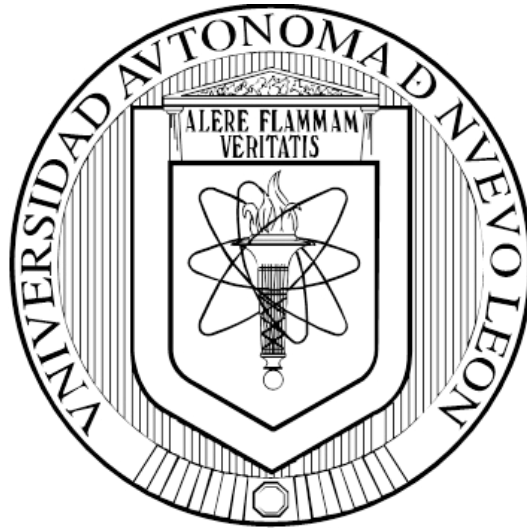


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**PRODUCCIÓN DEL INTERFERÓN- β RECOMBINANTE EN
Escherichia coli UTILIZANDO LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN
CusF3H+ Y SmbP**

POR

LBG. ARLETTE YULIANA GARZA RAMÍREZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
MICROBIOLOGÍA APLICADA**

MAYO, 2018

**PRODUCCIÓN DEL INTERFERÓN- β RECOMBINANTE EN *Escherichia coli*
UTILIZANDO LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CusF3H+ Y SmbP**

Revisión de tesis

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Director de tesis

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
Comité tutorial

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio
Comité tutorial

Dr. José Rubén Morones Ramírez
Comité tutorial

**PRODUCCIÓN DEL INTERFERÓN- β RECOMBINANTE EN *Escherichia coli*
UTILIZANDO LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CusF3H+ Y SmbP**

Aprobación de tesis

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Director de tesis

Dra. María Araceli Hernández Ramírez
Sub-directora de posgrado

AGRADECIMIENTOS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo.....	Página
<u>1.</u> INTRODUCCIÓN	1
1.1 Proteínas recombinantes.....	1
1.2 Sistemas de expresión.....	3
1.3 Proteínas de fusión.....	4
1.4 Interferón- β	5
<u>2.</u> ANTECEDENTES	7
<u>3.</u> JUSTIFICACIÓN	12
3.1 Definición del problema.....	12
3.2 Hipotesis.....	13
<u>4.</u> OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 objetivos específicos.....	14
<u>5.</u> METODOLOGÍA.....	15
5.1 Diseño del gen IFNB1.....	15
5.2 Construcción de plásmidos	16
5.2.1 Transformación de <i>E. coli</i> con pUC57+IFNB1.....	16
5.2.2 Extracción de ADN plasmídico pUC57+IFNB1.....	17
5.2.3 Preparación de los insertos, proteínas de fusión.....	17.
5.2.4 Digestión de los insertos: CusF3H+ y PelB-SmbP.....	19

5.2.5 Ligación y clonación molecular.....	21.
5.3 Transformación en células de <i>E. coli</i> con pET30a CusF3H+ IFNB1 y pET30a PelB-SmbP IFNB1.....	22
5.4 Extracción de ADN plasmídico.....	22
5.5 Secuenciación.....	25
5.6 Transformación en <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	25
5.7 Expresión piloto.....	26
5.7.1 Expresión piloto en <i>E. coli</i> BL21(DE3) con pET30a CusF3H+ IFNB1 y pET30 PelB-SmbP IFNB1.....	26
5.7.2 Lisis celular, expresión piloto.....	26
5.7.3 Choque osmótico, expresión piloto.....	27
5.7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida. SDS-PAGE.....	28
5.8 Expresión a escala 1L.....	29
5.8.1 Lisis celular, escalamiento 1L.....	29
5.9 Purificación de proteínas.....	30
5.9.1 Purificación del interferón- β por resina IMAC.....	30
5.9.2 Purificación del interferón- β por cromatografía IMAC.....	31
5.9.2.1 Diálisis.....	32
5.9.3 Cuantificación de proteínas	32
5.9.4 Remoción de la proteína de fusión	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Síntesis del gen IFNB1.....	34
6.2 Amplificación de los insertos CusF3H+ y PelB-SmbP.....	35
6.3 Clonación molecular de los plásmidos pET30a PelB-SmbP IFNB1 y pET30a CusF3H+ IFNB1.....	36
6.3.1 Construcción de pet30a PelB-SmbP y pet30a CusF3H+.....	36
6.3.1.1 Construcción de pet30a PelB-SmbP IFNB1 y .pET30a CusF3H+ IFNB1.....	36
6.3.2 Secuenciación	39
6.4 Condiciones para la expresión de la proteína recombinante.....	41

6.4.1	Expresión piloto del interferón- β utilizando el método de choque osmótico.....	43
6.4.2	Expresión a escala del interferón- β	44
6.4.2.1	Expresión en medio de cultivo LB adicionado con Kanamicina.....	44
6.4.2.2	Expresión a escala de 200 utilizando como medio de cultivo TB adicionado con Kanamicina.....	46
6.4.3	Expresión a escala de 1L, en medio de cultivo LB adicionado con Kanamicina.....	47
6.4.4	Expresión a escala de 4L, en medio de cultivo TB adicionado con Kanamicina.....	48
<u>7.</u>	DISCUSIÓN	51
<u>8.</u>	CONCLUSIÓN.....	55
<u>9.</u>	PRESPECTIVAS.....	56
<u>10.</u>	SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS	57
<u>11.</u>	BIBLIOGRAFÍA	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Reactivos para la amplificación de las proteínas de fusión	18
Tabla 2 Condiciones para PCR	18
Tabla 3 Digestión de insertos, CusF3H+ y PelB-SmbP.....	19
Tabla 4 Reacción de digestión para pET30a.....	20
Tabla 5 Reacción de ligación: pET30a+PelB-SmbP/pET30a+CusF3H+.....	21
Tabla 6 Reactivos para PCR	24
Tabla 7 Condiciones de PCR confirmatoria para construcciones en pET30a	24
Tabla 8 SDS-PAGE. Preparación de geles de poliacrilamida para análisis de proteínas	28
Tabla 9 Peso húmedo de sedimentos celulares de las construcciones pET30aPelB-SmbPIIFNB1 y pET30aCusF3H+IFNB1, como control negativo se utilizó la cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de proteínas recombinantes	2
Figura 2 Secuencia nucleotídica optimizada para la síntesis de interferón- β en <i>E. coli</i> , el codón de inicio que codificaba para una Met fue suprimido, además se realizó un cambio en la posición Cis-17 fue sustituida por una Ser	34
Figura 3 Productos de amplificación de PelB-SmbP en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2 y 3: PelB-SmbP, 4: Control (-) sin enzima.	35
Figura 4 Productos de amplificación de CusF3H+ en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2 y 3 CusF3H+.	36
Figura 5 Digestión enzimática de pUC57 IFNB1. Gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2: pUC57 IFNB1	37
Figura 6 Productos amplificados de PCR para confirmar el gen PelB-SmbP IFNB1 en el plásmido pET30a. Gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2: control (-) sin DNA, 3: control (+) IFNB1, 4 y 5: pET30a PelB-SmbP IFNB1	38
Figura 7 Productos amplificados de PCR para confirmar el gen CusF3H+ IFNB1 en el plásmido pEt30a. Gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2 y 3: pET30a CusF3H+ IFNB1, 4: control (+) IFNB1.	39
Figura 8 Secuenciación de la construcción de pET30a PelB-SmbP IFNB1	40
Figura 9 Secuenciación de la construcción de pET30a CusF3H+ IFNB1	40
Figura 10 Fig. 2 Expresión piloto, a diferentes concentraciones de IPTG. SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2 y 3: Concentración 1 mM, 4 y 5: Concentración 0.5 mM, 6 y 7: Concentración 0.2 mM.....	42
Figura 11 Lisis celular de expresiones piloto. SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2 y 3: control (-) <i>E. coli</i> BL21(DE3) sin transformar, 4-7: pET30a-PelB-SmbP-IFNB1 inducida (fracción soluble/fracción insoluble), 8-11: pET30a-CusF3H+IFNB1 inducida (fracción soluble/fracción insoluble	43
Figura 12 Choque osmótico de expresiones piloto. SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2 y 3: control (-) <i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin inducir, 4-7: PelB-SmbP-IFNB1 inducida, 8-11: CusF3H+-IFNB1	44

Figura 13 Purificación por reina IMAC.SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2 y 3: control (-) E. coli BL21(DE3) sin inducir, 4-7: PelB-SmbP-IFNB1 inducida, 8-11: CusF3H+-IFNB1	46
Figura 14 Lisis de expresión a escala en 200 mL. SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2: Muestra sin purificar, 3: fracción no unida, 4-8: fracciones de elusión.	47
Figura 15 Purificación de la fracción soluble del lisado en 1L. SDS-PAGE al 12%. Carril 1: marcador peso molecular, Carril 2 muestra son purificar, Carril 3: Fracción no unida, Carril 4 y 5: Lavados con imidazol al 5 y 10 mM, Carril del 6 al 15: Fracciones eluidas	48
Figura 16 Purificación de la fracción soluble del lisado en 4L. SDS-PAGE al 12%. Carril 1: marcador peso molecular, Carril 2 muestra son purificar, Carril 3: Fracción no unida, Carril 4: Lavados con imidazol al 10 mM, Carril del 5 al 15: Fracciones eluidas con imidazol	49
Figura 17 Cromatograma de la purificación por cromatografía IMAC de Pelb-SmbP-IFNB1	49
Figura 18 Segunda purificación por IMAC del lisado de 4L. SDS-PAGE al 12%. Carril 1: marcador peso molecular, Carril 2 muestra son purificar, Carril 3: Fracción no unida, Carril 4: Lavados con imidazol al 10 mM, Carril del 5 al 12: Fracciones eluidas con imidazol al 200 mM, Carri 13Fracción eluida con 300 mM de imidazol.....	50

NOMENCLATURA

°C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitros
SAP	Fosfatasa alcalina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> , para expresión de proteínas
pb	Pares de bases
BSA	Albumina de suero bovino (Bovine serum albumin)
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> , para producción y mantenimiento de ADN recombinante
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
g	Gramos
APS	Persulfato de amonio
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
Kbp	Kilopares de bases
kDa	Kilodaltones
L	Litro
TB	Terrific Broth
LB	Luria Bertani
M	Molar
Met	Metionina
mg	Miligramos
pmol	Pico mol
rpm	Revoluciones por minuti
mM	Milimolar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ADNr	Ácido desoxirribonucleico recombinante
Cys	Cisteína
Ser	Serina

RESUMEN

Arlette Yuliana Garza Ramírez

Fecha de Graduación: Diciembre, 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: PRODUCCIÓN DEL INTERFERÓN- β RECOMBINANTE EN *Escherichia coli* UTILIZANDO LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN CusF3H+ Y SmbP

Número de páginas: 60

**Candidato para el grado de Maestría
con Orientación en Microbiología
Aplicada**

Área de Estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y método de estudio: Las proteínas recombinantes son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en una línea celular distinta a la original. Su producción ha mejorado gracias al uso de proteínas de fusión, las cuales tienen la capacidad de mejorar la solubilidad y facilitar la purificación de la proteína que se desea sintetizar. El interferón- β es una glicoproteína que presenta propiedades antivirales, antiproliferativa e inmunoestimuladora, por lo que se ha estudiado como tratamiento contra diversas enfermedades. Se propone utilizar CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión para la síntesis del interferón- β , mejorando los procesos post-traduccionales y de purificación, potenciando su aplicación como biofármaco. Se diseñó el gen IFNB1 optimizado, que codifica para el interferón- β , con el fin de expresarse en *E. coli*, se realizaron las técnicas de clonación y expresión utilizando el plásmido pET30a, finalmente se realizó una purificación mediante una columna de afinidad a iones metálicos inmovilizados (Ni^{+2}). Se obtuvieron las clonas positivas de las construcciones y se procedió con la expresión y purificación de la proteína, para su caracterización se realizó un SDS-PAGE; logrando identificar las bandas correspondientes al PM del interferón- β

Contribuciones y conclusiones: En este trabajo se propone utilizar CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión para la síntesis del interferón- β , logrando mejorar los procesos post-traduccionales y de purificación, obteniendo así mayores rendimientos y bajos costos de producción, para su potencial aplicación como biofármaco.

Se expresó el interferón- β en *Escherichia coli* obteniendo proteína completamente soluble, sin embargo, al llegar al proceso de purificación se presentaron problemas.

Se observó que la proteína presenta afinidad al Ni^{+2} , no obstante, se debe de trabajar en estandarizar esta etapa, ya que debemos asegurar el grado de pureza para poder pasar a la siguiente etapa que es la de evaluación.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas recombinantes

A mediados de 1970 se inició el desarrollo de la ingeniería genética basada en la tecnología del ADN recombinante que marcó a su vez, el comienzo de la industria biofarmacéutica actual. Mediante la tecnología del ADN recombinante ha sido posible modificar genéticamente diversos tipos de células que actúan como “reactores” biológicos o biorreactores, capaces de sintetizar biofármacos con aplicaciones terapéuticas basadas en proteínas recombinantes. [7]

La producción de proteínas recombinantes es una tecnología que surgió a base de la necesidad de proveer proteínas de uso terapéutico con un abasto asegurado, es decir que no dependiera de fuentes animales además de contar con una calidad constante.

Esta Biotecnología de las proteínas recombinantes está implicada en el aislamiento, producción y mejoramiento de las propiedades biológicas de proteínas específicas a partir de diversas fuentes naturales tales como plantas, animales y/o microorganismos, con el fin de satisfacer las necesidades de la población. Por lo que una proteína recombinante es aquella cuya síntesis y expresión se realiza en un organismo distinto al organismo nativo.

[15]

A diferencia de las proteínas de origen natural, las proteínas recombinantes pueden ser producidas en grandes cantidades lo que ha permitido cubrir la creciente demanda actual. En contraste con las proteínas no humana obtenidas de animales como por ejemplo la insulina de cerdo. Las proteínas recombinantes son idénticas o difieren ligeramente respecto a las proteínas nativas de origen humano, por lo que las reacciones inmunológicas adversas disminuyen significativamente.

La fase inicial de producción de biofármacos consiste en el diseño del sistema de expresión que implica la elaboración mediante ingeniería genética del vector de clonación del gen, el cual codifica la proteína de interés en la célula hospedera adecuada. La segunda fase se enfoca en el proceso de purificación, evaluación y validación del producto. En termino generales, la producción de proteínas recombinantes sigue el siguiente esquema [7]:

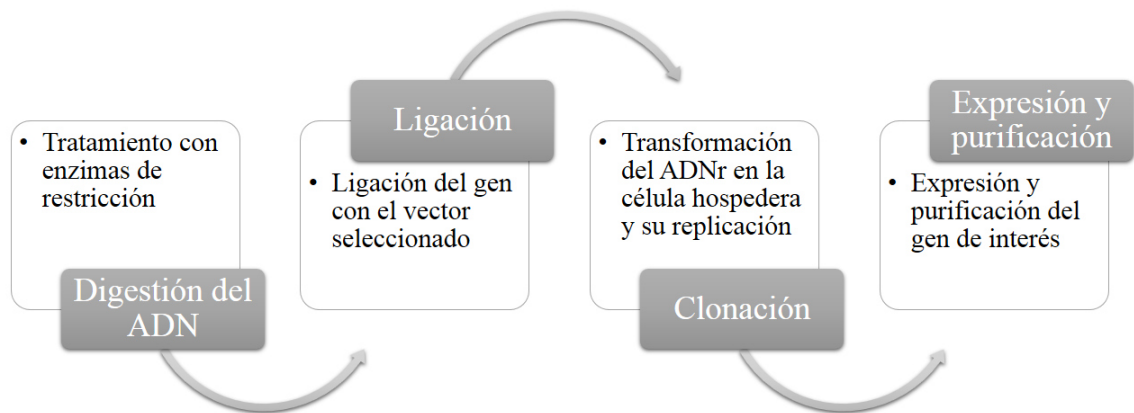


Figura 1. Producción de proteínas recombinantes

1.2 Sistemas de expresión

En la industria biofarmacéutica suelen emplearse como células receptoras del ADNr la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las células de mamíferos como la línea celular CHO (Chinese Hamster Ovary) y BHK (Baby Hamster Kidney).

Las bacterias son ideales para producir proteínas de tamaño pequeño que no requieran de modificaciones post-traduccionales. Pero al ser procariotas no son tan aptas para sintetizar proteínas de gran tamaño o procedentes de organismos superiores, estas a menudo muestran plegamientos complejos que incluyen muchos puentes disulfuro o que necesitan la intervención de chaperonas. Además, muchas de estas proteínas requieren para su función la inclusión de modificaciones tras su síntesis.

Escherichia coli es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos, ya que está muy bien caracterizada fisiológica y genéticamente. Dentro de las ventajas que brinda es que su velocidad de crecimiento es mayor que células de mamífero y levaduras, no requiere de gran cantidad de nutrientes para poder crecer y los que requiere no son costosos. Entre los parámetros más importantes para la producción de recombinantes es su eficiencia transcripcional y traduccional, así como también la posibilidad de secretarlas al periplasma siempre y cuando se utilicen los péptidos adecuados. Sin dejar atrás las ventajas antes mencionadas, *E. coli* es un microorganismo aprobado por las entidades reguladoras para ser utilizado como hospedero en la producción de biofármacos. [8]

Cabe resaltar que su maquinaria se utiliza para la expresión de proteínas no glicosiladas recombinantes, ya que, a escala industrial, el cultivo de esta bacteria para la producción de dichas proteínas suele llevarse a cabo en medios químicamente definidos. Los medios sintéticos facilitan el aislamiento y purificación de producto además de reducir los costos de su producción. En términos generales los vectores de clonación y expresión para *E. coli* contienen: origen de replicación, sitio mutile de clonación, gen de selección y un promotor.

1.3 Proteínas de fusión

La producción de proteínas recombinantes ha mejorado gracias al uso de proteínas de fusión, éstas son polipéptidos originados al traducirse dos o más genes previamente unidos en un mismo marco de lectura para dar origen a una sola proteína, estas proteínas tienen la capacidad de mejorar la solubilidad y facilitar la purificación de la proteína que se desee sintetizar. Actualmente las proteínas de fusión más utilizadas son: la proteína A de estafilococo, la G de estreptococo, la proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum* y Tiorredoxina. [19]

CusF es una proteína periplásmica que forma parte del complejo CusCBFA, el cual juega un papel importante en la resistencia de *E. coli* a niveles altos de iones cobre y plata. Tiene una estructura de barril beta y un peso molecular de 9.9 kDa. Esta proteína se ha aplicado como proteína de fusión; al obtener la proteína fusionada, su purificación sería mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), utilizando la afinidad que esta presenta por los iones Cu(II), sin embargo los resultados

que se encuentran reportados muestran que no se obtienen proteínas con alto grado de pureza como las que se obtiene utilizando iones Ni(II), por lo que se realizó una modificación agregando 3 histidinas en su extremo N-terminal para mejorar la afinidad hacia Ni(II), así con CusF3H+ se logra obtener mejores grados de pureza. [2]

SmbP es otra proteína que se le ha dado uso como proteína de fusión, es una proteína pequeña de unión a metales con un peso de 9.9 kDa, aislada del periplasma de *Nitrosomonas europaea*. Tiene la capacidad de unirse a iones metálicos divalentes como Cu, Ni y Zn, por lo que se ha propuesto que es una proteína de eliminación de cobre a concentraciones altas en *N. europaea*. Al obtener la proteína fusionada, la purificación se realizaría por cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC), utilizando la afinidad que la proteína presenta a los iones Ni(II). [21]

1.4 Interferón- β

Los interferones (INFs) son una familia de citosinas producidas por las células mononucleares como parte de la respuesta inmunológica contra virus y otros agentes infecciosos, presentan propiedades antivirales, inmunomoduladoras y antiproliferativas.

El interferón- β forma parte de esta familia, es una glicoproteína antiviral de bajo peso molecular que consta de 166 aminoácidos con un peso molecular de 18 kDa; es secretada por los fibroblastos primarios humanos después de la inducción con un virus o un RNA de doble cadena. Permite inducir proteínas antivirales, limita la presentación de antígenos, activa a las células natural killer (NK) y presenta actividad antiproliferativa.

Debido a esto se ha estudiado como tratamiento contra diversas enfermedades como: esclerosis múltiple, artritis, enfermedades infecciosas, melanomas, entre otras. Además, mediante la degradación del RNA y/o la inhibición de síntesis proteica, pueden aumentar o disminuir la respuesta inmune, dependiendo de la dosis. [4]

Por las características que brinda se ha llevado a la producción de manera *in vitro*. Existen dos maneras de producirlas: la primera es la forma glicosilada la cual es producida en células de mamíferos (CHO), siendo su secuencia aminoacídica idéntica a la humana; la segunda consta de 165 aminoácidos y sufre modificaciones en su secuencia (delección de la Met-1 y una mutación en la Cys-17 por una Ser) para así poder tener un producto estable, además de ser producida en *Escherichia coli*, aunque no está glicosilada es fisiológicamente activa. [12]

Estas proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP serán utilizadas con el fin de aumentar la solubilidad de la proteína sintetizada, en este caso interferón β -1b, y así tener un método de purificación y producción más eficiente.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

La producción de proteínas recombinantes es una de las aportaciones más importantes de la biotecnología. El hospedero más común es *Escherichia coli* por ventajas destacables como: el conocimiento de su genoma hasta que cuenta con vectores bien establecidos para la producción de proteínas recombinantes; cerca del 30% de las proteínas con fin terapéutico son producidas en *E. coli*. [14]

Se investigó la unión de interferón- β recombinante marcado con ^{125}I , en el cual se realizó una mutación en la Cys 17 por una Ser. Se ha demostrado que los interferones compiten por receptores, el gen de fibroblastos interferón humano (IFNB1) se ha clonado modificado por mutagénesis específica de sitio, y se ha expresado en *Escherichia coli* para generar un interferón altamente activo y estable. La proteína no presenta glicosilación y carece de la metionina N-terminal. Se desea desarrollar un método de radioyodación del interferón para la caracterización directa del receptor, y así determinar si la unión del interferón a varias células es un indicador útil de la respuesta celular. Los resultados se utilizaron para determinar si la unión al receptor se puede utilizar como una prueba de detección para la selección de pacientes antes del tratamiento con el IFN-P Ser17. Con esto se demuestra que el interferón al ser modificado genéticamente y sin presentar glicosilación puede permanecer activo. [1]

El interferón de fibroblastos humano cuenta con 3 residuos de cisteína, utilizando la técnica de mutagénesis específica de sitio, se cambió el codón que codificaba para la Cys-17 por un codón para Ser, se clonó y expresó en *Escherichia coli*, el interferón resultante tiene solo 2 residuos de cisteína, por lo tanto puede formar solamente un único puente desulfuro intramolecular, sin dejar ningún grupo sulfhidrilo libre para formar dímeros u oligómeros y conservar su actividad antiviral, la activación de células natural killer y las actividades antiproliferativas de interferón de fibroblastos nativa. Cuenta con una actividad específica antiviral de 2×10^8 unidades/mg, similar a la del interferón nativo, sin dejar de lado que su conservación puede ser por un plazo largo a -70°C , y esta no pierde actividad. [5]

La estructura de hidratos de carbono de los principales oligosacáridos del interferón humano, han sido sintetizados por una línea celular de ovario de hámster chino mediante ingeniería genética. La cadena de azúcar es importante para mantener la solubilidad de la proteína. El interferón humano es una glicoproteína secretada por los fibroblastos primarios después de la inducción con un virus o un ARN de doble cadena. La proteína producida por las células humanas tiene aproximadamente un peso molecular de 23 kDa, mientras que la forma no glicosilada sintetizada por las células de *E. coli* genéticamente modificadas es de 18 kDa. El peso molecular más alto del interferón es debido a la presencia de hidratos de carbono en una secuencia señal del tripéptido de oligosacáridos ligados al N-terminal de la proteína, sin embargo no hay más información del resto de los carbohidratos, tanto en la proteína nativa como en la recombinante, por lo que se caracterizó el resto de los oligosacáridos del interferón recombinante, secretada por una

línea celular de ovario de hámster chino obtenida por transfección con un plásmido que lleva el gen del interferón humano, bajo un promotor constitutivo. [10]

Con el tiempo la producción de proteínas recombinantes ha ido incrementando, por lo que se busca la manera de que el producto sea lo más similar y fácil de producir, como lo es la proteína nativa. En este estudio se probaron diversos sistemas de expresión entre los cuales se incluyeron diferentes vectores y proteínas de fusión en *E. coli* del interferón-beta humano, para poder ver si los procedimientos podrían crear variaciones al momento de la producción y/o expresión. El gen que codifica para el interferón-beta humano, fue diseñado con los codones preferenciales para *E. coli*, además incluyendo la mutación de la Cys17 por Ser. [9]

La optimización para la producción, así como también para aumentar el potencial de acción de las proteínas recombinantes es lo que se busca para poder seguir innovando o mejorando los fármacos contra enfermedades que en la actualidad se vuelven más resistentes a los fármacos ya existentes. El problema que se presenta en la producción de proteínas recombinantes en células de mamíferos es que presentan muerte celular prolongada, por lo que se ha estudiado la expresión del gen *30kc6* para la producción del interferón-beta recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) en una suspensión libre de suero, los resultados mostraron que si se expresa este gen se muestra una menor actividad apoptótica y se puede aumentar la viabilidad de las células adicionando diferentes compuestos. [22]

Al saber todas las implicaciones que lleva a cabo la producción de proteínas recombinantes en células de mamíferos, en este estudio se utiliza *E. coli* para la producción del interferón-beta recombinante, ya que este microorganismo cuenta con la

capacidad intracelular de poder secretar proteínas al periplasma. Por lo que el proceso y la purificación son más simples, la estabilidad no se ve afectada y proporciona un estado oxidante para promover el plegamiento apropiado de las proteínas producida (interferón-beta). Se diseñó un vector de expresión y clonación basado en el vector pET-25b con el promotor T7, el gen que codifica para el interferón fue optimizado con los codones preferenciales de *E. coli* y se utilizó el péptido señal PelB en el N-terminal, para poder aumentar su solubilidad y permitir que sea secretada al espacio periplásmico. Como resultado se obtuvo que el vector diseñado puede sobre-expresar eficazmente el interferón-beta recombinante en el espacio periplásmico. [12]

La sobre expresión de proteínas recombinantes en el periplasma de *E. coli*, se ha llevado a la optimización, con el fin de aumentar la producción del interferón-beta recombinante en *E. coli* se han estudiado diferentes factores para poder predecir y desarrollar las condiciones óptimas de fermentación para la expresión del mismo. Las variables estudiadas fueron la concentración de glucosa como fuente de carbono, la densidad celular antes de la inducción y la temperatura de inducción. De acuerdo a los valores observados y/o pronosticados, confirmaron la precisión del método estadístico: superficie de respuesta (RSM) para predecir las condiciones óptimas de producción y expresión de la proteína. [11]

El uso de proteínas de fusión para la producción de proteínas recombinantes ha sido de mucha ayuda, ya que permite facilitar la solubilidad del péptido diana, su purificación y hasta la detección de la proteína recombinante. Entre las proteínas de fusión más comunes se encuentran: proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión S-transferasa (GST) y tiorredoxina. Las proteínas CusF y SmbP son nuevas proteínas de fusión que se

utilizaron para mejorar la expresión de distintas proteínas en *E. coli*. Estas proteínas ha incrementado la solubilidad de las proteínas recombinantes comparadas con MBP y GST además facilitan la purificación gracias a que cuentan con cierta afinidad hacia metales, Cu(II) y Ni(II) respectivamente, los datos que se han obtenido en estudios anteriores muestran que se llega a obtener hasta 95 mg de proteína soluble total a partir del lisado de 1 L de cultivo de *E. coli*, y después de la purificación por afinidad se ha recuperado 8.0 mg de la proteína (8.42% de rendimiento) utilizando CusF. Utilizando SmbP los rendimientos también son similares ya que en el estudio que se realizó permitió obtener 4.0 mg de la proteína de interés pura a partir de 5.6 mg de la proteína con SmbP [21] [2]

CAPITULO 3

JUSTIFICAIÓN

3.1 Planteamiento del problema

En la actualidad el proceso de producción de los interferones recombinantes se lleva a cabo de dos formas la primera a partir de *E. coli*, el cual es un producto no glicosilado cuya secuencia aminoacídica en la posición Cys 17 es sustituida por una Ser; la segunda es mediante células de mamíferos (CHO) en el cual el producto es glicosilado, sin embargo, los costos para producción en estas son muy elevados. [14]

Partiendo de los resultados que se han obtenido para la síntesis de quimeras utilizando las proteínas CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión, las cuales fueron aplicadas como tales en el laboratorio de Biotecnología 2 de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, se desea obtener la producción del interferón- β recombinante utilizando estas proteínas de fusión para poder facilitar la purificación de la proteína de interés así como mejorar su procesamiento post-traducciona l ya que son más pequeñas que las que se encuentran ya reportadas, logrando el transporte de la proteína al espacio periplásmico, mejorando los rendimientos de producción.

Este proyecto propone utilizar a *Escherichia coli* genéticamente modificada con el gen IFNB1 (*Homo sapiens*), el cual codifica para el interferón- β , utilizando las proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP para mejorar los procesos post-traduccionales y de purificación en la proteína, logrando así mayores rendimientos y bajos costos, para su potencial aplicación como biofármaco.

3.2 Hipótesis

Utilizando las proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP se producirá interferón- β recombinante en *Escherichia coli* con actividad biológica comparable al producto farmacéutico comercial.

CAPITULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aplicar la tecnología de expresión y purificación de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* utilizando CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión a la producción del interferón- β .

4.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar el gen que codifica para el interferón- β , IFNB1.
2. Construir los plásmidos para la expresión del interferón- β recombinante en *Escherichia coli* marcado con CusF3H+ y SmbP.
3. Purificar el interferón- β recombinante mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos.
4. Evaluar la actividad biológica del interferón- β recombinante mediante un ensayo de cuantificación de partículas víricas.

CAPITULO 5

METODOLOGIA

5.1 Diseño del gen IFNB1

Se mandó a sintetizar el gen IFNB1 el cual codifica para el interferón- β , esto con el fin de optimizar la secuencia con los codones preferenciales de *E. coli*, más una modificación de cambio de aminoácido en la posición Cys-17 por una Ser, para poder asegurar el correcto plegamiento de la proteína y mantener su actividad. Además de añadir una región de reconocimiento para las enzimas de restricción NcoI (CCATGGCT) y XhoI (TAACTCGAG).

La síntesis del gen fue realizada por GenScript Corporation, la secuencia modificada fue entregada en el vector pUC57, enseguida se presenta la secuencia optimizada:

```
CCATGGCTTCTTATAACCTGCTGGGCTTTCTGCAGCGTAGCTCTAATTTCCAG  
TCCCAAAAAGTGTGTGGCAGCTGAACGGTCGTCTGGAATACTGCCTGAAAG  
ATCGCATGAATTTTGACATTCCGGAAGAAATCAAACAGCTGCAGCAATTCCA  
AAAAGAAGATGCGGCCCTGACCATTTATGAAATGCTGCAGAACATTTTTGCG  
ATCTCCGTCAAGACAGTTCCTCAACCGGCTGGAATGAAACGATTGTGCGAAA  
ACCTGCTGGCAAATGTGTACCATCAGATCAACCACCTGAAAACCGTTCTGGA  
AGAAAAACTGGAAAAAGAAGATTTACGCGCGGCAAAGTATGTCGAGCCT  
GCATCTGAAACGTTATTACGGTTCGCATTCTGCATTATCTGAAAGCAAAGAA
```

TACAGCCACTGTGCTTGGACCATTGTGCGTGTTGAAATCCTGCGCAACTTTT
ATTCATCAATCGTCTGACGGGTTACCTGCGCAATTAACTCGAG

5.2 Construcción de plásmidos

El plásmido que se utilizó fue pET30a por lo que fue necesario extraer el gen mediante una digestión enzimática. Por lo que primero se replicó el plásmido para posteriormente realizar una extracción de DNA plasmídico, seguir con la digestión del DNA y obtener las construcciones deseadas, es decir el plásmido pET30a|PelB-SmbPI|IFNB1 y pET30a|CusF3H+|IFNB1.

5.2.1 Transformación de *E. coli* con pUC57+IFNB1

La transformación se realizó en células de *E. coli* DH5a, siendo estas las más utilizadas para clonación ya que aumentan la estabilidad del inserto y mejoran la calidad del DNA plasmídico; esta se llevó a cabo mediante la técnica de rubidio competentes. Se añadieron 30 µl de células a un tubo eppendorf, seguido de 10 ng del DNA plasmídico, ya que se homogenizó la muestra, se dejó incubando en hielo por 30 min, concluido el tiempo se realizó el choque térmico en el cual la muestra se coloca a 44°C por un tiempo de 45 s, enseguida se pasó a hielo por 2 min, terminado el choque térmico se añadieron 800 µl de medio de cultivo LB y se dejó incubando 1 h a 37°C 200 rpm, la muestra fue centrifugada a 10,000 rpm durante 2 min, se descartó el sobrenadante y con el remanente se resuspendió la pastilla celular, esta suspensión celular fue transferida a una placa de LB adicionada con ampicilina (a una concentración final de 100 µg/ml) y se sembró por

dispersión, del mismo modo se realizó un control negativo para finalmente la placa fue incubada aproximadamente 16 h a 37°C.

5.2.2 Extracción de DNA plasmídico pUC57+IFNB1

De las colonias que se obtuvieron al transformar las células, se realizó una selección. Estas se inocularon en 6 mL de caldo LB adicionado con Ampicilina (a una concentración final de 100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas con agitación a 200 rpm. Se colectó en un tubo y se llevó a centrifugación por 2 min a 10000 rpm. Una vez obtenido el sedimento celular se procedió a extraer el ADN plasmídico utilizando el kit QiaPrep Spin Miniprep.

5.2.3 Preparación de los insertos, proteínas de fusión

Para la construcción de los plásmidos primero se deben de tener las construcciones con las proteínas de fusión, es decir CusF3H+ y PelB-SmbP, por lo cual primero se amplificaron las secuencias por el método de PCR siguiendo las condiciones que se presentan a continuación en la tabla 1 y 2.

Tabla 1

Reactivos para la amplificación de las proteínas de fusión

Reactivos	Cantidades
DNA 10ng	1 μ L
Vent polimerasa (2U/ μ L)	0.5 μ L
Buffer 10X	5 μ L
Oligonucleótido 5'-3' (PelB) 60pmol	3 μ L
Oligonucleótido 3'-5' (SmbP) 60pmol	3 μ L
dNTP's (10 mM)	1 μ L
Agua MQ	36.5 μ L
Total de reacción	50 μ L

Tabla 1

Condiciones para PCR

Ciclo de PCR		
Desnaturalización inicial	95 °C	2 min
Desnaturalización	95 °C	1 min
Alineamiento	58 °C	30 s
Amplificación	72 °C	45 s
Extensión final	72 °C	10 min
Mantenimiento	10 °C	-

Al finalizar la amplificación de los genes se realizó una electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 0.7%, con el fin de poder confirmar la secuencia amplificada. Enseguida se cuantificó la cantidad de DNA presente utilizando el Nanodrop, un espectro de UV-Vis, obteniendo una concentración de 68.4 ng/mL.

5.2.4 Digestión de los insertos: CusF3H+ y PelB-SmbP

Para que las proteínas de fusión puedan ser insertadas en el plásmido estos deben de ser complementarios entre si, por lo cual se realizó una digestión enzimática utilizando NdeI y KpnI como se muestra en la siguiente tabla. Tabla 3 y 4

Tabla 2

Digestión de insertos, CusF3H+ y PelB-SmbP

Reactivos	Cantidades
NdeI (10U/ μ l)	1 μ L
DNA (1500 ng)	22 μ L
10 X NeBuffer (1.1)	5 μ L
Agua MQ	21 μ L
Incubar a 37 °C por 1 h	
KpnI (10U/ μ l)	1 μ L
Incubar a 37 °C por 1 h	
Total de reacción	50 μ L

Tabla 3

Reacción de digestión para el pET30a

Reacción	Cantidades
DNA plasmídico (1500ng)	10 μ L
NeBuffer 10X (1:1)	2 μ L
NdeI (10U/ μ L)	1 μ L
KpnI	1 μ L
Agua MQ	6 μ L
Total de reacción	20 μ L

Posteriormente se incubó durante 2 h a 37C, al término de la incubación se añadieron 2 μ L de SAP (1U/ μ L) y se incubo a 37 C por 1 h. Este último paso se realizó con la finalidad de evitar que el plásmido se vuelva a cerrar, los extremos que quedaron libres no se vuelvan a unir.

A finalizar la digestión se realizó una purificación para eliminar sales y poder desactivar las enzimas. este proceso se realizó de la siguiente manera: en un tubo eppendorf se mezcló 1 parte de DNA con 3 partes de buffer QG más 1 parte de isopropanol. Esta mezcla fue colocada en una columna y centrifugada a 6000 rpm durante 1 min. Se descartó el filtrado y se añadieron 750 μ L de solución amortiguadora PE y se centrifugo a 6000 rpm durante 1 min, este paso se realizó por duplicado. Una vez seca la columna, se colocó en un tubo nuevo y se añadieron 30 μ L de agua MQ, por último, se incubo por 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min.

5.2.5 Ligación y clonación molecular

Ligación del plásmido con las proteínas de fusión: pET30a + PelB-SmbP y pET30a + CusF3H+.

Para llevar a cabo las ligaciones se preparó la reacción que se encuentra en la tabla 5, posteriormente se incubó toda la noche a 4 °C, pasado el tiempo se inactivó la enzima a una temperatura de 65 °C por un tiempo de 10 min.

Tabla 4

Reacción de ligación: pET30a + PelB-SmbP/ pET30a + CusF3H+

Reacción	Cantidad
DNA plasmídico	3 µL
DNA inserto (proteína de fusión)	1 µL
10X T4 DNA ligasa Buffer	2 µL
T4 DNA ligasa (2.5 U)	0.5 µL
Agua MQ	13.5 µL
Total de reacción	20 µL

5.3 Transformación en células de *E. coli* con pET30a|CusF3H+|IFNB1 y pET30a|PelB-SmbP|IFNB1

Ya realizadas las construcciones, se procedió con la transformación de cada una de ellas, este paso se realizó de la siguiente manera: primero se descongelaron las células de *E. coli* DH5 α competentes en hielo, ya descongeladas se tomaron 30 μ L y se colocaron en un tubo nuevo eppendorf y se añadió 2 μ L de la construcción, lo cual corresponde aproximadamente a 10 ng de DNA. Se homogenizó la muestra y se incubó en hielo por 30 min, enseguida se realizó el choque térmico en baño de agua a una temperatura de 44 °C por 45 s. Inmediatamente se pasaron a hielo y se mantuvieron ahí por 2 min. Pasado el tiempo, en un ambiente estéril se añadieron 800 μ L de medio LB a cada una de las muestras y se incubaron durante 1 h a 37 °C con agitación. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras fueron centrifugadas a una velocidad de 10000 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante dejando un volumen aproximado de 50 μ L del mismo, con el cual se resuspendió el pellet celular, posteriormente se tomó el homogenizado y se sembró en una placa que contenía agar LB adicionado con Kanamicina (a una concentración final 30 μ g/mL). Por último, se incubó 16 h a 37 °C, para poder observar las clonas positivas.

5.4 Extracción de ADN plasmídico

Para poder asegurar que lo que transformamos era el DNA correcto, se realizó una extracción de DNA plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep kit, siguiendo el protocolo que a continuación se presenta: se levantó una colonia de las clonas positivas que se obtuvieron del paso anterior, es decir de las transformaciones, esta se inoculó en

un tubo que contenía 6 mL de caldo LB adicionado con 6 mL de Kanamicina, se incubó a 37 °C con agitación por 16 h. Transcurrido el tiempo se centrifugó el cultivo a una velocidad de 8000 rpm durante 3 min, el pellet resultante fue resuspendido en 250 µL de solución amortiguadora P1, se añadieron 250 µL de la solución amortiguadora P2 y se homogenizó por inversión hasta que la solución se tornó clara. Se agregaron 350 µL de la solución amortiguadora Buffer N3 y de igual manera se mezcló por inversión. Este homogenizado se centrifugó por 10 min a una velocidad de 13000 rpm. El sobrenadante fue transferido a una columna QIAprep y se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm. Se añadieron 750 µL de solución de lavado PE se centrifugó por 1 min a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante y la columna se colocó en un tubo nuevo, se añadieron 30 ml de agua MQ, para realizar la elución, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó por 1 min a 13000 rpm.

Posteriormente se realizó una PCR para poder confirmar las construcciones realizadas, por lo cual se utilizaron los reactivos que se presentan en la tabla, y las condiciones que se describen a continuación:

Tabla 5

Reactivos para PCR

Reactivos	Cantidades
ADN (10ng)	1 μ l
Taq polimerasa (5U/ μ L)	0.5 μ l
Buffer 10X	5 μ l
Primer Forward T7 (60 pmol)	3 μ l
Primer Reverse T7 (60pmol)	3 μ l
dNTP's (10mM)	1 μ l
Agua MQ	36.5 μ l
Total	50 μ l

Tabla 6

Condiciones de PCR confirmatoria para construcciones en pET30a

Ciclo de PCR		
Desnaturalización inicial	95° C	2 min
Desnaturalización	95°C	1 min
Alineamiento	55°C	1 min
Amplificación	72°C	1.20 min
Extensión final	72°C	2 min
Mantenimiento	4°C	-

Finalizada las PCR, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, la cual se pudo observar las bandas correspondientes a los pesos moleculares de las construcciones.

5.5 Secuenciación

Las construcciones fueron mandadas a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.6. Transformación en *E. coli* BL21(DE3)

Para poder llevar a cabo a expresión y síntesis del interferón- β , fue necesario la transformación de las células de *E. coli* competentes BL21(DE3) con las construcciones que se obtuvieron en el paso anterior, estas células fueron seleccionadas ya que aumenta la eficiencia de la transformación, lo que nos da seguridad de que el plásmido permanezca en la células además de ser deficiente de proteasas, cuenta con el gen de la ARN polimerasa T7 el cual es necesario ya que la expresión está bajo la regulación del promotor T7. Esta parte experimental se llevó a cabo siguiendo la metodología que se redactó en el punto 5.3.

5.7 Expresión piloto

5.7.1 Expresión piloto en *E. coli* BL21(DE3) con pET30a|CusF3H+|IFNB1 y pET30a|PelB-SmbPI|IFNB1

Se realizó una expresión piloto de las clonas positivas que se obtuvieron de la transformación de en *E. coli* BL21(DE3), con la finalidad de poder expresar el interferón- β . Se levantó una colonia de las clonas positivas que se encontraban en las placas de agar, esta se inoculó en un tubo con 2 mL de medio LB adicionada con 2 μ L de Kanamicina (a una concentración final de 30 μ g/ml), se incubó durante 16 h a 37°C 200 rpm, posteriormente se tomaron 20 mL del cultivo y se inocularon en matraces de 250 μ L con 2 mL de caldo LB + 20 μ L de Kanamicina (30 μ g/ml). Se dejaron crecer hasta llegar a una D.O de 0.4, al alcanzar a esta densidad se agregó 20 ml de IPTG a una concentración de 0.1 M, el cual es utilizado como inductor ya que el plásmido que se empleó se encuentra bajo la represión del gen *lacI*. Como control se utilizó un cultivo sin transformar. Los matraces fueron incubados por 16 h a 25 °C, 200 rpm. Finalizada la incubación se centrifugaron los cultivos a 10000 rpm durante 2 min para así obtener el sedimento celular y poder realizar lisis del mismo.

5.7.2 Lisis celular, expresión piloto

Se tomaron 2 mL de los cultivos expresados y se pasaron a tubos eppendorf, estos fueron centrifugados por 2 min a 10000 rpm, se retiró el sobrenadante y quedó el pellet al cual se le añadieron 120 μ L de agua MQ y 40 μ L de Sample Buffer y se homogenizó. Las muestras se sometieron a una temperatura de 100 °C en baño de agua durante 10 min, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 13000 rpm por 10 min. Se obtuvieron dos fases:

el sobrenadante y el pellet, se tomó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, a esta fracción se le denomina fracción soluble. Por el contrario, al sedimento celular restante se le añadieron 120 μ L de Urea al 8 M y se homogenizó. De la misma manera se colocó a baño de agua a 100 °C por 10 min, se centrifugo a 13000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, a esta fase se le denomina fracción insoluble.

5.7.3 Choque osmótico, expresión piloto

Para poder obtener la proteína que se encuentra almacenada en el periplasma, se llevó a cabo un proceso el cual desestabiliza la membrana sin lisar la célula, una de las principales ventajas que presenta esta metodología es que al solo desestabilizar la membrana celular evitamos contaminaciones por proteínas que se pueden encontrar en el citoplasma al momento de realizar una ruptura total de la célula.

De los cultivos que fueron expresados se tomaron 2 mL y se pasaron a un tubo eppendorf, estos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 min. se obtuvo la fase soluble el precipitado celular, se descartó el sobrenadante y se agregó un volumen de 2 mL de agua MQ para lavar el sedimento celular y eliminar restos del medio de cultivo que pudieran encontrarse. Posteriormente se obtuvo el peso húmedo de la muestra, ya que dependiendo de la cantidad celular que se tenga se agregará la solución amortiguadora para realizar el choque a cada una de ellas. Primero se añadió la solución amortiguadora 1 (solución hipertónica), por cada 0.05 g de células se añadió 1 mL que contiene 20% de Sacarosa, 200 mM de Tris-HCl, 2 mM de EDTA, 0.5 mg de Lisozima, a un pH de 8.0. se dejó incubando a 4°C por 1 h. estáticamente, se centrifugó nuevamente a 10000 rpm y se recuperó el sobrenadante, a esta fracción se denominó: fracción hipertónica. El pellet

resultante se resuspendió con la misma cantidad de mL utilizados con la solución número 1, pero ahora se añadió agua MQ, de igual manera se homogenizó y se incubó durante 1 h a 4°C. Finalizado el tiempo se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, se obtuvo el sobrenadante y se almacenó como fracción hipotónica.

5.7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida. SDS-PAGE

Ya obtenidas las fracciones de la lisis (soluble e insoluble) como las del choque osmótico (hipertónica e hipotónica) se realizó una electroforesis, la cual nos permitió visualizar si el interferón- β se estaba expresando, ya que esta técnica permite la separación de proteínas en base a su peso molecular. Para la elaboración del gel se utilizó una concentración del 4 y 12 % de poliacrilamida, siguiendo las especificaciones que se indican en la siguiente tabla:

Tabla 7

SDS-PAGE. Preparación de geles de poliacrilamida, para análisis de proteínas

Gel Separador al 12 %		Gel Concentrador al 4 %	
Agua MQ	4.4 mL	Agua MQ	6.4 mL
Poliacrilamida 40%	3 mL	Poliacrilamida 40%	1 mL
Solución amortiguadora 1.5 M	2.5 mL	Solución amortiguadora 1.5 M	2.5 mL
SDS 10 % p/v	100 μ L	SDS 10 % p/v	100 μ L
APS	100 μ L	APS	100 μ L
TEMED	10 μ L	TEMED	20 μ L

Las condiciones de voltaje que se utilizaron fueron 10 min a 100 V y 1.20 h a 110 V al finalizar los geles se dejaron incubando en una solución de azul de Comassie hasta que las bandas se empezaron a visualizar. Posteriormente se destiñó con agua destilada, y se analizaron los resultados obtenidos.

5.8 Expresión a escala de 1 L

Se realizó un escalamiento a 1 L de la síntesis y expresión del interferón- β . De las expresiones piloto que se realizaron anteriormente, se seleccionaron las colonias que presentaron mayor expresión. Los cultivos fueron elaborados en 8 matraces de 500 mL, es decir, cada uno contaba con 125 mL de medio de cultivo TB adicionado con 125 μ L de Kanamicina (30 μ g/ml) e inoculado con 125 mL de cultivo, el inóculo fue tomado de un cultivo que se dejó creciendo durante la noche de las colonias ya mencionadas.

Los matraces fueron incubados a 37°C con agitación de 200 rpm y se dejaron crecer hasta llegar a una D.O de 1, al alcanzar la D.O se añadieron 125 μ L del inductor (IPTG), y se mantuvo la inducción por un lapso de 4 h. Transcurrido el tiempo se centrifugaron los cultivos en refrigeración a 4 °C a 10000 rpm durante 10 min. y se procedió a realizar una lisis celular.

5.8.1 Lisis celular, escalamiento 1 L

El equipo que se utilizó para realizar la lisis celular fue una cámara de lisado con perlas de vidrio. El sedimento celular se agregó a la cámara interior junto con las perlas de vidrio a los cuales se les añadió una solución amortiguadora (50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl) de lisado y antiespumante aproximadamente 10 μ L, y se colocó en la cámara exterior la

cual siempre debe estar rellena con hielo. Se realizaron 4 ciclos de licuado teniendo un tiempo de duración de 15 s cada uno. Transcurridos los ciclos se dejó sedimentar por 10 min y se tomó el sobrenadante, el cual fue centrifugado a 4° C, 15000 rpm durante 10 min. Se tomó el clarificado o la fracción soluble y se centrifugó nuevamente para desgasificar la muestra, estando lista para poder pasar a la purificación.

5.9 Purificación de proteínas

Para la purificación del interferón- β se utilizaron diferentes metodologías, las cuales implican la técnica de IMAC (Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados), a continuación, se describirán cada una de ellas.

5.9.1 Purificación del interferón- β por resina IMAC

En un tubo se añadió la resina, se centrifugó por 15 s. a 1000 xg y se retiró el sobrenadante dejando un poco para no dejarla completamente seca. Se lavó con agua MQ utilizando un volumen de resina, este paso se realizó 5 veces. Se equilibró la resina con 5 volúmenes de columna utilizando una solución amortiguadora para equilibrar la resina (5mM de acetato de sodio, 0.3 M de NaCl, pH 4.0), posteriormente se lavó con 5 volúmenes de la solución NiSO₄ 0.1 M, y de nuevo se pasaron 5 volúmenes de la solución de equilibrio, posteriormente se realizó otro lavado con agua MQ utilizando 10 volúmenes de resina. Se equilibró nuevamente utilizando la solución amortiguadora con la que se realizó la lisis (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.5). Enseguida se añadió la fracción obtenida, siendo esta de la lisis o del choque osmótico y se incubó toda la noche (16 h) en refrigeración a 4°C. posteriormente se recolectó la resina y se colectó en un tubo

ependorf. Se realizó un lavado con solución amortiguadora (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.5) y posteriormente con una solución de lavado que contenía imidazol (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.5) por último se realizó la elución de la proteína utilizando 5 volúmenes de columna con solución amortiguadora (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 8.5).

5.9.2 Purificación de interferón- β por cromatografía de afinidad a iones metales inmovilizados (IMAC)

Este proceso se realizó utilizando el equipo AKTA de GE, se cargó una columna empacada HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare) con iones Ni. Posteriormente esta fue equilibrada con 5 volúmenes de columna con una solución amortiguadora compuesta de Tris-HCl 300 mM- NaCl 500 mM pH 8.5, posteriormente se pasó la muestra por la columna utilizando 0.5 mL de flujo y 0.5 MPa el límite de presión, al mismo tiempo se recolectó la fracción no unida para analizarla al final de la purificación; se realizó un lavado de la columna utilizando la misma solución de tampón ya antes mencionada hasta que se logró diluir la muestra y disminuir la señal de absorbancia hasta alcanzar el punto en el que se mantuviera constante, posteriormente se realizaron lavados a la columna pasando tres volúmenes de la misma utilizando la solución amortiguadora ya antes usada adicionada con 10 mM de imidazol, para finalizar se realizó una elución utilizando una solución amortiguadora de Tris-HCl 300 mM – NaCl 500 mM – Imidazol 200 mM, manteniendo el flujo y la presión constante se recolectaron fracciones de 500 μ L cada una, las cuales fueron refrigeradas para su posterior análisis.

5.9.2.1 Diálisis

De las fracciones que se colectaron al realizar la elusión de la proteína, se seleccionaron aquellas en las cuales se mostró un aumento en la absorbancia, la cual indicaba que la proteína estaba pasando por la columna, además de corroborar la presencia de la misma por SDS-PAGE. Se realizó una diálisis con la finalidad de remover la solución amortiguadora con la cual se realizó la elusión de la proteína ya que este contenía imidazol, esta fue realizada en una membrana de diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) utilizando como solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM y NaCl 500 mM pH 8.5, este proceso se realizó dos veces en constante agitación y refrigeración, cambiando la solución amortiguadora cada hora. Posteriormente la muestra se conservó a -20° C.

5.9.3 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó por medio del método Bradford, el cual consiste en agregar un colorante que al encontrarse en un medio hidrofóbico, como es el interior de una proteína, tiende a originar un color azul intenso el cual se puede medir fácilmente por un espectro de absorción (agregar referencia). Para poder determinar la concentración de la proteína se requiere de una curva de calibración, la cual se realizó con un estándar de albúmina de suero bovino (ASB) a distintas concentraciones:

Concentración mg/mL	ASB	Agua MQ
1.0	15 μ l	0
0.8	16 μ l	4 μ l
0.6	12 μ l	8 μ l
0.4	8 μ l	12 μ l
0.2	4 μ l	16 μ l
0.1	2 μ l	18 μ l

Enseguida en una placa de 96 pocillos se colocaron 5 μ L de cada estándar por triplicado, así como de la muestra (nuestra proteína) y se colocó en un lector de microplacas Thermo Scientific (Modelo MultiSkan Go) y se mantuvo en incubación por 5 min en agitación para después pasar a realizar la medición a una longitud de onda 595 nm.

5.9.4 Remoción de la proteína de fusión

Para poder remover la proteína de fusión fue necesario realizar un corte con la enzima enteroquinasa de cadena ligera de (NEB), ya que entre la proteína de fusión y el interferón- β se encuentra este sitio de reconocimiento , para lo cual se tomó 1 mL de la proteína que se dializo, y se agregaron 3 μ l de la enzima enteroquinasa, se dejó incubar por 16 h a temperatura ambiente y posteriormente se realizó una purificación por resina siguiendo los pasos de la apartado anterior, para poder separar las proteínas y obtener el interferón- β puro. Se realizo la elusión y las fracciones obtenidas se analizaron por medio de un SDS-PAGE utilizando un gel de una resolución del 15 %.

CAPITULO 6

RESULTADOS

6.1 Síntesis del gen IFNB1

Se mandó a sintetizar la secuencia del gen IFNB1, el cual codifica para el interferón- β , esto lo realizó en GenScript, quien optimizo la secuencia con los codones preferenciales para *E. coli*, los cuales son presentados en la siguiente tabla X:

TCT	TAT	AAC	CTG	CTG	GGC	TTT	CTG	CAG	CGT	AGC	TCT	AAT	TTC	CAG	TCC	CAA	AAA	CTG	CTG
S	Y	N	L	L	G	F	L	Q	R	S	S	N	F	Q	S	Q	K	L	L
TGG	CAG	CTG	AAC	GGT	CGT	CTG	GAA	TAC	TGC	CTG	AAA	GAT	CGC	ATG	AAT	TTT	GAC	ATT	CCG
W	Q	L	N	G	R	L	E	Y	C	L	K	D	R	M	N	F	D	I	P
GAA	GAA	ATC	AAA	CAG	CTG	CAG	CAA	TTC	CAA	AAA	GAA	GAT	GCG	GCC	CTG	ACC	ATT	TAT	GAA
E	E	I	K	Q	L	Q	Q	F	Q	K	E	D	A	A	L	T	I	Y	E
ATG	CTG	CAG	AAC	ATT	TTT	GCG	ATC	TTC	CGT	CAA	GAC	AGT	TCC	TCA	ACC	GGC	TGG	AAT	GAA
M	L	Q	N	I	F	A	I	F	R	Q	D	S	S	S	T	G	W	N	E
ACG	ATT	GTC	GAA	AAC	CTG	CTG	GCA	AAT	GTG	TAC	CAT	CAG	ATC	AAC	CAC	CTG	AAA	ACC	GTT
T	I	V	E	N	L	L	A	N	V	Y	H	Q	I	N	H	L	K	T	V
CTG	GAA	GAA	AAA	CTG	GAA	AAA	GAA	GAT	TTC	ACG	CGC	GGC	AAA	CTG	ATG	TCG	AGC	CTG	CAT
L	E	E	K	L	E	K	E	D	F	T	R	G	K	L	M	S	S	L	H
CTG	AAA	CGT	TAT	TAC	GGT	CGC	ATT	CTG	CAT	TAT	CTG	AAA	GCA	AAA	GAA	TAC	AGC	CAC	TGT
L	K	R	Y	Y	G	R	I	L	H	Y	L	K	A	K	E	Y	S	H	C
GCT	TGG	ACC	ATT	GTG	CGT	GTT	GAA	ATC	CTG	CGC	AAC	TTT	TAT	TTC	ATC	AAT	CGT	CTG	ACG
A	W	T	I	V	R	V	E	I	L	R	N	F	Y	F	I	N	R	L	T
GGT	TAC	CTG	CGC	AAT															
G	Y	L	R	N															

Figura 2 Secuencia nucleotidica optimizada para la síntesis de interferón- β en *E. coli*, el codón de inicio que codificaba para una Met fue suprimido, además se realizó un cambio en la posición Cis-17 fue sustituida por una Ser

Además, se agregaron los sitios de corte de las enzimas Nco I CCATGGCT y Xho I TAACTCGAG en el extremo 5' y 3' prima.

6.2 Amplificación de los insertos CusF3H+ y PelB-SmbP

Se realizó un análisis de restricción para poder obtener las secuencias de las proteínas de fusión, utilizando las enzimas Nde I y Kpn I. Posteriormente se realizó la amplificación de los mismos por medio de una PCR siguiendo los pasos que se describen en el apartado de metodología X, los productos amplificados se analizaron a través de una electroforesis en gel de agarosa los cuales obtuvieron un peso aproximado de 354 pb para PelB-SmbP y 348 pb para CusF3H+ observándose los resultados en las figuras 1 y 2 que se presentan a continuación:

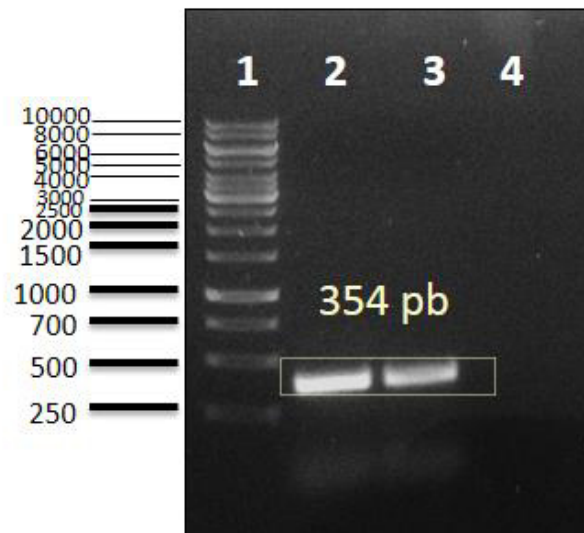


Figura 3 Productos de amplificación de PelB-SmbP en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2 y 3: PelB-SmbP, 4: Control (-) sin enzima.

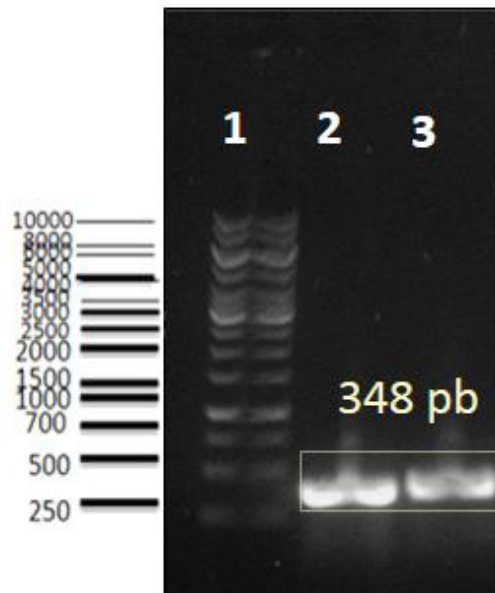


Figura 4 Productos de amplificación de CusF3H+ en gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2 y 3 CusF3H+.

6.3

Clonación

molecular de los plásmidos pET30a|PelB-SmbP|IFNB1 y pET30a|CusF3H+|IFNB1

6.3.1 Construcción de pET30a|PelB-SmbP y pET30a|CusF3H+

Ya obtenidos los insertos se continuó realizando una reacción de ligación en el plásmido pET30a siguiendo la metodología ya antes descrita en el apartado X. Posteriormente el producto de ligación fue transformado en la cepa de *E. coli* DH5a para la propagación del plásmido.

6.3.1.1 Construcción de pET30a|PelB-SmbP|IFNB1 y pET30a|CusF3H+|IFNB1

El plásmido pUC57 se sometió a una digestión enzimática ya que en este se encontraba el gen IFNB1, el cual codifica para el interferón- β , la digestión se llevó a cabo con las enzimas Nco I y Xho I, ya que el gen cuenta con esos sitios de reconocimiento en

sus extremos 5' y 3'. De la misma manera se realizó la digestión para la construcción pET30alPelB-SmbP y pET30alCusF3H+. para analizar los fragmentos obtenidos de la digestión del pUC57, se realizó un análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.7%, en el cual se observaron dos bandas, las cuales corresponden al plásmido linealizado con un peso de 2710 pb y otra que corresponde al gen IFNB1 con un peso de 512 pb, fig. 5

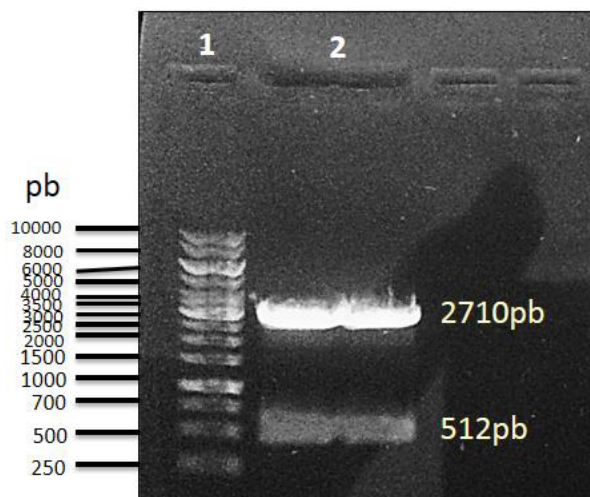


Figura 5 Digestión enzimática de pUC57/IFNB1. Gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2: pUC57/IFNB1

Se realizó una extracción de la banda que corresponde al peso molecular del IFNB1 para poder realizar una extracción de ADN por medio del QUIAPrep Spin Miniprep.

Ya que se obtuvo el DNA digerido se procedió a realizar la reacción de ligación para poder tener las siguientes construcciones: pET30alPelB-SmbP/IFNB1 y pET30alCusF3H+/IFNB1, para lo cual se siguió el procedimiento ya mencionado en la sección de metodología. Se tomaron 5 ml de la reacción de ligación para transformarse en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la cual se utilizó para la expresión de la proteína.

Se seleccionaron 2 clonas positivas de cada construcción y se realizó una extracción de ADN plasmídico para ser analizada y confirmada por PCR. Se realizó la PCR del ADN extraído, posteriormente los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa nuevamente al 0.7%. se obtuvo una banda de un peso de 1086 pb para la construcción que corresponde a pET30a|PelB-SmbPI|IFNB1 y otra de 1080 pb para la construcción de pET30a|CusF3H+|IFNB1, figuras 6 y 7

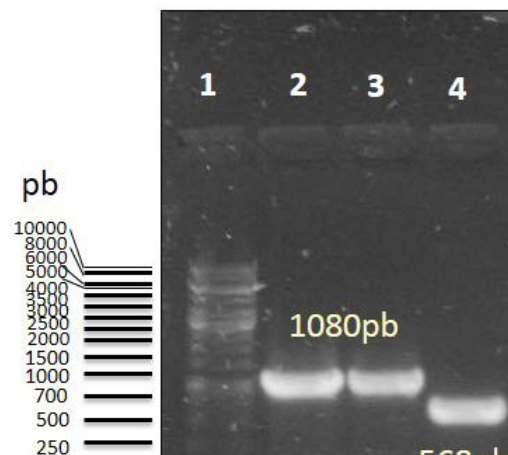


Figura 6 Productos amplificados de PCR para confirmar el gen PelB-SmbPI|IFNB1 en el plásmido pET30a. Gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2: control (-) sin DNA, 3: control (+) IFNB1, 4 y 5: pET30a|PelB-SmbPI|IFNB1

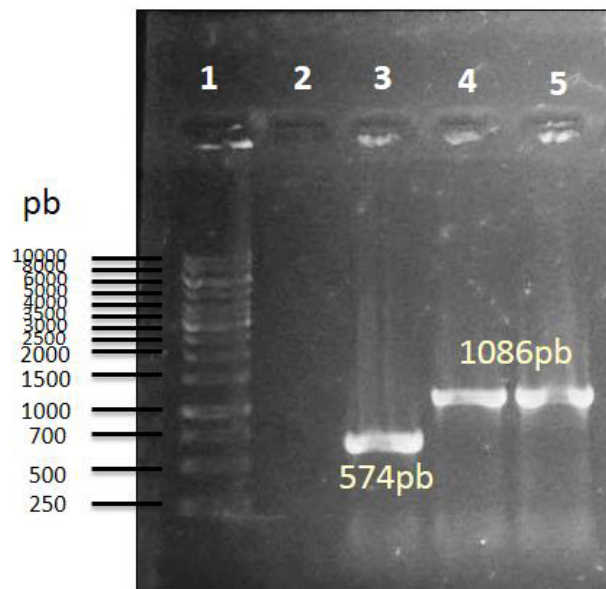


Figura 7 Productos amplificados de PCR para confirmar el gen Cusf3H+IFNB1 en el plásmido pEt30a. Gel de agarosa al 0.7%. Carril 1: marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder), 2 y 3: pET30a/CusF3H+IFNB1, 4: control (+) IFNB1.

6.3.2 Secuenciación

Una vez realizadas las construcciones y confirmadas por medio de PCR, se mandó a realizar una secuenciación, para asegurarnos de que las secuencias tanto de las proteínas de fusión como la del interferón- β estuvieran insertadas en el plásmido. Por lo cual se mandó una muestra de 50 μ l, los resultados fueron analizados utilizando el programa Finch TV, mostrando las bases nucleotídicas, las cuales fueron comparadas con las secuencias codificantes que se tenían de cada una de las proteínas. Figuras 8 y 9



Figura 8 Secuenciación de la construcción de pET30a|PeIB-SmbPI IFNβ1



Figura 9 Secuenciación de la construcción de pET30a|CusF3H+IFNβ1

6.4 Condiciones para la expresión de la proteína recombinante

Se han reportado diferentes condiciones para la expresión de proteínas recombinantes, por lo cual se decidió variar las siguientes condiciones: temperatura, medio de cultivo, concentración del inductor, y la D.O a la que se requiere para iniciar la expresión.

Se comenzó utilizando las condiciones que ya se encuentran establecidas para trabajar con las proteínas PelB-SmbP y CusF3H+, las cuales son medio de cultivo LB a una temperatura de 37°C a 200 rpm, una D. O alcanzada de 0.4 para poder iniciar la inducción, una concentración de IPTG de 0.01 mM y una temperatura y tiempo de expresión a 25 °C durante 16 h. Estas condiciones fueron probadas en un volumen de 25 mL en matraces de 125 mL. Al realizar el choque osmótico y analizar las fracciones hipertónicas e hipotónicas, se observó que no se encontraba la banda correspondiente al peso molecular esperado de la proteína recombinantes, aproximadamente 30 kDa.

Dados los resultados y basándonos en los reportes consultados, se decidió modificar la temperatura de expresión, por lo cual se realizó de nuevo una expresión piloto de la misma manera solo que ahora se cambió la temperatura a 37°C y la D.O se dejó alcanzar a 1.0, y al momento de observar los resultados se mostró el mismo comportamiento por lo que se optó por la modificación del medio de cultivo y las concentraciones del inductor.

Nuevamente se realizó la expresión utilizando las siguientes condiciones: Temperatura de incubación a 37°C 200 rpm, D.O alcanzada de 1.0, temperatura de expresión de 37°C durante 4, 6 y 8 h., y variando la concentración del inductor a 0.2, 0.5 y 1 mM. En esta ocasión se lograron observar las bandas en el peso esperado, y se pudieron elegir las mejores condiciones para su expresión, las cuales fueron de: temperatura de

incubación de 37°C a 200 rpm hasta llegar a una D.O de 1.0, posteriormente añadir IPTG a una concentración de 1 mM y expresar por 4 h con las mismas condiciones. Figura 10

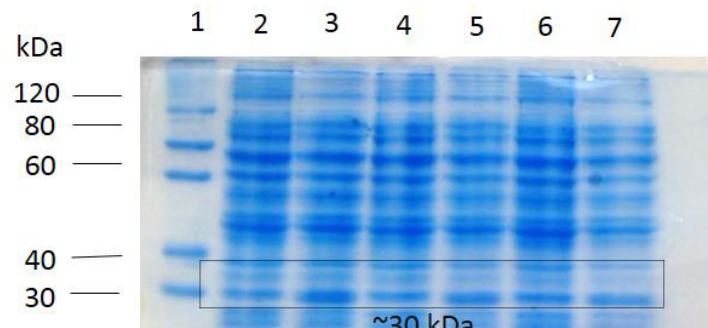


Figura 10 Fig. 2 Expresión piloto, a diferentes concentraciones de IPTG.SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2 y 3: Concentración 1 mM, 4 y 5: Concentración 0.5 mM, 6 y7: Concentración 0.2 mM

Ya establecidas las mejor condiciones de expresión, se transformó en la cepa *E. coli* BL21(DE3), se preparó un pre inoculo (overnight) y se cultivó en 25 mL de caldo LB adicionado con Kanamicina (30µg/ml) para su crecimiento posteriormente al llegar a la densidad 1 se realizó la inducción de la síntesis de la proteína recombinante con diferentes concentraciones de IPTG, esto con el fin de poder obtener mejor resultados al momento de su extracción y purificación, concluido el tiempo de la inducción se obtuvieron los sedimentos celulares y se realizó la lisis celular utilizando la metodología ya antes descrita en el 5.1.2 , posteriormente se realizó un análisis de las fracciones en gel de poliacrilamida, SDS-PAGE para visualizar la expresión de la proteína en base a su peso molecular. Resultando las bandas en aproximadamente en 30 kDa para ambas construcciones y

mostrando proteína soluble, sin embargo se puede observar que hay mayor presencia de proteína en la construcción que cuenta con la proteína de fusión PelB-SmbP.

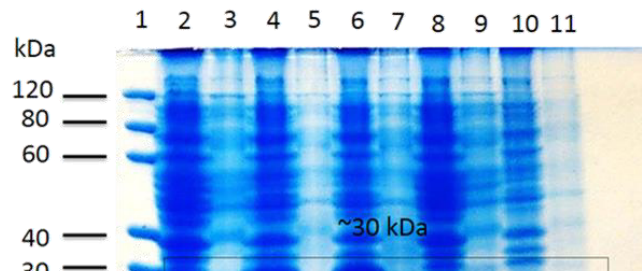


Figura 11 Lisis celular de expresiones piloto. SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2 y 3: control (-) *E. coli* BL21(DE3) sin transformar, 4-7: pET30a-PelB-SmbP-IFNβ1 inducida (fracción soluble/fracción insoluble), 8-11: pET30a-CusF3H+IFNβ1 inducida (fracción soluble/fracción insoluble)

6.4.1 Expresión piloto del interferón-β utilizando el método de choque osmótico

Las construcciones, se transformaron en la cepa *E. coli* BL21(DE3) y se inocularon en 25 mL de caldo LB adicionado con Kanamicina (a una concentración final de 30 μg/ml) para realizar una expresión piloto del interferón-β, se obtuvieron los sedimentos celulares y se realizó la extracción de las proteínas por medio de choque osmótico, el cual se describe en el apartado de metodología, posteriormente se realizó un análisis de las fracciones solubles e insolubles en gel de poliacrilamida, SDS-PAGE para visualizar la expresión de la proteína en base a su peso molecular. Resultando las bandas en aproximadamente en 30 kDa y mostrando proteína soluble, sin embargo, la banda que pertenece a la construcción pET30a|CusF3H+IIFNβ1, no es tan visible. Figura 11



Figura 12 Choque osmótico de expresiones piloto. SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2 y 3: control (-) *E. coli* BL21 (DE3) sin inducir, 4-7: PelB-SmbP-IFNB1 inducida, 8-11: CusF3H+-IFNB1

6.4.2

Expresión a escala del interferón- β

6.4.2.1 Expresión en medio de cultivo LB adicionado con Kanamicina

Al observar la presencia de la banda en las fracciones analizadas tanto de la lisis celular y del choque osmótico, se optó por llevar el proceso a una escala de 1 L, en el cual solo se expresó la construcción de pET30a|SmbP-PelB|IFNB1. Se preparó 1 L de medio de cultivo LB y se vació en matraces bafleados, cada uno con 125 mL adicionados con Kanamicina (a una concentración final de 30 $\mu\text{g/ml}$), estos fueron inoculados con el 1% de su volumen. Se realizó la incubación y posteriormente se obtuvieron los sedimentos celulares para proceder con la extracción de la proteína recombinante, para llevar a cabo el choque osmótico se tomó en cuenta la cantidad de masa celular que se obtuvo ya que

las condiciones para poder realizar el procedimiento son dependiente de la masa que se haya obtenido, por lo cual se tomó en cuenta el peso húmedo de los mismo así como el peso de los tubo en los que se encontraban para poder obtener el peso exacto que se obtuvo a partir de 1 L de cultivo. Tabla 9

Tabla 8

Peso húmedo de sedimentos celulares de las construcciones pET30alPelB-SmbPIIFNB1 y pET30alCusF3H+IFNB1, como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* BL21(DE3)

Muestra	Tubo vacío (gr.)	Tubo con sedimento celular (gr.)	Sedimento celular (gr.)
Control negativo	16.1309	16.3854	0.3
pET30alPelB-SmbPIIFNB1	16.1309	16.3566	0.3
pET30alCusF3H+IFNB1	16.1564	16.4071	0.3

Cada una de las muestras fue resuspendida en 6 mL de la solución hipertónica, de igual manera al retirar esa fracción se añadieron 6 mL de la solución hipotónica al sedimento celular resultante y se procedió con el mismo protocolo. Posteriormente estas fracciones fueron analizadas por una electroforesis de poliacrilamida SDS-PAGE, el cual las bandas resultantes no se lograron observar cómo se visualizaron en las expresiones piloto, sin embargo, se esperaba la banda correspondiente al peso molecular de la proteína recombinante en 30 kDa. Figura 13

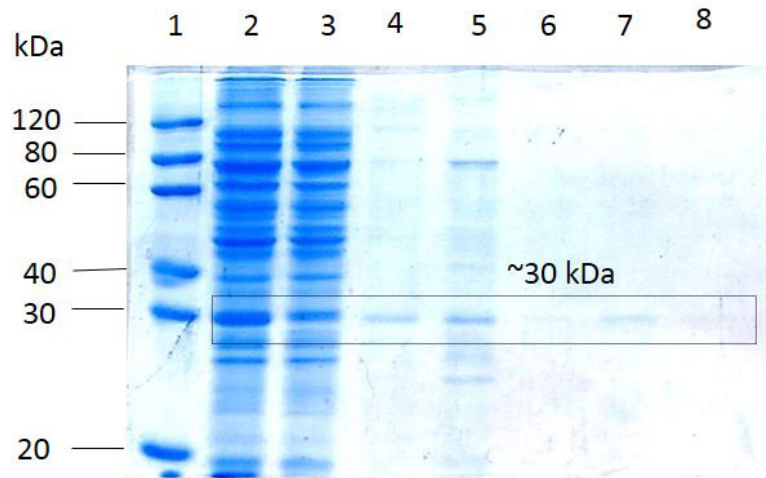


Figura 13 Purificación por resina IMAC.SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2 y 3: control (-) *E. coli* BL21(DE3) sin inducir, 4-7: PelB-SmbP-IFNB1 inducida, 8-11: CusF3H+-IFNB1

6.4.2.2 Expresión a escala de 200 mL utilizando como medio de cultivo TB adicionado con Kanamicina.

Utilizando la misma metodología, se preparó un matraz con 200 mL de medio TB adicionado con Kanamicina, se llevó a cabo la expresión de la proteína, se realizó una lisis y una purificación por IMAC utilizando resina cargada con Ni^{+2} , se analizaron las fracciones por medio de SDS-PAGE y se visualizó la banda esperada en un peso de 30kDa como se muestra en la figura 14.

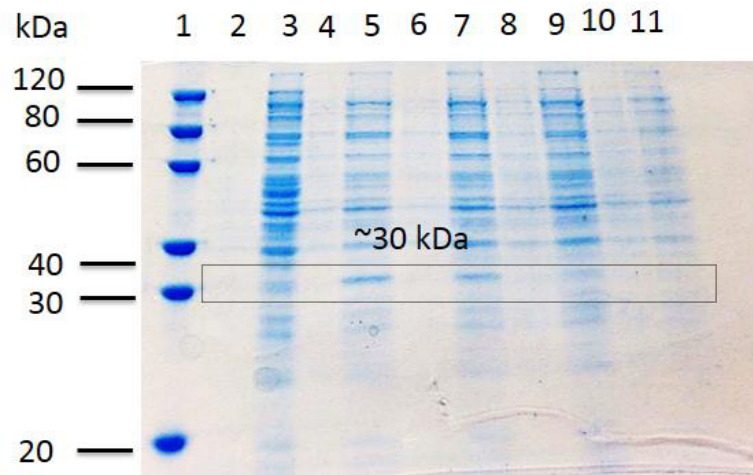


Figura 14 Lisis de expresión a escala en 200 mL. SDS-PAGE 12%.
 Carril 1: marcador de peso molecular, 2: Muestra sin purificar, 3:
 fracción no unida, 4-8: fracciones de elusión.

6.4.3 Expresión a escala de 1 L, en medio de cultivo LB adicionado con Kanamicina

Al observar la presencia de la banda en las fracciones analizadas tanto de la lisis celular y del choque osmótico, se optó por llevar el proceso a una escala de 1 L, en el cual solo se expresó la construcción de pET30a|SmbP-PelB|IFNB1. Se preparó 1 L de medio de cultivo LB y se vació en matraces bafleados, cada uno con 125 mL adicionados con Kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$), estos fueron inoculados con el 1% de su volumen. Se realizó la incubación y posteriormente se obtuvieron los sedimentos celulares para proceder con la extracción de la proteína recombinante, para llevar a cabo el choque osmótico se tomó en cuenta la cantidad de masa celular que se obtuvo ya que las condiciones para poder realizar el procedimiento son dependiente de la masa que se haya obtenido, por lo cual se tomó en cuenta el peso húmedo de los mismo así como el peso de los tubo en los que se encontraban para poder obtener el peso exacto que se obtuvo a partir de 1 L de cultivo. Posteriormente se realizó una diálisis para poder solubilizar la muestra y así realizar la

purificación por el ÄKTA Prime Plus utilizando cromatografía IMAC. Posterior a la purificación se analizaron las fracciones eluidas, sin embargo, la expresión fue muy baja, observándose en las bandas correspondientes a la proteína recombinante, PelB-SmbP.

Figura 15

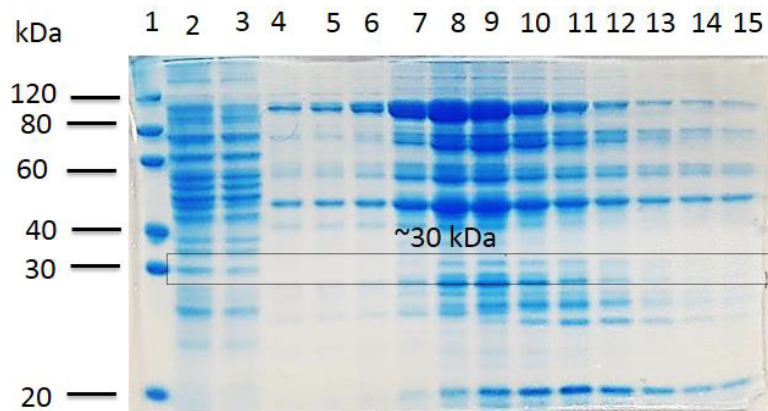


Figura 15 Purificación de la fracción soluble del lisado en 1L. SDS-PAGE al 12%. Carril 1: marcador peso molecular, Carril 2 muestra son purificar, Carril 3: Fracción no unida, Carril 4 y 5: Lavados con imidazol al 5 y 10 mM, Carril del 6 al 15: Fracciones eluidas

6.4.4 Expresión a escala 4L, en medio de cultivo TB adicionado con Kanamicina

Se realizo el método para la expresión de la proteína y se llevó a cabo un lisado celular, recolectando la fracción soluble del mismo, esta fracción se purifico por cromatografía IMAC utilizando el FPLC ÄKTA Prime Plus, se realizaron lavados y para la elusión se utilizó una solución de lavado con imidazol a una concentración de 200 mM.

Posteriormente las fracciones en las cuales se encontraba la proteína fueron analizadas por medio de SDS-PAGE. Mostrando resultados positivos, ya que se encontró una banda con el peso esperado de la quimera: 30 kDa. Figura 16

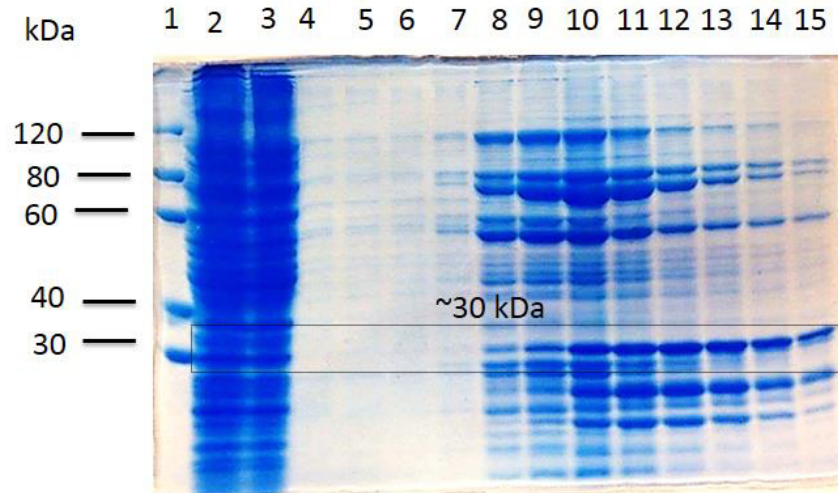


Figura 16 Purificación de la fracción soluble del lisado en 4L. SDS-PAGE al 12%. Carril 1: marcador peso molecular, Carril 2 muestra son purificar, Carril 3: Fracción no unida, Carril 4: Lavados con imidazol al 10 mM, Carril del 5 al 15: Fracciones eluidas con imidazol

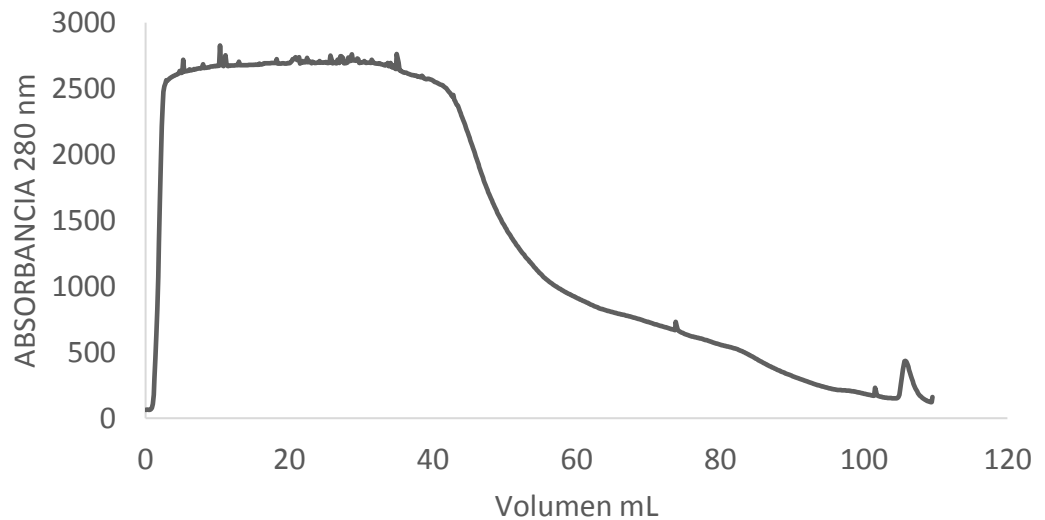


Figura 17 Cromatograma de la purificación por cromatografía IMAC de Pelb-SmbP-IFNB1

Siguiendo el mismo procedimiento ya descrita con anterioridad, de nuevo se realizó la expresión del interferón- β en 4 L de medio de cultivo TB, al término de la expresión se recolecto el sedimento celular y se realizó una lisis utilizando las soluciones amortiguadoras a un pH de 8.5 posteriormente se realizó la purificación por resina la cual se mantuvo en contacto con la muestra lisada durante 16 h, posteriormente se siguieron los pasos para lavar y colectar las fracciones eluidas y se tomó el sobrenadante o la fracción no unida a la resina, esta fracción fue desgasificada para de nuevo someterse a una segunda purificación pero ahora por cromatografía IMAC utilizando el FPLC ÄKTA Prime Plus, se realizaron los lavados y la elución, las fracciones eluidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE, en el cual se puede observar una banda que corresponde al peso molecular de la proteína quimera la cual se presenta en ~ 30 kDa Figura 18, además se puede apreciar que la banda muestra una cantidad menor de proteínas contaminantes si aplicamos el paso de purificación en resina comparada con la fig 15 en la cual solo se realizó una purificación.

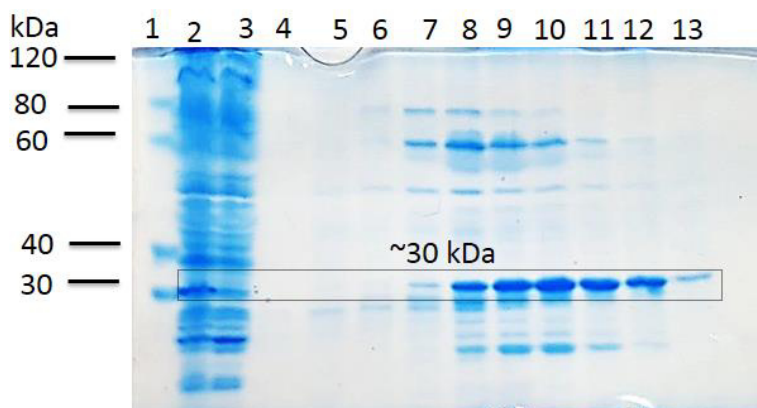


Figura 18 Segunda purificación por IMAC del lisado de 4L. SDS-PAGE al 12%. Carril 1: marcador peso molecular, Carril 2 muestra son purificar, Carril 3: Fracción no unida, Carril 4: Lavados con imidazol al 10 mM, Carril del 5 al 12: Fracciones eluidas con imidazol al 200 mM, Carri 13Fracción eluida con 300 mM de imidazol

CAPITULO 7

DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó la síntesis del interferón- β recombinante, utilizando proteínas de fusión con el fin de facilitar la purificación y obtener un producto con mayor solubilidad. Con la finalidad de poder utilizar este sistema de expresión en *Escherichia coli* para la síntesis de diferentes proteínas recombinantes, principalmente biofármacos, los cuales son muy costosos de realizar, además los procesos para su purificación requieren de múltiples etapas, las cuales elevan aún más sus costos.

Para la construcción de los vectores fue necesario la síntesis del gen que codifica para el interferón- β , para lo cual fue necesario realizar unas modificaciones en la secuencia como se menciona en el apartado de resultados, ya que si la secuencia se mantiene tal cual como codifica para una célula eucariota, al momento de sintetizarse en una procariota es decir en *E. coli*, esta pierde su actividad, debido a la formación de enlaces disulfuro que la bacteria no puede llevar a cabo. Sin embargo, con las modificaciones sufridas (delección de la Met inicial, cambio de aminoácido Cis-17 por Ser) y además la inserción de la proteína de fusión (PelB-SmbP), esta fue posible sintetizarse y expresarse en la bacteria, además permite que la proteína traducida en su estructura primaria sea capaz de viajar al periplasma a través de la ruta de transporte dependiente de Sec. El péptido señal de escinde y la proteína recombinante se pliega en el periplasma con la ayuda de chaperonas,

favoreciendo la formación de enlaces disulfuro que requiere para su funcionalidad. Ya que el periplasma mantiene un ambiente oxidado el cual permite que se realice la formación de dichos enlaces. [11] [12]

La Met inicial de la secuencia del interferón- β fue eliminada ya que, al momento de sintetizar la quimera, la proteína de fusión proveerá una sola proteína.

Las expresiones piloto fueron llevadas a cabo a un volumen de 25 mL las cuales al principio se tomaron las condiciones que ya se encontraban establecidas en el laboratorio, las cuales consistían llegar a una D.O de 0.4 posteriormente la inducción con IPTG al 0.1 mM a una temperatura de 25 °C, ya que se ha comprobado que las temperaturas bajas ayudan a disminuir la formación de cuerpos de inclusión además como su metabolismo se ve reducido, la cinética del plegamiento de las proteínas se puede ver beneficiado. [23]. Sin embargo, no se observaron resultados, a pesar de que las temperaturas bajas son las que elevan o ayudan a la expresión de proteínas recombinantes, se debe resaltar que no funciona de la misma manera para todas, ya que cada una presenta características diferentes, por lo cual requieren de condiciones distintas. Encontrando que la temperatura no es solo la que puede variar, si no también el medio de cultivo, la D.O a la que se trabaja para iniciar la expresión, el tiempo al cual se deja induciendo la proteína y la concentración del inductor (IPTG). [18] Sin embargo, en la literatura consultada no se encontró una condición establecida, por lo cual se trabajó realizando un pequeño diseño de experimentos para encontrar las mejores condiciones de síntesis y expresión.

Mostrando los mejores resultados a temperaturas altas y tiempos de expresión cortos (37°C y 4 hr.) [24]

Para poder extraer la proteína del espacio periplásmico se probaron dos metodologías: el choque osmótico y la lisis celular. El choque osmótico es el método más recomendado, ya que al solo crear poros en la membrana, evita la contaminación con desechos celulares y otras proteínas que puedan encontrarse en el citoplasma, sin embargo, se decidió optar por la lisis, ya que, al momento de obtener la fracción hipotónica del choque, se mostraba muy denso, lo cual no permitía la purificación por IMAC, cabe mencionar que al momento de realizar choque osmótico no todas las células sufren el daño hacia su membrana, por lo cual la cantidad de proteínas que se extraen es menor. [21]

Uno de los problemas más comunes que se presentan en la producción de proteínas recombinantes, es la solubilidad. Al utilizar una proteína de fusión, en este caso PelB-SmbP pudimos observar que esta característica se mejoró, como se visualiza en la figura 10, la proteína se encuentra en su gran mayoría o en su totalidad de manera soluble. Esto es un gran paso ya que si deseamos escalar el proceso podemos evitar una etapa en la que se tenga que replegar la proteína, ya que la producción del interferón- β en células procariotas conlleva la máxima expresión de la proteína de manera insoluble, por lo que en su mayoría son cuerpos de inclusión, que estos representan proteína inactiva. [23] Por lo cual podemos asumir que el aumento de solubilidad y expresión fue gracias a la proteína de fusión.

En investigaciones anteriores la purificación de esta proteína recombinante se ha realizado a través de cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) utilizando un His-Tag, por otra parte, la cantidad obtenida de proteína se debe de someter a un proceso de repliegamiento para mantener su forma activa. Este proyecto tiene como finalidad crear un

sistema de expresión que permita facilitar la purificación de las proteínas recombinantes, sin embargo, en los experimentos que se realizaron se presentaron dificultades para poder llevar a cabo una purificación exitosa. No obstante, como resultados de esta investigación se ha logrado mejorar la producción y solubilidad del interferón- β recombinante, y finalmente se ha logrado disminuir la formación de cuerpos de inclusión.

CAPITULO 8

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos se clono y se transformó en *Escherichia coli* la secuencia sintetizada del IFNB1, el cual codifica para el interferón- β , así mismo se logró su expresión en el periplasma de la bacteria.

Las condiciones ideales para la expresión del interferón-b son: inducción con IPTG a una concentración de 1 mM al llegar a un D.O de 1, temperatura de 37 °C a 200 rpm durante 4 horas.

Durante la purificación se observa que se retiene la proteína tanto en la resina como en la columna ambas cargadas con Ni⁺², sin embargo, se debe seguir trabajando en esta etapa probando diferentes condiciones, para lograr aumentar la pureza de nuestra proteína.

CAPITULO 9

PRESPECTIVAS

El presente trabajo de investigación forma parte de una línea de investigación que continua en desarrollo, cabe recalcar que PelB-SmbP ha mostrado resultados positivos para la expresión de proteínas recombinantes y exportación de estas mismas hacia el periplasma, proporcionando una gran ventaja sobre la producción de biofármacos en células eucariotas, ya que se podrán realizar modificaciones post-traduccionales como la formación de enlaces disulfuro.

La purificación fue la etapa en la que se presentaron problemas, por lo cual este trabajo nos permite seguir creando diversas estrategias las cuales nos permitan aumentar el grado de pureza de nuestra proteína de interés, como lo son:

- Expresar la proteína recombinante (PelB-SmbP-IFNB1) en una célula que permita la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma
- Estandarizar el proceso de purificación, probando así diferentes métodos tales como la precipitación a pH ácidos para poder elevar el grado de pureza de nuestra proteína de interés

CAPITULO 10

SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPICIÓN DE RESIUOS

La disposición de residuos que se generaron durante el presente trabajo fueron realizados de acuerdo a lo establecido en el Programa de Gestión para el Manejo Integral de los Residuos Generados en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

CAPITULO 11

BIBLIOGRAFÍA

1. C. O'Rourke E., J. Drummond R., and A. Creasey A. (1984). Binding of ¹²⁵I-labeled recombinant interferon (IFN-β ser17) to human cells. *Molecular and Cellular Biology*. Vol.4, N°12, p.2745- 2749.
2. Cantu Bustos J., Vargas Cortez T., Morones Ramirez J., Balderas Renteria I., W. Galbraith D., M. McEvoy M., Zarate X. (2016). Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with the metal-binding protein CusF. *Protein Expression and Purification*. N° 121, p. 61-65.
3. Choi B., Lee Y., Pi J., Jeong Y., Baek K. and Yoon J. (2015). Overproduction of recombinant human transforming growth factor beta 3 in Chinese hamster ovary cells. *Protein Expression and Purification*. N° 110, p. 102-106.
4. Cruz A., Rodriguez Y. and Bello C. (2013). Interferon alpha and type 1 diabetes mellitus. *Revista Cubana Endocrinol*. Vol. 24, N° 3.
5. D. F. Mark, S. D. Lu, A. A. Creasey, R. Yamamoto, and I. S. Lin. (1984). Site-specific mutagenesis of the human fibroblast interferon gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* Vol. 81, p. 5662-5666.
6. Day C., Schwartz B., Li Bo-Liang, and Pestka S. (1992). Engineered disulfide bond greatly increases specific activity of recombinant murine interferon-β. *Journal of interferon research* N°12, p.139-143.
7. Drago M., Sainz T. (2006). Expression Systems for Therapeutic Recombinant Proteins. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. Volumen 37 • No. 1
8. García J., Santana Z., Zumalacárregui L., Quintana M., Gonzalez D. y Furrázola G. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*. Vol. 22 N° 2, p. 30-39
9. Ghane M., Yakhchali B., Khodabandeh M. and Malekzadhe. (2006). Design, construction and expression of a synthetic β-interferon (IFN-β) gene in *E. coli*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. Vol. 9, N° 15, p. 2922-2926.

10. Conradt H., Egge H., Peter-Katalinic J., Reiser W., Siklosi T and Schaper K. (1987). Structure of the carbohydrate moiety of human interferon- β secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 262, N° 30, p. 14600-14605.
11. Hossein Morowvat M., Babaeipour V., Rajabi-Memari H., Vahidi H and Maghsoudi N. (2015). Optimization of fermentation conditions for recombinant human interferon beta production by *Escherichia coli* using the response surface methodology. *Journal of Microbiology*. Vol.8 N° 4.
12. Hossein Morowvat M., Babaeipour V., Rajabi-Memari H., Vahidi H and Maghsoudi N. (2014). Overexpression of recombinant human beta interferon (rhINF- β) in periplasmic space of *Escherichia coli*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. N° 13, p. 151-160.
13. Kamionka M. (2011). Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. N° 12, p. 268-274.
14. Lara A. (2011). Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol. 10, N° 2, p. 209-223
15. Neissi A., Abad Shapouri M., Ghorbanpoor Najafabadi M., Jaydary A. (2013). Using rice flour for purification of maltose binding fusion proteins expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology*. Vol. 6, N°3, p. 233.236.
16. Pareja A. J., Torres Z. M., Castilli T. E., Covo C. P., Berrocal R. M., Polo V. L., Zequeria C. R., Gonzalez S. J., Guzman A. D. and Alwers C. R. (2012). Physical disability in daily clinical practice in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. N° 29, p. 87-94.
17. Rodriguez J., Spearman M., Huzel N., and Butler M. (2005). Enhanced Production of Monomeric Interferon- β by CHO Cells through the Control of Culture Conditions. *Biotechnol.* Vol. 21, No. 1.
18. Rodriguez J., Spearman M., Tharmalingam T., Sunley K., Lodewyck C., Huzel N. and Bulter M. (2010). High productivity of human recombinant beta-interferon from a low-temperature perfusion culture. *Journal of Biotechnology*. N° 150, p. 509-518.
19. Smith D. and Johnson K. (1998). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene*. Vol 67, N°1, p. 31-40.
20. Thomas Siklosi, and Karin Schaper. (1987). Structure of the Carbohydrate Moiety of Human Interferon- β Secreted by a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Li. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 262, No. 30, p. 14600-14605.

21. Vargas Cortez T., Morones Ramirez J., Balderas Renteria I., Zarate X. (2016). Expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* tagged with a small metal-binding protein from *Nitrosomonas europaea*. *Protein Expression and Purification*. N° 118, p. 49-54.
22. Young koo T., Hyun Park J., Ho Park H. and Hyun Park T. (2009). Beneficial effect of 30Kc6 gene expression on production of recombinant interferon- β in serum-free suspension culture of CHO cells. *Process Biochemistry*. N° 44, p. 146-153.
23. Fang Yang, Yingying Pan, Yazhou Chen, Shiming Tan, Mingfei Jin, Zirong Wu, Jing Huang. (2015). Expression and purification of Canis interferon α in *Escherichia coli* using different tags. *Protein Expression and Purification* N°115, p.76–82 Contents
24. Fatemeh Tabandeh, Mahvash Khodabandeh, Bagher Yakhchali, Hassan Habib-Ghomi, Parvin Shariati. (2008). Response surface methodology for optimizing the induction conditions of recombinant interferon beta during high cell density culture. *Chemical Engineering Science* N°. 63, p. 2477–2483
25. Karolina Peciak Rita Tommasi, Ji-won Choi, Steve Brocchini, Emmanuelle Laurine. (2014). Expression of soluble and active interferon consensus in SUMO fusion expression system in *E. coli*. *Protein Expression and Purification* N° 99, p.18–26