

## Optimización de la secuencia señal para la producción de proteínas recombinantes en el periplasma de *Escherichia coli* marcadas con SmbP

Bryan Santos Rodríguez<sup>a\*</sup>, Xristo Zarate<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Av. Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

\*bryan.sr.qfb@gmail.com

**Palabras clave:** Proteína de fusión, *Escherichia coli*, Péptido señal.

### Introducción

*Escherichia coli* es el hospedero más utilizado para la producción de proteínas heterólogas, sin embargo, existen ciertas dificultades cuando se expresan tales como la degradación intracelular por proteasas del hospedero y la formación de cuerpos de inclusión<sup>1</sup>. Un método común para superar estos obstáculos es el uso de proteínas de fusión. La expresión en el periplasma confiere ciertas ventajas con respecto a la expresión citoplásmica ya que contiene una menor cantidad de proteínas y proteasas del hospedero además de favorecer la formación de enlaces disulfuro<sup>2</sup>. Para que las proteínas puedan ser transportadas al periplasma es necesario que contengan un péptido señal o péptido líder<sup>3</sup>. En este estudio se evalúa el efecto de péptidos señal alternativos de las proteínas PelB y CusF en la proteína de fusión SmbP para la expresión de proteínas en el periplasma de *E. coli*. Los resultados muestran que SmbP con el péptido señal de la proteína PelB produce mayores cantidades de RFP y facilita su extracción por medio del método lisozima/shock osmótico.

### Materiales y métodos

La secuencia de aminoácidos de los péptidos señal de CusF, PelB y SmbP se obtuvieron a través de la herramienta SignalP 4.1<sup>4</sup> y fueron sintetizados por GenScript. La Tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos de los péptidos señal de las proteínas SmbP, CusF y PelB. Las secuencias de CusFps-SmbP y PelBps-SmbP fueron amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), digeridos y ligados en pET30a conteniendo el gen de la proteína rojo fluorescente (RFP) como proteína reportera. *E. coli* BL21(DE3) fue transformada con los plásmidos pET30a-CusFps-SmbP-RFP y pET30a-PelBps-SmbP-RFP para la expresión de proteínas la cual fue cultivada a 37°C a una densidad óptica a 600nm de 0.6. La expresión fue inducida con IPTG a concentración final de 0.1mM incubada a 25°C durante 16h. La extracción de las proteínas periplásmicas se llevó a cabo utilizando el método de lisozima/shock osmótico<sup>5</sup>.

Tabla 1

Secuencia de aminoácidos de los péptidos señal de SmbP, CusF y PelB obtenidos con la herramienta SignalP 4.1.

Proteína	Secuencia de aminoácidos del péptido señal
SmbP	MKTTLIKVIAASVTALFLMQVYA
CusF	MKKALQVAMFSLFTVIGFNAQA
PelB	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA

### Resultados y discusión

Los resultados preliminares de las diferentes versiones de SmbP realizadas en este estudio muestran que la versión de

SmbP con el péptido señal de PelB tuvo una mayor producción de RFP en comparación con SmbP wild type ya que las células se tornaron más rojas. Esto era de esperarse ya que el péptido señal de PelB es de los más utilizados en diversos vectores de expresión comerciales como pET para la expresión de proteínas heterólogas en el periplasma de *E. coli*<sup>6</sup>. Sin embargo, se esperaba que el péptido señal de CusF mostrara mejores resultados comparados con los del péptido señal de PelB ya que es una proteína nativa del periplasma de *E. coli* que juega un rol importante en el transporte y equilibrio de metales<sup>7</sup>.

Un péptido señal posee 3 regiones: la región -n, la región -h y la región -c. Para que un péptido señal sea un buen candidato para transportar proteínas heterólogas al espacio periplásmico debe de cumplir con ciertas características: una región -n altamente positiva confiriéndole la capacidad al péptido señal de anclarse en la membrana interna por medio de interacciones electroestáticas; una región -h con aminoácidos hidrofóbicos para que la maquinaria Sec sea capaz de reconocer el péptido señal; y la región -c con el patrón A-X-A el cual será reconocido por la peptidasa señal I para el corte del péptido señal de la proteína heteróloga de interés y pueda ser liberado satisfactoriamente al periplasma. El péptido señal de CusF y PelB cumplen muy bien estas características, sin embargo, PelB posee una región -h más hidrofóbica ya que posee una mayor cantidad de aminoácidos hidrofóbicos lo cual es un punto muy importante para el reconocimiento del péptido señal por la maquinaria Sec<sup>8</sup>.

### Conclusión

PelBps-SmbP ha mostrado mejores resultados en la producción de RFP con respecto a CusFps-SmbP y SmbP wild type debido a que las células se tornan más rojas.

### Referencias

1. Gopal G. J.; Kumar A. *Protein J.* **2013**, 32, 419-425.
2. Dow B.; Tatulian S.; Davidson V. *Protein Express. Purif.* **2015**, 108, 9-12.
3. Martoglio B.; Dobberstein B. *Trends. Cell Biol.* **1998**, 8, 410-415.
4. SignalP 4.1 Server-CBS at DTU. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> (consultado el 8 de octubre de 2015).
5. French C.; Keshavarz-Moore E.; Ward J. M. *Enzyme Microb. Tech.* **1996**, 19, 332-338.
6. Sockolovsky J. T.; Szoka F. C. *Protein Express. Purif.* **2013**, 87, 129-135.
7. Loftin I. R.; Franke S.; Roberts S. A.; Weichsel A.; Héroux A.; Montfort W. R.; Rensing C.; McEvoy M. M. *Biochemistry-US*, **2005**, 44, 10533-10540.
8. Low K. O.; Mahadi N. M.; Illias R. M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 3811-3826