

Expresión del factor estimulante de colonias de granulocitos en *Escherichia coli* utilizando la proteína CusF3H+ para su producción y purificación.

Mireya Santiago^a, Vania Suárez^a, Irasema Duque^a, Claudia Guajardo^a, Teresa Vargas-Cortez^b, Xristo Zárate^{b*}

^aFacultad de Ciencias Químicas, Av. Universidad s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás, México.

^bBiología 2, Facultad de Ciencias Químicas, UANL, Guerrero esq. Progreso S/N Monterrey, México

* xristo.zaratekl@uanl.edu.mx

Palabras clave: CusF3H+, expresión, G-CSF, *E. coli*, proteína de fusión.

Introducción

En la ingeniería genética, cuando se intenta expresar genes en huéspedes heterólogos, es frecuente encontrarse con el hecho de que la proteína buscada se degrada, obteniendo poca proteína activa. Para solventar este problema se utilizan proteínas de fusión que ayudan a que no sean degradadas en los organismos donde se producen.¹

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es un factor de crecimiento hematopoyético producido por el organismo en cantidades muy pequeñas y regula la formación de los neutrófilos.² El Filgrastim es un G-CSF humano (hG-CSF) producido mediante la tecnología de recombinación genética utilizando como hospedero *Escherichia coli*. El Filgrastim ha sido utilizado para disminuir las complicaciones infecciosas en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia, aumentando el número de neutrófilos y mejorando su función.³

En anteriores investigaciones se ha utilizado CusF como proteína de fusión para la expresión de hG-CSF en *E. coli*; ésta es purificada por cromatografía de afinidad utilizando Cu(II) como fase estacionaria. Como *E. coli* produce muchas proteínas afines al Cu(II) se dificulta aún más la purificación del G-CSF⁴, por lo que en esta investigación se buscó desarrollar la producción de G-CSF (filgrastim) de forma plegada y activa en *E. coli* utilizando como proteína de fusión CusF3H+. CusF3H+ es una variante de CusF a la que se le han añadido tres histidinas en el N-terminal con el fin de facilitar la purificación empleando como fase estacionaria Ni(II). De esta manera se obtendría la proteína G-CSF más pura ya que no habría interferencia de otras proteínas como lo presenta la purificación con Cu(II) con CusF, además de que se espera producir un volumen de proteína recombinante similar al producido por CusF.

Parte experimental

El gen G-CSF se amplificó mediante PCR a partir de un gen sintético y optimizado. El producto se purificó y se digirió con las enzimas *NcoI* (NEB) y *XhoI* (NEB). Se construyeron los plásmidos linearizando el vector pET30a-CusF3H+ con las mismas enzimas que se usaron para el inserto. El gen de G-CSF se ligó en el vector pET30a-CusF3H+ utilizando la enzima *T4 DNA ligase* (BioBasic) y se transformó en *E. coli* DH5α. Se extrajo el ADN plasmídico de varias colonias transformadas y con PCR, utilizando iniciadores específicos, se buscaron clonas positivas que tuvieran el inserto de G-CSF. La construcción final se transformó en *E. coli* BL21(DE3) para su posterior expresión y análisis.

Resultados y discusión

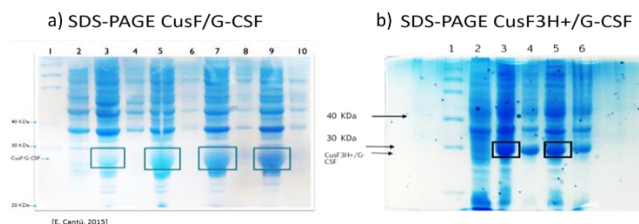


Figura 1. Expresiones de CusF/G-CSF y CusF3H+/G-CSF analizadas por SDS-PAGE; a) carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control (-), carriles 3 – 10: fracción soluble e insoluble; b) carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control (-), carriles 3 – 6: fracción soluble e insoluble.

Para cada carril se empleó el mismo volumen de muestra.

En la figura 1 se comparan los niveles de expresión de las proteínas quiméricas CusF/G-CSF (32.1 kDa) y CusF3H+/G-CSF (32.4 kDa). Se puede observar que con CusF se produce más proteína soluble en comparación con CusF3H+. La producción con CusF3H+ es comparable con CusF, pero produce más cuerpos de inclusión como se observa en el SDS-PAGE. Esto demuestra que la modificación de CusF3H+ no afecta su rendimiento como proteína de fusión, aunque sería conveniente buscar las condiciones de expresión idóneas con el fin de disminuir la formación de cuerpos de inclusión. G-CSF es una proteína de origen eucariótico, por lo que poder expresarla en los niveles obtenidos en un sistema procarionta brinda una clara ventaja al sistema. Ya que, una alta expresión del G-CSF aunado al pequeño peso molecular de CusF3H+ permitirá obtener altos rendimientos de la proteína G-CSF.

Conclusiones

En este proyecto se desarrolló un sistema para la producción y purificación del factor G-CSF en *E. coli* por medio de la proteína CusF3H+. Se compararon las expresiones de G-CSF marcada con CusF y CusF3H+, esta última presentó niveles de expresión en *E. coli* más bajos que los que se obtienen con CusF, además de que forma más cuerpos de inclusión. Por otra parte, se ha demostrado que la purificación por cromatografía de afinidad utilizando como fase estacionaria Ni(II) es mayor utilizando la proteína CusF3H+.

Referencias

1. Las proteínas recombinantes pueden utilizarse en la elaboración de biofármacos como la hormona anti-crecimiento o la insulina. <http://www.uanl.mx/noticias/investigacion/producen-proteinas-recombinantes-de-alta-calidad.html> (consultado el 20 de agosto de 2015).
2. Pérez L, Fernández J, Cedeño A. *Rev Panam Salud Pública*. 2009, 26, 282-283.
3. Von Wichmann M, Camino X, Txoperena G, Arrizabalaga J, Rodríguez F, Iribarren JA. *Enferm. infect. microbiol. Clín*. 2001, 19, 19-23.
4. Carlson ED, Gan R, Hodgman CE, Jewett MC. *Biotechnol Adv* 2012, 30, 1185-1194.