

Expresión del Fragmento 6xHis-hGH1 en Cultivos de *E. Coli* por Fermentación en Lote

Tania María Ascencio Carbajal^a, María Teresa Ponce Noyola^a, María del Carmen Montes Horcasitas^a, Armando Ariza Castolo^a, Octavio Gómez Guzmán^a, Josefina Pérez Vargas^b, Graciano Calva Calva^a

Resumen

La hormona de crecimiento humano (hGH1), es una proteína producida en la glándula pituitaria y exhibe extensos efectos fisiológicos en el cuerpo humano, sus aplicaciones pueden ser tanto terapéuticas como estéticas. Comercialmente se produce en cultivos de células de mamífero y en *Escherichia coli* (*E. coli*.) La finalidad del trabajo, como parte de un

Acerca de los autores...

^a Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN.

^b División Ingeniería Bioquímica, Posgrado en Ingeniería Bioquímica, TESE.

proyecto global, fue establecer un sistema control de expresión de la hGH1 en *E. coli*, que pueda ser utilizado como comparativo contra otros sistemas de expresión dentro del grupo de trabajo, tanto microbianos como lo es *Bacillus thuringiensis* (1) y sistemas vegetales como los cultivos de raíces transformadas (4, 2).

Primero se obtuvo el gen de la hGH1, mediante PCR a partir del vector pBS-hGH1. El producto de restricción se insertó en el vector de expresión bacteriano pProEx HTb entre los sitios de restricción EcoRI y XhoI. Dicho vector presenta la ventaja de incluir una marca de seis Histidinas en el extremo amino terminal a la secuencia codificante para la proteína heteróloga, plásmido denominado "pEOhGHis". El plásmido pEOhGHis se clonó en *E. coli* DH5 α mediante choque térmico para obtener la cepa *E. coli* pEOhGHis. Se realizó una fermentación en lote para determinar la cantidad de proteína total específica producida (1.16ng/QL), la cual se dio de manera asociada al crecimiento y potenciada por la adición del inductor IPTG. Se identificó el fragmento 6xHis-hGH1 con un tamaño de 29.5 kDa.

Introducción

Una de las estrategias comúnmente utilizadas para favorecer la recuperación y purificación de proteínas heterólogas, es el uso de una marca de histidinas en la proteína, lo que a la vez puede facilitar su detección, y generalmente sin afectar su estructura ni actividad biológica (7,3). El vector pProEX HTb (Invitrogene, EUA), es un vector de expresión bacteriana inducible, que incluye una la secuencia para una marca de 6 Histidinas que se añaden a la proteína clonada en el extremo amino terminal.

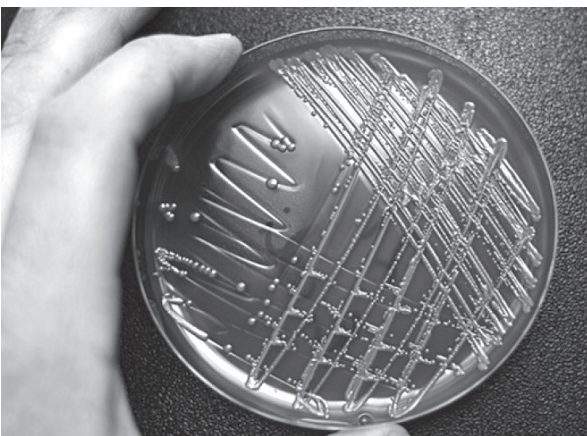
La marca de 6XHis resulta ser uno de los sistemas de adición de marcas a proteínas más económico y por su secuencia pequeña disminuye la probabilidad de producir efectos negativos en la estructura y expresión de la proteína (9); ello lo hace un método bastante atractivo para la purificación de proteínas heterólogas, además de que es fácilmente escalable (10). La proteína de interés, es la hormona del crecimiento humana isoforma 1 (hGH1), también conocida como somatotropina. Es un polipéptido de cadena única de 22 kDa, conformada por 191 aminoácidos, estabilizada por dos puentes disulfuro, desempeña un papel importante en el metabolismo, la síntesis de proteínas y la proliferación celular (8). *E. coli* ha sido el microorganismo de producción comercial de la hGH desde los años 80. En sistemas bacterianos, la proteína no es producida en su estructura funcional, ya que no se realiza la formación de puentes de disulfuro, con lo que se afecta el plegamiento; para ello se desarrollan alternativas que buscan favorecer la recuperación, purificación y el plegamiento *in vitro* de las proteínas heterólogas a partir de sistemas procariontes (6).

Metodología

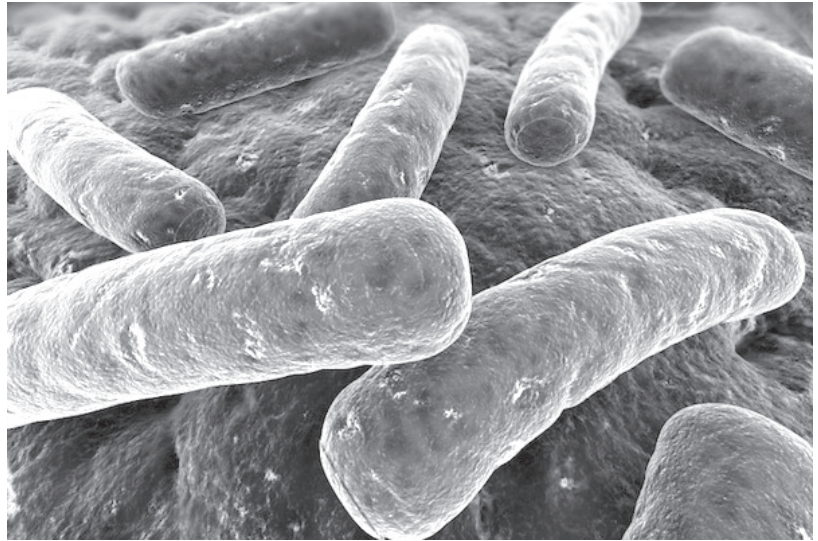
Se extrajo el gen de hGH1, a partir del plásmido pBluescript-hGH (pBS-hGH1) mediante amplificación por PCR. Para ello, se diseñaron los siguientes oligos: directo:

5'-ATAGAATTCTCAAGGCCCAACTCCCCG-3' y reverso:
5'-CGGCTCGAG GGATGCACTTAATTTTAT-3'

que amplifican un fragmento de 833 pb a una temperatura de 58 °C.



Se añadieron secuencias para enzimas de corte EcoRI en el 5' y XhoI en el 3', con las cuales posteriormente se digirió el amplificado. El producto de restricción se ligó en el vector de expresión bacteriano pProEx HbTM previamente digerido con las mismas enzimas, siguiendo el protocolo de T4 DNA Ligasa (15224-041, Invitrogene, EUA) en una relación inserto:vector 3:1; el plásmido resultante se denominó "pEOhGHis". La mezcla de ligación se corrió en un gel de agarosa para identificar la banda de interés de 5534 pb, que corresponde a la unión del gen de hGH1 al vector pProEX HTb; finalmente, se clonó por choque térmico en *E.coli* DH5 α utilizando 2QL de la mezcla de ligación y las clonas transformantes se analizaron por digestión enzimática y PCR.



Para la fermentación en lote, se empleó un birreactor Applikon de 3L, el cual está equipado con sensor de temperatura integrado, una hélice tipo Rushton de seis paletas para el mezclado y un difusor de aire tipo "L", electrodo de pH (Z001023510, Aplisens) y de oxígeno disuelto (Z71202API0, Applikon). Se suministró aire pasado a través de un filtro estéril de 45Qm (Midisart 2000, Sartorius, Alemania). Se ajustaron los parámetros de control de manera automática y manual cuando fue necesario desde la computadora mediante el software BioXpert versión 1.15. La temperatura se mantuvo constante a 37 °C mediante circulación de agua a través de la chaqueta. La velocidad de agitación se controló manualmente para lograr una saturación de oxígeno en el reactor superior al 20%, ésta varió entre 400 y 900 rpm. El flujo de aire se inició en 1 vvm y se aumentó a 1,5 vvm cuando se requirió para mantener la demanda de oxígeno por encima del 20%. Para el control de la espuma, se adicionaron gotas de una suspensión 1:1 v/v de antiespumante (Mazu-DF 7911, Mazer, México) cuando fue necesario. El volumen de operación del reactor fue de 1.5 L y se utilizó medio de cultivo LB. Los reactivos fueron obtenidos de Becton, Dickinson and Company (EUA). El medio fue preparado y esterilizado junto con el reactor en autoclave a 121 °C por 15 minutos; posteriormente se adicionó en condiciones de esterilidad, el inóculo y ampicilina para una concentración de 100 Qg/mL. El inóculo se preparó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, con 135 mL de medio, y fue inoculado con una asada de un cultivo de agar inclinado y se incubó a 37 °C con agitación por 12 horas. El bioreactor se inoculó con el cultivo de 150 mL de 12 horas y la primer muestra fue tomada. La toma de muestra se llevo a cabo cada hora por 11 horas. Cuando la densidad óptica del cultivo fue de 0.7, se añadió el inductor (IPTG a una concentración final de 0.6 mM). Se realizaron las determinaciones de densidad óptica a 600 nm, en peso seco, SDS-PAGE (5) y ensayos tipo Elisa (KAQ1081, Invitrogene, EUA) para detectar la aparición y cuantificar la proteína hGH1.

Resultados

La descripción gráfica de la estrategia para la construcción del vector pEOhGHis, se muestra en la Figura 1, donde se observa que el gen hGH1 se encuentra inserto en el vector pBS-hGH1 entre los sitios EcoRI y XhoI y es clonado en el vector pProEX dentro de esos mismos sitios.

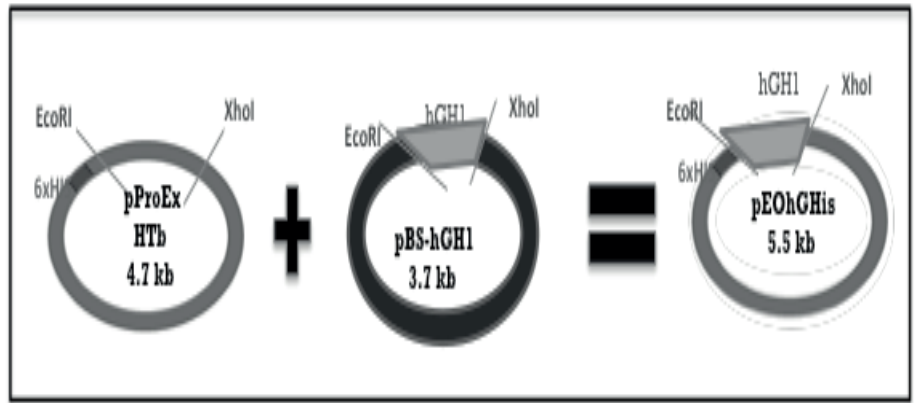


Figura 1

Esquema de la construcción del vector pEOhGHIs.

Primeramente se amplificó exitosamente por PCR el gen hGH1, partiendo del vector pBS-hGH1, como lo muestra la Figura 2, se obtuvo un producto de 833 pb, correspondientes al gen de hGH1 incluyendo las secuencias de las enzimas EcoRI y XhoI.

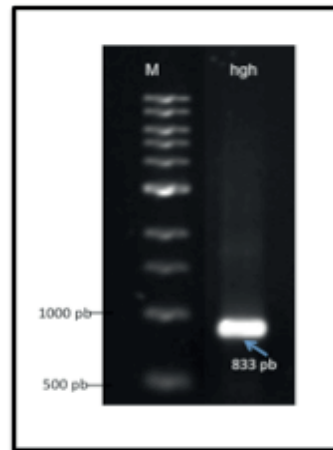


Figura 2

Amplificación por PCR del cDNA de hGH1. M, marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb, Biolabs), hgh: amplificado del gen hGH1 a partir del vector pBS-hGH. Gel de agarosa 1%, corrimiento a 100V por 45 minutos.

Una vez amplificado el gen y digerido con las enzimas EcoRI y XhoI tanto el producto de PCR como el vector pProEX HTb, se realizó la ligación entre ambos. De la mezcla de ligación, se identificó la banda que correspondería al tamaño del vector esperado de 5.5 kb, que se muestra en la Figura 3; las demás bandas que aparecen en el gel pertenecen a la ligación del gen entre sí mismo.

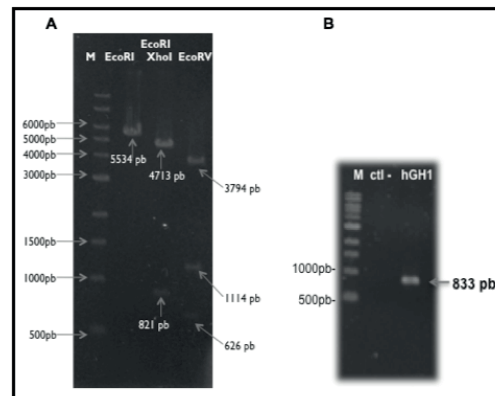


Figura 3

Mezcla de ligación para obtener el vector pEOhGHIs. M, marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb, Biolabs), 3:1 mezcla de ligación en proporción inserto: vector 3 a 1. Gel de agarosa 1%, corrimiento a 100V por 60 minutos.

Las clonas resultantes luego de la transformación se aislaron y analizaron para verificar la presencia del vector de interés, los resultados de la caracterización del vector pEOhGHIs se muestran en la Figura 4.

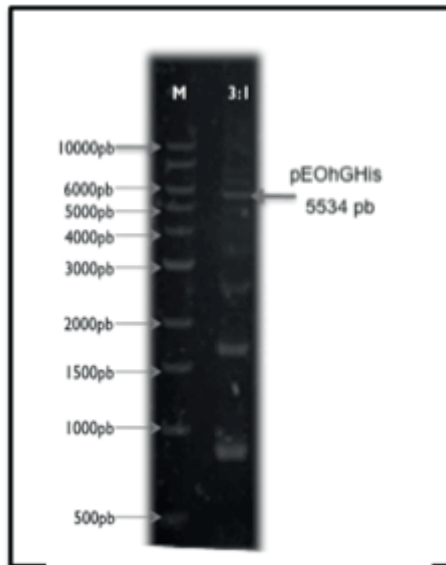
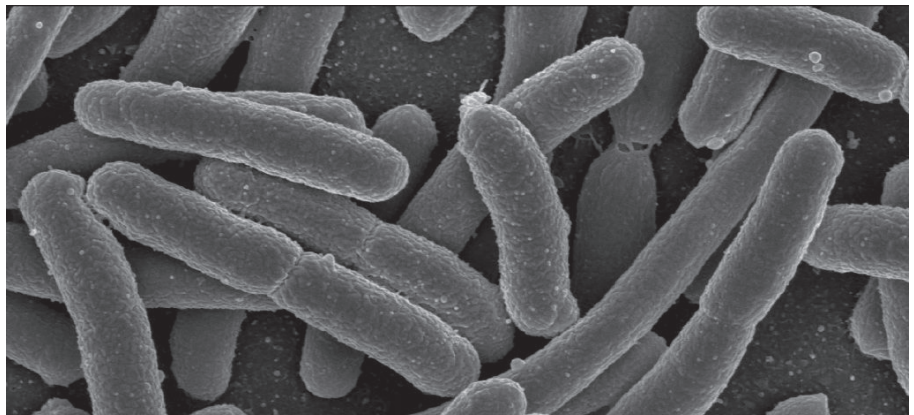


Figura 4

Caracterización del vector pEOhGHIs por restricción y PCR. A. Corte del vector pEOhGHIs con las enzimas EcoRI, EcoRV y liberación del fragmento hGH1 con EcoRI y XhoI. M, marcador de peso molecular (DNA ladder 1kb). Gel de agarosa 1%, corrimiento 100V, por 60 minutos B. Amplificación por PCR del gen hGH a partir del vector pEOhGHIs, Ctrl-, control negativo el vector pProEX HTb. Gel de agarosa 1%, corrimiento a 100V por 25 minutos.

Como se observa en la Figura 4.A, se obtuvieron los fragmentos esperados para la construcción del vector pEOhGHIs. Linealizado con la enzima EcoRI, se obtuvo una banda de 5534 pb, la enzima EcoRV corta en tres sitios diferentes del vector, por ello, se obtienen los fragmentos de 626 pb, 1114 pb y 3794pb, y para la liberación del gen de hGH se utilizó EcoRI y XhoI, dando como resultado 4713 pb que corresponden al resto del plásmido y 821 pb correspondientes al gen de hGH1 (el cambio en el tamaño del gen de 833pb a 821pb es debido a que luego del corte con las enzimas se pierden algunas bases unidas a la secuencia). Con los anteriores resultados y la Figura 4.B, se comprueba que la secuencia inserta en el vector pEOhGHIs es en efecto el gen de la hGH1.

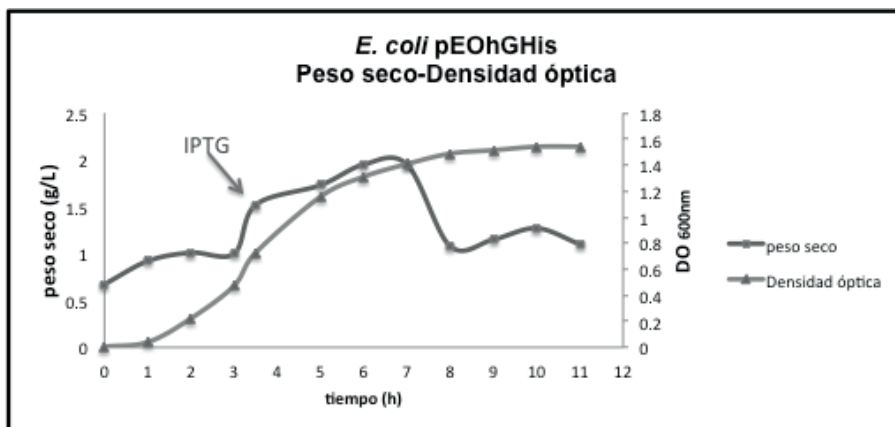
Ya que el vector pPEOhGHIs es un vector inducible, se esperó que el cultivo en la fermentación, llegara a una densidad óptica de 0.7 para añadir el inductor IPTG y ello diera lugar a la síntesis de la proteína hGH1. El tiempo de adición del inductor se encuentra señalado en la Figura 5 por una flecha roja a las 3.5 horas. La mayor acumulación de biomasa fue entre las 6 y 7 horas con 1.95 g/L, después de este tiempo empieza el decaimiento celular.



Como se muestra en la Figura 5, mediante los datos de peso seco y densidad óptica se pudo graficar el perfil de crecimiento de la cepa pEOhGHis, identificando las fases de adaptación (0-2h), crecimiento exponencial (2-5 h), desaceleración (5-7 h) y la estacionaria (7-11 h) características del crecimiento microbiano.

Figura 5

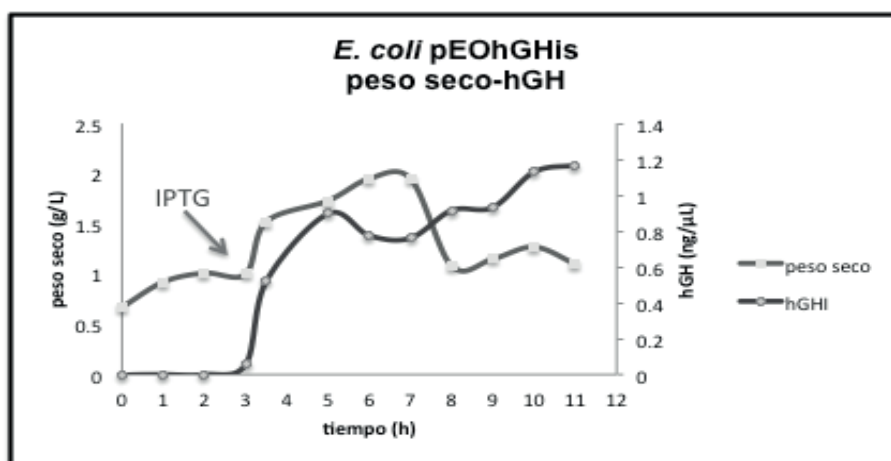
Gráfica con los resultados de peso seco y densidad óptica de la fermentación en lote de la cepa E. coli pEOhGHis.



La producción de hGH se determinó a partir de cada muestra y como se aprecia en la Figura 6, la síntesis de la proteína se inicia durante la fase de crecimiento exponencial, mas se dispara al añadir el inductor al cultivo, la máxima cantidad de proteína hGH1 detectada fueron 1.16 ng/QL de cultivo acumulados al final de la fermentación. Si bien es un valor bajo de producción, es una cantidad suficiente para ser utilizado como un control positivo y de comparación dentro del grupo de trabajo.

Figura 6

Gráfica con los resultados de peso seco y cuantificación de hGH de la fermentación en lote de la cepa E. coli pEOhGHis.



Se logró detectar mediante el análisis SDS-PAGE la banda correspondiente a la proteína hGH1 ligada a los seis residuos de Histidina, con un tamaño aproximado de 29.5 kDa, como se muestra en la Figura 7, con una banda destacada con una flecha; se observa que aumenta de tamaño en los distintos carriles, es decir, que hay mayor acumulación de dicha proteína respecto al tiempo, lo cual coincide con los datos de la cuantificación de hGH; además,

no se aprecia la banda de la proteína en el control negativo (vector pProEX HTb ni en una muestra del tiempo 1 (antes de la inducción), con lo cual puede deducirse que efectivamente, la banda señalada corresponde a la de la proteína hGH1- ligada a los seis residuos de Histidina.

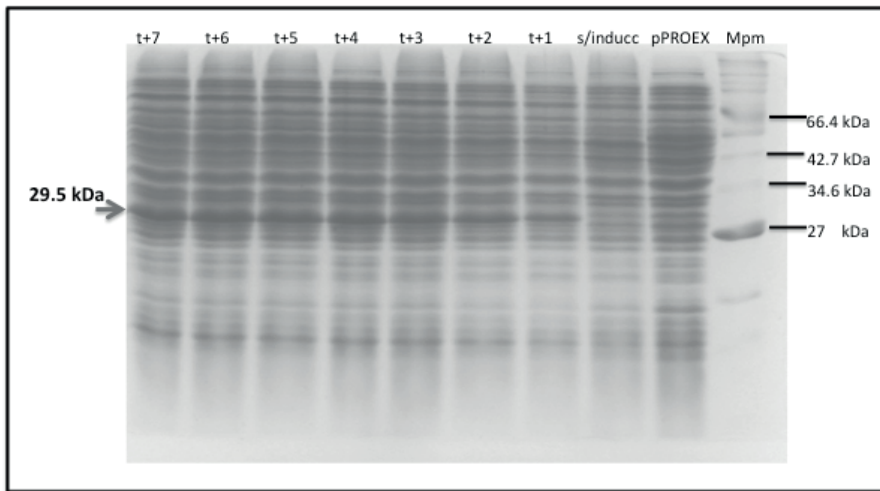


Figura 7

Gel de poliacrilamida con las muestras de proteína de *E. coli* pEOhGHis. Mpm marcador de proteínas de amplio rango 2-212 kDa (New England, Biolabs), pProEX es el control negativo, s/inducc es la muestra del tiempo 1 aún sin inductor; t+1 a t+7 son las muestras después de la inducción. Corrimiento a 80V por una hora y luego 100V por tres horas en una fuente de poder (Enduro power supply, 250V, Labnet, USA).

Conclusiones

- Los primers diseñados para amplificar el de hGH1 funcionan correctamente, proporcionando un producto de 833 pb.
- El plásmido pEOhGHis incluye el gen de hGH1 ligado a la secuencia de 6 Histidinas (6xHis-hGH1) y se encuentra clonado en *E. coli*.
- La cepa de *E. coli* que contiene el plásmido pEOhGHis es resistente a la ampicilina y produce la proteína hGH1 de manera asociada al crecimiento y con ayuda del inductor.
- El tamaño del péptido 6xHis-hGH1 es de 29.5 kDa.

Referencias

Ascencio Carbajal T., "Evaluación de *Bacillus thuringiensis* 4D22 como posible modelo de expresión de proteínas heterólogas", Tesis de maestría en curso, CINVESTAV-IPN, 2013.

Cabral Quezada C., "Establecimiento de cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. itálica (brócoli) transformadas con el cDNA del gen de la hormona del crecimiento humano unido a una marca de 6xHis". Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, 2012.

Garbec V., Menart V., "Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography", *J. Biochem Biophys Methods*, Vol. 49, No. 1-3, p. 335-360, 2001.

García López E., "Establecimiento de cultivos de raíces de *Brassica oleracea* var. itálica (brócoli) transformadas con el cDNA del gen1 de la hormona de crecimiento humano. Tesis de Maestría, CINVESTAV-IPN, 2009.

Laemmli UK., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*. Vol. 227, No. 5259, p.680-685,1970.

Liu H, Bravata D. M., "Systematic review: the safety and efficacy of grow hormone in the healthy elderly", *Ann Intern Med*, Vol. 146, No. 2, p. 104-115, 2007.

Peti W, Page R., "Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost", *Protein Expr Purif*, Vol. 51 No. 1, p. 1-10, 2007.

Tritos NA, Mantzoros CS. Recombinant human growth hormone: old and novel uses. *Am J. Med.* 1998;105:44-57

Waugh D.S., "Making the most affinity tags", *Trends Biotechnol*, Vol. 23, No. 6, p. 316-320, 2005.

Waertens B., Block H., "Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review", *Methods Enzymol*, Vol. 463, p. 439-473, 2009.