

## Solubilización y renaturalización de la fusión superóxido dismutasa humana y proquimosina de ternero sintetizada en *Saccharomyces cerevisiae*

R. E. NARCIANDI, E. RODRÍGUEZ, I. TORRENS, A. SANTOS, J. MORALES y L. HERRERA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en noviembre de 1989

Aprobado en junio de 1990

### RESUMEN

La proquimosina de ternero fusionada al gen de la superóxido dismutasa humana (SOD) fue sintetizada en forma insoluble en *Saccharomyces cerevisiae*.

Las condiciones que permiten la solubilización de la proteína fueron investigadas, siendo la desnaturación el proceso esencial mediante el cual es solubilizado más del 90 % del producto recombinante.

Se estudiaron diferentes parámetros que intervienen en el proceso de renaturalización de la SOD-proquimosina, describiéndose un procesamiento mediante el cual es posible recuperar el 25 % de la proquimosina soluble en su forma nativa.

Más del 98 % de la proteína fue activada, obteniéndose un preparado enzimático cuya función biológica fue determinada mediante el proceso de coagulación de la leche.

### SUMMARY

Calf prochymosin fused to Human Superoxide Dismutase (SOD) gene was synthesized in an insoluble form in *Saccharomyces cerevisiae*. The conditions that permit the protein solubilization were investigated. It was shown that denaturation was the essential process for solubilization of up to 90% of this recombinant product.

The effect of different parameters on the renaturation of the synthesized prochymosin was studied. More than 25% of prochymosin was recovered in its native form by using the method described in this work.

On the other hand, more than 98% of the recovered protein was activated, an enzymatic extract was obtained and its biological activity was determined by milk-clotting assay.

### INTRODUCCION

La proquimosina (365 aa) es el precursor de una proteasa ácida obtenida del cuerno estómago de los terneros jóvenes denominada quimosina (325 aa), la cual se caracteriza por presentar una alta actividad coagulante conjuntamente con una baja actividad proteolítica, por lo que es ampliamente utilizada en la industria quesera (Beppu, 1983). Su obtención por vía recombinante ha generado un considerable interés por su amplia aplicación comercial y limitada disponibilidad.

La clonación y expresión de la proquimosina de ternero ha sido realizada en diferentes organismos como *Escherichia coli*

(Emtage *et al.*, 1983; Nishimori y Shimizu, 1984) y *Saccharomyces cerevisiae* (Goff y Moir, 1984), obtenida en la mayoría de los casos de forma insoluble e inactiva.

Proteínas auténticas expresadas de forma insoluble pueden ser desnaturalizadas y renaturalizadas *in vitro* con poca pérdida de actividad, por lo que estos procesos han sido utilizados para producir polipéptidos eucarióticos biológicamente activos, incluyendo proteínas que presentan estructuras complejas (Winkler *et al.*, 1985).

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos al realizar el estudio de los diferentes parámetros que influyen en los procesos de solubilización y renaturalización de la proquimosina de ternero fusionada a la superóxido dismutasa humana (SOD-proquimosina) (Torrens *et al.*, 1990).

## MATERIALES Y METODOS

### Cepa y plasmidio utilizado

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2202 ( $\alpha$ , leu 2-3, leu 2-112, ura 3-52, his 4-519) y el plasmidio pYQ 60 fueron descritos previamente (Torrens *et al.*, 1990).

### Condiciones de crecimiento

Las células fueron cultivadas en 200 ml de medio mínimo GO (Galzy y Slonimski, 1957), suplementado con 2 % de sacarosa e hidrolizado ácido de caseína al 1 %.

Las condiciones de cultivo fueron: agitación a 250 rpm y temperatura de 30°C a nivel de zaranda (modelo G-25, New Brunswick Scientific Co. Inc.). En la fase de crecimiento exponencial, 500 ml de cultivo fueron transferidos a un fermentador de 7,5 l de volumen total (B.E. Marubishi), conteniendo 5 l de medio GO suplementado con 5 % de sacarosa y 1 % de hidrolizado ácido de caseína. El cultivo *batch* fue aerado con 5 l/minuto de aire, agitado a 350 rpm y la temperatura fue controlada a 30°C. El pH fue

controlado a 5,0 por adición de NaOH 2 N y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2 N. Cada fermentación fue cultivada durante 34 horas.

### Procedimiento de ruptura

Las células procedentes de 5 l de cultivo fueron aisladas por centrifugación a 3500 rpm y 4°C de temperatura, y a continuación fueron resuspendidas en 5 volúmenes (200 g/l) de buffer de ruptura conteniendo por litro: Tris 12,1 g, sacarosa 100 g, NaCl 17,53 g, EDTA 1,86 g a pH 8 y lisadas mecánicamente, utilizando un molino de células (DYNOMIL-KDL, WAB, Suiza), con perlas de vidrio (0,25-0,5 mm de diámetro) y un tiempo de retención de 8 minutos. El debris celular fue obtenido por centrifugación.

### Solubilización y renaturalización de la SOD-proquimosina

Las proteínas insolubles fueron resuspendidas en buffer A (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, pH 10,7) conteniendo urea 8 M. Después de incubar la solución 1 hora a 37°C, el material insoluble fue removido por centrifugación y se añadieron 50 mM de NaCl a la solución de SOD-proquimosina, la cual fue diluida a 0,4 M urea, utilizando 19 volúmenes de buffer A. El pH se mantuvo en 10,7 durante todo el proceso.

Después de mantener la SOD-proquimosina renaturalizada en reposo a 4°C, el pH fue ajustado a 7,5 con HCl 2 N y el material insoluble fue removido por centrifugación.

### Activación y determinación de la actividad coagulante de la enzima

La SOD-proquimosina fue activada según lo describen Goff y Moir, 1984. La actividad de la enzima fue evaluada de acuerdo con el procedimiento de Foltmann, 1970.

### Técnicas de determinación de proteínas y técnicas inmunológicas

La concentración de proteínas se determinó según el procedimiento descrito por Lowry *et al.* (1951) y la estimación de la concentración de proteína recombinante se realizó con la técnica de Inmunodot (Gershoni *et al.*, 1983).

El Western blot se realizó según Towbin *et al.*, 1979 y Burnette, 1981.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Solubilización de la SOD-proquimosina

La solubilización de la SOD-proquimosina contenida en el precipitado de la ruptura celular fue realizada durante 1 hora a 4°C, en presencia de diferentes agentes utilizando como buffer base  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 10,7. Como se muestra en la tabla 1, extremas condiciones de desnaturalización (1 % SDS, 8 M urea y 6 M cloruro de guanidina), fueron efectivas en la solubilización de la SOD-proquimosina, mientras que al utilizar 1 % Tween-80, 1 % Nonidet P-40, 5 M NaCl y 6 %  $\text{NaHCO}_3$ , solo se logra solubilizar menos del 5 % de la proteína de interés.

El efecto de la concentración de urea y la temperatura en la solubilización de la SOD-proquimosina, fue examinado (figura 1). Tal como se ha reportado anteriormente (Marston *et al.*, 1984; Kawaguchi *et al.*, 1987), la cantidad de proteína recombinante soluble aumenta al elevar la concentración del desnaturalizante, por lo que los mejores resultados fueron obtenidos al realizar la solubilización de la proteína utilizando 8 M de urea, lo cual demuestra que la SOD-proquimosina es expresada de forma insoluble, mientras que en todas las variantes elevar a 37°C la temperatura a la cual se realiza el proceso trae como consecuencia un aumento en el porcentaje de proteína recombinante soluble.

Tabla 1  
SOLUBILIZACION DE LA SOD-PROQUIMOSINA

Agentes solubilizantes	SOD-Proquimosina soluble (%)
1 % SDS	90-95
5 M NaCl	< 5
1 % TWEEN 80	< 5
8 M UREA	90-95
6 % $\text{NaHCO}_3$	< 5
1 % NP-40	< 5
6 M Gdm HCl	90-95

**Nota:** Las soluciones fueron preparadas utilizando como buffer base  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 10,7. La solubilización fue realizada durante 1 hora a 4°C. El porcentaje de SOD-proquimosina soluble fue estimado cuantitativamente mediante la técnica de Inmunodot.

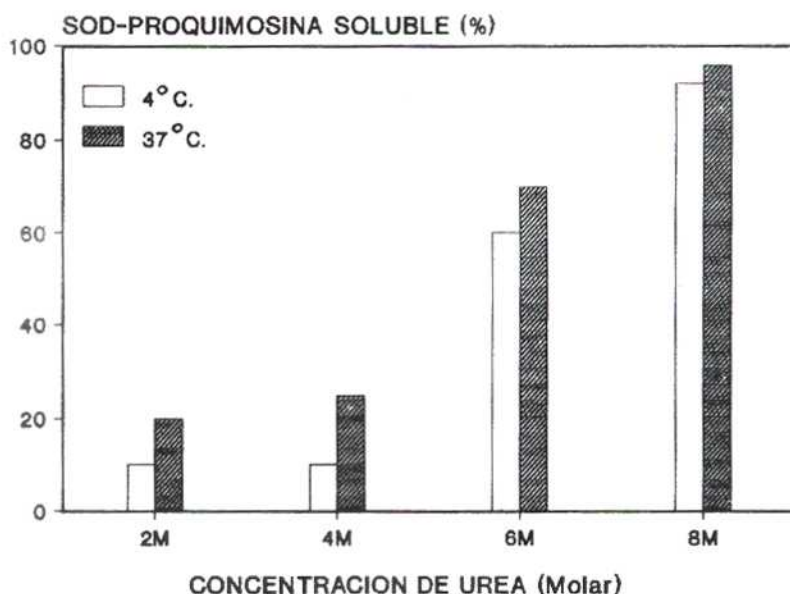


FIG. 1. Efecto de la concentración de urea y la temperatura en el proceso de solubilización de la SOD-proquimosina.

### Condiciones de renaturalización

Para determinar las condiciones óptimas que facilitan la renaturalización de la proteína de interés, se estudiaron diferentes factores, los cuales se conoce que afectan el rendimiento del proceso. Los factores estudiados fueron: concentración de proteína recombinante, utilización de agentes oxidantes y reductores, efecto de la dilución inicial y tiempo de dilución.

A continuación se discute detalladamente el efecto de cada uno de ellos.

### Concentración de la proteína recombinante

Uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta para obtener altos rendimientos en la renaturalización de una

proteína, lo constituye la concentración inicial de esta, utilizada en el proceso (Tsuji *et al.*, 1987).

La solución de SOD-proquimosina soluble fue ajustada a una concentración que variaba desde 0,01 hasta 0,2 mg de proteína recombinante/ml de urea 8 M y diluida instantáneamente utilizando buffer A hasta alcanzar una concentración final de 4 M. A continuación, las soluciones fueron diluidas 10 veces durante 12 horas a 4°C utilizando buffer A y el pH controlado a 10,7. Al finalizar el proceso, la proteína renaturalizada fue activada a quimosina y se determinó la actividad coagulante de dichas soluciones (figura 2). Los mejores resultados fueron obtenidos al utilizar una concentración de 0,07 mg de SOD-proquimosina/ml de urea 8 M, valor en el cual el 20 % de la SOD-proquimosina inicial es recuperada en forma de quimosina

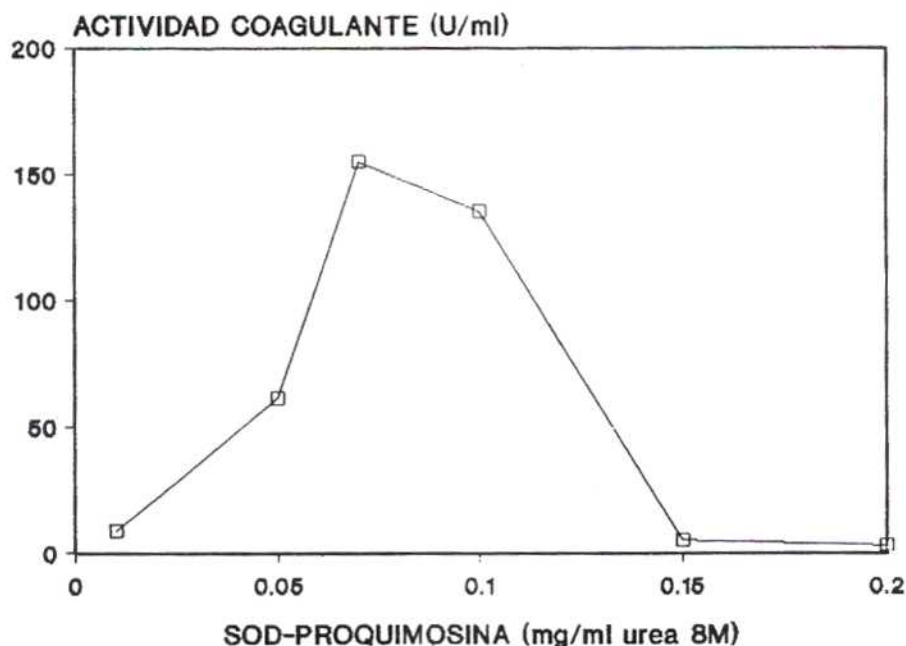


FIG. 2. Efecto de la concentración de SOD-proquimosina en el proceso de renaturalización.

activa, posiblemente porque en estas condiciones se favorecen las interacciones intramoleculares con respecto a las intermoleculares, de forma tal que se garantizan las condiciones para que ocurran los intercambios tioles disulfuros (Marston *et al.*, 1984). Concentraciones más elevadas provocaron una disminución en la eficiencia del procedimiento, lo que puede haber sido motivada por la formación de agregados durante el proceso de renaturalización a pH alcalino (Kawaguchi *et al.*, 1987), mientras que las bajas concentraciones traen como consecuencia la disminución en el recobrado, lo cual se refleja en el hecho de que la proquimosina es inestable en soluciones diluidas (Marston *et al.*, 1984).

### Agentes oxidantes y reductores

La introducción de agentes oxidantes y reductores en el proceso de renaturalización de proteínas recombinantes ha sido utilizado ampliamente con muy buenos resultados (Tsuji *et al.*, 1987; Weir *et al.*, 1987; Weir y Sparks, 1987).

La gráfica de la figura 3 muestra el comportamiento obtenido al ensayar la renaturalización de la SOD-proquimosina en condiciones similares al experimento anterior, utilizando en el buffer de dilución como agentes oxidantes 10 mM de glutatona oxidada (GSSG)/1 mM Glutatona reducida (GSH), 1,5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> y como agentes reductores 40 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) y 10 mM de Ditiotreitól (DTT).

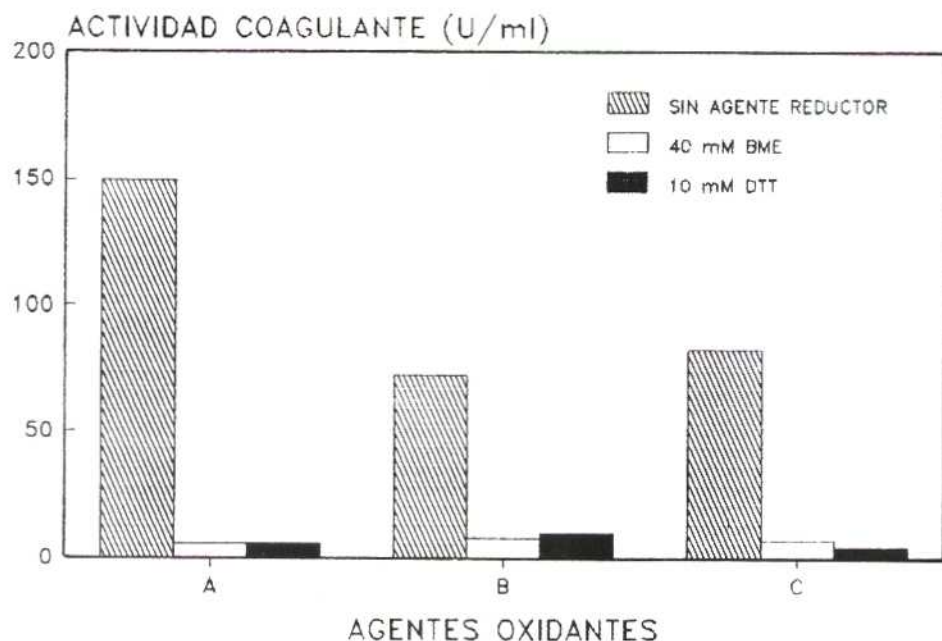


FIG. 3. Utilización de agentes oxidantes y reductores en la renaturalización de la SOD-proquimosina. **Abscisa:** actividad coagulante en U/ml; **ordenada:** agentes oxidantes: (A) sin agente oxidante (B) 10 mM GSSG/1 mM GSH (C) 1,5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>.

Se observa que la reducción de los enlaces disulfuros provoca una inhibición de la renaturalización de la SOD-proquimosina, independientemente de la utilización o no de agentes oxidantes, mientras que al realizar el proceso en ausencia de agentes reductores se logra la mayor cantidad de proteína en su forma nativa, lo que demuestra la capacidad que presenta la proquimosina de formar enlaces disulfuros nativos en ausencia de agentes tioles, ya que los intercambios tioles disulfuros son promovidos por los grupos tioles libres presentes en el polipéptido recombinante (Marston, 1986).

### Fases del proceso de renaturalización

Se determinó la influencia de la dilución inicial realizada de forma instantánea en el proceso de renaturalización, donde la concentración de urea contenida en la solución de SOD-proquimosina (8 M), fue disminuida rápidamente mediante la adición de buffer A hasta alcanzar concentraciones de 0,4; 2; 4 y 6 M de urea. Las soluciones obtenidas fueron diluidas lentamente a 0,4 M de urea durante 12 horas a 4°C y al final fue determinada la actividad coagulante de las mismas (tabla 2).

**Tabla 2**  
**INFLUENCIA DE LA DILUCION INICIAL**  
**RAPIDA EN EL PROCESO**  
**DE RENATURALIZACION**

Concentración → inicial urea (mol/l)	Actividad coagulante (U/ml)
0.4	53
2.0	96
4.0	154
6.0	178

**Nota:** La solución de SOD-proquimosina conteniendo urea 8 M fue diluida instantáneamente añadiendo buffer A hasta alcanzar la concentración final de urea deseada. La dilución final se realizó durante 12 horas a 4°C.

Se observa que una disminución brusca de la concentración del agente desnaturizante trae como consecuencia una disminución de la eficiencia del proceso de renaturalización, por lo que una pequeña

dilución de 8 M a 6 M garantiza las mejores condiciones para obtener una estructura secundaria que influya positivamente en la obtención final del estado nativo.

### Tiempo de dilución

Para determinar la influencia que ejerce la velocidad con que es disminuida la concentración del agente desnaturizante en la renaturalización, la SOD-proquimosina soluble contenida en la solución de urea 8 M es diluida de forma instantánea hasta alcanzar 6 M, a continuación fue diluida lentamente a 0,4 M de urea durante 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas a 4°C. Las soluciones obtenidas fueron activadas y finalmente se determinó la actividad coagulante.

Como se aprecia en la figura 4, es posible utilizar un tiempo que oscile entre 8 y 12 horas de dilución, lo cual asegura las mejores condiciones para obtener la mayor

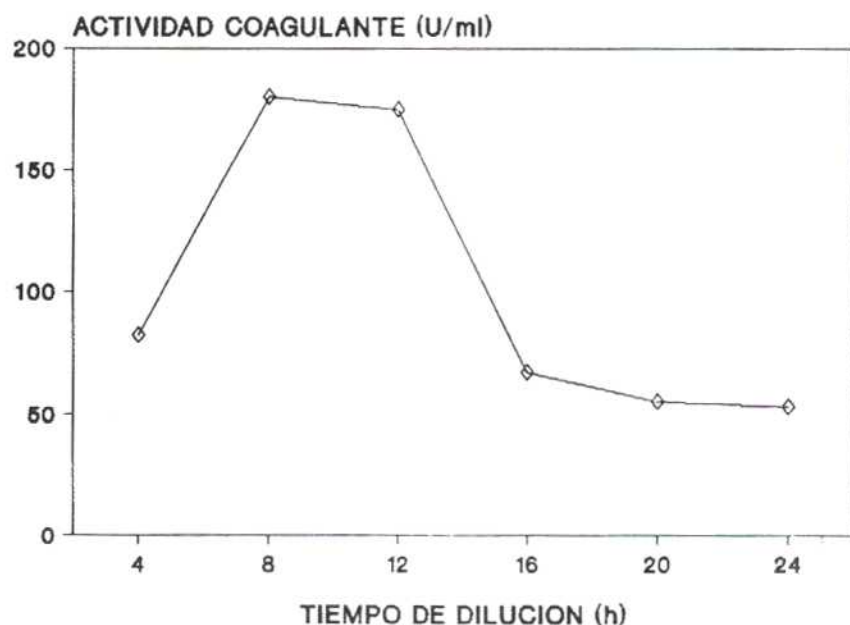


FIG. 4. Influencia del tiempo de dilución en la renaturalización de la SOD-proquimosina.

cantidad de proquimosina renaturalizada de forma correcta. Al utilizar 8 horas como tiempo de dilución, el 25 % de la proquimosina inicial presenta su actividad biológica correspondiente.

### Obtención de quimosina activa

Las fracciones obtenidas en los procesos de solubilización, renaturalización y activación de la proteína, fueron analizadas mediante la técnica de Western blot (figura 5).

Se observó que las condiciones de activación garantizaron que más del 98 % de la SOD-proquimosina fuese activada a quimosina, la cual presenta un peso molecular de 35 kDa.

Durante el proceso de renaturalización se observa una ligera disminución de la talla molecular de la proteína fusionada (línea C), por tal motivo actualmente se realizan experimentos para determinar si es un artefacto de electroforesis como ha sido reportado por otros autores (Beyer *et al.*, 1987) o que ha sido ocasionado por un proceso proteolítico (Hrisch *et al.*, 1989).

### CONCLUSIONES

La proteína fusionada SOD-proquimosina es sintetizada en *S. cerevisiae* de forma insoluble e inactiva, lo cual hace necesaria la utilización de procesos de solubilización y renaturalización con vistas a obtener la quimosina en su forma nativa y con su actividad biológica correspondiente.

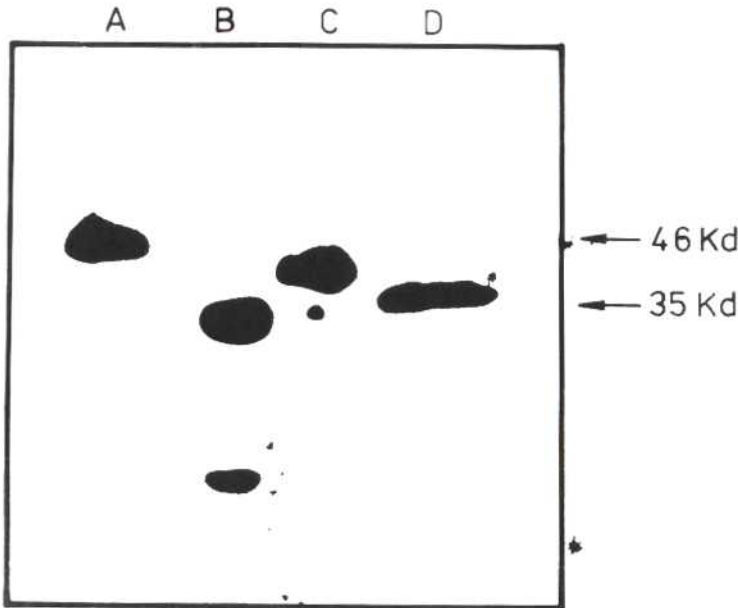


FIG. 5. Western blot de las fracciones de proteínas obtenidas en las diferentes etapas del proceso de obtención de la quimosina: línea (A) solubilización urea 8 M, fracción soluble; línea (B) quimosina natural; línea (C) SOD-proquimosina renaturalizada; línea (D) quimosina activa. La posición de los marcadores de pesos moleculares (no demostrados) son indicados a la derecha.



Agentes desnaturalizantes tales como urea 8 M son requeridos para lograr una efectiva solubilización de la SOD-proquimosina, mientras la utilización de agentes reductores no es necesaria en dicho proceso.

La concentración de proteína recombinante, las etapas en que se divide y el tiempo en el cual se efectúa la dilución de la solución de SOD-proquimosina soluble, son factores importantes a tener en cuenta durante el proceso de renaturalización.

El hecho de que la proquimosina se encuentre fusionada a una parte de la superóxido dismutasa humana no influye en los rendimientos obtenidos en los diferentes pasos, pues los mismos se corresponden con los reportados en la literatura por diferentes autores (Goff y Moir, 1984).

## AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestra gratitud al licenciado E. Amador por la escritura del manuscrito y al técnico E. Trujillo por su asistencia técnica en la computadora.

## REFERENCIAS

- BEPPU, T. (1983). The cloning and expression of chymosin (rennin) genes in microorganisms. *Trends in Biotechnology* 1: 85-89.
- BEYER, W. F.; I. FRIDIVICH; G. T. MULLENBACH y R. HALLERVELL (1987). Examination of the role of arginine-143 in the human copper and zinc superoxide dismutase by site-specific mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 262: 11182-11187.
- BURNETTE, W. N. (1981). Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio iodinated protein. *A. Analyt. Biochem.* 112: 195-203.
- EMTAGE, J. S.; S. ANGAL; M. T. DOEL; T. J. R. HARRIS; B. JENKINS; G. LILLEY y P. A. LOWE (1983). Synthesis of calf prochymosin (prorennin) in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 3671-3675.
- FOLTMANN, B. (1970). Prochymosin and chymosin. *Meth. Enzym.* 19: 421-436.
- GALZY, P. y P. P. SLONIMSKI (1957). Variation physiologique de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *Comptes Rend. Acad. Sci. (Paris)*. 245: 2423-2433.
- GERSHONI, J. M. y G. E. PALADE (1983). Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.* 131: 1-15.
- GOFF, C. G. y D. T. MOIR (1984). Expression of calf prochymosin in *S. cerevisiae*. *Gene* 27: 35-46.
- HRISCH, H. H.; P. SUARES RENDUELES y D. H. WOLF (1989). "Yeast *S. cerevisiae* proteinases: structure, characteristics and function", in: *Molecular and Cell Biology of Yeast*, Ed EF Walton and G.T. Yarranton, New York 5: 134-200.
- KAWAGUCHI, Y.; S. KOSUGI; K. SASAKI; T. VOZUMI y T. BEPPU (1987). Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* 51: 1871-1877.
- LOWRY, D. H.; N. J. ROSENBOUGH; A. L. FARR y L. J. RANDALL (1951). Protein measurement with the fain phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MARSTON, F. A. O.; P. A. LOWE; M. T. DOEL; J. M. SCHOEMAKER; S. WHITE y S. ANGAL (1984). Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *E. coli*. *Biotechnology* 2: 800-804.
- MARSTON, F. A. O. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *E. coli*. *Biochem. J.* 240: 1-12.
- NISHIMORI, K. y N. SHIMIZU (1984). Expression of cloned calf prochymosin cDNA under control of the Tryptophan promoter. *Gene* 29: 41-49.
- TORRENS, I.; A. VILLEGAS; R. NARCIANDI; A. SANTOS; E. RODRIGUEZ; J. MORALES; A. SILVA y L. HERRERA (1990). La fusión de los genes del superóxido dismutasa humana y la proquimosina de ternero se expresa eficientemente en *S. cerevisiae*. *Biotechnology Aplicada* 7(3): 257-264.

- TOWBIN, H.; T. STAEBLIN y J. GORDON (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354.
- TSUJI, T.; R. NAKAGAWA; N. SUGIMOTO y K. FUKUHARA (1987). Characterization of disulphide bonds in the recombinant proteins: Reduced Human Interleukin 2 in inclusion bodies and its oxidative refolding. *Biochemistry* **26**: 3129-3134.
- WEIR, M. P.; J. SPARKS y A. M. CHAPLIN (1987). Micropreparative purification of recombinant Human Interleukin 2. *J. of Chromatography* **396**: 209-215.
- WEIR, M. P. y J. SPARKS (1987). Purification and renaturation of recombinant human Interleukin 2. *Biochem. J.* **245**: 85-91.
- WINKLER, M. E.; M. BLABER; G. L. BENNETT; W. HOLMES; G. A. VEHR (1985). Purification and characterization of recombinant urokinase from *E. coli*. *Biotechnology* **3**: 990-1000