

Construcción de un plásmido recombinante para el eficiente transporte extracelular de GLP-1 en *Lactococcus lactis*.

Diego Jaramillo^a, Eiber Briones^{a,b} e Isaías Balderas-Rentería^{b*}

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Pedro de Alba S/N, Niños Héroes, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. Monterrey, México.
^{*}ibalderas@hotmail.com.

Palabras clave: Diabetes, Usp45, *Lactococcus*, Incretinas, Secreción.

Introducción

El péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) es una hormona tipo incretina que se secreta en las células L del intestino con capacidad de estimular la secreción de insulina, así como la reparación y proliferación de las células beta del páncreas¹. Es por esto que el GLP-1 en los últimos años se ha utilizado como una alternativa para tratar la Diabetes mellitus tipo 2. Se ha intentado sin éxito su producción intracelular en bacterias debido a la alta presencia de proteasas intracelulares y costosa purificación². Actualmente su producción consiste en el método sintético sólido-líquido, sin embargo, este método se caracteriza por tener bajos rendimientos de reacción, numerosos pasos para su síntesis, uso de múltiples reactivos y purificación ineficiente³. Es por esto que en este trabajo se optó por la ingeniería genética para realizar la construcción de un plásmido para la producción extracelular de GLP-1 en *Lactococcus lactis*, con el fin de evitar su purificación en la producción intracelular.

Metodología

Se extrajo el DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina y extracción por fenol cloroformo de la cepa de *Lactococcus lactis* MG1363 (LL-MG1363) que contenía el plásmido PLB333. Este plásmido tiene 4 sitios de interés: una región promotora que se activa mediante estrés térmico, salino y pH bajo; una región que contiene una nucleasa reportera de bacterias Gram positivas; el gen de resistencia a cloranfenicol; y los sitios de restricción de las enzimas *Bgl* II y *Eco* RI.

El gen de interés se solicitó a una empresa comercial de síntesis genética, dicho gen codifica el péptido señal Usp45 (el cual dirige la secreción de la proteína al medio extracelular) unido al GLP-1, el cual se encuentra modificado en su estructura primaria, sustituyendo el codón que codifica la Ala⁸ por una Gly⁸ así como la eliminación del codón de la Arg³⁶ con el fin de darle estabilidad a la proteína al momento de su expresión. Asimismo, contiene los sitios de restricción de las enzimas *Bgl* II y *Eco* RI.

Al plásmido extraído se le realizó una doble digestión con las enzimas *Bgl* II y *Eco* RI al igual que al gen de interés para posteriormente en presencia de una T4 DNA ligasa realizar una reacción de ligación en una relación molecular vector:inserto 3:1, para generar el plásmido recombinante UGLP-PLB.

Una vez generada la construcción molecular se transformó una cepa electrocompetente de *Lactococcus lactis* libre de plásmidos aplicando un pulso de 2000 V por 4.5-5 milisegundos para generar la cepa transformada LL-UGLP-1. La selección se realizó tomando una colonia que no degradaba DNA de una placa que contenía M17, cloranfenicol y DNase Agar with

Methyl Green.

La caracterización de UGLP-PLB se realizó por electroforesis mediante la extracción de DNA plasmídico por el método de lisis alcalina de la cepa LL-UGLP-1 y doble digestión con las enzimas *Bgl* II y *Eco* RI comparado con la doble digestión del plásmido PLB333.

Resultados y discusión

En la figura 1 se observa en el carril 2 una banda de 289 pb correspondiente a la secuencia del Usp45 unido al GLP-1, esto indica la correcta integración al plásmido UGLP-PLB del inserto de interés. Por otro lado, en el carril 4 se observa una banda con un peso molecular de 765 pb correspondiente a la nucleasa del plásmido PLB333. Mientras que, en los carriles 3 y 5 las bandas correspondientes a los plásmidos UGLP-PLB y PLB333 linealizados con un peso molecular de 3,152 pb y 3,628 pb respectivamente.

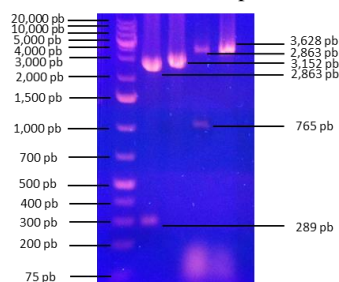


Figura 1. Análisis de la construcción del plásmido UGLP-PLB. Gel de agarosa al 1.3%. Carril 1: Marcador de peso molecular Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Carril 2: Plásmido UGLP-PLB digerido con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Eco* RI. Carril 3: Plásmido UGLP-PLB linealizado con la enzima *Eco* RI. Carril 4: Plásmido PLB333 digerido con las enzimas de restricción *Bgl* II y *Eco* RI. Carril 5: PLB333 linealizado con la enzima *Eco* RI.

Conclusiones

Se confirmó la construcción de un plásmido recombinante que contiene un gen que codifica un péptido señal para la expresión extracelular del GLP-1 en *Lactococcus lactis*.

Referencias

1. Manandhar, B.; Ahn, J. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (3), 1020–1037. <https://doi.org/10.1021/jm500810s>.
- (2) Kuppanna, A.; Venjivaka, S.; Mallikarjuana, S. Process for the Preparation of Liraglutide Field of the Invention. WO2014/199397A2, 2014.
- (3) Co, T. 的臣阮. WO2009024015A1, 2009.