

Producción de la hormona del crecimiento humana en *Escherichia coli* marcada con SmbP y CusF3His+

David Pérez Pérez^{a*}, Xristo Zarate^a

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Av. Universidad s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

*DavidAntonio.Perez@live.com.mx

Palabras clave: hGH, Proteínas de fusión, *Escherichia coli*.

Introducción

La hormona del crecimiento humana (hGH) es una proteína compuesta por 191 aminoácidos con un peso molecular de 22 kDa unida por dos puentes disulfuro, la cual es producida, almacenada y secretada por la glándula pituitaria. Es una de las hormonas más importantes en el cuerpo humano debido a su papel central en una variedad de funciones biológicas, incluyendo la proliferación celular, el metabolismo y el crecimiento¹.

La hGH es una proteína no glicosilada, debido a esto, se ha producido extensamente en sistemas de expresión procarionota. El organismo más empleado para la producción es *E. coli*. Su popularidad se debe principalmente a sus altas tasas de crecimiento, bajo costo, y la capacidad de expresar altos niveles de proteína².

CusF es una proteína periplásmica que forma parte del complejo CusCBFA presente en *E. coli* que se encarga de regular las concentraciones de plata y cobre; CusF ha demostrado ser una buena alternativa como proteína de fusión durante la expresión de proteínas recombinantes³. Para optimizar el proceso de purificación se creó CusF3H+ que es una mutante de CusF a la cual se le han agregado 3 histidinas para fomentar la afinidad a iones Ni(II)⁴.

La proteína pequeña de unión a metales (SmbP por sus siglas en inglés) es también una proteína de 9.9 kDa aislada del periplasma de *Nitrosomonas europaea*. La proteína madura es un monómero de sólo 93 aminoácidos que tiene la capacidad de unirse a diferentes iones metálicos divalentes como Cu, Ni y Zn, y ya se ha usado en estudios anteriores como proteína de fusión⁵.

Parte experimental

La secuencia de aminoácidos correspondiente a la hGH fue sintetizada por GenScript, esta secuencia se optimizó para su expresión en *E. coli*. Las secuencias de PelB-SmbP+hGH y CusF3H+hGH fueron digeridos y ligados en el plásmido pET30a. *E. coli* BL21(DE3) fue transformada con los plásmidos pET30a- PelB-SmbP + hGH y pET30a- CusF3H+hGH.

Se realizó la producción de la hGH cultivando *E. coli* a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica entre 0.4-0.6. 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/choque osmótico.

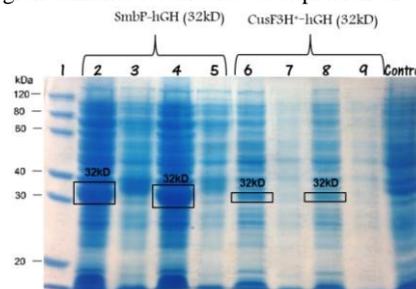
Se llevó a cabo la purificación de la proteína de interés usando cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). Para la evaluación de la expresión de la hGH se empleó la técnica de SDS-PAGE.

Resultados y discusión

El análisis mediante SDS-PAGE mostró, que había altos niveles de expresión y la proteína obtenida no formaba cuerpos de inclusión.

La baja formación de cuerpos de inclusión se debe a que la producción de la proteína se lleva en el espacio periplásmico de *E. coli*, el cual posee un ambiente oxidante, lo que es importante para la formación de enlaces disulfuro, además ofrece otras ventajas como la reducción en proteínas contaminantes y ácidos nucleicos⁶.

Los niveles de expresión son mayores usando PelB-SmbP que con CusF3H+ (Fig.1), esto se debe a que el péptido señal PelB, posee una región -h más hidrofóbica que el péptido señal de CusF3H+, se ha demostrado que el aumento de la hidrofobicidad en esta región aumenta los niveles de expresión en el



periplasma⁷.

Fig. 1 SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular; Carriles 2, 4, 6, 8: Fracción Soluble; Carriles 3, 5, 7, 9: Fracción Insoluble.

Conclusiones

Este proyecto describe una estrategia eficiente para la expresión y purificación de la hGH. Según los análisis realizados la construcción PelB-SmbP+hGH ha mostrado mejores niveles de expresión con respecto a CusF3H+hGH. La purificación de la hGH se llevó a cabo usando IMAC con Ni(II).

Referencias

- Guyen, M. T.; Koo, B.-K.; Thi Vu, T. T.; Song, J.-A.; Chong, S.-H.; Jeong, B.; Ryu, H.-B.; Moh, S.-H.; Choe, H. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–10.
- Kim, M.-J.; Park, H. S.; Seo, K. H.; Yang, H.-J.; Kim, S.-K.; Choi, J.-H. *PLoS One* **2013**, *8*, 1–8.
- Cantu-Bustos, J. E.; Vargas-Cortez, T.; Morones-Ramirez, J. R.; Balderas-Renteria, I.; Galbraith, D. W.; McEvoy, M. M.; Zarate, X. *Protein Expr. Purif.* **2016**, *121*, 61–65.
- Vargas-Cortez, T.; Morones-Ramirez, J. R.; Balderas-Renteria, I.; Zarate, X. *Protein Expr. Purif.* **2017**, *132*, 44–49.
- Vargas-Cortez, T.; Morones-Ramirez, J. R.; Balderas-Renteria, I.; Zarate, X. *Protein Expr. Purif.* **2016**, *118*, 49–54.
- Matos, C. F. R. O.; Robinson, C.; Alanen, H. I.; Prus, P.; Uchida, Y.; Ruddock, L. W.; Freedman, R. B.; Keshavarz-Moore, E. *Biotechnol. Prog.* **2014**, *30* (2), 281–290.
- Low, K. O.; Muhammad Mahadi, N.; Md. Illias, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 3811–3826.