

TRABAJO DE REVISION

DEGRADACION DE PROTEINAS EN *E. coli*: PAPEL DE LA ESTRUCTURA PROTEICA

Raimundo Ubieta y Nelson Santiago.

Departamento de Genética Molecular. División de Farmacéuticos. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Apartado 6162, La Habana 6, C.P.10600, Cuba.

Recibido en septiembre de 1993. Aprobado en octubre de 1993

Key words: Protein degradation, *E. coli*, Rop, Insulin.

INTRODUCCION

La degradación de proteínas juega un importante papel en la regulación de los niveles proteicos específicos intracelulares así como en la eliminación de péptidos y proteínas extrañas, ya sea por un plegamiento erróneo durante su síntesis, por inactivación o por la introducción de proteínas virales u otras que la célula no reconozca como propias.

Con el desarrollo de la biotecnología moderna los estudios acerca de los procesos de degradación de proteínas en bacterias han tomado un gran auge dada la influencia de estos mecanismos regulatorios sobre la expresión de genes heterólogos introducidos en el interior de la célula por técnicas de ingeniería genética. La existencia de estos procesos representa todavía una de las principales limitaciones para la obtención de altos niveles de expresión de moléculas recombinantes con idénticas características a sus homólogos naturales.

A pesar del acelerado incremento de grupos de investigaciones dedicados a la obtención de proteínas recombinantes la mayoría de los conocimientos adquiridos acerca de la degradación de proteínas en estos estudios son muy específicos y empíricos derivados de proteínas particulares.

No obstante, se conoce que la secuencia aminoacídica es responsable de la sensibilidad de la proteína a los procesos degradativos. La conformación espacial que esta determina ejerce una acción fundamental en el grado de exposición de los sitios de corte a la actividad de proteasas. En el presente trabajo se presenta un análisis de la importancia de estos factores en la degradación de proteínas en *E. coli* basado fundamentalmente en dos

ejemplos estudiados: la proteína Rop de bacteria y la Proinsulina humana. El primero se refiere a la relación entre la estabilidad conformacional de la proteína y su degradación utilizando como modelo de estudio una proteína propia de la bacteria. El segundo caso está relacionado a la utilización de péptidos estabilizadores en el extremo N-terminal de una proteína heteróloga como sistema de protección frente a la acción de proteasas.

Proteasas de *E. coli*

La bacteria *Escherichia coli* posee un gran número de enzimas proteolíticas distribuidas en el citoplasma, en la membrana interna y en el espacio periplasmático, aunque en general, las funciones fisiológicas que cumplen son poco conocidas.

Entre las proteasas citoplasmáticas más estudiadas se encuentran las proteasas Lon y Clp, ambas dependientes de ATP en su mecanismo de acción y vinculadas a un gran número de eventos regulatorios intracelulares. La proteasa Lon es fundamentalmente expresada durante la respuesta de la célula a un incremento de la temperatura así como en la regulación de la proteína N del fago lambda. Por otro lado la proteasa Clp ha sido vinculada al sistema de degradación vía ubiquitina en células eucariotes. En el espacio periplasmático se encuentra entre otros el sistema de proteasas relacionado con la secreción de proteínas hacia este compartimento como son las Peptidasa señal I y II de acciones en el procesamiento de los péptidos señales y la Proteasa IV, vinculada a la degradación posterior de estos (1,2).

La degradación de proteínas puede ser convenientemente dividida en dos categorías; de

conservación y de regulación, dependiendo de si la proteína eliminada es o no es funcional (1). La función de conservación se expresa en la eliminación de proteínas no funcionales que han resultado por errores en la transcripción o traducción, por procesos oxidativos, por daños químicos, por incorrecto plegamiento o por desnaturalización térmica. Su degradación elimina las interacciones dañinas con otras proteínas, además de liberar aminoácidos para la síntesis de novo.

Existen numerosos ejemplos tanto en eucariotes como procariones de degradaciones proteicas que intervienen en los procesos regulatorios e incluye la activación o inhibición de proteínas que deben permanecer en la célula de forma continua o como respuesta a estímulos ambientales o señales metabólicas. La degradación selectiva de proteínas bajo condiciones de inanición (3,4,5), la activación del ciclo de vida lítico del fago lambda debido al corte proteolítico del represor CI (6) y la degradación de ciclina en el inicio de la mitosis (7), son algunos de los ejemplos de degradación que ocurren en respuesta a cambios fisiológicos o ambientales específicos. Otras proteínas son por el contrario, constitutivamente inestables debido a que su degradación ocurre rápidamente después de su síntesis, como es el caso de la proteína SulA (8). En otros casos, el nivel intracelular puede ser rápidamente incrementado por la transiente inhibición de la degradación como ocurre con el factor sigma 32 (heat shock) de *E.coli* (9).

La inestabilidad metabólica de una proteína reguladora permite el rápido ajuste de sus concentraciones intracelulares a través de cambios en los procesos de síntesis o degradación. Las señales de una proteína que le confieren inestabilidad metabólica son llamadas señales de degradación.

Regla del extremo N-terminal.

Varshavsky y colaboradores establecieron que un componente esencial de una señal de degradación en las proteínas es el residuo N-terminal (2,10). La presencia de estas señales, denominadas N-degron (11), conforman la regla del extremo N-terminal, que relaciona la estabilidad metabólica de una proteína con el tipo de residuo en dicho extremo.

En células eucariotes ha sido reportada una vía de **marcaje** de sustratos proteicos para el reconocimiento selectivo de estos por el sistema de proteasas intracelulares (12). La ubiquitina es un pequeño péptido encontrado en altas concentraciones en las células eucariotes de solo 76 residuos aminoácidos. Según se ha demostrado (12) su conjugación covalente a determinadas proteínas es esencial para la degradación selectiva de estas.

En células eucariotes el N-degron comprende dos determinantes diferentes: un residuo N-terminal desestabilizante y uno o más residuos de lisinas internos involucrados en la conjugación al péptido ubiquitina para su posterior degradación (11,13).

Los residuos N-terminales desestabilizantes, dado que representan una señal de degradación intracelular, han sido clasificados jerárquicamente. Los residuos desestabilizadores primarios son aquellos que proporcionan directamente la señal de degradación. En células eucariotes los residuos Asp y Glu en el extremo N-terminal (Cys en reticulocitos de mamíferos) son residuos desestabilizadores secundarios debido a que solo a través de su conjugación mediante la Arg-tRNA-proteína transferasa a arginina, uno de los residuos desestabilizadores primarios (10,14,15), pueden ejercer su acción desestabilizadora y dirigir, de esta forma, la degradación de la proteína. Asn y Gln en este extremo son entonces desestabilizadores terciarios a través de su conversión, por una desamidasa específica, en desestabilizadores secundarios como Asp y Glu (14).

Para la determinación de los residuos desestabilizantes en eucariotes fueron utilizadas fusiones lineales de ubiquitina a la β -galactosidasa como proteína blanco, aprovechando que el procesamiento de estas fusiones en la célula por enzimas específicas es independiente del residuo aminoácido en el sitio de la fusión. Esto permite la expresión y el análisis de proteínas con diferentes residuos N-terminales independientemente de la estabilidad que este confiera. Sin embargo, la técnica de fusión a la ubiquitina era imposible de aplicar en bacterias ya que carecen de esta proteína y de las enzimas necesarias para su

procesamiento (16). El aislamiento del gen UBP-1 de *Saccharomyces cerevisiae* que codifica para una enzima del procesamiento de la ubiquitina, ha permitido aplicar esta metodología en bacterias al estudio de los mecanismos que regulan la regla del extremo N-terminal (16).

Cuando la proteasa de levadura Ubp1 es expresada en *E. coli*, hidroliza eficientemente fusiones Ub-X- β gal (X como residuo de unión) tanto en extractos celulares como *in vivo*. Los experimentos de marcaje celular con estas fusiones en cepas de *E. coli* que expresan el gen UBPI, muestran que la estabilidad metabólica depende del residuo X. La enzima Leu-Phe-tRNA-transferasa (L/F-transferasa) presente en bacterias gram-negativas y ausente en eucariotes, cataliza la conjugación de Leu o Phe a residuos Lys o Arg N-terminales estéricamente accesibles en proteínas y péptidos (17). Un mutante de *E. coli* que carece de L/F transferasa (aminoacid transferase strain aat) fue aislado (18) y usado para determinar *in vivo* si la propiedad desestabilizadora de Lys y Arg en el extremo N-terminal es dependiente de esta enzima, detectándose de esta forma los aminoácidos desestabilizantes en el extremo N-terminal. Estos resultados han demostrado que los residuos Lys o Arg, desestabilizadores primarios en células eucariotes, son residuos desestabilizadores secundarios en *E. coli*. Asimismo los residuos Phe, Leu, Trp y Tyr constituyen desestabilizadores primarios en este microorganismo.

Estas mediciones llevadas a cabo con 19 fusiones diferentes X- β gal dieron como resultado la regla del extremo N-terminal de *E. coli* (2) (Tabla 1).

ROP: Modelo de plegamiento- proteólisis.

Otro de los factores que determinan la estabilidad de una proteína en *E. coli* es la conformación que ella adquiere una vez terminada la síntesis proteica. Una proteína plegada presenta un mínimo de energía en su conformación, la diferencia de esta energía entre su forma nativa y no plegada es típicamente de 5 a 15 Kcal/mol, permitiendo la interconversión de formas en tiempos de milisegundos (19). El equilibrio entre el estado plegado y el no plegado de la molécula es un factor esencial que determina su susceptibilidad a proteasas en bacteria (20). Por lo tanto la degradación puede ser gobernada en parte, por la concentración de proteína no plegada o semiplegada, sustrato blanco de la proteólisis (21).

Como modelo de plegamiento-proteólisis se estudió la proteína Rop, que es una proteína dimérica de 63 aa donde el monómero está constituido de dos

Tabla 1.
Regla del N-terminal en *E. coli*

Aminoácidos desestabilizadores primarios	Aminoácidos desestabilizadores secundarios	Aminoácidos estabilizadores
Phe Leu Trp Tyr	Arg Lys	His Ile Asp Glu Asn Gln Cys Ala Ser Thr Gly Val Pro Met

cadena antiparalelas de α hélices conectadas por un residuo único de alanina (22). Esta proteína participa en el mecanismo de control del inicio de la replicación de los plásmidos de la familia ColE1, aumentando la afinidad entre dos ARN complementarios: ARN I y ARN II (23-28) (figura 1).

Se han realizado estudios con mutantes de esta proteína para obtener un modelo sobre las propiedades de su estructura espacial. A partir de estos se llegó a la conclusión de que: las cadenas laterales de los residuos que conforman el núcleo hidrofóbico de la molécula no pueden ser cambiados sin alterar la estabilidad del dímero, los aminoácidos cargados o polares no son tolerados y perjudican el correcto plegamiento de la proteína. Cuando se realizan modificaciones en dos posiciones diversas: leucina 41 (L41A) y leucina 48 (L48A), la sustitución de estos aminoácidos hidrofóbicos por otros similares tiene efectos diversos, usualmente desestabilizantes (22).

Aunque la estabilidad de las proteínas mutantes resultantes no es muy diferente de la estabilidad de la proteína nativa, se han estudiado los aminoácidos comprendidos entre la Asn 27 y Glu 33 produciéndose alrededor de 40 mutaciones formadas por sustituciones de uno o varios aminoácidos y si bien esta región es funcionalmente importante, ninguna de estas mutaciones parece alterar la conformación general de la proteína, indicando así que esta región no es esencial para la formación de la estructura nativa (29).

Por otra parte se comprobó que los siete aminoácidos del extremo C-terminal no juegan ningún papel funcional o estructural y ha sido demostrado

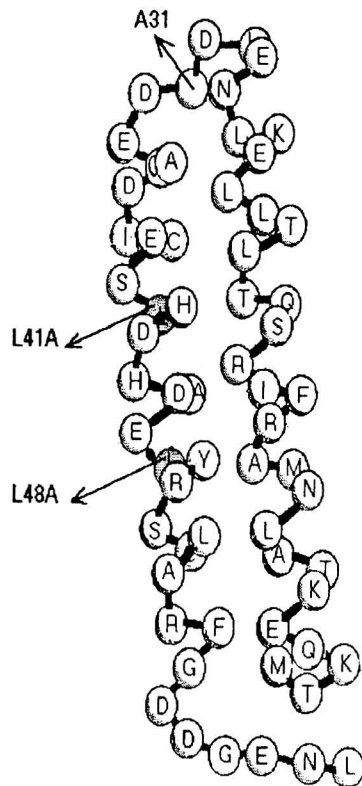


Fig. 1. Monómero de la proteína Rop donde se señala el residuo de alanina que une las dos α hélices antiparalelas y los residuos Leu 41 y Leu 48 que han sido cambiados en los mutantes L41A y L48A.

que pueden ser eliminados sin alterar la estructura de Rop. Los mismos no han podido ser localizados en análisis de difracción de rayos X probablemente debido a la alta flexibilidad de estos residuos (30).

Teniendo en cuenta el conocimiento existente, la proteína Rop se utilizó como modelo para que sus dos α hélices sirvieran de andamiaje para la introducción de bibliotecas peptídicas de 9 aminoácidos. Las técnicas utilizadas anteriormente para lograr estos objetivos se realizaban uniendo los fragmentos peptídicos a zonas de los extremos N-terminal o C-terminal de otras proteínas con el inconveniente de que uno de los extremos de los péptidos quedaba libremente expuesto al solvente con la consecuente variación de energía libre.

Se seleccionó como péptido el fragmento comprendido entre los residuos 163-171 de la proteína interleuquina 1 β humana debido a que la determinación de la estructura tridimensional de alta resolución de la IL-1 β humana ha permitido identificar este nonapéptido en un lazo que une dos hojas β (31), siendo capaz de mantener su correcta

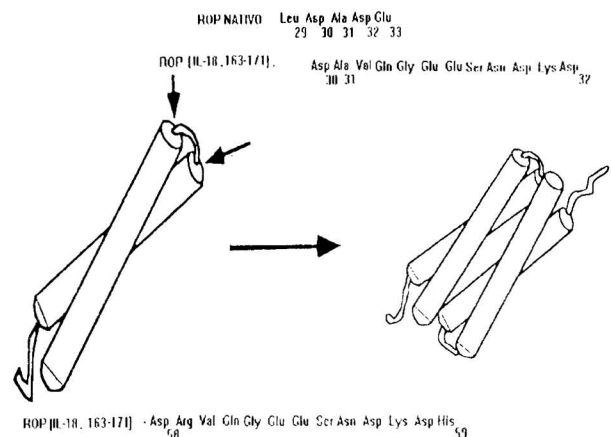


Fig. 2. Inserción del oligopéptido formado por los residuos 163-171 de la IL-1 β humana en el lazo entre las dos α hélices y en el C-terminal de la proteína Rop.

estructura y función aún cuando se sitúe en diversos contextos estructurales (32).

Usando el modelo antes expuesto, se trabajó en la expresión de la proteína Rop junto a la señal de secreción pelB de *Erwinia carotovora*, que ha sido utilizada en la traslocación a periplasma de varias proteínas heterólogas. La proteína Rop expresada en este sistema es eficientemente secretada al periplasma donde ocurre su rápida dimerización a su forma más estable. Los mutantes L41A y L48A son rápidamente degradados cuando se secretan al periplasma bacteriano ya que, aunque son capaces de dimerizar en el citoplasma, las interacciones hidrofóbicas entre sus dos α hélices son mucho más débiles disminuyendo la estabilidad del dímero.

La inserción de este nonapéptido en el extremo C-terminal de Rop permite también la eficiente secreción de la proteína quimérica, obteniéndose un comportamiento estable de la proteína en la fracción periplasmática (figura 2).

Cuando el nonapéptido se insertó en el lazo entre las dos cadenas antiparalelas se comprobó que provocaba la desestabilización y degradación de la proteína debido a la no formación del dímero, lo que apunta a la teoría de que las formas no dimerizadas de una proteína dimerica la hacen más expuesta a la degradación por proteasas. Estos mismos resultados se comprobaron cuando la expresión de Rop se realizó intracelularmente siendo en este caso más estable la proteína con la inserción del nonapéptido entre las dos α hélices y haciéndose más dependiente la estabilidad proteica de la temperatura de crecimiento del cultivo. Cuando

se incrementaba de 37 a 42°C, se hacía más sensible a la degradación proteolítica ya sea por la mayor exposición de zonas blancas a las proteasas o porque se prolongaba el tiempo en asumir el correcto plegamiento, permitiendo a las proteasas bacterianas degradar el producto quimérico (33). Este es un ejemplo de la correlación entre el grado de plegamiento de la proteína y su degradación (figura 3).

Otros factores que influyen en la susceptibilidad de las proteínas a un corte proteolítico inicial son su estabilidad térmica (19) y la disociación del ligando en proteínas asociadas a estos (34,35). En el tránsito a la conformación plegada o en la no plegada ocurre un incremento en los niveles de degradación por un aumento de la influencia de estos factores.

Insulina: Uso de estabilizadores protéicos.

La expresión de proteínas heterólogas en bacterias está sujeta también a todos los

mecanismos anteriormente descritos de degradación proteica con la particularidad de que estas proteínas son, en muchos casos, consideradas moléculas extrañas en estos hospederos y por tanto potenciales blancos del sistema de proteasas de la célula.

El desarrollo de la ingeniería genética y con ella de la biotecnología moderna ha incrementado el estudio de estos sistemas con el objetivo de lograr altos niveles de expresión fundamentalmente en *E. coli* como hospedero más conocido y utilizado para la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, aún son pocos los sistemas de proteasas así como las proteasas específicas de las cuales se tiene un conocimiento amplio acerca de sus funciones y mecanismos de acción. Estas limitaciones han llevado fundamentalmente al uso de cepas deficientes en determinadas proteasas y a una gran búsqueda de nuevos mutantes que permitan eludir más que enfrentar con estrategias concretas, la acción de estas enzimas sobre las proteínas o péptidos de interés biotecnológico.

En el caso de las proteínas eucariotes, las cuales constituyen la mayoría de las moléculas recombinantes de interés a producir, se adiciona una dificultad mayor. El ambiente reductor del citoplasma bacteriano (36) hace poco factible el correcto plegamiento de las proteínas eucariotes en su interior. Estas proteínas adoptan su estructura terciaria en un ambiente significativamente diferente y con la ayuda, en muchos casos, de complejos sistemas proteicos. Este hecho, por tanto, conlleva a una sensibilidad mayor de estas proteínas a las proteasas intracelulares de la bacteria como se demostró anteriormente con los experimentos realizados con la proteína Rop.

Una de las prácticas más usadas para evitar la degradación temprana de proteínas eucariotas en *E. coli* ha sido la fusión de estas a proteínas o fragmentos peptídicos de *E. coli* que sirven como estabilizadores.

Gilber y su grupo construyeron una serie de plásmidos con un único sitio PstI cerca del gen de *E. coli* que codifica para la secuencia señal de la prepenicilina y a continuación se clonaron copias de cDNA de los genes de preproinsulina de rata y de

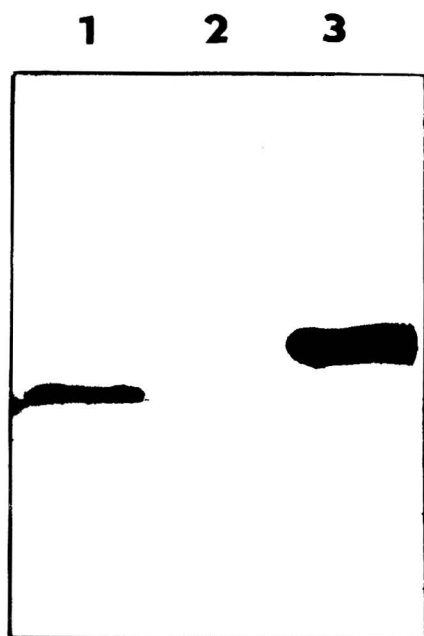


Fig. 3. Western-blot realizado con un anticuerpo anti-Rop en conejo y un anticuerpo anti-conejo conjugado a peroxidasa, a las muestras de la fracción periplasmática corridas en un gel al 20% de SDS-PAGE. Línea 1: Proteína Rop natural. Línea 2: Proteína Rop con la inserción del fragmento 163-171 de la IL-1 β humana entre las α hélices. Línea 3: Proteína Rop con el fragmento 163-171 de la IL-1 β humana en el extremo C-terminal.

proinsulina humana, además se usó el propio péptido señal de la insulina humana y en todos los casos esta fue secretada. En las construcciones en que faltaba el péptido señal, la insulina permanecía en el citoplasma, con un tiempo de vida media de 2 minutos (37). Este tiempo de vida media, cuando la insulina se encontraba sin ninguna secuencia en el extremo N-terminal, parecía estar asociado a algún tipo de actividad proteolítica presente en la bacteria. En 1979 Cheng y colaboradores aislaron y caracterizaron una proteasa de *E. coli* que degradaba la insulina tanto *in vivo* como *in vitro* (38). Esta endopeptidasa denominada Proteasa III tiene actividad proteolítica en un número de pequeños polipéptidos como son la insulina, el glucagón y fragmentos de β -galactosidasa (39) (figura 4).

Recientemente se caracterizó una proteasa de células humanas denominada IDE (insulin degrading enzyme) que interviene en la degradación de la insulina una vez que se ha internalizado el complejo insulina- receptor en las

células humanas (40). Esta enzima tiene un 46 % de similitud con la Proteasa III de *E. coli*, además de presentar la misma secuencia (HEXXH) en el sitio activo, secuencia no característica de las demás proteasas de mamíferos (41). Es curioso que el sitio de corte de las dos enzimas es similar, estando entre los aminoácidos Tyr16/Leu17 y Phe25/Tyr26 de la cadena B de la insulina (42).

Dado los problemas de degradación presentes cuando la insulina es expresada en *E. coli*, se han utilizado estrategias de fusión a diferentes péptidos para lograr su estabilidad en el citoplasma de la célula. Konrad realizó la fusión a los 12 primeros aminoácidos del péptido señal de la β -lactamasa y más del 90% de la proinsulina fue secretada al espacio periplasmático (43). Los grupos de Goddel y Guo fusionaron la proinsulina humana a la β -galactosidasa de *E. coli* obteniendo un producto estable (44,45). Shen demostró que la expresión de proinsulina humana en *E. coli* puede ser grandemente incrementada dirigiendo la síntesis a través de una estructura de multi-unidades en la cual un solo polipéptido es puesto en forma de unidades de repetición análogas logrando aumentar la estabilidad de la proteína (46). Cuando el extremo N-terminal de la proinsulina es fusionado a los primeros 80 aa del N-terminal de la β -gal solo dos dominios de la proinsulina son necesarios para hacer la molécula estable con una vida media mayor de una hora, sin embargo cuando ningún péptido de bacteria está presente en esta región, se necesitan tres unidades de proinsulina para producir el producto estable. Este resultado muestra además que el producto puede comenzar a ser estable en ausencia de un polipéptido relacionado con *E. coli* pero con un número crítico de unidades de repetición análogas (45). Kang y su grupo expresaron la proinsulina humana fusionada a un estabilizador formado por 6 treoninas lográndose así la estabilización de la molécula (46).

En nuestro laboratorio se han realizado diversas construcciones genéticas con vistas a expresar el gen de la proinsulina humana. En ellas se utilizaron los primeros 63 residuos del extremo N-terminal de la interleuquina-2 humana. En publicaciones previas se habían demostrado la alta eficiencia de expresión de la IL-2 en *E. coli* (47) así como la utilización de este mismo fragmento como estabilizador de proteínas

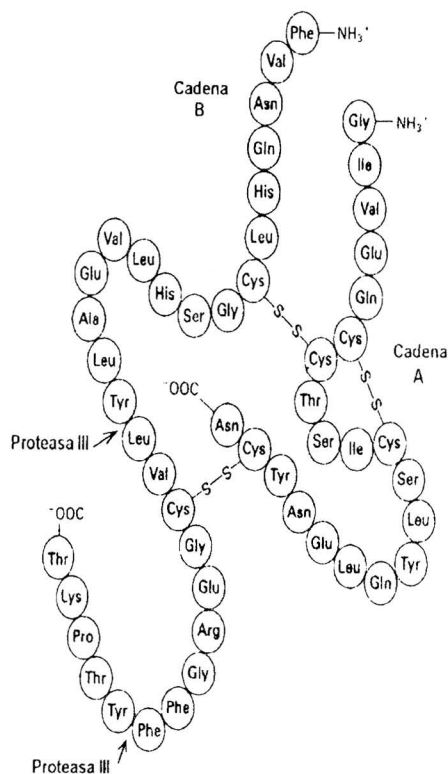


Fig. 4. Molécula de insulina humana donde se señalan los sitios de corte de la Proteasa III.

heterólogas(48). Esta fusión permitió alcanzar hasta un 30% de expresión de proinsulina con respecto a la proteína total. Debido a dificultades en el proceso de renaturalización dado la fuerte influencia de esta fusión en la estructura de la molécula se diseñó un nuevo péptido estabilizador sobre la base del anterior con vistas a obtener una proteína híbrida con mayores posibilidades de renaturalización. El nuevo péptido sintético se diseñó manteniéndose básicamente los primeros 23 residuos de la secuencia a excepción de las lisinas 9 y 10 las cuales fueron cambiadas por alanina y glutamina respectivamente. Esto se fundamenta por la utilización posterior de la tripsina como enzima para la proteólisis tanto del péptido C como del estabilizador. Un aumento de sitios de cortes innecesarios pudiera reducir la eficiencia de la digestión enzimática. Este péptido de 29 residuos aminoacídicos logró niveles similares de estabilización de la proinsulina al utilizado previamente (figura 5).

Con vistas a trabajar no solo en la estabilidad de la fusión, sino también en el aumento de solubilidad de la proteína fusionada una vez expresada, además de aumentar las facilidades estéricas para el corte enzimático posterior en el proceso de renaturalización y purificación, se diseñó un tercer péptido estabilizador con solo nueve aminoácidos de los antes empleados y el mismo sitio de corte enzimático. Sin embargo, en este caso no se logró expresión de la proteína fusionada según experimentos de Western-blot (manuscrito en preparación) a pesar de un sostenido proceso de transcripción que mantuvo la síntesis del ARNm específico por más de 12 h.

Dado que la secuencia N-terminal de todas las fusiones utilizadas es la misma, el factor estabilizante de la proinsulina humana en estos casos parece ser de tipo conformacional. La presencia del fragmento de IL-2 fusionado a esta proteína pudiera facilitar la formación de una estructura conformacional dada en la cual quedarán protegidos los sitios sensibles a proteasas y aumentar con ello la estabilidad de la proinsulina. La demostración de la presencia de los sitios de corte de la Proteasa III en la cadena B de la insulina es una evidencia más a favor de esta teoría.

Los péptidos estabilizadores de 63 y 29 residuos aminoacídicos descritos anteriormente logran proporcionar una conformación adecuada para evadir la acción de las proteasas sobre los sitios sensibles en las proteínas fusionadas (posiblemente sobre los sitios específicos de la Proteasa III). Sin embargo, la reducción de estos a solo nueve



Fig. 5. Gel de proteínas SDS-PAGE al 12.5% de las proteínas totales de los clones recombinantes de las fusiones IL-2-Proinsulina mostrando las proteínas expresadas. Línea 1: Insulina humana patrón. Línea 2: Proinsulina humana fusionada al estabilizador de 29 aminoácidos. Línea 3: Proinsulina humana fusionada al estabilizador de 63 aminoácidos. Línea 4: Proinsulina humana fusionada al estabilizador de 10 aminoácidos. Línea 5: Control de expresión de la IL-2 humana.

Péptido de 63 aminoácidos

MAPTSSSTRKRTQIQLEHLLLDLQMI LNGLNNTKPKLTRMLTFKPYMPLLA TELKHILQCLDTK

Péptido de 29 aminoácidos

MAPTSSSTAQTQIQLEHLLLDLQIFLDTK

Péptido de 10 aminoácidos

MAPTSSLDTK

Fig. 6. Fragmentos peptídicos utilizados para estabilizar la proinsulina humana.

aminoácidos no parece ser capaz de proporcionar dicha protección (figura 6).

Por otra parte en las fusiones anteriores de IL-2-proinsulina los altos niveles de expresión alcanzados provocan la agregación de la proteína insoluble en forma de agregados refractarios cuando se observan al microscopio de contraste de fase denominados cuerpos de inclusión (figura 7) (49). Se plantea que la formación de estos puede constituir un factor adicional para evitar la acción de proteasas contra las proteínas heterólogas expresadas en *E. coli*.

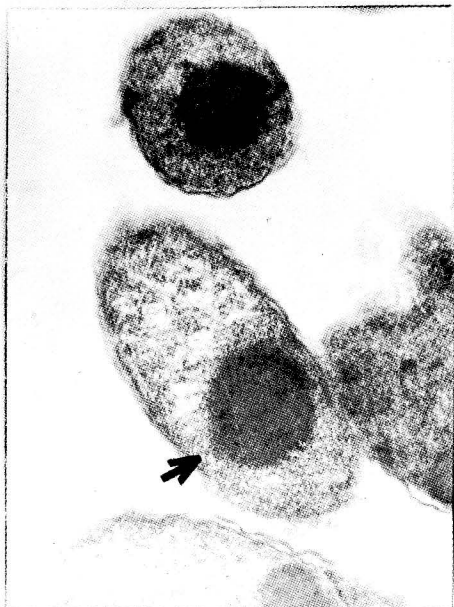


Fig. 7. Cuerpos de inclusión de la fusión IL-2-Proinsulina. La flecha señala un cuerpo de inclusión formado en *E. coli* producto de la agregación de la proteína fusionada.

CONCLUSIONES

Los casos analizados en este trabajo demuestran por una parte que los procesos de degradación proteolítica en la bacteria *E. coli* responden en gran medida a las características estructurales de las proteínas así como que la estabilización de estas puede ser lograda a través de cambios en su secuencia aminoacídica que conlleven a cambios conformacionales específicos que bloqueen los sitios blancos sensibles a la acción proteolítica.

El uso de péptidos estabilizadores fusionados al extremo N-terminal de la proteína de interés ha constituido una de las principales herramientas en la modulación de los procesos degradativos intracelulares que afectan la producción de proteínas heterólogas. La función de estos parece estar vinculada al bloqueo, en ocasiones, de residuos

desestabilizadores según la regla del extremo N-terminal así como a la adopción de una conformación más estable de la proteína resultante por un menor acceso a los sitios sensibles a proteasas.

AGRADECIMIENTOS:

Los autores agradecen al Profesor Gianni Cesareni del Dipartimento di Biologia, II Università degli Studi di Roma, Italia, por aceptar la participación en su laboratorio de Nelson Santiago en los estudios relacionados con la proteína Rop, así como a la Dra. Lila Castellanos por la útil revisión de este trabajo.

REFERENCIAS

- 1- MAURIZI, M. (1992). *Experientia* 48. Birkhauser Verlag.
- 2- TOBIAS, W. ; SHRADER, T. ; ROCAP, G. ; VARSHAVSKY, A. (1991). *Science*. 254:1374-1377.
- 3- MANDELSTAM, J. (1958) *Biochem. J.* 169:110-119.
- 4- MAURIZI, M.R. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:2696-2703.
- 5- PINE, M.J. (1970) *J. Bact.* 103:207-215.
- 6- ROBERTS, J.W. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 147-151.
- 7- MURRAY, A. W. (1989) *Nature*. 339:280-286.
- 8- MIZUSAWA, S. y GOTTESMAN, S. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:358-362.
- 9- STRAUS, D. B.; WALTER, W. A. and GROSS, C. A. (1987) *Nature* (London) 329 : 348-391.
- 10- BACHMAIR, A.; FINLEY, O.; Y VARSHAVSKY, A. (1989) *Science*. 234: 179 y VARSHAVSKY, A. (1991) *Cell*. 64:13.
- 11- VARSHAVSKY, A. (1989). *Cell*. 56: 1019 y (1990). *Nature*. 346:287
- 12- JENTSCH, S.; SEUTER, W Y HAUSER, P. (1991). *Biochimica et Biophysica Acta*. 127-139..
- 13- CHAU, V. (1989). *Science*. 243:1576.
- 14- GONDA, D. (1989). *J. Biol. Chem.* 264:16700.
- 15- VARSHAVSKY, A. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7351 y (1990). *EMBO J.* 9:3179.
- 16- TOBIAS, J. Y VARSHAVSKY, A. (1991). *IBID.* 266: 12021.
- 17- SOFFER, R. (1971). *J. Biol. Chem.* 246:5207.
- 18- SOFFER, R. Y SAVAGE, M. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71:1004
- 19- Mc LENDON, G.; SMITH, M.; (1978). *J. Biol. Chem.* 253:6335- 6337.
- 20- Mc LENDON, G. (1977). *BBRC.* 77: 959-966.
- 21- DAGGETT, V. (1987). *Pharmaceutical Research.* 4:278-284.
- 22- BANNER, D.; KOKKINIDIS, D.; TSERNOLOGLOU, D. (1987). *J. Mol. Biol.* 196: 657-675.
- 23- CESARENI, G Y BANNER, D. (1985). *T. I. B. S.* 10: 303-306.
- 24- TWIGG, A.; SHERRAT, D. (1980). *Nature.* 287:82-84.
- 25- TOMIZAWA, J.; SOM, I. (1984). *Cell.* 38: 871-878.
- 26- TOMIZAWA, J. (1990). *J. Mol. Biol.* 212: 695-708.
- 27- CESARENI, G.; MUESING, A.; POLISKY, B. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:6313- 6317.
- 28- CESARENI, G.; HELMER-CITTERCH, M.; CASTAGNOLI, L. (1991). *Trends Genet.* 7:230-235.
- 29- CASTAGNOLI, L.; SCARPA, M.; KOKKINIDIS, M.; BANNER, W.; TSERNOLOGLOU, D. CESARENI, G. (1989). *EMBO. J.* 8:621-629.

- 30- STEIF, C.; WEBER, P.; HINZ, H.; FLOSSDORF, J.; CESARENI, G.; KOKKINIDIS, M. (1993). *Biochemistry*. **32**:3867-3876.
- 31- BORASCHI, D.; VOLPINI, L.; VILLA, L.; NENCIONI, G.; SCAPIGLIATI, D.; TAGLIABUE, A. (1989). *J. Immunol.* **143**:131-134.
- 32- CASTANGOLI, L.; VETRIANI, C.; GONFLONI, S.; F. FELICI; SANTIAGO VISPO, N.; CESARENI, G. (1993). *Year Immunol.* Basel. Karger. Vol 7.
- 33- GONFLONI, S. (1991). Tesis de Doctorado. Univ de Torvergata. Roma.
- 34- HOLZER, H.; HEINRICH, P. (1980). *Annu. Rev. Biochem.* **49**:63-91.
- 35- SEGAL, H.; WINKLER, R.; MIYAGI, P. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**: 6364-6365.
- 36- TUGGLE, J.; FUSH, J. (1985). *J. Bacteriology*. **162**: 448-450.
- 37- GILBERT, W. Y TALMADGE, K. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1830-1833.
- 38- CHENG, Y.; ZIPSER, D.; CHENG, C.; Y ROISETH, S. (1979). *J. Bact.* **140**:125-130.
- 39- DYKSTRA, C Y KUSHNER, S. (1985). *Journal of Bacteriology*. **163**:1055-1059.
- 40- DUCKWORTH, W. (1988). *Endocr. Rev.* **9**: 319-345 y Duckworth, W. (1990). Handbook of Experimental Pharmacology, Insulin (Cuatrecasas, P. and S. Jacob, eds) 143-165.; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- 41- VALLEE, B Y AULD, D. (1990). *Biochemistry*. **29**: 5647-5659.
- 42- ROTH, R.; A. SUSUKI; A. BECKER; DING, A. (1992). *The Journal of Biological Chemistry*. **267**: 2414-2420.
- 43- KONRAD, W.; WHITE, T.; BEN-BASAT, A.; BERTOLANI, L.; EMERICK, A. (1984). *Biotechnology*. feb
- 44- GOEDEDEL, D.; KLEJN, D.; BOLIVAR, F.; HEYNEKER, H.; YANSURA, D.; ITAKURA, K.; RIGGS, D. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 106-110.
- 45- GUO, L.; STEPIEN, P.; YUN TSO, J.; BROSSEAU, R.; NARAANG, S.; THOMAS, D.; WU, R. (1984). *Gene*. **29**: 251-254.
- 46- YOON, W.; KANG, Y. (1991). *Biotechnology Letters*. **13**: 755-760
- 47- DEVOS, R.; PLAETICK, G.; CHEROUTRE, H.; SIMONS, G.; DEGRAVE, W.; TANAVIER, J.; REMAUT, F.; FERS, W. (1983). *Nuc. Acid. Res.* **11**:4307-4318.
- 48- Paten Application: NOVOA, L. I., MACHADO, J., FERNÁNDEZ, J., JIMENEZ, V., PADRON, G., PENTON, E., BENITEZ, J., ESTRADA, M., HERRERA, L., RODRIGUEZ, J., GARCIA, J., NARCIANDI, E., Procedure for the expression of heterologous protein products as fusion proteins in *E. coli*: expression vectors, recombinant strains and applications. EU 90202108, JP 2- 205268.
- 49- SCHIOEMAKER, J.; BRASNETT, F.; MARSTON, F. (1985). *EMBO J.* **4**:775-780.