

Expresión y purificación del factor estimulante de colonias de granulocitos humano, usando SmbP y CusF como proteínas de fusión

Isaac Díaz*, Mónica Ramírez, Xristo Zárate

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av Guerrero s/n esq. Progreso. Colonia Treviño. Monterrey Nuevo León.

*isaacdiaz22@gmail.com

Introducción

La producción de proteínas recombinantes se ha facilitado gracias a la implementación de la tecnología de péptidos de fusión, ésta tiene como fin conferir ciertas características a la proteína de interés que permitan la purificación por medio de cromatografía de afinidad. Además, los péptidos de fusión incrementan considerablemente la solubilidad de las proteínas de interés, facilitando su obtención. Entre las proteínas recombinantes en las que se puede innovar haciendo uso de estas proteínas se encuentran los biofármacos.

Un biofármaco de interés es el factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hG-CSF), una hormona promotora de neutrófilos, es un agente terapéutico efectivo contra neutropenia febril de pacientes que han sido sometidos a varios tratamientos contra cáncer. El hG-CSF se purificó inicialmente a partir de una línea celular tumoral que continuamente secreta la proteína. Cuando se expresa en la levadura *Pichia pastoris*, el hG-CSF se secreta en su forma soluble, sin embargo, la proteína secretada tiende a producir agregados que deben ser solubilizados usando altas concentraciones de desnaturalizantes como hidrócloruro de guanidina o urea. En consecuencia, la purificación del hG-CSF biológicamente activo proveniente de la levadura requiere de la eliminación de desnaturalizantes y replegadores de la proteína. La producción de esta proteína a partir de *Escherichia coli* tiende a formar cuerpos de inclusión y esto se ha convertido en un reto que se busca disminuir en la expresión. Durante este trabajo se estudia la capacidad de dos proteínas de fusión para incrementar la expresión de hG-CSF soluble en *E. coli*. La proteína pequeña de unión a metales (SmbP) y la proteína CusF incrementan la cantidad de proteína soluble producida bajo condiciones normales, es por ello que se utilizaron estas proteínas de fusión para la producción de hG-CSF, usando *E. coli* como organismo hospedero.

Parte Experimental

Por medio de técnicas de clonación clásicas se realizó la construcción del plásmido dentro de un vector pET-30a(+) con un sitio de unión a enterocinas entre el gen de la proteína de fusión y el gen de hG-CSF, dicha construcción fue confirmada por secuenciación de nucleótidos y por PCR utilizando cebadores específicos para la construcción. La expresión de la proteína se llevó a cabo variando la temperatura de expresión: 25°C, 30°C y 37°C; el tiempo de expresión: 4 y 16 horas; y variando la concentración de inductor IPTG: 0.1 y 1 mM. La purificación del hG-CSF se llevó a cabo por pasos: primero, cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC)

utilizando columnas cargadas con iones de Ni³⁺ y Cu²⁺ para SmbP y CusF, respectivamente; segundo, cromatografía de intercambio iónico (IEX) de tipo aniónico; y por último, una vez que las proteínas fueron cortadas, se usó, una vez más, cromatografía de tipo IMAC. Las proteínas fueron cortadas con enterocinas, justo en el sitio de corte diseñado en la construcción. Un análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) confirmó la separación del biofármaco y la alta pureza de las proteínas aisladas.

Resultados y Discusión

Se llevó a cabo satisfactoriamente la construcción de los vectores de expresión SmbP-hG-CSF y CusF-hG-CSF, la cual se confirmó por secuenciación de nucleótidos. Tras analizar por SDS-PAGE las diferentes condiciones de expresión que se utilizaron se eligió 37°C como la mejor temperatura de expresión por un tiempo de 4 horas y con IPTG 0.1mM. Se expresaron 2.5 L de LB en las mejores condiciones de expresión. La expresión se confirmó por SDS-PAGE observando una banda de 29 KDa para las dos construcciones. El mismo método analítico se utilizó para confirmar la pureza de la muestra tras los pasos de purificación observando la banda del biofármaco a 18 KDa y la banda de las proteínas de fusión a 11 KDa.

Conclusiones

Se desarrolló un proceso eficiente para la expresión de hG-CSF activo soluble y su purificación en *E. coli*, utilizando SmbP y CusF como proteínas de fusión.

Referencias

- Vargas T. Expresión y purificación de proteínas recombinantes y biofármacos en *Escherichia coli* utilizando la proteína SmbP como proteína de fusión. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León. 2014.
- Bich H. et al. PLOS ONE **2014**, 9, 1-10.
- Chang K.; Chi L.; Seung-Bae L. PLOS ONE **2013**, 8, e80109.
- Vemula S.; Dedaniya A.; Thunuguntla R.; Mallu M.; Parupudi. J Chromatogr A **2015**. 1379, 74-82.