

24



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REPLEGAMIENTO DEL COMPLEJO CD1a/ $\beta$ 2m:  
ALCANCES DE LA CROMATOGRAFIA DE  
REPLEGAMIENTO OXIDATIVO

2.48.106

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**L U I S      B R I S E Ñ O      R O A**



COORDINADOR DE TESIS:  
DRA. MYRIAM MARLENNE TAMIRANO BUSTAMANTE

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



MEXICO, D.F.

2001

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA  
ANTIOQUIA

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**Replegamiento del Complejo CD1a/β<sub>2</sub>m: Alcances de la Cromatografía de Replegamiento Oxidativo.**

realizado por **Luis Briseño Roa**  
 con número de cuenta **9450364-7** , pasante de la carrera de **Biología.**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

**Director de Tesis**  
 Propietario **Dra. Myriam Marianne Altamirano Bustamante.**  
 Propietario **Dr. Antonio Eusebio Lazcano-Araujo Reyes.**  
 Propietario **M. en C. Victor Manuel Valdés López.**  
 Suplente **M. en IBB Saul Cano Colín.**  
 Suplente **M. en C. Arturo Carlos II Becerra Bracho.**

*[Handwritten signatures: Myriam Altamirano Bustamante, Antonio Lazcano-Araujo Reyes, Victor Manuel Valdés López, Saul Cano Colín, Arturo Carlos II Becerra Bracho]*

FACULTAD DE CIENCIAS  
 U. N. A. M.

*Edna María Suárez Díaz*  
**Consejo Departamental de Biología.**  
**Dra. Edna María Suárez Díaz,**  
**Coordinadora de Licenciatura.**



**DEPARTAMENTO  
 DE BIOLOGIA**

Replegamiento del Complejo CD1a/ $\beta_2m$ : Alcances de la  
Cromatografía de Replegamiento Oxidativo

## AGRADECIMIENTOS

Es un tesoro tener tanta gente a la cual agradecer por los inolvidables años en la Facultad de Ciencias. A nombre de todos ellos un abrazo a Javier Páez, Rosa Zugazagoitia, Eva Noyola y Liliana Gutiérrez, quienes representan todo lo que un estudiante y amigo sueña con tener.

Este proyecto de investigación, que concluyó como mi tesis de licenciatura, no hubiera podido ser posible sin la ayuda de Fundación UNAM que brindó el apoyo económico para mi manutención fuera del país – la comida mala no fue culpa suya. Gracias también a Luis A. Briseño, Cristina Roa, Julieta Briseño, Bárbara Ayala, Enrico Ramírez, Santiago Moreno, Gilberto Ayala, Rosa Orozco, Lena Ruiz y Mario Calcagno quiénes, entre muchos otros, siempre me apoyaron incondicionalmente.

Por supuesto hay que agradecerle a Toño Lazcano quién comenzó todo esto y quién, sin dudarle, me brindó toda su confianza y amistad. Gracias a la comunidad de Orchard Street por adoptarme como decorado en su sala durante el otoño inglés. Un agradecimiento especial a mi tío Fernando González por la lección de cariño y apoyo como nunca he visto.

Agradezco al profesor Alan Fersht quién me permitió aprender en una institución como el Centre for Protein Engineering, donde se realizó la totalidad de este proyecto. Finalmente, quiero agradecerle a Myriam Altamirano por la oportunidad, los consejos y la paciencia a lo largo de los meses que pasé en Cambridge.

Gracias a ustedes, mencionados aquí o no, este trabajo no es mío sino de todos nosotros.

A Luis, Julieta y Cristina con todo mi amor, respeto,  
admiración y – por supuesto – buen humor.

A Bárbara, por los sueños compartidos.

A Gerardo, que para eso están los amigos.

## ÍNDICE

	Página
Introducción	5
Antecedes	13
Material y Método	16
Resultados	24
Discusión	31
Apéndice	32
Referencias	33

## Introducción

La información de la estructura terciaria de una proteína está contenida en su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, se sabe que algunos factores protéicos participan en el plegamiento de las proteínas. Dichos factores no alteran la información contenida en la secuencia de aminoácidos, sino que asisten en la formación de la estructura correcta, ya sea inhibiendo los plegamientos incorrectos o promoviendo los correctos.

### Asistentes de plegamiento

Existen dos tipos de asistentes del plegamiento: las chaperonas moleculares y las foldasas. Las chaperonas evitan la exposición del centro hidrofóbico de las proteínas y así, su agregación inespecífica. Las foldasas, en cambio, sí poseen una verdadera actividad catalítica, ya que aceleran el plegamiento al incrementar la velocidad en las reacciones limitantes. Las foldasas conocidas actualmente son la peptidilprolil *cis-trans* isomerasa (PPI), que cataliza la isomerización del enlace peptídico que precede a los residuos de prolina (Xaa – Pro), y las proteína-disulfuro isomerasas (PDI), que participan en la formación y rearreglo de los puentes disulfuro (Voet y Voet, 1995).

### De chaperonas a mini-chaperoninas

Las chaperonas son proteínas que se unen a conformeros inestables de otras proteínas, controlando y facilitando, a través de su unión y disociación, que adquieran las características de plegamiento, ensamblaje de oligómeros o localización celular, propias de la proteína nativa (Hartl, 1996).

Entre todas las moléculas que presentan función de chaperonas moleculares, las chaperoninas (cpns) son aquellas que promueven el plegamiento, con hidrólisis de ATP, tanto en condiciones normales de crecimiento como de estrés (a excepción de aquellas encontradas en cloroplasto). Existen dos subgrupos de chaperoninas: los miembros de la familia GroEL (o Hsp60) y las chaperoninas de la familia TRiC (Ellis, 1996).

Las chaperoninas TRiC, presentes en arqueas y en el citosol eucarionte, poseen siete o nueve anillos dobles apilados de aprox. 55 kDa

por subunidad. Solamente en arqueas son inducibles en condiciones de estrés térmico.

Las chaperoninas tipo GroEL, presentes en eubacterias, mitocondrias y cloroplastos, están constituidas por dos anillos formados por 7 subunidades de 60 kDa cada una. En *Escherichia coli* estos anillos cooperan con un cofactor protéico, GroES, formado por un anillo heptamérico de aprox. 10 kDa por subunidad (Hartl, 1996).

En la ausencia de GroES, GroEL puede unir hasta dos moléculas de polipéptido, una en cada centro de los dos anillos al nivel de los dominios apicales. La formación de complejos estables probablemente requiere que el polipéptido, en conformación de 'glóbulo fundido' (*molten globen*), haga contacto con varias subunidades de GroEL. Las chaperoninas como GroEL muestran baja especificidad en la unión de sustratos proteicos, ya que reconocen regiones hidrofóbicas que normalmente están ocultas en el estado nativo (Clarke y Lund, 1996). De hecho, en la estructura cristalina, los dominios apicales de GroEL exponen varios aminoácidos hidrofóbicos hacia la cavidad (cuya mutación destruye la unión al polipéptido).

La gran eficiencia del plegamiento asistido por chaperoninas se debe a que éstas (1) evitan la agregación entre polipéptidos parcialmente plegados; (2) aíslan al polipéptido desplegado, colocándolo en un compartimento cerrado; y (3) rearreglan estructuralmente a los polipéptidos que fallan en plegarse (Hartl, 1996)

Los sitios de reconocimiento de péptidos en GroEL se encuentran en el dominio apical de las subunidades (Buckle *et al*, 1997); las minichaperoninas son los fragmentos 191-345, 191-376 (Zahn *et al*, 1996; Buckle *et al*, 1997) y 193-335 (Chatellier *et al*, 1998) que incluyen dichos sitios de reconocimiento y que muestran una actividad eficiente de chaperonina *in vitro* para algunas proteínas, en solución (Zahn *et al*, 1996) o inmovilizadas (Altamirano *et al*, 1997; Altamirano *et al*, 1999).

### Isomerización del enlace peptídico de la prolina

Los enlaces peptídicos son planos y pueden encontrarse en la conformación *cis* o *trans*, con respecto a la posición de dos C $\alpha$  sucesivos.

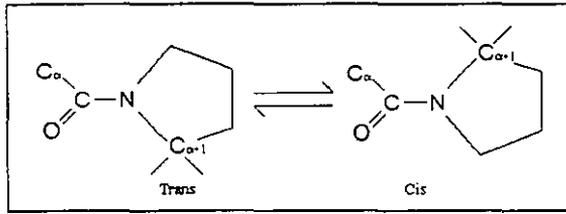
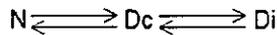


Figura 1. Isomerización *cis-trans* del enlace peptídico Xaa-Pro

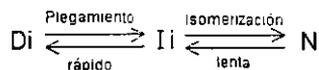
A menos que exista una restricción estructural, la isoforma *trans* es la favorecida en los enlaces peptídicos (menos del 0.1% se encuentran en forma *cis*, Shind *et al*, 1993), exceptuando aquellos en los que participan residuos prolina. La isomerización *cis-trans* es una reacción relativamente lenta ( $k = 10$  a  $100 \text{ s}^{-1}$  a  $25^\circ \text{C}$ ) y con una elevada energía de activación ( $85 \text{ kJ/mol}$ ), ya que implica la rotación de un doble enlace parcial.

En las proteínas cuya estructura tridimensional se conoce, cerca del 7% de los enlaces peptídicos en los que participan prolina, se encuentran en la conformación *cis*. La isoforma presente en cada enlace depende del marco estructural de la proteína, sin embargo,



al despegarse la proteína ( $N \rightarrow Dc$ ) las restricciones estructurales desaparecen y los enlaces están libres para isomerizarse ( $Di$ ). Es importante hacer notar que los isómeros no nativos no impiden el plegamiento, y que la reisomerización no es necesaria para el inicio del proceso de plegamiento. Sin embargo, en aquellas moléculas con el isómero correcto el plegamiento tiende a llevarse a cabo con mayor rapidez.

Bajo condiciones en las que el solvente permite la existencia de estructuras semi-plegadas ( $Ii$ ),



son éstas las que presentan una reacción limitante en cuanto a la isomerización lenta de sus residuos prolina. La rapidez en la formación de estos intermediarios depende de la posición de los isómeros no nativos de prolina en la estructura y de las condiciones del solvente. Si los isómeros se

encuentran en la superficie o en resto permite la formación de dichos intermediarios.

En general la causa de un plegamiento lento de las proteínas involucradas es la relación entre la formación de la estructura protéica y la isomerización del enlace peptídico de la prolina.

### Prolil-isomerasas

Se han reportado tres familias de proteínas que presentan función de prolil-isomerasas: (1) enzimas que se inhiben por ciclosporina A, y que son homólogas a la ciclofilina, (2) aquellas inhibidas por FK 506 (Schmid *et al*, 1993) y (3) las que no son inhibidas por ninguno de estos compuestos, como la parvulina (Sholz *et al*, 1997).

Las peptidilprolil *cis-trans* isomerasas (PPI) homólogas a la ciclofilina, son proteínas monoméricas con masa molecular de 17.7 kDa, que aceleran la isomerización *in vivo* de los enlaces Xaa-Pro. Aparentemente, estas enzimas se encuentran en todos los organismos y en todos los compartimentos celulares (principalmente citoplasma, mitocondrias y retículo endoplásmico de eucariontes, y en el periplasma de *E. coli*).

Las prolil isomerasas no poseen información direccional, ya que el producto final está determinado únicamente por las condiciones del solvente y la estabilidad de la proteína sustrato; sin embargo, su eficiencia está determinada en gran parte por la accesibilidad del enlace Xaa-Pro.

El mecanismo de las prolil isomerasas es comparable con la acción de las proteínas disulfuro isomerasas en el replegamiento oxidativo, ya que éstas reducen puentes disulfuro, los forman o hacen ambas cosas, dependiendo únicamente del potencial redox y de la estabilidad del sustrato (Schmid, *et al* 1993).

### Los puentes disulfuro y la Proteína Disulfuro Isomerasa

Los puentes disulfuro son enlaces covalentes formados entre dos residuos de cisteína al ser sus grupos tiol que contienen oxidados. Estos enlaces estabilizan la estructura terciaria y en algunos casos cuaternaria, especialmente en proteínas que son secretadas como por ejemplo algunas

toxinas, anticuerpos e inhibidores de proteasas, entre otros (Branden y Tooze, 1999).

Christian Anfinsen demostró que era posible replegar *in vitro* la ribonucleasa, reducida y desnaturalizada, formando los puentes disulfuros correctos (Anfinsen *et al*, 1961); sin embargo, el experimento de Anfinsen *et al* requería aproximadamente de 10 horas para recuperar la actividad inicial de la enzima, con una eficiencia que se encontraba muy por debajo de aquella encontrada *in vivo*. Años después, Anfinsen descubrió la proteína disulfuro isomerasa (PDI), como un catalizador oxidativo del plegamiento (Bardwell y Beckwith, 1993).

La PDI es una proteína eucarionte que pertenece a la familia de las tiol/disulfuro oxidorreductasas (TDOR), las cuales comparten un dominio estructural común: el plegamiento tiorredoxina. Esta familia incluye la glutarredoxina, la tiorredoxina y la contra parte de la PDI en procariontes, la DsbA (Guddat *et al*, 1998).

La DsbA es una proteína periplasmática de *Escherichia coli* que se identificó como la primera proteína procarionte requerida para la formación de enlaces disulfuro *in vivo* (Bardwell *et al*, 1991). La DsbA es un monómero de 189 aminoácidos (21 kDa) producto del gen *dsbA*, la cual contiene un único enlace disulfuro (Cys30 – Cys33) en su sitio catalítico. Aun cuando el dominio catalítico de DsbA es semejante a aquel de la tiorredoxina de *E. coli* (prototípico para la familia de las disulfuro) sólo comparte 10% de identidad en secuencia con esta proteína (Martin *et al*, 1993).

El bajo pK<sub>a</sub> de la Cys30 (3.2 - 3.5) permite reacciones rápidas de intercambio tiol-disulfuro en la DsbA. Esta reactividad se debe a que el puente disulfuro Cys30 – Cys33 es mucho menos estable cuando la proteína se encuentra plegada (Zapun *et al*, 1993).

La función de la DsbA depende de su estado de oxidación. Cuando el sitio catalítico se encuentra oxidado puede formar puentes disulfuro al ceder un par de electrones, y cuando se encuentra reducido puede isomerizar puentes disulfuro. La forma oxidada es más estable que la forma reducida (Darby y Creighton, 1995).

## Acción simultánea de la PPI y la DsbA

En plegamientos oxidativos *in vitro* de RNAsa reducida, se observó un aumento en la eficiencia de la DsbA (hasta 6 veces) en presencia de la PPI (Shönbrunner y Shmid, 1992). Probablemente este efecto se deba a que la formación de los puentes disulfuro sea más rápida en las proteínas desnaturalizadas con los enlaces peptídicos Xaa – Pro correctos (Shimid *et al*, 1993).

## El complejo CD1a/ $\beta_2m$

CD1 es una familia no polimórfica de glicoproteínas transmembranales compuestas por una cadena pesada de 43-49 kDa asociada no covalentemente, en la mayoría de los casos, con una  $\beta_2$ -microglobulina ( $\beta_2m$ ) de 12 kDa (proteína no polimórfica en el humano pero dimórfica en el ratón). Existen cinco isotipos de CD1 (CD1a-e), los cuales se agrupan según su relación en secuencias en dos subgrupos: el que contiene a las proteínas CD1a, CD1b y CD1c, y el que contiene a CD1d y CD1e (Porcelli, 1995).

Las cadenas pesadas de CD1 son también homólogas a los complejos de histocompatibilidad (MHC) de clase I y clase II. Sin embargo, y en contraste con ambas clases, las CD1 poseen una región hidrofóbica de reconocimiento y parecen especializarse en la presentación de lípidos y glicolípidos de origen bacteriano a los linfocitos T (Riegert *et al*, 1998).

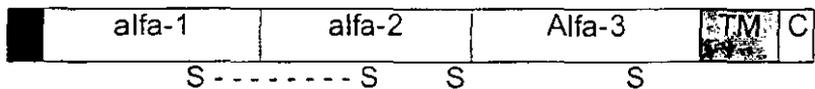


Figura 2. Estructura de la cadena pesada de CD1. Los probables enlaces disulfuro intradominio de  $\alpha_3$  de todas las cadenas pesadas de CD1 se muestran con una línea continua. Los probables enlaces intradominio de  $\alpha_2$  de algunas cadenas pesadas de CD1 se indican con una línea discontinua.

Los precursores de todos los polipéptidos CD1 comienzan con una región hidrofóbica líder de 17 ó 18 aminoácidos (Figura 2), y que se requiere para su translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico

(Porcerlli, 1995). A excepción de CD1e, el dominio transmembranal consiste en un pequeño péptido de conexión (aprox. 4-6 residuos) seguido de una porción hidrofóbica de aproximadamente 20 residuos. La región citoplasmática predicha para las proteínas CD1 es extremadamente corta. En dicha región CD1a posee dos residuos de cisteína, con los que posiblemente forma enlaces disulfuro con otras proteínas (Porcerlli, 1995).



Figura 3. Estructura del complejo CD1a/ $\beta_2m$  de ratón (Zeng *et al.* 1997). Imagen generada por RASMOL.

La región extracelular posee tres dominios ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ), con un número más o menos constante (90-94) de residuos (Figura 3). Estudios cristalográficos realizados con CD1d1 de ratón indican que los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  forman un superdominio de reconocimiento hidrofóbico formando una estructura  $\beta$ -plegada antiparalela de ocho bandas con dos estructuras  $\alpha$ -hélice antiparalelas ubicadas transversalmente por encima de ésta (Figura 4, Zeng *et al.* 1997). Un puente disulfuro intradominio entre la Cys11 y la Cys76 estabiliza el dominio  $\alpha_2$ .

El dominio próximo a la membrana,  $\alpha_3$ , al igual que  $\beta_2m$ , posee un patrón de plegamiento semejante al dominio C de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Roitt *et al.* 1993). Dichos dominios están constituidos por

dos láminas  $\beta$  de tres cadenas la primera y cuatro la segunda. Ambas láminas están unidas entre sí por un puente disulfuro. Los giros en la estructura son cortos, por lo que la mayoría de los residuos del dominio se encuentran en éstas láminas. Los residuos invariantes, incluyendo el puente disulfuro, poseen dos funciones importantes, la primera es formar y estabilizar el armazón, empacando las láminas  $\beta$  con un centro hidrofóbico entre ambas; su segunda función incluye las interacciones entre el dominio C y las diferentes cadenas con las que se asocia (Branden y Tooze, 1999).

Aun cuando la asociación de la cadena pesada de CD1 con la  $\beta_2$ -microglobulina es un carácter estructural distintivo de estas proteínas, no se conoce cuál es la función exacta de dicha asociación. En el caso de la clase I del MHC, la  $\beta_2$ -microglobulina se requiere para un ensamblaje apropiado de la proteína, así como para su eficiente expresión en la superficie de la membrana. Se ha propuesto que la disociación de la  $\beta_2$ -microglobulina de la cadena pesada vacía (sin antígeno) permite que la CD1 asuma una conformación que favorezca la unión de los antígenos (Porcerelli, 1995). En la mayoría de las proteínas CD1 que se conocen (exceptuando CD1d1 de ratón) existe un segundo enlace disulfuro intradominio que estabiliza el dominio  $\alpha_3$  (Cys22-Cys77).



Figura 4. Vista superior de los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , a donde se une el ligando.

Se han cuantificado con gran precisión la expresión de la cadenas pesada y ligera en timocitos humanos y se observó una proporción estequiométrica. Por otro lado, se ha observado que existe una fracción de cadenas CD1a y CD1b en la superficie celular que no se encuentran asociada con  $\beta_2$ -microglobulina (Porcerelli, 1995).

## Antecedentes

La eficiencia en la producción de proteínas con uso biotecnológico depende en gran medida que éstas puedan ser replegadas para alcanzar su forma activa. Un método comúnmente empleado es la clonación en bacterias. Sin embargo, en muchos casos el producto se deposita como agregados inactivos llamados cuerpos de inclusión. Esta agregación se debe a la interacción hidrofóbica de proteínas plegadas parcial o erróneamente. El tener la proteína recombinante en cuerpos de inclusión permite al producto protegerse de la degradación proteolítica, acumularse de grandes cantidades y, en el caso de ser tóxica para el organismo hospedero, mantenerse inactiva. Aunque es posible resuspender con relativa facilidad dichos agregados el factor limitante es la renaturalización del producto (Rudolph e Hillie, 1996). Debido a lo anterior, es evidente la importancia con contar con un método que permita replegar proteínas a partir de condiciones desnaturalizantes.

Dado que los agregados protéicos se forman rápidamente, un método que permita un replegamiento rápido es esencial para evitar la agregación inespecífica (De Bernárdez, 1998). En general, el tiempo de plegamiento de las proteínas con uso biotecnológico (por ejemplo interleucinas, interferones, insulina, toxinas y proteasas) depende principalmente a dos reacciones limitantes: (1) la formación de puentes disulfuro; y (2) la isomerización *cis-trans* de las uniones peptídicas que preceden a residuos prolina.

La Cromatografía de Replegamiento Oxidativo (ORC) consiste en una matriz de agarosa a la cual están inmovilizadas minichaperonas (fragmento 131- 195) y foldasas (DsbA y PPI) en concentraciones de casi 3 órdenes de magnitud mayor que en los protocolos convencionales de replegamiento oxidativo. El efecto de estos factores asistentes del plegamiento, junto con la flexibilidad de la ORC para ser combinada con diferentes amortiguadores , permitió el replegamiento de la toxina Cn5 de *Centruroides noxius* (Altamirano *et al*, 1999).

## Replegamiento de complejo HLA-A2-péptido

Como se mencionó anteriormente, las cadenas pesadas de CD1 son homólogas a los Complejos de Histocompatibilidad (MHC) clase I y II. En los humanos los complejos MHC clase uno son codificados en tres *loci* homólogos: HLA-A, HLA-B y HLA-C (antígeno asociado a leucocitos humanos, ya que fueron observados por primera vez en estas células).

En trabajos previos de replegamiento *in vitro* de HLA-A2 (uno de los 23 alelos del *locus* HLA-A en humanos) y  $\beta_2m$  es sólo ha sido posible obtener complejo replegado conservando los enlaces disulfuro iniciales y en presencia de ligandos específicos.

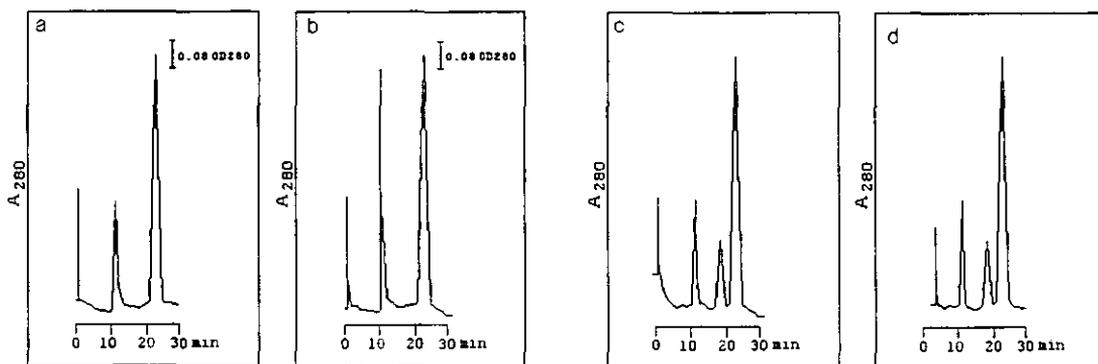


Figura 5. Perfil de filtración en gel en la reconstitución de HLA-A2.  
(a) sin péptido, (b) péptido irrelevante, hemaglutinina 307-319,  
(c) Nucleoproteína Np85-94: KLGEFYNQMM y (d) proteína de matriz  
Mp58-68: GILGFVFTLTV de virus influenza (Garboczi, *et al* 1992).

En la figura 5 se muestra la separación por HPLC filtración en gel de los componentes obtenidos en diferentes condiciones de replegamiento del complejo HLA-A2/ $\beta_2m$ . En las cuatro figuras aparecen dos picos característicos: el volumen de excluido de la columna, pico a 10 minutos, que consiste en la cadena pesada agregada; y el pico de 23 minutos el cual consiste en  $\beta_2m$  monomérica (datos no mostrados). Ningún pico adicional se observó en la ausencia de péptido (Figura 5a) ni en la presencia de un péptido irrelevante: la hemaglutinina 307-319 (Figura 5b). Sin embargo, saturando con péptidos específicos para HLA-A2 (40:2:1, péptido: $\beta_2m$ :cadena pesada), se observa la formación del complejo HLA-A2 – pico a 19 minutos

(Figura 5c-d). Los péptidos Np85-94 y Mp58-68, son de una nucleoproteína y proteína de matriz del virus de influenza respectivamente (Garboczi, *et al* 1992).

Dado que el replegamiento *in vitro* de un complejo semejante a CD1a/ $\beta_2m$  se logró sin la reducción de los enlaces disulfuro y ya que la Cromatografía de Replegamiento Oxidativo (ORC) posee la maquinaria necesaria para la formación y rearreglo de dichas uniones – así como otros asistentes de plegamiento –, será posible replegar el complejo CD1a/ $\beta_2m$  completamente desnaturalizado usando la ORC.

## Material y Método

### Expresión y purificación de DsbA, PPI y 191-345

El gen *dsbA* de *E. coli*, se amplificó mediante PCR empleando los cebadores *dsbA-Fo* y *dsbA-Ba*. El gen amplificado se cortó, incluyendo su péptido señal, con *NcoI* y *BamHI* y se clonó en el plásmido de alta expresión pCE820. El pMA14 (pCE820-*DsbA*) se purificó y su secuencia fue confirmada por el método estándar. Se obtuvo una sobre-expresión del producto del gen *dsbA* en la cepa C41(DE3) de *E. coli*, apareciendo casi exclusivamente en la fracción periplásmica. Las células se crecieron en medio rico 2xTY a 37°C hasta tener  $A_{600nm} = 0.2$ . Se indujo la expresión con isopropil  $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG) 0.7 mM y se dejó crecer a los cultivos durante 12-14 hrs. a 30°C. Posteriormente, las proteínas fueron fraccionadas en esferoplastos y el periplasma soluble resultante fue preparado utilizando el método lisozima/EDTA. La suspensión que contenía a los esferoplastos se centrifugó a 48,000xg durante 30 min. a 4°C. Empleando una cámara de concentración con agitación (Amicon) con una membrana de corte de 10kDa, las proteínas fueron desaladas en MPOS/NaOH 10 mM, pH 7.0. La proteína DsbA se purificó mediante una cromatografía de intercambio iónico, utilizando columna Mono-Q HR 10/10 FPLC (Pharmacia Biotech, Suecia). La elusión se hizo con un gradiente de KCl (0-250mM). La proteína DsbA eluye a KCl 70 mM con un 95% de pureza. La concentración a 280nm se determinó con un coeficiente de absorción  $A_{280,1mg/ml/crr} = 1.10$  y su actividad se determinó mediante métodos espectrométricos

La PPI humana se expresó y purificó como describen Jasanoff *et al*, salvo algunas modificaciones. La cepa C41(DE3) de *E. coli* se transformó con el plásmido que contenía la proteína de fusión GST-PPI. Las células se crecieron en medio 2XTY a 34°C hasta tener  $A_{600nm} = 0.5$ . Se indujo con IPTG 0.7 mM y se dejó crecer a los cultivos por 16 hrs a 25°C. El botón celular se resuspendió en fosfatos 50 mM pH 7.5, KCl 100mM, 1% Triton X100 y floruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.2 mM. Después de sonicar, las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en agarosa-glutatión; la columna fue tratada con trombina para obtener PPI libre – la trombina se quitó empleando una cromatografía de afinidad con agarosa-benzamidina.

Finalmente, la pureza de la PPI obtenida se verificó por SDS-PAGE y FPLC con una columna Superdex 75.

La minichaperona 191-345 fue clonada y expresada en *E. coli* con una construcción en el extremo N-terminal de 17 residuos de histidina. La incubación de las células se hizo a 37°C en medio 2xTY durante 12 hrs. Las células se sonicaron y el extracto crudo se centrifugó a 120,000xg durante 30 minutos. Se tomó el sobrenadante y se repitió la centrifugación. La purificación se realizó empleando una resina Ni-NTA (Qiagen, Chatsworth, CA). La unión a la resina con el sobrenadante final se realizó en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.0, KCl 300 mM e Imidazol 10 mM y se incubó durante 2 horas a 4°C; el lavado (con dos volúmenes) y la elución se hicieron aumentando la concentración de imidazol a 20 mM y 250 mM respectivamente.

### Actividad de la DsbA.

Cuando la DsbA se encuentra correctamente plegada y está activa, existe una diferencia de casi tres veces en su fluorescencia intrínseca (debido al Trp76), cuando la Cys30 y Cys33 se encuentran reducidas (Wunderlich y Glockshuber, 1993). La fluorescencia se midió en un espectrofluorímetro Hitachi 4000, excitando a 280nm y leyendo a 335nm. Se empleó una cubeta estándar de 3 ml, con 580  $\mu$ m de DsbA en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.0, KCl 50 mM. La reducción del sitio catalítico se llevó a cabo incubando durante 1 hora en una concentración final de 5mM de ditioneitol (DTT).

### Bloqueo reversible de Cys30 y Cys33 de DsbA.

La inmovilización a la resina de agarosa activada (N-hidroxisuccinimida [NHS] -activated Sepharose-3 Fast Flow) se debe al grupo  $\epsilon$ -amino de las lisinas, por lo que la reacción debe realizarse en un pH alcalino. Esto representa un problema en la inmovilización de DsbA, ya que a pH alcalino el puente disulfuro del sitio activo puede sufrir una hidrólisis alcalina (debida a la gran reactividad de las Cys30 y Cys33), transformando el enlace disulfuro en un sulfenato y un tiolato (Figura 6) (Altamirano, 1999). Mas aún, debido a la elevada concentración de proteína y a la presencia de tioles libres, se puede

favorecer la formación de agregados a través de uniones disulfuro interproteicos.

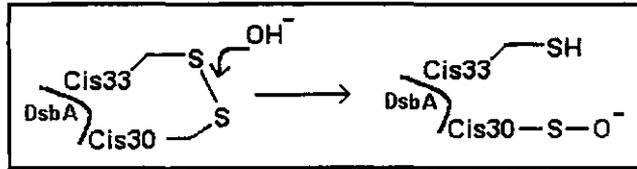


Figura 6. Hidrólisis alcalina del sitio activo de DsbA

La formación de sulfenatos y la agregación se evita reduciendo y cianilando (en un ambiente anaerobio) reversiblemente las Cys30 y Cys33 (Figura 7) (Altamirano, 1999).

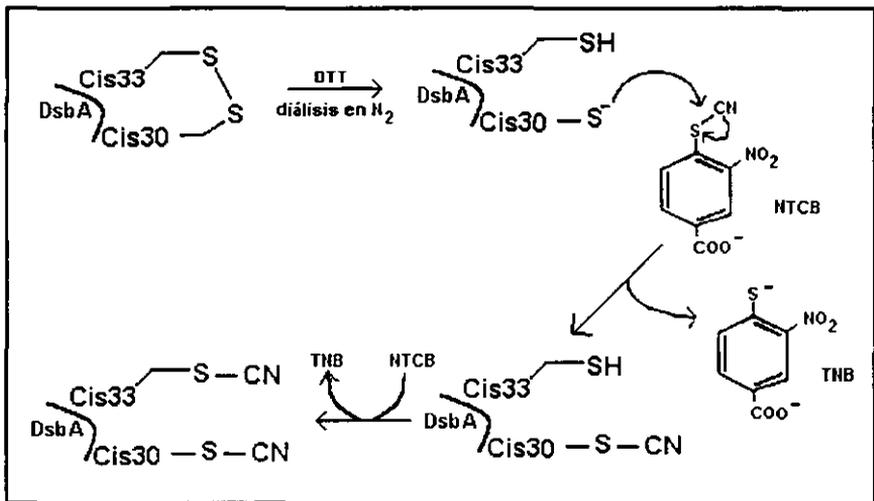


Figura 7. Reducción y bloqueo reversible de Cys30 y Cys33 del sitio catalítico de DsbA.

La reducción se realizó incubando con 5 mM de DTT en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 8.0, KCl 50 mM, durante 1 hora. El DTT se eliminó dializando la muestra de proteína en solución (2 ml) contra 3 litros del mismo amortiguador en una atmósfera saturada de N<sub>2</sub>. La cianilación se realizó con una concentración final de 5 mM de 2-nitro-5-tiocianato benzoato (NTCB) durante 30 minutos. Finalmente, se cambió el amortiguador en una columna de desalación (Desalt 10/10 column; Pharmacia Biotech) a NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 8.3 y KCl 500mM.

## Inmovilización de DsbA, PPI y minichaperona 191-345.

La proteína DsbA, la PPI y la minichaperona se inmovilizaron por separado sobre agarosa activada (NHS-activated Sepharose-4 fast flow de Pharmacia Biotech, Suecia). La resina se lavó con 15 volúmenes de HCl 1 mM a 4°C y se resuspendió en 50 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3, KCl 500 mM (amortiguador de unión), se agitó a temperatura ambiente por un minuto en un agitador rotatorio.

Las proteínas se añadieron a la resina – la DsbA con sus grupos Cys30 y Cys33 previamente bloqueados –, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la resina con el amortiguador de unión; los grupos activos de la resina que quedaron libres se bloquearon agregando 2M de etanolamina pH 8.0 mezclando a temperatura ambiente por 4 horas. La resina se lavó alternando cinco veces amortiguadores con alto (fosfatos 50 mM pH 7.8, KCl 500mM) y bajo pH (acetato de sodio 100mM pH 4.0, KCl 500 mM) para eliminar la proteína que no se asoció a resina.

Para la reactivación de los grupos tiol de la DsbA se incubó en concentración final de 5 mM de DTT en un amortiguador de fosfatos 100 mM pH 8.0, KCl 250 mM y se lavó el exceso con 10 volúmenes de fosfatos 50 mM pH 8.0, KCl 250 mM. Para guardar las resinas se empleo fosfatos 50 mM pH 8.0, KCl 50mM (amortiguador de almacenamiento) a 4°C.

## Preparación de la resina ternaria

Para preparar la resina ternaria, se mezclaron en proporciones 1:1:1 las resinas con minichaperona, PPI y DsbA inmovilizadas. Se separaron en 2 tubos (Falcon de 50 ml), 5 ml de resina ternaria por cada uno y se equilibraron con 30 ml del amortiguador de Replegamiento A (TrisHCl 50 mM, pH 8.0, L-Arginina 0.3 M, EDTA mM y PMSF 0.2 mM) a 4°C durante 15 minutos. Se centrifuga suavemente (50xg) durante 10 minutos y se desecha el sobrenadante.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las proteínas con DTT, justo antes de comenzar el replegamiento, las resinas se equilibraron con 45 ml del amortiguador de Replegamiento B (Tris-HCl 50 mM, pH8.0, L-Arginina 0.3 M, EDTA 1mM, PMSF 0.2 mM y GSSG 8m) a 4°C durante 15

minutos. De esta forma, el volumen total (resina más amortiguador) fue de 50 ml.

## El Replegamiento

Un punto crítico para obtener una elevada eficiencia en el replegamiento es tener la proteína 100% desnaturalizada y reducida. Para reducir los puentes disulfuro, se mezclaron alícuotas de  $\beta_2m$  (400  $\mu$ l) y de CD1a (200 $\mu$ l) resuspendidas en urea y, por separado, se mezclaron alícuotas de  $\beta_2m$  (300 $\mu$ l) y de CD1a (200 $\mu$ l) que se encontraban en la sal de guanidinio. Ambas mezclas se incubaron a una concentración final de DTT 0.3 M durante 3 horas en ausencia de luz a temperatura ambiente.

Manteniendo una agitación constante se mezclaron las proteínas desnaturalizadas y reducidas con la resina ternaria. Las muestras preparadas en urea o en la sal de guanidinio, se procesaron por separado, usando en cada caso volúmenes de 50  $\mu$ L. La agitación y el agregado de un pequeño volumen de proteína a la suspensión de resina son dos factores muy importantes. Esto se debe a que es necesario que cuando las proteínas dejen las condiciones desnaturalizantes, tengan el mayor contacto posible con la resina. El amortiguador final poseía los componentes del amortiguador de Replegamiento B más GuHCl 50 mM y DTT 3mM, agregados junto con las proteínas. Se incubó durante 8 horas a 4°C en un agitador rotatorio.

### **Replegamiento.**

1. La proteína desnaturalizada se incuba durante tres horas con una concentración final de 0.3 M DTT.
2. La Resina Ternaria se equilibra con el Amortiguador A de Replegamiento (sin GSSG ni GSG) a 4° C durante 15 minutos.
3. La Resina Ternaria se equilibra con el Amortiguador B de replegamiento (con GSSG y GSG) a 4° C durante 15 minutos.
4. Se agrega la proteína (1:100 con respecto al volumen del amortiguador) en dosis 10% del total de proteína – agitando en cada adición.
5. Se incuba a 4°C durante toda la noche.

Posterior a la incubación, ambos tubos se centrifugaron a 50xg durante 10 minutos. Los sobrenadantes se guardaron, y la resina se lavó con 30 ml del amortiguador Replegamiento B durante 15 minutos en un agitador

rotatorio; se centrifugo a 50xg durante 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes. Ambos sobrenadantes – de la primera y segunda centrifugación – se colocaron en bolsas de diálisis (con 3kDa de corte) y se concentraron con trehalosa a 4°C hasta obtener un volumen aproximado de 5 ml (proceso de aprox. 12 horas). Para tener una mayor cantidad de proteína para el análisis, se mezclaron los concentrados y, utilizando una cámara de agitación con una membrana Amicon YM-3 (Amicon, Centricon), se llevó a 400 µl. La muestra se filtró con filtros minisart de 0.22 µm de corte (Sartorius) y se corrió en una columna de filtración en gel Superdex 75 XK26/10 (Pharmacia Biotech) equilibrada con un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 8.0, que contenía glicerol 1% y GuHCl 50 mM.

### Controles y Replegamientos Alternos

Se realizaron replegamientos en (A) diferentes valores de pH, (B) en presencia de coadyuvantes y (C) en diferentes proporciones de cadena ligera y pesada.

Se mantuvo constante en todos los replegamientos los parámetros L-Arginina 0.3 M, GSSG 8 mM, PMSF 0.2 mM y EDTA 1mM, utilizando para los diferentes pH los siguientes amortiguadores: pH 5.0 (NH<sub>4</sub>OAc 50 mM), pH 7.0 (amortiguador de fosfatos 50 mM), pH 8.0 (TrisHCl 50 mM) y pH 8.5 (DEA 50 mM). Como coadyuvantes se emplearon el péptido NAI/34 a una concentración final de 1.3 µg/ml y 100 µl de DMSO saturados con un extracto de *Mycobacterium tuberculosis* H27RA. Todos los replegamientos con coadyuvantes se realizaron a pH 8.0. Por otro lado, en los experimentos donde se varió las proporciones entre ambos componentes, se emplearon las razones 1:10, 1:5 y 1:3 (CD1a:β<sub>2</sub>m).

### Ensayo de Actividad del Complejo CD1a/β<sub>2</sub>m

La actividad del complejo CD1a/b<sub>2</sub>m replegado consiste en un inmunoensayo por inhibición, empleando células Molt 4 que sobre expresan CD1a. Se inmovilizaron timocitos mutantes NH17 en placas para ELISA (con aprox. 2.5x10<sup>5</sup> células por pozo). Los sobrenadantes que contienen CD1a se diluyeron hasta alcanzar un volumen final de 150 µl con FCS PBS / FCS 5 % en una placa para ELISA de 24 pozos. Se agregaron 50 µl de NAI/34

(anticuerpos anti-CD1a) diluidos 1:12,800 y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas con NH se lavaron con cinco volúmenes de PBA y se agregaron 50  $\mu$ l de la mezcla sobrenadante/anticuerpos a cada pozo (por duplicado); se incubó la placa a 37°C durante 90 minutos. Posteriormente, la placa se lavó con cinco volúmenes de PBS y se agregaron 50  $\mu$ l de HRP conjugado en cada pozo (diluido 1:600 en PBS / FCS 5%). Se dejó por 50 minutos a 37°C y se lavó con seis volúmenes de PBS. Finalmente se agregaron 50  $\mu$ l de sustrato ABTS en cada pozo. La reacción se detuvo después de incubar 10 minutos a temperatura ambiente, agregando 50  $\mu$ l de ácido cítrico 0.1M. Finalmente se determinó la absorbancia en cada pozo a 414 nm. Los ensayos se realizaron con ayuda del Dr. Adrian Woolfson del Laboratory of Molecular Biology, MRC, Cambridge, UK.

### Mantenimiento de la Resina Ternaria.

Es conveniente que el centrifugado (50xg) y la agitación sean suaves, de lo contrario puede perderse resina al fragmentarse ésta. Al igual que la resina con el fragmento 191-345 inmovilizado, la resina ternaria puede permanecer viable hasta por un año si se mantiene a 4°C (Altamirano *et al*, 1997). Sin embargo, se recomienda cambiar periódicamente el amortiguador de almacenamiento (fosfatos 50 mM pH 8.0, KCl 50mM).

### Extracción y purificación de CD1a y $\beta_2$ m.

Se expresó CD1a y  $\beta_2$ m en la cepa BLR DE3 de *E. coli*, inoculando con 10 ml 2xTY con 100  $\mu$ g/ml de Amp a 25°C (cuando la  $A_{600nm}$  fue igual a 0.6-0.8 se creció por tres horas más. Los botones bacterianos de CD1a y  $\beta_2$ m se resuspendieron separadamente en fosfatos 50 mM pH 8.0, PMSF 0.2 mM y sonicados durante 5 minutos. Ambas proteínas precipitaron y el extracto crudo se centrifugó a 12,000xg durante 40 minutos. Los botones obtenidos se resuspendieron en dos lotes, el primero en GuHCl 6M, Tris 50 mM pH 8.0 y el segundo en Urea 8M con Tris 50 mM, pH 8.0.

Se intentó purificar empleando un Ni-NTA Spin Kit en condiciones desnaturizantes (urea 8M, fosfatos 0.1M y TrisHCl 0.01M) despegando por diferencia de pH (lisis a pH 8.0, lavado a pH 6.3 y elución a pH 4.5), sin

embargo ambas proteínas no se unieron a la resina. Probablemente esto se debió a una deficiencia en la construcción de la cola de histidinas.

## Resultados.

*Actividad de DsbA.* Antes de inmovilizar la DsbA a la matriz de agarosa se debe de comprobar que se encuentre correctamente plegada. En la prueba de fluorescencia (figura 9) se comprobó que la DsbA a inmovilizar se encontraba plegada correctamente ya que al ser reducida con 1mM DTT el espectro de fluorescencia aumentaba por lo menos al doble.

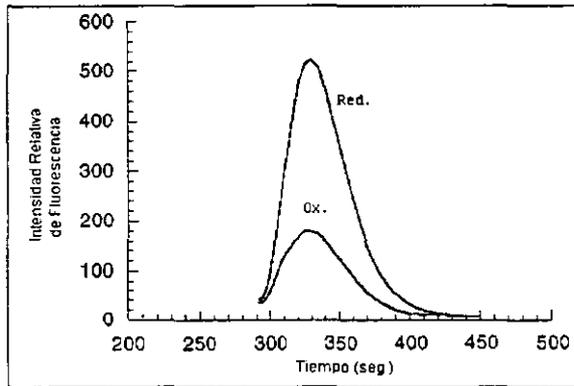


Figura 9. Espectro de fluorescencia de DsbA oxidada y reducida a 335nm , excitando a 280nm.

*Inmovilización a la matriz de agarosa.* Las minichaperona 191-345 y las foldasas PPI y DsbA se inmovilizaron por separado (tabla 1). La concentración de PPI y DsbA inmovilizada en la resina excede en casi 2 órdenes de magnitud a empleada en trabajos previos, donde dichos asistentes de plegamiento se emplearon en solución (Shönbrunner y Shmid, 1992).

Tabla 1. Eficiencia de Inmovilización de la minichaperona 191-345, PPI y DsbA.

	Proteína inicial (mg)	Proteína Final (mg)	Volumen de Resina (ml)	Proteína (mg/ml) Inmovilizada	Eficiencia
191-345	593.62	16.22	12	48.15	97%
PPI	30.24	0.04	5	6	99%
DsbA	27.72	0.9	4	6.7	97%

La concentración se determinó por Abs. a 280 y 276 nm, empleando los coeficientes de extinción molar : fragmento 191-345: 6.25 mg/ml por A.U.(a 276nm); PPI 1mg/ml por A.U. (a 280nm); DsbA 1.11mg/ml por A.U. (a 280 nm).

*Sobre-expresión de CD1a y  $\beta_2m$ .* La sobre-expresión tanto de CD1a como de  $\beta_2m$  fueron cercanas al 80% (figura 10), por lo que fue posible trabajar con los

cuerpos de inclusión resuspendidos en el agente caotrópico sin necesidad de purificación.



Figura 10. Gel en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de expresión CD1a y  $\beta_2m$ . Los marcadores moleculares son 44, 29, 20, 14, 5 y 3 kDa.

*Agregación en GuHCl 6M.* Durante los experimentos se observó que la duración del proceso de desnaturalización repercute en la eficiencia del repliegamiento. En presencia de GuHCl 6M a 4°C, el producto soluble cae dramáticamente después de 24hrs (figura 11). Es posible que este comportamiento se deba a que la proteína sufra modificaciones químicas producidas por la alta concentración de guanidinio (como sucede con la urea). Hasta ahora no se había reportado agregación en estas condiciones desnaturizantes y probablemente este fenómeno se extienda a otras proteínas

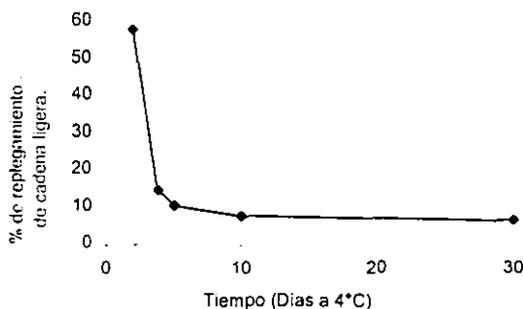


Figura 11. Efecto de la permanencia en sal de guanidinio 6 M en el repliegamiento de  $\beta_2m$  a 4°C.

*Filtración en gel.* Después del cambio de amortiguador por diálisis, los componentes de las muestras repliegadas se sometieron a una filtración en gel. En la figura 12 se observa el perfil obtenido a  $A_{280nm}$ , donde aparecen

tres componentes principales correspondientes a (1) >2000 kDa (volumen de exclusión), (2)  $K_A = 0.2526$  (42.9 kDa) y (3)  $K_A = 0.3739$  (12.2 kDa) (en el apéndice se muestra la calibración de la columna). Los pesos obtenidos corresponden los esperados para el el complejo CD1a/ $\beta_2m$  (46 kDa) y la microglobulina monomérica (de 12 kDa). Las fracciones de los picos se recolectaron y se concentraron utilizando una cámara de agitación con una membrana Amicon YM-3 (Amicon, Centricon).

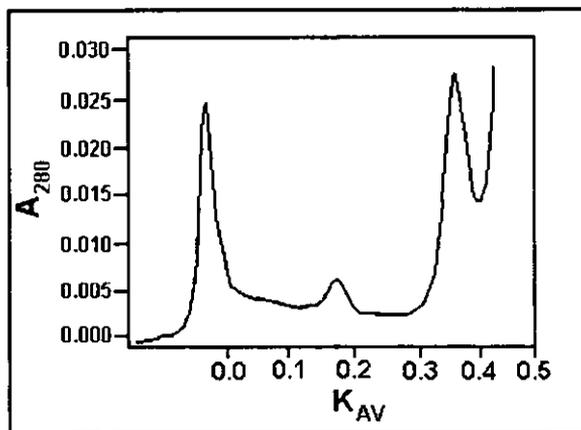


Figura 12. Separación de componentes replegados a por filtración en gel HPLC Superdex 75 XK26/10 (Pharmacia Biotech) equilibrada con un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 8.0, glicerol 1% y GuHCl 50 mM del replegamiento de CD1a/ $\beta_2m$ .

*Gel SDS en condiciones desnaturalizantes.* Se tomaron alicuotas en varias etapas después del replegamiento y se corrió un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS (Dodecil Sulfato de Sodio). La solución replegada antes de ser filtrada, muestra cuatro bandas (primer carril de la figura 13); la banda correspondiente a mayor peso molecular desaparecieron después de la filtración (segundo carril, figura 13), por lo que probablemente se haya tratado de agregados inespecíficos de alto peso molecular. Los carriles tres, cuatro y cinco, corresponden a los picos obtenidos en la separación por filtración por gel. En el carril cuatro, correspondiente a el volumen de exclusión de la columna, se observa una banda de aprox. 27 kDa, por lo que la mayoría de la proteína que forma estos agregados es la cadena pesada del complejo. En el siguiente carril, que corresponde al pico  $K_A = 0.2526$  (42.9 kDa) aparecen una banda de 27kDa (CD1a) y otra más ligera de 12 kDa ( $\beta_2m$ ), aunque las proporciones aparentes no sean estequiométricas. Por último, en el pico con un valor de  $K_A = 0.3739$  (12.2

kDa) sólo aparece la banda correspondiente a 12 kDa, correspondiente a la cadena ligera.

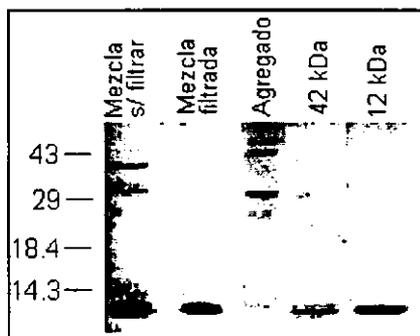


Figura 13. Gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de los componentes obtenidos en el perfil de  $A_{280}$ .

*Ensayo de Actividad.* Los tres componentes del perfil por filtración en gel del repliegamiento se sometieron al ensayo de actividad que detecta complejos CD1a/ $\beta_2m$  activos.

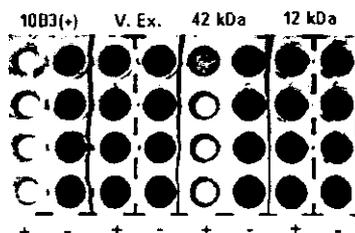


Figura 14. Actividad de los componentes del repliegamiento. De izquierda a derecha: control positivo (CD1a producido via cultivo de tejidos), volumen de exclusión de la columna, componente 42kDa y 12kDa (positivo en color claro y negativo color oscuro)

En dicho ensayo el único pico con actividad de complejo CD1a/ $\beta_2m$  fue el componente de 42 kDa (figura 14), lo que prueba que el complejo no sólo está plegado si además está activo (es decir, no se encuentra en alguna isoforma soluble pero carente de actividad).

*Eficiencia del repliegamiento.* La eficiencia del repliegamiento se cuantificó midiendo concentración de proteína (Bradford BioRad). La Cromatografía de Repliegamiento Oxidativo permitió recobrar 77% de la proteína en solución. De esta fracción, el 16% fue complejo activo y 60% fue

cadena ligera monodispersa. Para cada una de las fracciones se determinó la concentración de proteína (tabla II).

Tabla II. Cantidad de proteína en cada uno de los pasos del replegamiento.

	$\beta$ 2m Urea 8M	CD1a Urea 8M	$\beta$ 2m GuHCl 6M	CD1a GuHCl 6M	HPLC	42 kDa.	12 kDa.
Volumen	400 $\mu$ l	200 $\mu$ l	300 $\mu$ l	200 $\mu$ l	10.18 ml	516.8 $\mu$ l	2300 $\mu$ l
Concent. (mg/ml)	6.6	1.88	5.6	4.3	0.4245	0.265	1.092
Masa	2.64 mg	0.376 mg	1.68 mg	0.860 mg	4.32 mg	136.7 $\mu$ g	2512 $\mu$ g
Recuperación	--	--	--	--	77.7% <sup>1</sup>	11% <sup>2</sup>	58% <sup>3</sup>

Los porcentajes se obtuvieron con respecto al (1) total de proteína, 5.556 mg; (2) CD1a inicial y (3)  $\beta$ 2m inicial.

*Dependencia del pH.* Con el propósito de buscar mejores condiciones para la renaturalización del complejo, se realizaron experimentos a diferentes pH (entre 5 y 9), así como con diferentes proporciones relativas entre CD1a y  $\beta$ 2m. Se observó una dependencia en la formación del complejo 42 kDa con el valor de pH al que se realizaron los experimentos. Bajo condiciones ácidas, el complejo se disoció y precipitó, perdiendo así actividad. El valor óptimo de pH que se encontró fue de 8 por lo que experimentos subsiguientes se realizaron bajo estas condiciones.

En los experimentos donde se varió las proporciones entre ambos componentes, se emplearon las razones 1:10, 1:5 y 1:3 (CD1a: $\beta$ 2m). Los tres componentes en el perfil a  $A_{280}$  corresponden aproximadamente a (1) un volumen de excluido, (2) un  $K_{av}$  0.1838 (41.3 kDa) y a (3) un  $K_{av}$  0.3853 (12.3 kDa).

En la proporción 1:10 se observó que más proteína salía en el volumen de excluido (figura 15), lo que indica que el exceso de cadena ligera no se solubilizó adecuadamente; mientras que en la condición 1:5 se observó un pico mayor de 42 kDa.

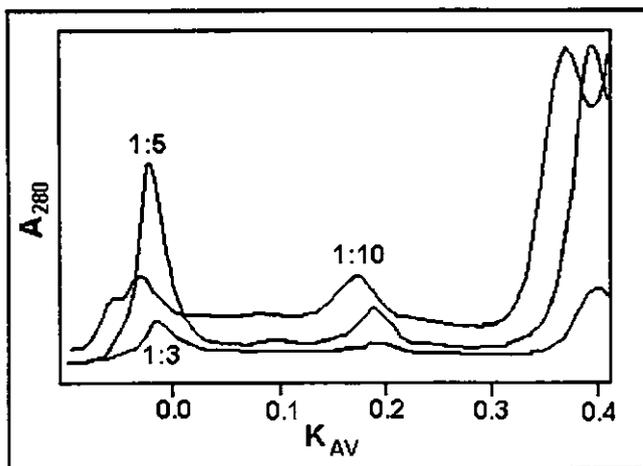


Figura 15.  $A_{280}$  empleando diferentes proporciones de CD1a/ $\beta$ 2m. (A 1:10; B: 1:5; C: 1:3).

*Controles.* Se realizaron replegamientos con (1) el amortiguador de replegamiento, donde se observaron agregados macroscópicos (datos no mostrados), y con la resina unida a DsbA (DsbA-agarosa), donde se observó un componente correspondiente a un  $K_{AV} = 0.2844$  (22.6 kDa, figura 16), probablemente por la formación de dímeros de la cadena ligera.

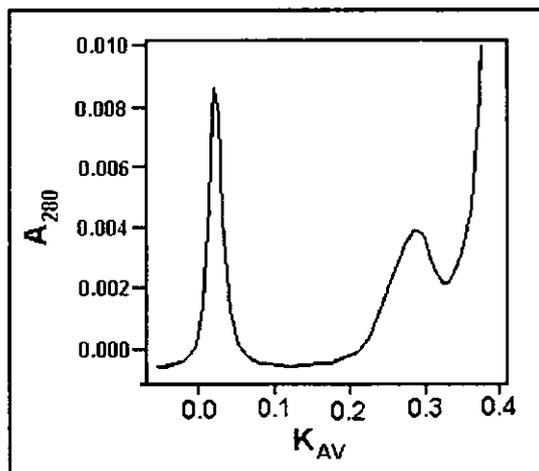


Figura 16. Perfil del replegamiento con DsbA-agarosa

*Presencia de Coadyuvantes.* Un resultado que llama la atención es que el replegamiento en presencia de coadyuvantes, aun cuando presentaban el

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

componente de 42 kDa, no presentó actividad (tabla IV). Probablemente esto se debe a la interferencia de estos compuestos con el ensayos.

Tabla IV. Presencia del pico 42 kDa y actividad en presencia de coadyuvantes inespecíficos.

Condición	Pico 42 kDa	Actividad
pH 8.0 sin coad.	+	+
pH 8.0 + péptido	+	-
pH 8.0 + lípido	+	-
pH 8.0 + pep. y lip.	+	-

## Discusión

Con los resultados obtenidos se demuestra que empleando la Cromatografía de Replegamiento Oxidativo, partiendo de las cadenas CD1a y  $\beta_2m$  completamente desnaturalizadas y reducidas, fue posible replegar y ensamblar el complejo activo CD1a/ $\beta_2m$ . Esta es la primera demostración que una molécula presentadora de antígenos, totalmente desnaturalizada, puede ser replegada *in vitro* en la ausencia de ligandos exógenos sintéticos, lo que sugiere que la ruta de plegamiento dependiente de la unión de ligandos no es el único camino posible para ensamblar *in vivo* este tipo de moléculas.

El problema de plegamiento erróneo y agregación de proteínas *in vitro* es un fenómeno similar a la agregación *in vivo* observada en enfermedades neurodegenerativas como las de Huntington, Alzheimer y Parkinson (Dobson, 1999). La formación de cuerpos de inclusión debido al plegamiento erróneo y la agregación de proteínas en el citoplasma de *Escherichia coli* es un problema limitante en la investigación biomédica y biotecnológica. En los próximos años este problema puede agudizarse ya que se conocerá la secuencia de miles de genes cuyos productos polipeptídicos deberán ser sobre-expresados para su estudio (Speed *et al*, 1996). En el presente trabajo se ha descrito un método que permite replegar de proteínas hetero-oligoméricas recombinantes en *E. coli*, cuyos monómeros poseen el importante patrón de plegamiento de las inmunoglobulinas. La Cromatografía de Replegamiento Oxidativo (ORC) es un método muy flexible ya que (1) puede ser utilizada en un intervalo amplio de condiciones; (2) aun cuando la eficiencia de replegamiento no sea elevada ésta puede ser empleada iterativamente como bioreactor en la cual el material insoluble puede volver a ser desnaturalizado y replegando con relativa rapidez; y (3) puede inmovilizarse otros asistentes de plegamiento más específicos.

## Apéndice.

### Calibración de la columna Superdex 75 10/10.

Para determinar la curva de calibración de la columna Superdex 75 10/10 se obtuvo la relación entre el logaritmo del peso molecular ( $\log (PM)$ ) y su Coeficiente de Reparto Promedio,  $K_{av}$  (Tabla A.1 y Figura A.1).

Tabla A.1 Proteínas empleadas en la calibración de la columna Superdex 75 10/10

Proteína	$K_{av}$	$\log (PM)$
Albumina Sérica Bovina (BSA)	0.104	4.826
Ovoalbúmina	0.170	4.6335
Quimotripsinógeno	0.283	4.3979
Ribonucleasa	0.359	4.1367

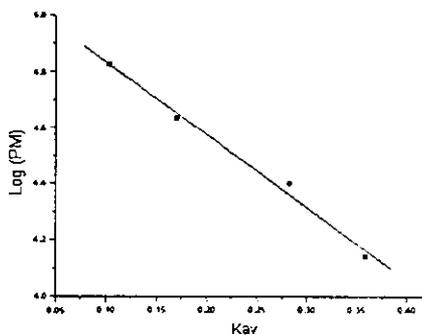


Figura A.1. Relación entre  $K_{av}$  vs.  $\log (PM)$  de las proteína de calibración.

En el cálculo de la relación se obtuvo un ajuste lineal a la ecuación  $\log (PM) = -2.60441 \cdot K_{av} + 5.09494$  ( $R = -0.99531$ ).

## Referencias

- Altamirano, M.M., Golbik, R. Buckle, A.M., y Fersht, A.R. (1997). Refolding chromatography with immobilised mini-chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3576-3578.
- Altamirano, M.M., Garcia, C., Possani, L.D., y Fersht, A.R., (1999). Oxifolding of the scorpion toxin Cn5. *Nature Biotech.* **17**:187-191.
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., y White, F.H. (1961). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**:1309-1314.
- Bardwell, J. C. A. y Beckwith, J. (1993). The bonds that tie: catalyzed disulfide bond formation. *Cell* **74**:769-771.
- Bardwell, J. C. A., McGovern, K y Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**: 581-598.
- Branden, C. y Tooze, J. Introduction to Protein Structure. (Garly, New York, 1999).
- Bouvier, M. y Wiley, C. D.(1998). Structural characterization of a soluble and partially folded class I major histocompatibility heavy chain/ $\beta_2m$  heterodimer. *Nature Struc. Biol.* **5**:377-384.
- Buckle, A.M, Zahn, R., Harding, S. E. y Fersht, A.R. (1997) A structural model for GroEl-polypeptide recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3571-3575.
- Chatellier, J., Hill, F., Lund, P.A. y Fersht, A.R. (1998). In vivo activities of GroEl minichaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9861-9866.
- Clarke, A.R. y Lund, P.A. Kinetic and Energetic Aspects of Chaperonin Function. (Ellis, J.R. Ed) 1 - 25 (Academic Press, New York, 1996).
- Darby, N. J. y Creighton, T. E. (1995). Catalytic mechanism of DsbA and its comparison with that of Protein Disulfide Isomerase. *Biochemistry* **34**:3576-3587.
- De Bernárdez Clark, E. 1998. Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**:157-163.
- Dobson, C.M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *TIBS.* **24**: 329-332.
- Ellis, J. R. The chaperonins, (Ellis, J.R. Ed) 1- 25 (Academic Press, New York, 1996).
- Garboczi, D. N., Hung, D.T. y Wiley, D.C. (1992) HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:3429-3433.
- Guddat, L. W., Bardwell, J. C. A., y Martin, J. L. (1998). Crystal structures of reduced and oxidized DsbA. *Structure* **15**:757- 767.
- Hartl, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**:571-580 (1996).
- Martin, J. L., Bardwell, J. C. A., y Kuriyan, J. (1993). Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo, *Nature* **356**:464 - 468.
- Jassanoff, A., Davis B., y Fersht A.R. 1994. Detection of an intermediate in the folding of the ( $\beta\alpha$ ) 8-barrel N-

- (5' phosphoribosyl)anthranilate isomerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**:6350-6355.
- Porcerelli, S. A. (1995) The CD1 Family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv. Immun* **59**:1-98.
  - Riegert, P, Valérie W. y Bahram, S., (1998) Genomics, isoform, expression, and phylogeny of the MHC Class I-related MR1 gene. *J. of Immun.* **161**:4066-4077.
  - Roitt, I., Brostoff, J y Male, D. (1993). Immunology. (Mosby, London, England).
  - Rudolph, R. e Hilie, H. 1996. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**:49-56.
  - Schmid, F. X., Mayr, L. M., Mücke, M., y Schönbrunner, R. Accessory Folding Proteins, (Anfinsen, C., Edsall, J., Richards, F., Eisenberg, D. Ed) 25-65. (Academic Press, Inc. New York, 1993).
  - Sholz, C., Rahfeld, J., Fisher, G. y Schmid, F.X. (1997). Catalysis of protein folding by parvulin. *J. Mol. Biol.* **273**:752-762.
  - Schönbrunner, E.R., y Schmid, F.X. (1992). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase improves the efficiency of protein disulfide isomerase as a catalyst of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4510-4513.
  - Speed, M.A., Wang, D.I. y King, J. (1996). Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: The molecular basis of inclusion body composition. *Nature.biotech.* **14**, 1283-1287.
  - Voet, D. y Voet, J. G. Biochemistry. (Jonh Wiley and Sons, New York, 1995).
  - Wunderlich, M. y Glocksuber, R. 1993. Redox properties of Protein disulfide isomerase (DsbA) from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **2**:717.726.
  - Zahn, R., Buckle, A. M., Perrett, S., Johnson, C. M., Corrales, F. J., Golbik, R. y Fersht, A. R., (1996) chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:15024-15029.
  - Zapun, A., Bardwell, J. C. A. y Creighton, T. E. (1993). The reactive and destabilizaing bisulfide bond of DsbA, a protein required for protein disulfide bond formation *in vivo*. *Biochem.* **32**:5083-5092.
  - Zeng, Z.H., Castaño, A. R., Segeike, B.W., E. A. Stura, P. A. Peterson y Wilson, I. A. (1997). Crystal Structure of Mouse CD1: An MHC-Like Fold with a large Hydrophobic Binding Groove. *Science* **277**: 339- 344.