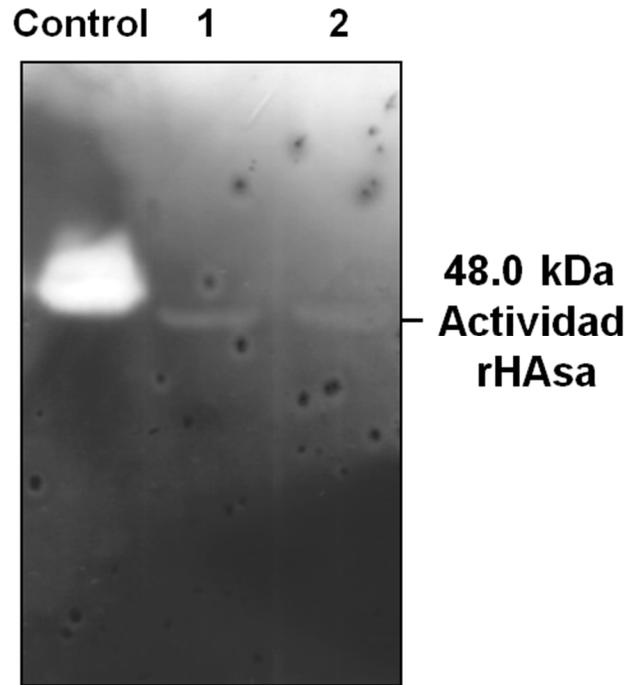


Figura suplementaria 3.-Análisis de actividad de rHAsa. Se analizó la actividad de rHAsa a través de zimogramas en geles de SDS-PAGE copolimerizados con ácido hialurónico, de las fracciones solubles correspondientes a las clonas de células competentes transformadas con el vector pQE 60-HAsa; carril 1) control positivo (veneno de tarántula), 2) fracción soluble de la expresión en BL21(DE3), 3) fracción soluble de la expresión en rosetta 2.

Apéndice III: Tablas suplementarias

Tabla suplementaria I.- Parámetros obtenidos en cada lote del replegamiento oxidativo cromatográfico espontáneo de lisozima.

Lote	Proteína inyectada (mg)	Proteína Eluída (mg)	Proteína en sistema (mg)	Actividad Específica	% R	Eficiencia
1	3	0.46	3.0	2.3	3.9	0.04
2	6	0.78	5.53	8.3	11.3	0.10
3	9	0.82	7.74	10.6	15.3	0.13
4	12	0.86	9.88	11.6	18.7	0.15
5	15	0.88	12.0	12.9	21.1	0.16
6	18	0.90	14.12	14.2	23.6	0.18

Considerando como 100% de replegamiento y eficiencia 1 a la actividad específica obtenida por 1 mL de 3 mg/mL de lisozima nativa inyectada en la columna de replegamiento que corresponde a 58.6 unidades arbitrarias.

Tabla suplementaria II.- Parámetros obtenidos en cada lote del replegamiento oxidativo cromatográfico asistido de lisozima.

Lote	Proteína inyectada (mg)	Proteína Eluída (mg)	Proteína en sistema (mg)	Actividad Específica	% R	Eficiencia
1	3	0.52	3.0	12.82	11.3	0.11
2	6	1.62	5.48	19.66	23.9	0.44
3	9	2.07	7.42	23.50	36.2	0.90
4	12	2.29	8.35	28.01	46.9	1.30
5	15	3.15	9.06	30.89	60.4	1.83
6	18	3.43	8.92	34.65	78.5	2.33

Considerando como 100% de replegamiento y eficiencia 1 a la actividad específica obtenida por 1 mL de 3 mg/mL de lisozima nativa inyectada en la columna de replegamiento que corresponde a 58.6 unidades arbitrarias.

Tabla suplementaria iii.- Rendimiento de replegamiento por dilución de rHAsa recombinante.

<i>Ensayo</i>	<i>Urea</i> <i>1M</i>	<i>HAsa</i> <i>mg/mL</i>	<i>(INT/mm²)</i> <i>#pixeles</i>	<i>Actividad</i> <i>Específica</i>	<i>% Rep</i>
Espontáneo	-	0.006	6245.13	1035.67	5.9
Espontáneo	-	0.003	9463.83	2783.48	15.9
Asistido	-	0.006	10292	1706.8	9.7
Asistido	-	0.003	14761.37	4341.57	24.75
Espontáneo	+	0.006	6188.38	1026.26	5.85
Espontáneo	+	0.003	12549	3690.86	21.0
Asistido	+	0.006	5751	953.73	5.4
Asistido	+	0.003	11315	3327.9	18.9
Veneno	-	0.00075	13154.62	17539	100

Tabla IV.- Tabla compilatoria de los datos para la construcción de la curva de desnaturalización por adición de GdnHCl de rHAsa recombinante.

<i>(GdnHCl)</i>	<i>Lmax (Y)</i>	<i>YF</i>	<i>YU</i>	<i>YF-Y</i>	<i>YF-YU</i>	<i>FU</i>	ΔG <i>(cal/mol)</i>
0	344.2	344.2	354.9	-0.04	-10.7	0.0037	3209.35
0.25	344.5	344.45	355.05	-0.047	-10.59	0.0044	3110.76
0.5	344.7	344.70	355.20	-0.084	-10.49	0.0080	2769.48
0.75	345.0	344.95	355.35	-0.091	-10.39	0.0087	2717.42
1	345.3	345.21	355.50	-0.138	-10.29	0.0134	2469.78
1.25	345.6	345.46	355.65	-0.185	-10.18	0.0181	2292.85
1.5	345.9	345.71	355.80	-0.242	-10.08	0.0239	2129.3
1.75	346.5	345.97	355.95	-0.529	-9.98	0.0529	1656.76
2	347.4	346.22	356.10	-1.239	-9.88	0.1253	1116.12
2.25	349.1	346.47	356.25	-2.643	-9.78	0.2702	570.77
2.5	350.7	346.73	356.40	-4.02	-9.67	0.4153	196.34
2.75	352.0	346.98	356.55	-5.057	-9.57	0.5281	-64.73
3	352.7	347.23	356.70	-5.504	-9.47	0.5810	-187.87
3.25	353.2	347.48	356.85	-5.801	-9.37	0.6190	-278.9
3.5	354.4	347.74	357.01	-6.748	-9.26	0.7280	-565.9
3.75	355.1	347.99	357.16	-7.175	-9.16	0.7827	-736.5
4	356.5	348.24	357.31	-8.302	-9.06	0.9159	-1372.3
4.25	357.2	348.50	357.46	-8.749	-8.96	0.9762	-2135.5
4.5	357.4	348.75	357.61	-8.726	-8.85	0.9849	-2401.8
4.75	357.7	349.00	357.76	-8.723	-8.75	0.9960	-3183.3
5	357.8	349.26	357.91	-8.63	-8.65	0.9971	-3358.0
5.25	358.0	349.51	358.06	-8.537	-8.55	0.9981	-3617.3
5.5	358.20	349.76	358.21	-8.436	-8.45	0.9983	-3690.6
5.75	358.3	350.01	358.36	-8.346	-8.35	0.9997	-4722.4
6	358.5	350.27	358.51	-8.245	-8.24	0.9998	-5181.4

Apéndice IV: Participación en Congresos

- ❖ 16th International Conference on Bopartitioning and Purification (BPP), 2011. Presentación del trabajo: GroEL Apical Domain, DsbA and DsbC immobilized in cellulose assisted the chromatographic oxidative refolding of recombinant hyaluronidase expressed as I.B.
- ❖ XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), 2011. Presentación del trabajo: "Replegamiento cromatográfico de hialuronidasa recombinante monitoreado por fluorescencia".
- ❖ 14th International Biotechnology Symposia and Exhibition. 2010. Presentación del trabajo "GroEL Apical Domain, DsbA and DsbC immobilized in cellulose assisted the chromatographic oxidative refolding of lysozyme".
- ❖ 24th Symposium of The Protein Society, August 1-5, 2010 in San Diego, CA. The meeting theme is "Looking at Proteins: Expanding Perspectives and New Technologies. "Chromatographic refolding of hyaluronidase assisted by the apical domain of GroEL, DsbA and DsbC immobilized in cellulose".
- ❖ American Chemical Society 238th National Meeting, 2009. Presentación del trabajo: Chromatographic refolding of lysozyme assisted by the apical domain of GroEL, DsbA and DsbC immobilized in cellulose.
- ❖ XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería (SMBB), 2009. Presentación del trabajo: Estabilidad de las proteínas DA-CBD, DsbC-CBD y DsbA-CBD en condiciones desnaturalizantes extremas.
- ❖ USA-México Workshop in Biological Chemistry: Multidisciplinary Approaches to Protein Folding. 2009. Presentación del cartel: GroEL apical domain, DsbA and DsbC fused to a carbohydrate-binding module CBD assisted the oxidative refolding of lysozyme without redox system GSSG:2GSH.
- ❖ IV Congreso Regional de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste (SMBB), 2008. Presentación del cartel: El replegamiento oxidativo de lisozima asistido por DsbA-CBD, DsbC-CBD and DA-CBD aún sin el par de oxido-reducción GSSG:2GSH.
- ❖ 1er Foro de Biotecnología de la Sociedad Estudiantil de Ingeniería Biotecnológica de UPIBI-PN. 2008. Presentación del trabajo: "Implementación de un sistema cromatográfico de replegamiento oxidativo de proteínas recombinantes asistido por chaperones moleculares".
- ❖ 2nd Latin American Protein Society Meeting 2007. Presentación del trabajo: DA-CBD, DsbA-CBD and DsbC-CBD assisted the oxidative refolding of hyaluronidase expressed as I.B.

Apéndice V: Productividad

- ❖ Antonio-Pérez, T. Rivera-Hernández, M. L. Aldaz-Martínez, J. Ortega-López. Oxidative refolding of lysozyme assisted by the GroEL Apical Domain, DsbA and DsbC immobilized in cellulose. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (2012). *Paper in Press*.
- ❖ Antonio-Pérez, L. A. Ramón-Luing, J. Ortega-López. Chromatographic refolding of rhodanese and lysozyme assisted by the GroEL apical domain of GroEL, DsbA, and DsbC immobilized in cellulose. *Journal of Chromatography A* 1248 (2012) 122– 129.
- ❖ Antonio-Pérez A, J. Ortega-López. Chromatographic refolding assisted by ADGroEL, DsbA and DsbC immobilized in cellulose. *Journal of Biotechnology* (2010). 150S; S85-S86.
- ❖ PATENTE MX/a/2011/004156. “Método de plegamiento de proteínas”.