UnADM
UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA DE MÉXICO

Programa de la asignatura:

Genética molecular bacteriana

U3 Obtención de proteínas recombinantes

DCSBA

BIOTECNOLOGÍA

Índice

Presentación 3
Propósitos 3
Competencia específica 4
Ruta de aprendizaje 3
Presentación de la unidad 6
3.1. Regulación de la expresión génica 6
3.1.1. Operón de la lactosa 6
3.1.2. El operón de triptófano 12
3.2. Purificación de proteínas recombinantes 15
3.2.1. Cuerpos de inclusión 16
3.2.2. Cromatografía 20
Actividades 25
Autorreflexiones 25
Cierre de Etapa 26
Para saber más 27
Fuentes de consulta 28

Presentación

A lo largo de esta unidad nos enfocaremos en las estrategias experimentales que pueden aplicarse durante y para la obtención de una proteína recombinante, y se discutirá la gran ventaja de utilizar a los procariontes como la fuente de generación.

Con objeto de poder identificar y comprender las estrategias o protocolos experimentales que sustentan la obtención de proteínas recombinantes utilizando un modelo procarionte, es necesario saber cómo se lleva a cabo la regulación genética en bacterias, puesto que con esto podemos ayudar a hacer más eficiente la producción de la proteína de interés, por lo que en esta unidad analizaremos con profundidad los mecanismos de regulación de los operones.

Por otro lado, una vez que se ha logrado producir la proteína recombinante de interés, requerimos realizar procedimientos que permitan la purificación de la misma para poder emplearla en distintos estudios o en la formulación de un producto. En esta unidad también estudiaremos éstas nuevas tecnologías que se han descrito para la purificación de proteínas recombinantes bacterianas.

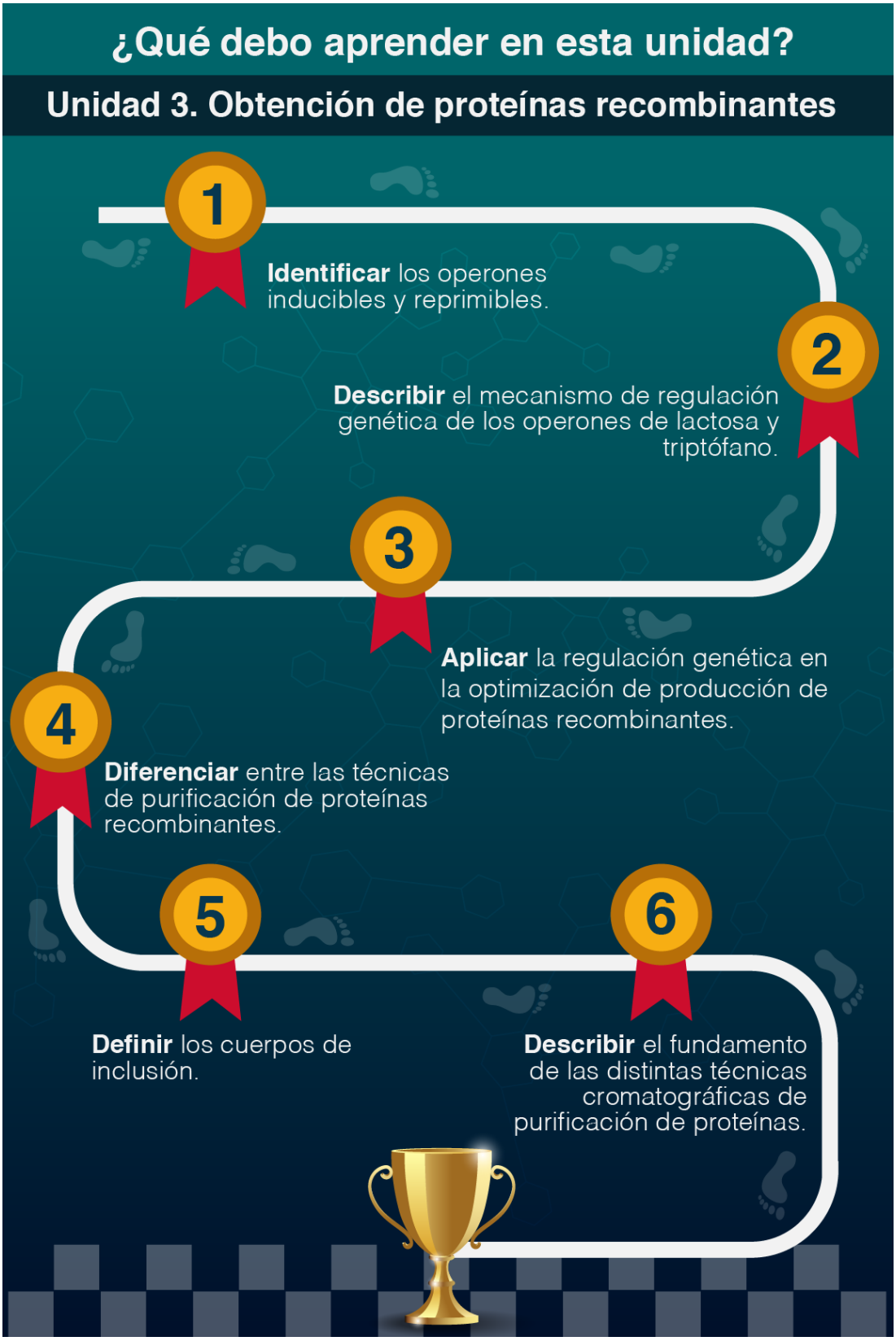
Propósitos

Esta unidad tiene los propósitos de:

- **Describir** el mecanismo de regulación genética de los operones de lactosa y triptófano.
- **Definir** los cuerpos de inclusión
- **Diferenciar** entre las técnicas de purificación de proteínas recombinantes.
- **Describir** el fundamento de la cromatografía de afinidad, exclusión molecular y de intercambio iónico.

Competencia específica

Aplicar estrategias de regulación genética y de purificación de proteínas mediante el uso de tecnologías moleculares para la obtención de proteínas recombinantes.


¿Qué debo aprender en esta unidad?
Unidad 3. Obtención de proteínas recombinantes
1
Identificar los operones inducibles y reprimibles.
2
Describir el mecanismo de regulación genética de los operones de lactosa y triptófano.
3
Aplicar la regulación genética en la optimización de producción de proteínas recombinantes.
4
Diferenciar entre las técnicas de purificación de proteínas recombinantes.
5
Definir los cuerpos de inclusión.
6
Describir el fundamento de las distintas técnicas cromatográficas de purificación de proteínas.

3.1. Regulación de la expresión génica

Antes de sumergirnos en el contenido de la asignatura, revisa la infografía que se muestra en la página anterior y que te permitirá tener un panorama completo de los contenidos que revisaremos en esta unidad, en caso de que tengas alguna pregunta o inquietud, consúltalo con tu docente en línea.

La obtención de un péptido recombinante implica varios aspectos, y uno de los más importantes es conocer el **mecanismo de regulación génica** que permitirá expresar mejor la proteína.

Enlace

Recuerda que en la asignatura de Biología Molecular 1, estudiamos la estructura y definición de los operones, por lo que en esta asignatura profundizaremos en los mecanismos genéticos involucrados con ellos, que permitirán incrementar la producción de una proteína recombinante.

La **expresión génica** es el proceso que abarca desde la transcripción, el procesamiento del mRNA hasta su traducción en proteína, y el control de esta expresión sucede fundamentalmente a nivel de la transcripción.

Este control se realiza a través de la unión específica de proteínas y la secuencia de DNA particular. A diferencia de lo que sucede en los eucariontes, los procariontes presentan agrupaciones de genes que están sujetos a una sola región regulatoria o promotora.

3.1.1. Operón de la lactosa

Los primeros estudios sobre los operones fueron realizados en *E.coli,* donde observaron que si bien la bacteria crecía en un medio con glucosa como fuente de carbono, también podía utilizar la lactosa como otra fuente, sin problema alguno. Lo curioso de esta observación es que ninguna ruta metabólica de este microorganismo presenta a este metabolito. Y entonces surgió la duda de cómo es que podía metabolizarla.

En el metabolismo de la lactosa, una enzima la β-galactosidasa que hidroliza al disacárido y produce galactosa y glucosa, es de suma importancia y resulta que ésta se expresaba en

células que crecían en un medio con lactosa, pero además se expresaba junto con otras dos enzimas; es decir había un patrón que sugería que los niveles de expresión de una serie de enzimas que participaban en la adaptación a una determinada modificación de su entorno, en este caso, el medio con lactosa, implicaba una regulación coordinada y fue entonces que Jacob y Monod propusieron el modelo del operón para dar una explicación a la expresión coordinada que observaron.

El operón de la lactosa está constituido por tres genes estructurales, designados como ***lacZ***, ***lacY*** y ***lacA***. El gen *lacZ* codifica para la enzima β-galactosidasa que cataliza la hidrólisis del disacárido lactosa en glucosa y galactosa. El gen *lacY* codifica para una permeasa de galactósido que proporciona funciones de transporte para una variedad de azúcares, incluidas la lactosa, melibiosa, y rafinosa. El gen *lacA* codifica para una tiogalactósido transacetilasa, una enzima de función incierta que puede desempeñar un papel en la desintoxicación de algunos tiogalactósidos. Las tres proteínas están normalmente presentes en cantidades pequeñas en una célula, pero cuando ésta se encuentra en crecimiento y utiliza lactosa, los niveles de estas enzimas aumentan hasta 1000 veces sus niveles.

A este proceso de estimular el aumento de las enzimas involucradas en el operón lactosa se le llama **inducción**, y por lo tanto las enzimas del operón lactosa se consideran inducibles. Cualquier compuesto, como la lactosa, cuya presencia en el medio de como resultado una inducción, es considerado un inductor. Después de que el suministro del inductor en un medio se agota, debido a la acción de la enzima β-galactosidasa, la síntesis de las enzimas del operón lac se reprimen una vez más, y la célula vuelve a su estado original.

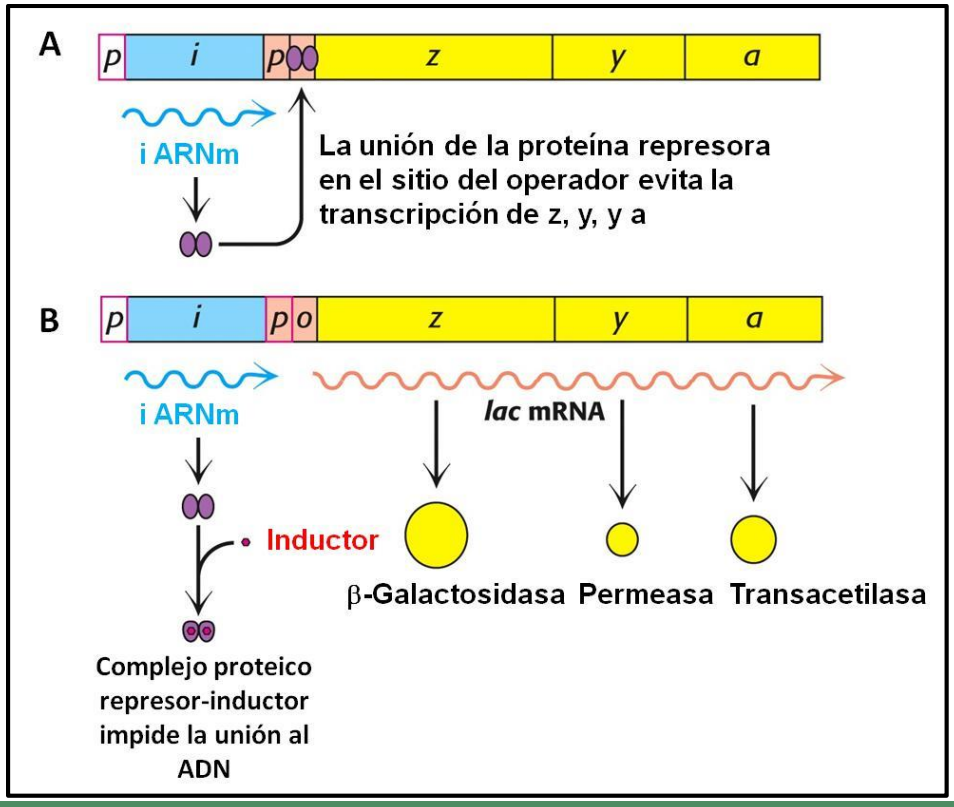


Figura 1. Regulación del operón de lactosa. Se muestran los productos del gen de la lactosa y su regulación.

Modificado de Stryer, 2003.

Ahora bien, lo contrario de una enzima que es inducible y reprimible es una enzima constitutiva, que siempre se está sintetizando. Una enzima constitutiva es por tanto aquella que se produce a una velocidad constante en todas las condiciones celulares presentes. La producción constitutiva de una enzima implica una falta de mecanismos de control, y ciertos tipos de mutaciones pueden hacer que la producción de las enzimas del operón lactosa sea constitutiva en lugar de que sea inducible.

Por estudios de mutaciones se encontró un gen represor llamado ***lacI*****,** que se encuentra adyacente a los genes del operón lactosa *lacZ, lacY* y *lacA*. El gen *lacI* codifica para una proteína represora que ejerce un control negativo sobre el operón lactosa, inhibiendo la transcripción. Ahora bien, este represor debe interactuar con el operón lactosa de alguna manera para evitar la transcripción, esto sucede en el operador.

Si la presencia de la proteína represora en el operador evita la transcripción y la ausencia de un represor lo permite, la inducción debe consistir en la eliminación del represor de un operador, debido a un cambio en las propiedades del represor, resultante de la interacción

con el inductor. Varias moléculas que tienen una unión y ligadura β-galactósido, tal como la que se encuentra en la lactosa, funcionan como inductores *in vivo* e *in vitro*. Algunas de estas moléculas, a diferencia de la lactosa, que no son degradadas por la β-galactosidasa se les denominan inductores gratuitos. Entre estos compuestos o inductores gratuitos se encuentra el tiometil-β-D-galactopiranósido (TMG) y el isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG), ambos de los cuales con frecuencia se han utilizado para los estudios sobre inducción. Debido a que no se degradan, su concentración no cambia en la célula, incluso si éstas crecen durante muchas generaciones.

El represor Lac, el cual es la proteína codificada por el gen *lacI*, fue el primer ejemplo de una clase de proteínas que Jacques Monod y Jean Pierre Changeaux llamaron proteínas alostéricas. Tales proteínas tienen al menos dos configuraciones estables de mínima energía, y cada una tiene una actividad característica (o falta de actividad) asociada a ella. En el caso del represor Lac, la configuración alostérica de la proteína se da cuando se une al operador como un complejo tetramérico, mientras que la otra configuración enzimática no lo hace. El cambio en la configuración de una proteína alostérica se desencadena por una molécula denominada efector alostérico, que es una pequeña molécula que se une a un sitio especial en una proteína alostérica. Para el represor Lac, el efector alostérico es cualquiera de las moléculas inductoras (TMG o IPTG). El inductor en realidad no compite por unirse al operador sino que se une a la proteína represora y esto resulta en que el represor ya no se puede unir al DNA.

La baja concentración de inductor que se requiere para un cambio alostérico es importante, debido a que el inductor químico del operón lactosa no es en sí la lactosa, sino un derivado de la lactosa llamado alolactosa. La enzima β-galactosidasa produce cantidades muy pequeñas de alolactosa a partir de la lactosa, por desplazamiento del enlace glucosídico presente en esta molécula. La enzima no rompe el enlace glucosídico, tan sólo mueve la posición del enlace de la posición 4 a la posición 6.

Para este caso, una cantidad mínima de β-galactosidasa debe estar presente en todo momento en la célula, o la inducción del operón lac no podría ocurrir, además el azúcar no tiene que ser modificado por la β-galactosidasa para ser un inductor. Además de los inductores gratuitos mencionados anteriormente, la melibiosa es un inductor que sólo requiere la función galactósido permeasa, ya que se descompone a través de una vía enzimática diferente. La rafinosa, por otra parte, no es un inductor, pero es transportada por la galactósido permeasa. Sólo las células que expresan constitutivamente el operón lac son capaces de crecer en rafinosa.

El modelo original del operón asumía que la RNA polimerasa se unía al operador para iniciar la transcripción, y que, por tanto, la represión era una simple competencia entre la polimerasa y la proteína represora para el mismo sitio de DNA. Sin embargo, Agnes Ullman

y Jacques Monod mostraron, a través de experimentos con bacterias mutantes, que si hay modificaciones en sitios rio arriba, la unión de la RNA polimerasa es más eficiente. Pero, si hay mutaciones rio abajo, la polimerasa se une con menos eficiencia y disminuye la tasa de transcripción. Para cuestiones prácticas, las mutaciones entre el gen *lacI* y los sitios del operador *lacZ*, se designan lacZp.

El último elemento regulador fue demostrado por Boris Magasanik, el cual era parte de un grupo más grande de eventos reguladores llamado represión de catabolitos o represión de glucosa. El concepto básico es que algunos componentes liberados durante el catabolismo de la glucosa, causaban inhibición de sistemas enzimáticos auxiliares, tales como el operón lactosa. Sin embargo, el mediador real de la represión catabólica no fue descubierto hasta que Earl Sutherland y colaboradores identificaron una molécula pequeña denominada 3', 5' adenosin-monofosfato cíclico (AMPc o AMP cíclico), como un elemento regulador en las células animales y bacterianas. Colaboradores mostraron más tarde que la adición de este compuesto a cultivos en la fase de crecimiento de *E. coli* liberaba la represión catabólica y permitía la inducción de una variedad de operones incluidos el de lactosa. La concentración de AMPc no variaba en *E. coli* durante el crecimiento exponencial sobre glucosa o lactosa. Por lo tanto, la concentración de AMPc no puede ser el mecanismo responsable de la represión catabólica.

Experimentos sobre el transporte de glucosa (Hogema *et al*., 1998) han proporcionado una explicación para este fenómeno. La glucosa entra en la célula a través del sistema fosfotransferasa (PTS por sus siglas en inglés: *PhosphoTransferase System*). Una de las enzimas en la vía es la IIA (Glc), una proteína que se fosforila y desfosforila alternativamente durante el transporte de glucosa, ya que proporciona el grupo fosfato para producir glucosa 6-fosfato. En su estado no fosforilado, la enzima IIA causa la exclusión del inductor de lactosa mediante la unión a la escasa lactosa permeasa presente en la membrana celular, lo que significa que el operón lac no se puede encender mientras que la glucosa está siendo transportada.

Una vez más, las mutaciones sirven para definir el papel del nuevo elemento regulador en el operón lac. Las mutaciones situadas en la región promotora eximen a la célula de la necesidad de AMPc, lo que ocasiona que las células se vuelvan insensibles a la represión catabólica. Otro tipo de mutación bien localizada y que está lejos del operón lactosa dio como resultado la incapacidad de AMPc para activar el operón lactosa; este nuevo sitio genético (*crp*) codifica para una proteína, a la cual se le han otorgado varias denominaciones como la proteína de activación de catabolitos (CAP por sus siglas en inglés: *catabolite activation protein*, proteína del receptor de AMPc (CRP por sus siglas en inglés: *cAMP receptor protein*), o gen de la proteína de activación catabólica (CGA por sus siglas en inglés: *catabolite gen activation protein*). El requerimiento de esta proteína también podía ser liberado por mutaciones localizadas en la región promotora. La CRP y restos de

cAMP actúan como elementos reguladores positivos de control debido a que en su ausencia la transcripción no puede ser aumentada por encima de los niveles basales.

Experimentos de unión a proteínas han demostrado que el represor lac se une a tres sitios dentro de la región del operón lac: O_1 es el sitio operador original, O_2 es un sitio dentro del gen *lacZ* en sí y O_3 es un sitio de 92 pb rio arriba cerca del sitio de unión a AMPc. La configuración más estable es cuando un tetrámero de proteína represora puede unirse a O_1 así como también a O_2 y O_3 de manera simultánea. Esta unión provoca la formación de una estructura en forma de U constituida por la hélice de DNA y que hace al promotor no disponible a la RNA polimerasa.

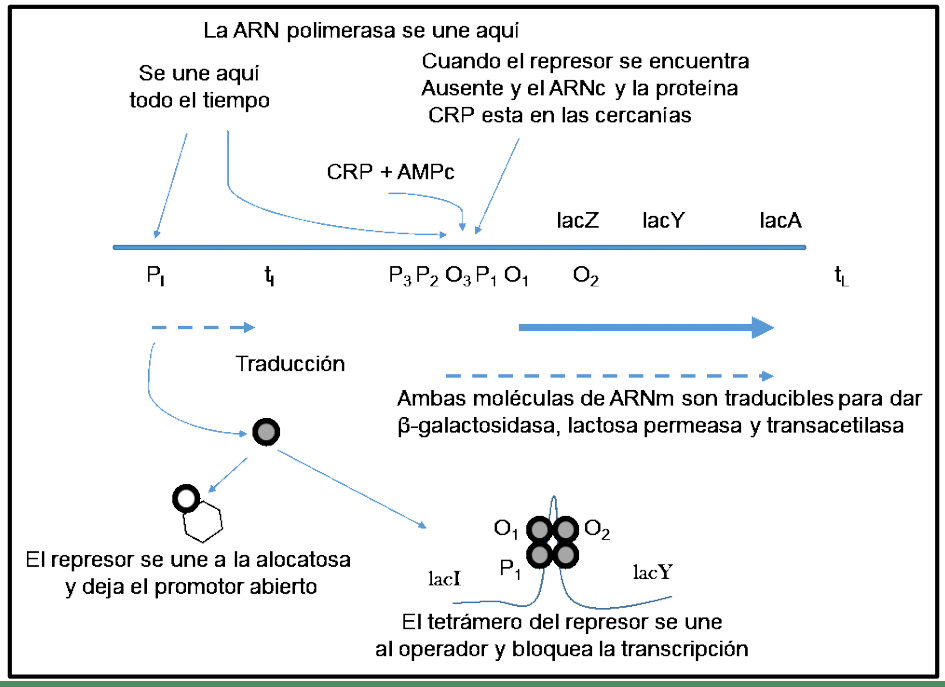


Figura 2. Regulación del operón lactosa. Las líneas azules representan DNA de doble cadena en la región del operón lac. Las flechas horizontales representan los transcritos de mRNA. Los sitios promotores se indican por P, los sitios de terminación de la transcripción se indican por t, y los sitios de unión del represor se indican por O. El transcrito lacI se sintetiza en todo momento, pero la proteína represora resultante es sólo activa en ausencia de alolactosa. Un tetrámero represor activo se une a O1 y O2 u O3 para formar un bucle que bloquea el acceso a la región promotora 1. Incluso si el promotor 1 está accesible, la RNA polimerasa se unirá sólo cuando AMPc y las proteínas CRP están presentes. Los promotores 2 y 3 son activos en niveles bajos en todo momento y proporcionan la síntesis de fondo de mRNA.

Tomado de http://www.ebi.ac.uk/biomodels-main/static-pages.do?page=ModelMonth%2F2006-12

Ahora bien, este evento génico, la transcripción, puede ser sujeto de modulación a través de proteínas que establecen contacto con la secuencia que está siendo codificada por la RNA polimerasa, que sería el complejo AMPc-CAP.

Entonces en resumen, el complejo AMPc-CAP es capaz de unirse a una secuencia específica del DNA y promover la transcripción de los genes involucrados en el metabolismo de la lactosa. Aunque los elementos reguladores positivos y negativos están presentes, el operón lac se considera que está bajo control negativo, porque se produce una proteína represora. El gen *lacI* no es parte del operón lac, ya que tiene su propio promotor y secuencias de terminación. Normalmente se expresa constitutivamente en un nivel bajo.

Como se señaló anteriormente, varias mutaciones causan un aumento considerable en la cantidad de represor producido, de tal manera que podemos incluir éstas dentro del diseño de un plásmido para manipular la expresión del operón. El gen *lacZ* juega un papel importante en la biología molecular, ya que se utiliza con frecuencia como un indicador de la actividad de un operón, es decir como gen reportero, en un sitio adyacente al promotor y operador en estudio debido a que es muy estable y rápida de ensayo con reacciones colorimétricas.

3.1.2. El operón de triptófano

Ahora vamos a revisar otro ejemplo de este tipo de regulación en procariontes, el operón del triptófano.

La biosíntesis de este aminoácido es un proceso complejo que se inicia con el ácido corismático compuesto, un producto de las enzimas codificadas por los arogenes, y es catalizada por enzimas cuyas tres subunidades están codificadas dentro de los cuatro genes (A-E). Los productos de los genes *trpA* y *trpB* forman la enzima triptófano sintetasa, y los productos de los genes *trpE* y *trpD* forman la enzima antranilato sintetasa. El gen *trpC* codifica para la enzima indol-glicerofosfato sintetasa.

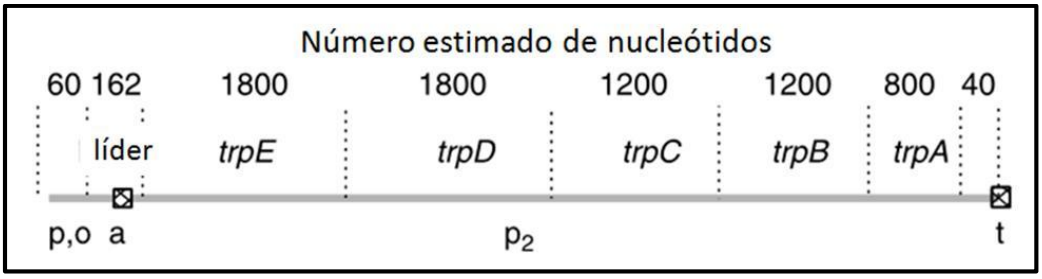


Figura 3. Estructura del operón triptófano. Se muestra la posición de cada uno de los genes que conforman el operón.
Modificado de Birge, 2006.

El mapa génico de *E. coli* del operón trp parece convencional, aunque los genes estructurales están dispuestas en orden alfabético inverso. El gen *trpR*, que codifica para una proteína represora, se encuentra a cierta distancia del operón que regula. Una vez más, las mutaciones han permitido identificar un promotor discreto y los sitios del operador, en este caso el operador se encuentra dentro del promotor. La fuerza del promotor se ve afectada por dos bloques ricos en Adenina y Timina localizados corriente arriba a partir del promotor (en -50 y -90). La supresión de estas regiones reduce en gran medida la eficiencia del promotor.

A pesar de su similitud con el operón de lactosa, el operón trp tiene varias características genéticas nuevas. A diferencia de los operones de carbohidratos, no hay participación de cAMP o CRP en esta regulación. En su lugar, hay una regulación de la producción de enzimas biosintéticas acorde con la cantidad de triptófano disponible en la célula. Esta regulación requiere de un método de detección de la presencia de triptófano en el citoplasma y de detener la transcripción del mRNA siempre que la concentración de triptófano sea lo suficientemente alta.

Estudios de unión demuestran que la proteína represora, codificada por el gen *trpR*, es un co-represor y no se une al operador trp a menos que esté formando un complejo con el triptófano. Por lo tanto, la formación del complejo inhibidor es dependiente de la presencia del producto final de la ruta bioquímica, el triptófano. El complejo represor compite directamente con la RNA polimerasa por la unión con el promotor. En un experimento donde se realizó un inmunoensayo con células que tenían un suministro excesivo de triptófano, se detectó la presencia de 120 dímeros del represor, pero en ausencia de triptófano hay 375 dímeros del represor, la mayoría de los cuales no son funcionales debido a la falta de triptófano.

Cabe señalar que el triptófano también actúa como un efector alostérico que inhibe directamente la enzima antranilato sintetasa, proporcionando de este modo dos niveles de regulación. Cuando el triptófano está presente en exceso, la primera etapa enzimática en la vía bioquímica se bloquea, y el complejo represor recién formado impide aún más la síntesis del mRNA. La represión del operón reduce la cantidad de enzima presente alrededor de 70 veces.

Charles Yanofsky y su equipo de trabajo identificaron otro mecanismo de regulación. En casi todas las moléculas de mARN hay una región llamada **secuencia líder**, localizada antes que el código para el primer producto del operón. Esta secuencia en *E. coli* consta de 162 pb que se extiende entre el extremo de la región del promotor-operador y el codón de inicio de la traducción para el gen *trpE*. A este sitio se le ha denominado sitio atenuador trpEa.

Esta región es capaz de adoptar dos estructuras alternativas de horquillas, una inhibe la transcripción y otra la favorece.

Cuando la concentración de triptófano es adecuada, se transcribe el mRNA de la secuencia líder y se forma una horquilla que impide la unión de la RNA polimerasa. Cuando el triptófano escasea también se forma una horquilla alternativa que no impide que se una la RNA polimerasa y de este modo continúa la transcripción.

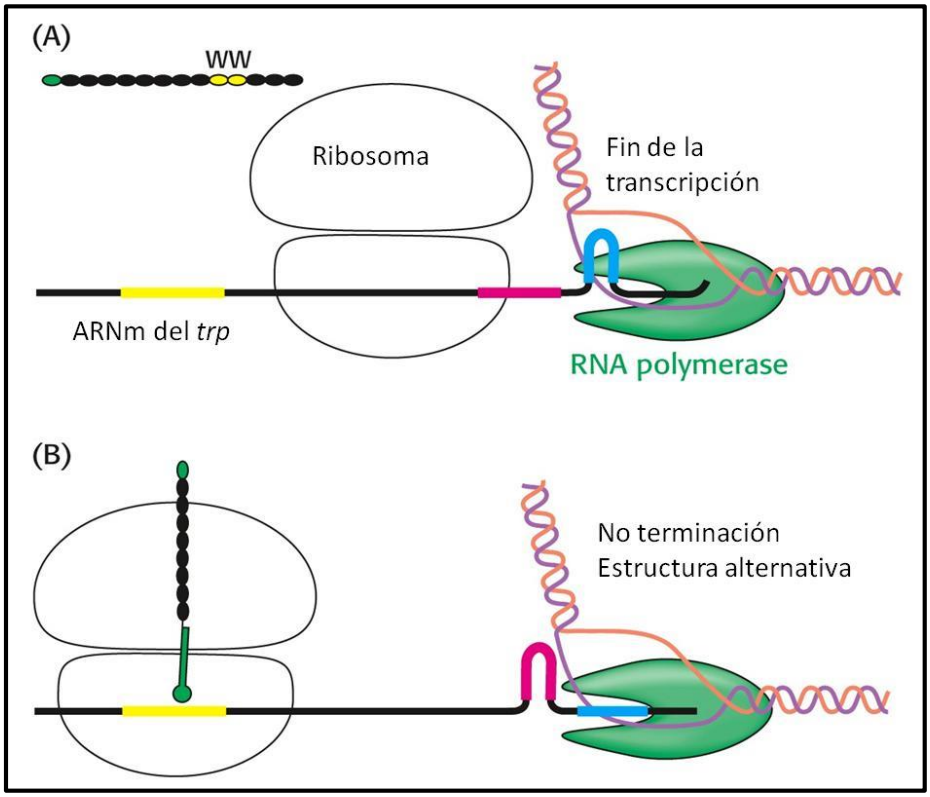


Figura 4. Mecanismo de atenuación del operón de triptófano. (A) Inhibición de la transcripción con la presencia de triptófano y (B) Transcripción a bajas concentraciones de triptofano.

Modificado de Stryer et al., 2003.

El análisis de la secuencia del RNA ha demostrado que puede doblarse en varias formas inmediatamente después de la transcripción, para producir las diversas estructuras de tallo-bucle. Al comienzo del primer bucle de potencial (27-68 bases) hay un marco de lectura abierto que codifica para un pequeño polipéptido de 14 aminoácidos. Entre los aminoácidos que aparecen en este polipéptido se encuentran dos residuos de triptófano adyacentes cerca del extremo carboxilo terminal. El triptófano es un aminoácido relativamente poco

usado, por lo que encontrar dos residuos de triptófano continuos es muy raro. Yanofsky y sus colegas sugirieron que este polipéptido es la clave para la regulación por atenuación.

Únicamente cuando conoces el mecanismo que regula el operón en el que está involucrada tu proteína de interés, puedes realizar modificaciones para que los represores, operadores o inductores participantes actúan de acuerdo a lo que se desea obtener.

3.2. Purificación de proteínas recombinantes

Ahora que ya hemos revisado algunas estrategias que pueden ser empleadas para incrementar la expresión de proteínas recombinantes, vamos a estudiar algunos métodos que se emplean para obtener las proteínas recombinantes de una manera más pura, ya que las técnicas de purificación tradicional no son lo suficientemente efectivas para este fin.

Una proteína recombinante con alta pureza debe ser diseñada desde su secuencia, teniendo en cuenta los puntos que ya hemos revisado en las unidades anteriores sobre la optimización.

Ya en el momento de la expresión y purificación de la proteína es importante considerar los siguientes puntos:

- Identificar la fase de crecimiento en la cual se sintetiza en mayor proporción la proteína recombinante, para intentar mantener el cultivo en esa fase.
- Agregar agente inductor o represor en la etapa de crecimiento adecuada para obtener la mayor cantidad de proteína recombinante.
- Definir los objetivos de la purificación: grado de pureza, cantidad y nivel de actividad requeridos.
- Seleccionar el material biológico de inicio que dependerá de la localización de la proteína tanto en tejidos como en compartimentos subcelulares.
- Desarrollar una técnica de análisis para la determinación de la pureza, actividad o contenido total de proteína.
- Minimizar la manipulación de la muestra.
- Remover desde el inicio, posibles contaminantes: por ejemplo proteasas
- Reducir el uso de aditivos.
- Apoyarse en el uso de técnicas diferentes en cada paso: Para ello se debe considerar las propiedades fisicoquímicas de la proteína.
- Minimizar el número de pasos.

Una vez que se ha obtenido la proteína recombinante, hay que aislarla del medio de cultivo y purificarla para eliminar las partes del microorganismo que no se desean. Un punto crítico involucra el conocimiento de la localización a nivel celular de la proteína, ya que dependiendo de su residencia es que se realizarán técnicas en particular para su purificación. Es necesario conocer si es una proteína membranal o si es el caso de que sea soluble, probablemente esté localizada en el citosol.

La parte final de aislamiento y purificación de la proteína recombinante, puede realizares de muchas maneras:

- **Purificación por gradiente**. En el caso de que las proteínas de interés sean membranales, se puede utilizar la técnica de centrifugación diferencial, donde la primera fase de centrifugación a 5000 x g permite eliminar células completas y otros restos celulares de gran tamaño y el sobrenadante se somete a una segunda centrifugación a 100,000 x g para recuperar la fracción membranal.

Enlace

La técnica de purificación por gradiente ya fue estudiada en la asignatura de Biología Molecular 2, por lo que ahora analizaremos otras técnicas de purificación que pueden ser aplicadas en la producción de proteínas recombinantes.

3.2.1. Cuerpos de inclusión

En la producción de proteínas recombinantes se utilizan preferentemente a las bacterias como organismos productores, ya que éstos permiten diseñar procesos de producción rápidos y de bajo coste.

Dentro de estos microorganismos se lleva a cabo un fenómeno de agregación, el cual se desarrolla cuando las bacterias se enfrentan a un estrés celular, tal como el que se da cuando son forzadas a producir la proteína de interés en concentraciones elevadas. Como consecuencia de la situación de estrés, las proteínas que se van produciendo se acumulan en forma de unos agregados insolubles que denominamos cuerpos de inclusión.

Cuerpos de inclusión

Se definen como agregados proteicos densos, refráctiles, altamente hidratados, resistentes a algunos detergentes, cilíndricos y de medida variable.

Se creía que todos estos agregados estaban formados por proteínas inactivas, lo que restringió de manera notable el espectro de proteínas comercializadas, ya que la forma inactiva no es útil, sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que no en todos los casos las proteínas se encuentran inactivas.

Figura 5. Cuerpos de inclusión. Se muestra una micrografía de E. coli con cuerpos de inclusión formados por la cadena pesada del anticuerpo MAK 33, se observan como estructuras de gris pálido.

Tomado de http://web.mnstate.edu/provost/Advancesproteinrefolding.pdf

En la actualidad existen protocolos donde los cuerpos de inclusión se purifican y en algunos casos se puede transformar a la proteína de inactiva a activa, haciendo a éstos elementos herramientas que favorecen el proceso de purificación de proteínas.

Los cuerpos se forman porque la proteína se produce en grandes cantidades y la bacteria no puede hacer el plegamiento del péptido porque carece de los elementos necesarios,

esto considerando que se trata de una proteína de origen eucarionte; y otro aspecto puede ser porque no se forman correctamente los puentes disulfuro necesarios para darle la estabilidad que requiere la proteína. Para resolver este punto, una estrategia es utilizar agentes desnaturalizantes, como aquellos que modifican los puentes disulfuro, donde se puede promover su ruptura y evitar la formación de nuevos enlaces.

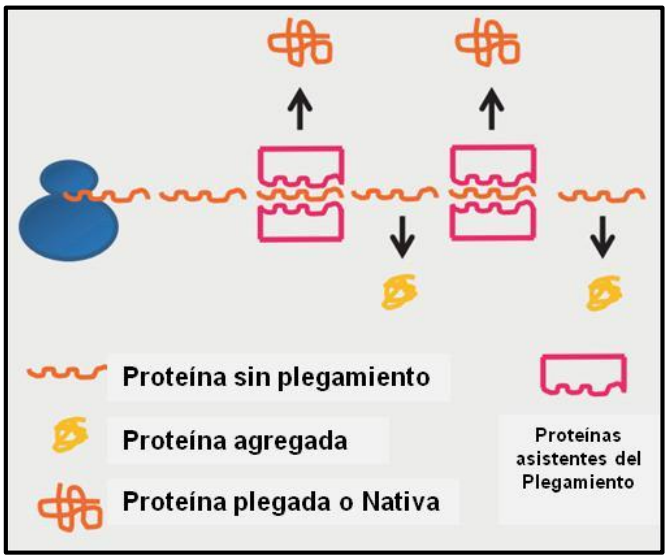


Figura 6. Mecanismo de plegamiento proteico. Se ilustra el proceso de traducción proteica y los posibles arreglos estructurales que se presentan para las proteínas recombinantes.

Modificado de Marco, 2013.

Por lo tanto, la técnica para purificar cuerpos de inclusión incluye los siguientes pasos:

Purificación por cuerpos de inclusión

1. Separar por centrifugación los cuerpos de inclusión del resto de la célula.
2. Lavar con soluciones que contienen desnaturalizantes como la urea, sacarosa o detergentes para reducir los niveles de contaminantes.
3. Solubilizar los cuerpos usando agentes caotrópicos a través de un proceso conocido como extracción.
4. Restablecer la estructura terciaria de la proteína mediante un paso de renaturalización, que consiste en la disminución de la concentración de este agente por diálisis, dilución directa o empleando una columna cromatográfica.

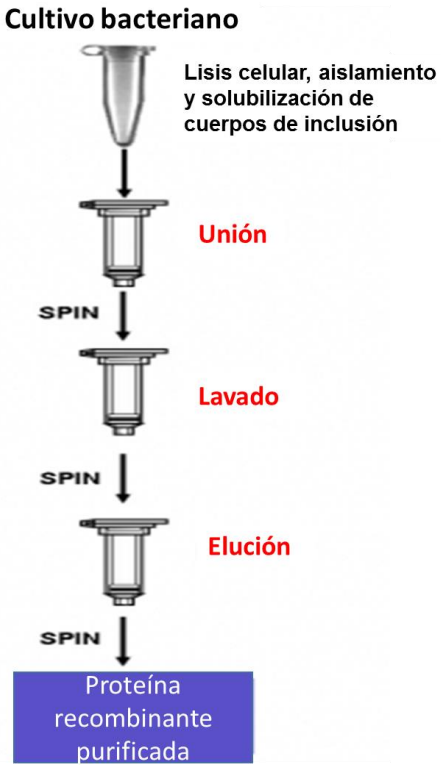


Figura 7. Esquema de purificación de cuerpos de inclusión. Se muestra el fundamento de la técnica de purificación de cuerpos de inclusión de un kit comercial.

Modificado de http://www.biosyn.com/sample-preparation-kit/product/proteospin-inclusion-body-protein-isolation-micro-kit.aspx

3.2.2. Cromatografía

Una técnica que se puede aplicar para la purificación de proteínas y que permiten diferenciarlas por su superficie, forma, tamaño, carga o reactividad que presentan, es la cromatografía.

Cromatografía

Es una técnica que permite la separación de moléculas diferentes presentes en una misma muestra. El método está basado en la circulación de una fase móvil que arrastra a la mezcla de compuestos a separar, a través de una fase estacionaria. Dependiendo de la afinidad relativa que por ambas fases tengan los distintos compuestos presentes en la mezcla resultará su separación.

Existen distintos tipos de cromatografía dependiendo de la propiedad que consideran en la proteína para su separación:

- **Cromatografía de exclusión**

También llamada filtración en gel o de tamiz molecular, se basa en la separación de la proteína de acuerdo a su tamaño. Es una de las técnicas más sencillas de las empleadas en la separación de proteínas, la cual se realiza en columnas cilíndricas rellenas con algunos de los geles que pueden ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Todos estos geles componen lo que se denomina como fase estacionaria, la cual está constituida por gránulos o partículas de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado. Cuando se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel, aquellas moléculas con un tamaño mayor que el diámetro de los poros de las partículas, sólo podrán moverse en su camino, a través de la fase estacionaria, en el espacio que queda entre las partículas; y por lo tanto, no se verán retrasadas en su descenso. En cambio aquellas moléculas capaces de penetrar en las partículas se verán retrasadas por la fase estacionaria; en mayor medida, cuanto menor sea su tamaño. Por lo tanto, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular.

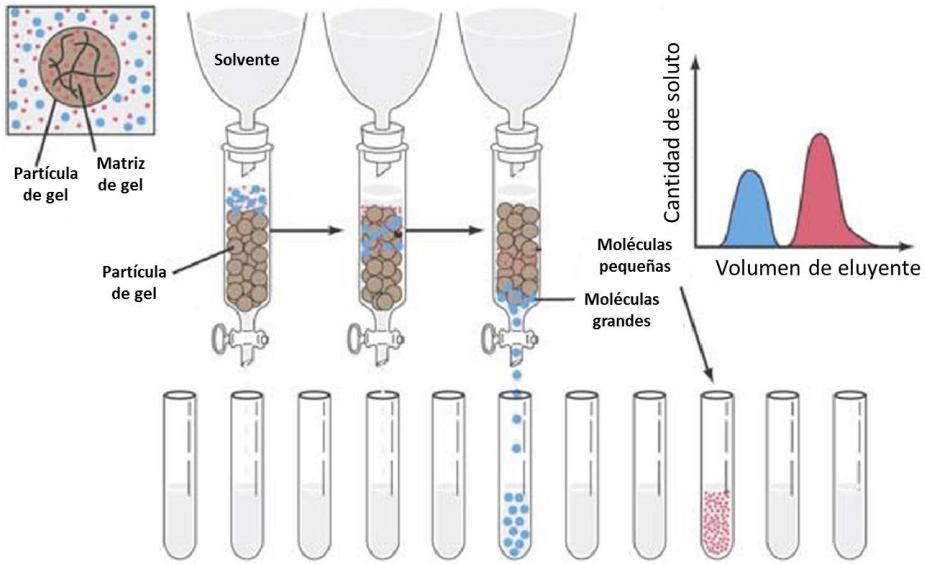


Figura 8. Cromatografía por exclusión. Se muestra la separación de las proteínas por su tamaño, eluyendo primero las moléculas más pequeñas y posteriormente las grandes.

- **Cromatografía por intercambio iónico**.

La carga de una proteína depende de su contenido de aminoácidos. En este caso la fase estacionaria insoluble lleva en la superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil, la cual suele ser una disolución acuosa con cantidades moderadas de metanol u otro disolvente orgánico miscible con agua que contiene especies iónicas generalmente en forma de buffer. Los iones de ésta compiten con los analitos por los sitios activos de la fase estacionaria. De esta manera las moléculas cargadas se adhieren a los intercambiadores de forma reversible y dichas moléculas pueden ser asociadas o disociadas cambiando el ambiente iónico. La separación mediante intercambiadores iónicos se realiza por lo general, en dos fases: en la primera las sustancias a separar se unen al intercambiador utilizando condiciones que originan una unión fuerte y estable; a continuación, se eluye de la columna con buffers de diferentes pH o diferente fuerza iónica, compitiendo los componentes del buffer con el material por los sitios de unión

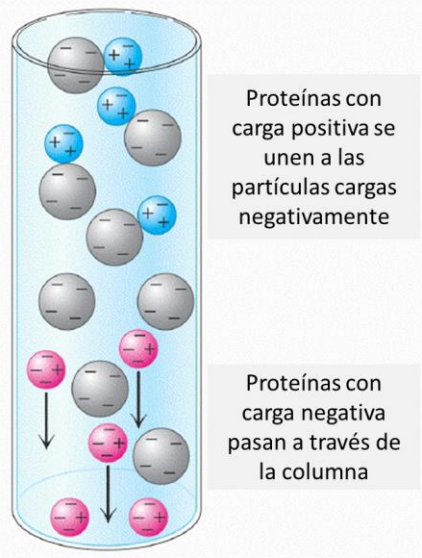


Figura 9. Fundamento de la cromatografía por intercambio iónico. Se muestra una fase estacionaria con carga negativa, a la cual se unen únicamente las proteínas cargadas positivamente y las de carga negativa fluyen a través de la columna.

Modificado de http://ecovi.tripod.com/id19.html

- **Cromatografía de afinidad.**

Este tipo se basa en la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando. En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido covalentemente a la matriz de la columna. Después de que las proteínas que no se unen al ligando son lavadas o eluidas a través de la columna, la proteína de interés que ha quedado retenida en la columna se eluye o libera mediante el empleo de una solución que contiene un ligando libre u otro compuesto que rompa la interacción entre el ligando y la proteína.

Se pueden emplear diferentes tipos de ligandos como los anticuerpos, que se enlazan reversiblemente a un solo soluto, y los ligandos generales enlazados con un determinado grupo de compuestos bioquímicos, como las lectinas y nucleótidos.

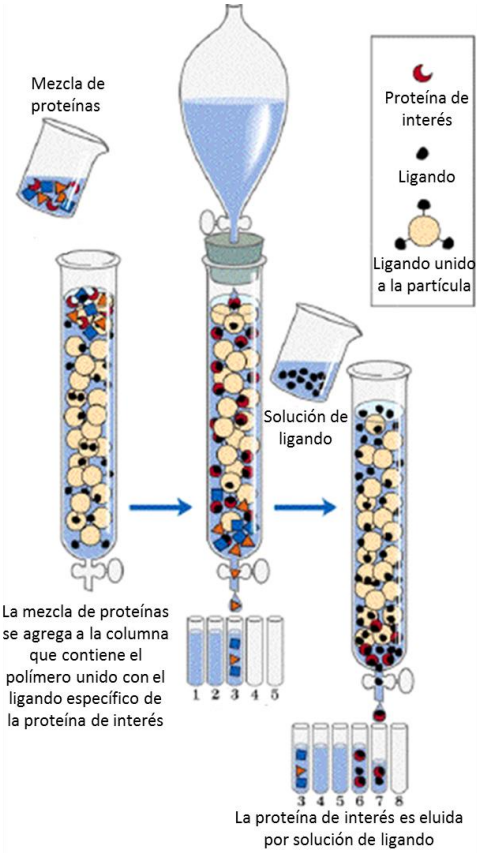


Figura 10. Cromatografía de afinidad. Una mezcla de proteínas se agrega a una columna que contiene partículas de polímero unidas a un ligando que es específico de la proteína de interés. Las proteínas que no tengan afinidad por el ligando eluirán, mientras que las otras se unirán al ligando y serán eluidas con una solución que permitan sustituir la unión específica formada.

Modificado de http://ecovi.tripod.com/id16.html

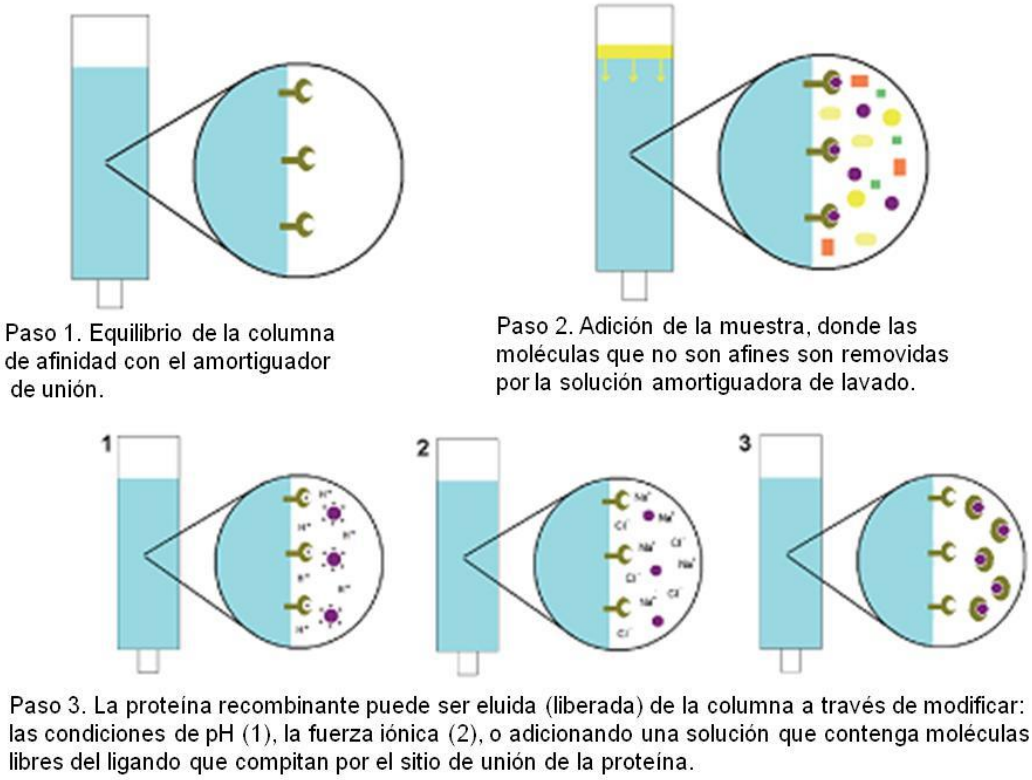


Figura 11. Cromatografía de afinidad con anticuerpos. Se ilustra los pasos básicos para desarrollar una purificación utilizando anticuerpos como ligados, que incluyen el equilibrio de la columna (1), adsorción y lavado (2) y desorción (3).

Tomado de Coelho et al 2012.

En muchos casos, si la proteína no tiene alguna característica particular que le permita ser separada por cromatografía de afinidad, se puede modificar genéticamente para que al momento de su expresión presente marcajes moleculares que permitan su purificación. Los marcajes moleculares más ampliamente utilizados son pequeños polipéptidos, pequeñas proteínas o enzimas adicionadas al amino o al carboxilo terminal de una proteína recombinante. Las características bioquímicas de los diferentes marcajes influencian la estabilidad, solubilidad y expresión de las proteínas a las cuales están unidas. Lo anterior se consigue con el uso de vectores de expresión que incluyen dichos marcajes moleculares de fusión, como pueden ser: colas de polihistidinas y de Glutatione-S-Transferasa (GST) entre otras.

Los pasos básicos para la purificación de proteínas por cromatografía, sin importar su tipo, incluyen:

Cromatografía

1. Empacar la columna.
2. Equilibrar la columna.
3. Aplicar la muestra.
4. Lavar la columna.
5. Eluir la muestra.
6. Fraccionar el eluato.
7. Detectar y cuantificar la proteína de interés.

Con todos los fundamentos que hemos revisado, tienes las bases para producir una proteína recombinante utilizando un sistema procarionte, pero recuerda que todas las metodologías dependen de las características de la proteína de interés, así que es muy importante estudiarla y conocer todas sus propiedades.

Actividades

La elaboración de las actividades estará guiada por tu docente en línea, mismo que te indicará, a través de la *Planificación de actividades*, la dinámica que tú y tus compañeros (as) llevarán a cabo, así como los envíos que tendrán que realizar.

Para el envío de tus trabajos usarás la siguiente nomenclatura: BGMB _U3_A1_XXYZ, donde BGMB corresponde a las siglas de la asignatura, U3 es la etapa de conocimiento, A1 es el número de actividad, el cual debes sustituir considerando la actividad que se realices, XX son las primeras letras de tu nombre, Y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno.

Autorreflexiones

Para la parte de **autorreflexiones** debes responder las *Preguntas de Autorreflexión* indicadas por tu docente en línea y enviar tu archivo. Cabe recordar que esta actividad tiene una ponderación del 10% de tu evaluación.

Para el envío de tu autorreflexión utiliza la siguiente nomenclatura: BGMB _U3_ATR _XXYZ, donde BGMB corresponde a las siglas de la asignatura, U3 es la etapa de conocimiento, XX son las primeras letras de tu nombre, y la primera letra de tu apellido paterno y Z la primera letra de tu apellido materno

Cierre de Unidad

Durante la presente Unidad se describieron los mecanismos de regulación genética en procariontes con objeto de identificar su potencial de aplicación en la biotecnología. Por ello, se discutió el funcionamiento de los operones de lactosa y triptófano. Lo anterior permitió contar con las bases moleculares necesarias para comprender la utilidad de emplear estos operones en las estrategias de clonación para la generación de proteínas recombinantes.

La segunda parte de esta revisión consistió en conocer los procedimientos generales que están involucrados para la obtención de las proteínas recombinantes, implícitamente este conocimiento provee la habilidad de poder visualizar las variantes que pueden subyacer en los mismos y que es la práctica o experiencia del trabajo de laboratorio lo que va a determinar el protocolo más adecuado.

Para saber más

Regulación genética en bacterias:
https://www.youtube.com/watch?v=23WPCB5q6aM

Operón lac:
https://www.youtube.com/watch?v=S1j1SzG7Gng
https://www.youtube.com/watch?v=pVgpUufUYCo

Operón del triptófano:
https://www.youtube.com/watch?v=wxvVIayhICs
https://www.youtube.com/watch?v=wjgatDyV5hY
https://www.youtube.com/watch?v=1jwVA7i_TRc

Obtención de proteínas recombinantes:
https://www.youtube.com/watch?v=8pZj91mkXI8

Purificación de proteínas por cromatografía:
https://www.youtube.com/watch?v=HRNVyGTZPk4
https://www.youtube.com/watch?v=CrjinCHGbjk
https://www.youtube.com/watch?v=Vo_-Zov2NEE
https://www.youtube.com/watch?v=COfNRENxGw8
https://www.youtube.com/watch?v=Na2RCXwneYI

Cuerpos de inclusión:
http://www.uab.cat/PDF/PDF_1096483256935_es.pdf

Obtención de proteínas recombinantes:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382011000200006&script=sci_arttext

Fuentes de consulta

Birge E. A. (2006). *Bacterial and Bacteriophage Genetics*. 5a Edición. Tempe. Springer.

Coelho L. C. B. B., Santos A. F. S., Napoleão T. H., Correia M. T. S. y Paiva P. M. G. (2012). *Protein Purification by Affinity Chromatography, Protein Purification*, Dr. Rizwan Ahmad (Ed.), Shanghai, InTech China.

Hogema BM, Arents JC, Bader R, Eijkemans K, Inada T, Aiba H, Postma PW. (1998). *Inducer exclusion by glucose 6-phosphate* in Escherichia coli. Mol. Microbiol. 28: 755–765.

Stryer L., Berg J. M., Tymoczko J. L. (2003) *Bioquímica*. Barcelona, Reverté.2006. Nature Biotech. 24:769-776.