



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**EXPRESIÓN DE INTERLEUCINA-10 HUMANA
RECOMBINANTE EN *Bifidobacterium longum* y
*Escherichia coli***

Tesis que presenta

María de Lourdes Reyes Escogido

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Co-director

Dr. Antonio de León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., Noviembre, 2006



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión de interleucina-10 humana en *Bifidobacterium longum* y *Escherichia coli***” presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **María de Lourdes Reyes Escogido** y aprobada el **24 de Noviembre de 2006** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ana Paulina Barba de la Rosa
Presidente

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Secretario

Dr. Antonio de León Rodríguez
Vocal

Dr. Sonia Lorena Arriaga García
Vocal



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de los doctores Ana Paulina Barba de la Rosa y Antonio de León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. de registro 157707 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 001 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 24 días del mes de noviembre del año 2006, se reunió a las 10:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dr. José Adelfo Escalante Lozada	Secretario	IBT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT
Dra. Sonia Lorena Arriaga García	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

María de Lourdes Reyes Escogido

sobre la Tesis intitulada:

Expresión de interleucina-10 humana recombinante en Bifidobacterium longum y Escherichia coli

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa
Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 24 días del mes noviembre de 2006.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Manríquez
Secretario Académico



A Dios

A mis Padres Estela y Eladio

A mi Hermano José y mis Hermanas Paty, Norma, Hilda y Viridiana

Dedico este trabajo a ellos y les doy gracias por su comprensión y apoyo incondicional.

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica de San Luis Potosí, A.C. (IPICyT).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios No. 157707.

A mis asesores Ana Paulina y Antonio.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Proteómica y Expresión Génica.

A mis amigos de las divisiones de Materiales Avanzados, Matemáticas Aplicadas y Ciencias Ambientales.

Resumen

Expresión de Interleucina-10 humana recombinante en *Bifidobacterium longum* y *Escherichia coli*

Palabras clave: Probiótico, Interleucina-10, Péptido líder

Bifidobacterium longum es una bacteria Gram-positiva no patógena que forma parte de un grupo de microorganismos conocidos como probióticos. Recientemente, el interés en esta bacteria ha aumentado considerablemente no solo por sus cualidades probióticas, ya que también se ha considerado como un sistema de producción de proteínas recombinantes y como vehículo para dirigir pro-fármacos hacia superficies tumorales. La bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*, es el microorganismo más comúnmente empleado en la expresión de proteínas recombinantes a nivel industrial, sin embargo su sistema de secreción de proteínas hacia medio extracelular es más complejo y son pocas las proteínas que se exportan hasta el medio de cultivo. El objetivo de este trabajo fue el diseño y construcción de un plásmido estable y funcional en *Bifidobacterium longum* para la expresión de Interleucina-10 humana, proteína que se ha propuesto para el tratamiento de enfermedades de carácter inflamatorio. El gen IL-10 se optimizó en paralelo para su expresión en *B. longum* y en *E. coli*, y se fusionó al péptido señal BIF3 de la β -galactosidasa de *B. bifidum*. El vector de expresión obtenido se denominó pLR y se utilizó para transformar células de *B. longum* y de *E. coli*. La presencia de hIL-10 en medio de cultivo y células se confirmó por Western blot y se cuantificó por ELISA. El vector pLR fue funcional en ambas cepas y el péptido BIF3 resultó eficiente para la secreción de hIL-10 en *E. coli*.

Abstract

Expression of recombinant human Interleukine-10 in *Bifidobacterium longum* and *Escherichia coli*

Key words: Probiotic, Interleukine-10, signal peptide

Bifidobacterium longum is a Gram-positive, non-pathogenic bacteria considered as probiotic. In last years the importance of *Bifidobacterium* spp has grown for their probiotic properties and recently has been proposed as expression system for recombinant proteins and for delivery pro-drugs target to tumor surfaces as well. *Escherichia coli*, is a Gram-negative bacteria frequently used for recombinant protein expression. Nevertheless, the secretory system for proteins in Gram-negative bacteria is complex and there are only few proteins exported at extracellular medium. The main objective of this work was the design and construction of a stable and functional vector for *Bifidobacterium longum* for the expression of human interleukine-10, which is considered as therapeutic treatment of inflammatory diseases. The IL-10 gene was optimized for both, *Bifidobacterium longum* and *Escherichia coli*, and was fused to the signal peptide BIF3 from a β -galactosidase exported by *Bifidobacterium bifidum*. The novel expression vector was named pLR and was used to transform *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 and *Escherichia coli* strains. hIL-10 was confirmed by Western blot and ELISA assays. pLR vector was functional in both strains and BIF3 led the secretion of hIL-10 in *Escherichia coli*.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Capítulo I. Introducción general	1
1. <i>Bifidobacterium</i>	2
1.1 Antecedentes de <i>Bifidobacterium</i>	2
1.2 Características del género <i>Bifidobacterium</i>	3
1.3 <i>Bifidobacterium</i> y su importancia como probiótico	6
1.4 Genética molecular de <i>Bifidobacterium</i>	8
1.5 <i>Bifidobacterium</i> como sistema de expresión	8
2. Interleucina-10	10
2.1 Descripción de la interleucina-10	10
2.2 Propiedades físicas de IL-10	10
2.3 Estructura de IL-10 humana	12
2.4 Localización y estructura del gen IL-10	14
2.5 Producción de IL-10	14
Capitulo 2. Diseño y construcción del vector pLR para expresión de proteínas en <i>Bifidobacterium</i> spp	17
I. Introducción	18
II. Objetivo	22
III. Materiales y métodos	23
3.1 Cepas y medios de cultivo	23

3.2 Plásmidos	23
3.3 Paquetes computacionales	23
3.4 Diseño y síntesis del cassette de expresión	24
3.5 Construcción del vector de expresión	24
3.6 Confirmación de la funcionalidad del promotor	26
IV. Resultados y discusión	27
4.1 Construcción del cassette de expresión	27
4.1.1 Promotor y terminador	27
4.1.2 Péptido señal	31
4.1.3 Optimización del gen IL-10 de humano	35
4.1.4 Diseño del cassette de expresión	35
4.2 Construcción del vector de expresión	38
Capítulo 3. Expresión de Interleucina-10 humana (hIL-10) en	
<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	45
I. Introducción	46
II. Objetivo	47
III. Materiales y Métodos	48
3.1 Plásmidos, cepas y medios de cultivo	48
3.2 Transformación de <i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707	48
3.3 Comprobación de la presencia de PLR en <i>B. longum</i> ATCC 15707	
3.4 Ensayos de expresión de hIL-10	49
3.4.1 Preparación de muestras	50
3.4.2 Identificación de hIL-10 por Análisis de Western Blot	50
3.4.3 Cuantificación de hIL-10 por ensayo de Elisa	50
IV. Resultados y discusión	51
	52
Capítulo 4. Expresión y secreción de hIL-10 en <i>Escherichia coli</i>	
utilizando el vector pLR	
I. Introducción	57
II. Objetivo	58

III. Materiales y Métodos	62
3.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo	63
3.2 Preparación y transformación de las células competentes de <i>Escherichia coli</i>	63
3.3 Comprobación de la presencia de pLR en las cepas de <i>E. coli</i>	63
3.4 Expresión en matraz de hIL-10 en las cepas de <i>E. coli</i> transformadas con pLR1 y pLR2	64
3.4.1 Expresión de hIL-10 en medio LB	64
3.4.2 Extracción de hIL-10 de medio de cultivo	64
3.4.3 Extracción de hIL-10 de las diferentes fracciones celulares	65
3.4.4 Identificación por Western blot	65
3.4.5 Cuantificación de hIL-10 por ensayo de Elisa	66
IV. Resultados y discusión	66
	68
Conclusiones generales	81
Referencias	83
Anexos	
Registro de patente	94

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. BIFIDOBACTERIUM

1.1 Antecedentes de *Bifidobacterium*

La primera descripción de *Bifidobacterium* fue realizada en el Instituto Pasteur por Tissier en el año de 1900, reportando que estos bacilos eran la flora predominante en heces de infantes alimentados con leche materna y les dio el nombre de *Bacillus bifidus communis* debido a su forma bifurcada (Figura 1). Posteriormente, basado en sus características morfológicas, bioquímicas y de cultivo, Orla-Jensen (1924) sugirió una clasificación como nuevo género al cual llamó *Bifidobacterium* y lo colocó en un taxón separado. Sin embargo tuvieron que pasar casi 50 años para que este género apareciera en la VIII edición del Manual Bergey's de Bacteriología Determinativa (Breed *et al*, 1957). Se consideraron principalmente tres características diferentes para su separación final y reclasificación como género; la fermentación de azúcares (Reuter, 1963), la presencia de la enzima fructosa 6-fosfato fosfocetolasa (De Vries y Stouthamer, 1967) y el alto contenido de G+C en el ADN. Actualmente el género *Bifidobacterium* está clasificado en el dominio *Bacteria* dentro de la clase *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al*, 1997) en la subclase *Actinobacteridae*, el orden *Bifidobacteriales* y la familia *Bifidobacteriaceae*. De acuerdo a criterios taxonómicos, bifidobacteria se agrupó filogenéticamente en la rama de los actinomicetos Gram-positivos en el cluster con alto contenido de G+C (Olsen *et al*, 1994). Existen a la fecha 33 especies diferentes en base a homología de ADN aislados de diferentes fuentes; 11 especies se aislaron del humano, 15 de mamíferos, 3 de abejas, 3 fueron aisladas de aguas negras y una de leche fermentada (Watabe *et al*, 1983; Scardovi, 1986; Lauer, 1990; Biavati y

Mattarelli, 1991; Biavati *et al*, 1991; Crociani *et al*, 1996; Meile *et al*, 1997), incluyendo la especie descubierta más recientemente; *B. thermacidophilum*, que fue aislada de un digestor anaerobio (Dong *et al*, 2000). *Bifidobacterium* coloniza rápidamente el tracto intestinal de recién nacidos y llega a ser el género dominante de la flora intestinal, sin embargo la población disminuye con la edad (Mitsuoka, 1990) y solo llega a representar del 1 al 3 % de la flora fecal de adultos sanos (Mitsuoka, 1982).

1.2 Características del género *Bifidobacterium*

Las bacterias del género *Bifidobacterium* son bacilos no esporulados, Gram-positivos, anaerobios, catalasa negativa, que presentan morfología bifurcada (Figura 1). *Bifidobacterium* spp metaboliza una gran cantidad de carbohidratos produciendo principalmente ácidos acético y láctico en una relación molar 3:1 sin producción de CO₂. La glucosa es metabolizada exclusivamente por la enzima fructosa 6-fosfato fosfocetolasa (Figura 2), enzima clave en el metabolismo de *Bifidobacterium* (Scardovi y Trovatelli, 1969).



Figura 1. La forma bifurcada es característica del género *Bifidobacterium*.

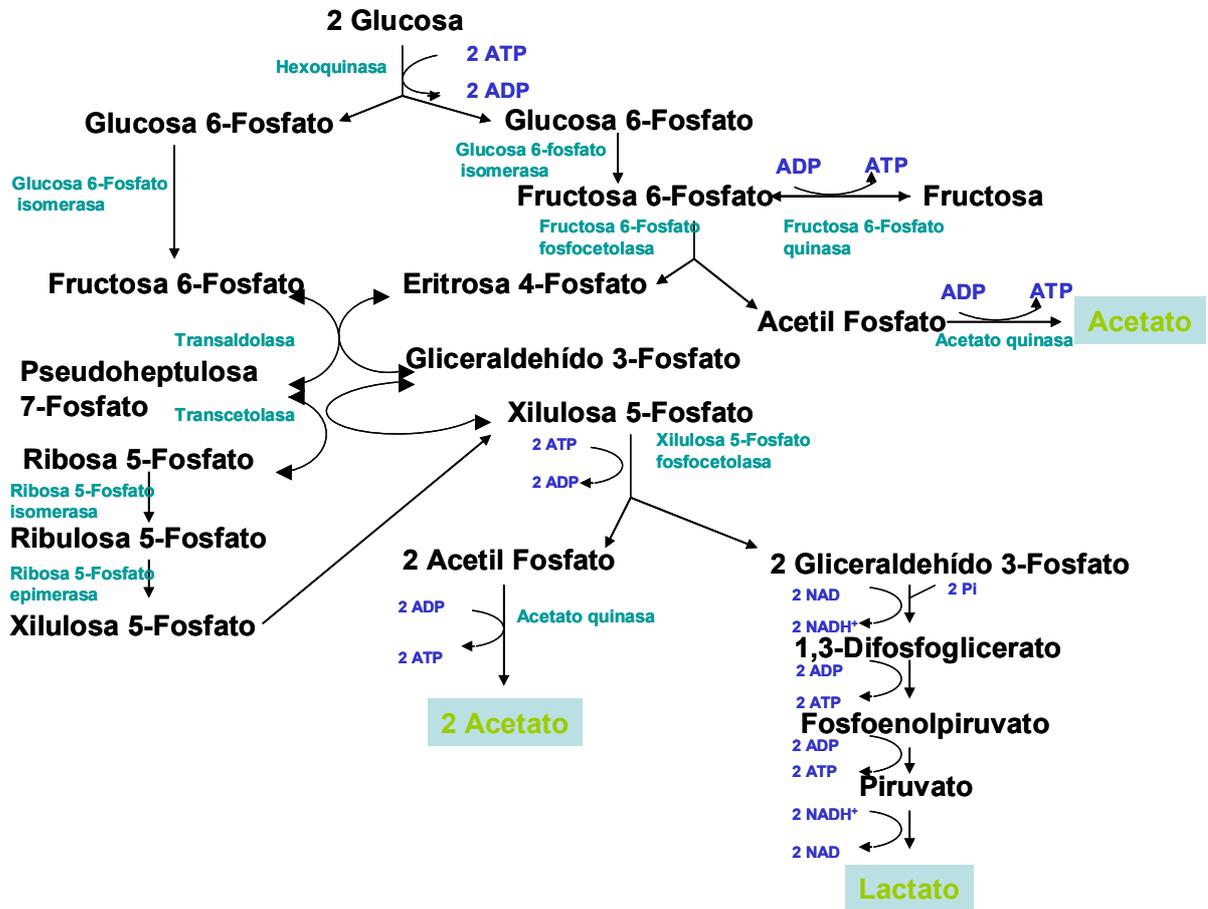


Figura 2. Vía metabólica de *Bifidobacterium*, los metabolitos principales son acetato y lactato.

1.3 *Bifidobacterium* y su importancia como probiótico

Metchnikoff (1907), observó en una población de Bulgaria que sus habitantes presentaban una longevidad larga y llegó a la conclusión de que este fenómeno estaba relacionado al consumo de leches fermentadas con bacterias lácticas, fue entonces cuando nació la idea de utilizar bacterias viables como suplemento alimenticio bajo la teoría de “Longevidad sin envejecimiento”. El concepto de probiótico fue introducido a principios del siglo XX, y su definición ha evolucionado a través de los años (Tabla 1).

Tabla 1. Evolución de la definición de probióticos

Definición	Referencia
Sustancia producida por microorganismos que promueve el crecimiento de otros microorganismos.	Lilly y Stillwell, (1965)
Organismos y sustancias que contribuyen al balance de la microbiota intestinal.	Parker,(1974)
Suplemento alimenticio vivo que afecta benéficamente al huésped mejorando el balance de la microbiota intestinal.	Fuller, (1989)
Cultivo o mezcla de cultivos de microorganismos que aplicados al humano o animales, afecta benéficamente al huésped mejorando las propiedades de la microflora nativa.	Havenaar y Huis In't Veld, (1992)
Microorganismos vivos, que al ser ingeridos en ciertas cantidades, presentan efectos benéficos más allá de la nutrición básica.	Schaafsma, (1996)
Adyuvante microbiano que afecta benéficamente la fisiología del huésped mediante la modulación de la mucosa e inmunidad sistémica, así como mejorando el balance nutricional y microbiano del tracto intestinal.	Naidu <i>et al</i> , (1999)
Preparación de un producto conteniendo microorganismos viables en cantidades suficientes, los cuales alteran la microflora (por implantación o colonización) presentando efectos benéficos en el huésped.	Schrezenmeir y de Vrese, (2001)
Microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped.	FAO/WHO, reporte de Octubre (2001)

*Adaptado de Sanders, 2003

Actualmente la definición más aceptada es la propuesta por la FAO/WHO (2001). Existe una gran controversia en cuanto a los beneficios atribuidos a los probióticos, sin embargo, los efectos más importantes considerados hasta ahora incluyen; el mantenimiento de la microflora normal (prevención de diarrea), inhibición del crecimiento de bacterias patógenas por producción de bacteriocinas y disminución del pH por la producción de acetato y lactato, mejoramiento de intolerancia a lactosa, reducción de niveles de colesterol en suero, reducción de las concentraciones de amonio en sangre, producción de vitaminas (Deguchi *et al*, 1985), estimulación del sistema inmune, y actividad anticarcinogénica y antimutagénica (Mitsuoka, 1990; Ballonge, 1993). Las bacterias con estatus GRAS (Generalmente reconocido como seguro, por sus siglas en inglés), más comúnmente utilizadas como probióticos en alimentos son *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* y *Bifidobacterium* spp.

El hábitat principal de *Bifidobacterium* es el tracto intestinal y se mantiene como flora predominante en el humano durante todas las etapas de su vida (Tannok *et al*, 1996), se asume que la composición y actividad de esta microflora influye en la salud del huésped y presenta gran competencia contra cualquier organismo que podría introducirse y alterar el balance de la comunidad normal (Berg, 1998). Todos estos aspectos aumentan el interés en este grupo de bacterias siendo importantes principalmente para la industria de alimentos. Algunas cepas de *Bifidobacterium* son consideradas como probióticas y varios productos tanto farmacéuticos como lácteos que las contienen se han propuesto como adyuvantes de la dieta.

1.4 Genética molecular de *Bifidobacterium*

A partir de que bifidobacteria fue considerada como probiótica y se empezó a utilizar como suplemento de alimentos, el interés por encontrar nuevas cepas ha aumentado considerablemente. Esto implica la necesidad de progresar en la genética de bifidobacteria y en consecuencia este campo de investigación va en aumento. Se han aislado y caracterizado nuevas cepas y se han realizado varios intentos para modificar por técnicas de ADN recombinante cepas con propiedades específicas. Sin embargo, para ello es necesario la selección de cepas de *Bifidobacterium* que alberguen plásmidos, encontrar genes relevantes y secuenciar e identificar sus funciones. Hasta la fecha solo se ha secuenciado el genoma de *B. longum* cepa NCC2705 (GenBank AEO14295), sin embargo está por terminarse la secuenciación de los genomas de *B. longum* cepa DJO10A (GenBank AABM00000000) y *B. adolescentis* ATCC 15703 (GenBank NZ_BAAD00000000).

1.5 *Bifidobacterium* como sistema de expresión

La producción de muchas proteínas de interés biotecnológico ha sido posible gracias a la tecnología del ADN recombinante, y uno de los sistemas más utilizados con este fin es la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*. La mayoría de las proteínas recombinantes producidas en *E. coli* no cruzan la membrana externa, y por lo tanto, el producto debe ser purificado a partir del citoplasma o del espacio periplásmico. Los problemas más frecuentes con este sistema incluyen la contaminación con material celular que puede ser tóxico y la formación de grandes cantidades de cadenas de polipéptidos formando agregados que se conocen como cuerpos de inclusión (Villaverde *et al*, 2003).

A pesar de la gran importancia que tiene *Escherichia coli* en la producción de proteínas recombinantes, es una bacteria que no cuenta con eficientes sistemas de secreción de proteínas, por lo que la atención se ha dirigido a la habilidad natural de bacterias Gram-positivas (*Bifidobacterium* entre ellas) para exportar proteínas hacia el medio extracelular. A pesar de los beneficios que ofrecen las bacterias Gram-positivas, poco se conoce sobre sus propiedades genéticas en comparación con las Gram negativas como *E. coli*, sin embargo se han propuesto como candidatos favorables para la producción de proteínas recombinantes. Los trabajos de expresión de proteínas en *Bifidobacterium* son muy pocos y las proteínas que se han expresado son: Pediocina PA-1 (Moon *et al*, 2005), glutamato descarboxilasa (Park *et al*, 2005), α -amilasa (Park *et al*, 2005), citosina deaminasa (Yi *et al*, 2005), α -amilasa (Rhim *et al*, 2006). La expresión de proteínas recombinantes en *Bifidobacterium* es un área relativamente nueva y aún desconocida, por lo que es necesario estudiar las características de la bacteria para proponerlo como un sistema de expresión, estudiar su secretoma para caracterizar las vías de transporte de proteínas y basándonos en ellas diseñar o escoger posibles péptidos señal que funcionen para secretar las proteínas heterólogas hacia el medio de cultivo, identificar secuencias de promotores que se puedan utilizar para la construcción de los vectores de expresión y obtener vectores constitutivos o inducibles, para todo esto es necesario realizar muchos estudios los cuales se facilitan un poco debido a que el genoma de *Bifidobacterium longum* cepa NCC2705 ya se encuentra en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con el número de acceso AE014295.

2. INTERLEUCINA-10

2.1 Descripción de la Interleucina-10

La interleucina-10 es una proteína que debido al efecto inhibitorio que presenta sobre un gran número de citocinas, es capaz de detener la respuesta inmune. Por su habilidad tanto supresora como inmunomoduladora, IL-10 recibió el nombre de factor inhibidor de la síntesis de citocinas (Florentino *et al*, 1989; Moore *et al*, 1990). IL-10 también cumple con un papel en la proliferación y diferenciación de células B, células T y mastocitos. En base a sus características inmunológicas, IL-10 se ha considerado como un candidato atractivo para aplicaciones terapéuticas dirigidas principalmente al tratamiento de inflamación aguda y crónica, cáncer y enfermedades infecciosas (Asadullah *et al*, 2003).

2.2 Propiedades físicas de IL-10

La interleucina-10 biológicamente funcional es un dímero de 36 kDa (Tan *et al*, 1993; Windsor *et al*, 1993), conformado por dos polipéptidos con una longitud de 160 aminoácidos cada uno (Vieira *et al*, 1991). El inicio de la transducción de señales ocurre cuando IL-10 se une a las dos cadenas receptoras, IL-10R1 e IL-10R2 (Liu *et al*, 1994; Kotenko *et al*, 1997). Ambas cadenas constan de dominios extracelular, transmembranal e intracelular/citoplásmico (Figura 3), y se encuentran dentro de la familia del receptor del interferón, caracterizada por la presencia de dos puentes disulfuro (Bazan *et al*, 1990, Ho *et al*, 1993).

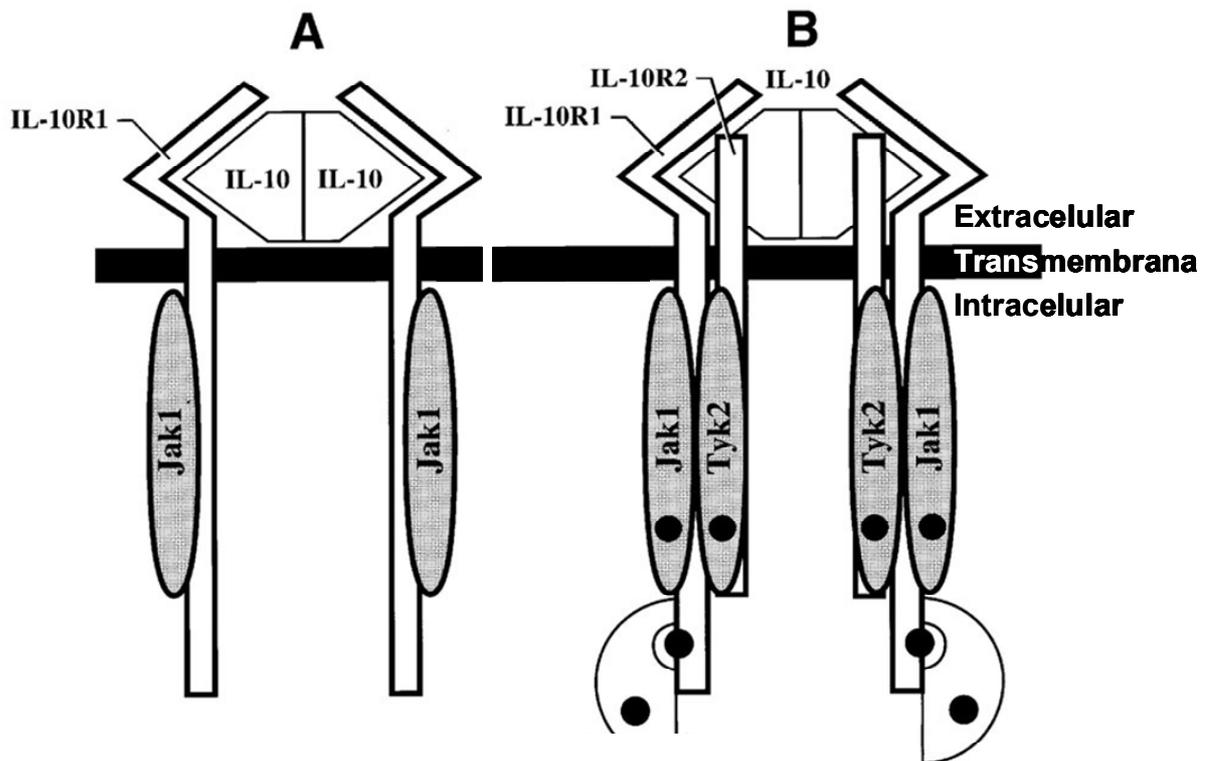


Figura 3. Modelo del receptor de IL-10. El homodímero se une a la cadena sola del receptor IL10R1 (A) o al complejo IL10R1-IL10R2 (B). Solamente cuando los dos receptores están presentes en el complejo, IL-10 inicia la transducción de señales.

Se han descubierto genes virales y celulares homólogos al gen IL-10. Esta familia de homólogos, ahora es conocida como familia IL-10 y se divide en dos grupos: homólogos virales y homólogos celulares (Kotenko, 2002; Ozaki *et al*, 2002). Los homólogos virales se encontraron en el genoma del virus de Epstein Barr (EBV) (Moore *et al*, 1990; Vieira *et al*, 1991; Hsu *et al*, 1990), herpesvirus equino tipo 2 (EHV2) (Rode *et al*, 1993), parapoxvirus (PV) (Fleming *et al*, 1997), citomegalovirus humano y de simios (CMV) (Kotenko *et al*, 2000) y en el virus de la enfermedad de Yaba (YV) (Lee *et al*, 2001). Aunque la identidad de aminoácidos de estas proteínas con hIL-10 varía entre 23 y 85 %, todos son dímeros que presentan una estructura tridimensional muy similar a IL-10, lo cual se ha mostrado por la estructura de EBVIL-10 y CMVIL-10 (Zdanov *et al*, 1997; Jones *et al*, 2002). Los homólogos celulares incluyen IL-19 (Gallagher *et al*, 2000), IL-20 (Blumberg *et al*, 2001), IL-22 (Dumoutier *et al*, 2000), IL-24 (Jiang *et al*, 1996), IL-26 (Knappe *et al*, 2000), IFN- λ 1, IFN- λ 2, e IFN- λ 3 (Kotenko *et al*, 2003; Sheppard *et al*, 2003), presentan una menor similitud en cuanto a la secuencia de aminoácidos con hIL-10, y difieren en sus funciones biológicas. La mayoría de ellos son monómeros, presentan estructuras similares a la estructura del dominio de IL-10; la única excepción es IL-26, la cual es probablemente un dímero (Knappe *et al*, 2000).

2.3 Estructura de IL-10 humana

IL-10 humana es un dímero intercalado de dos subunidades consistentes de seis hélices anfipáticas. La estructura de cada monómero se estabiliza por dos puentes disulfuro entre cisteínas; cys12-cys108 y cys62-cys114 (Figura 4) (Zdanov *et al*, 1995; Walter *et al*, 1995).

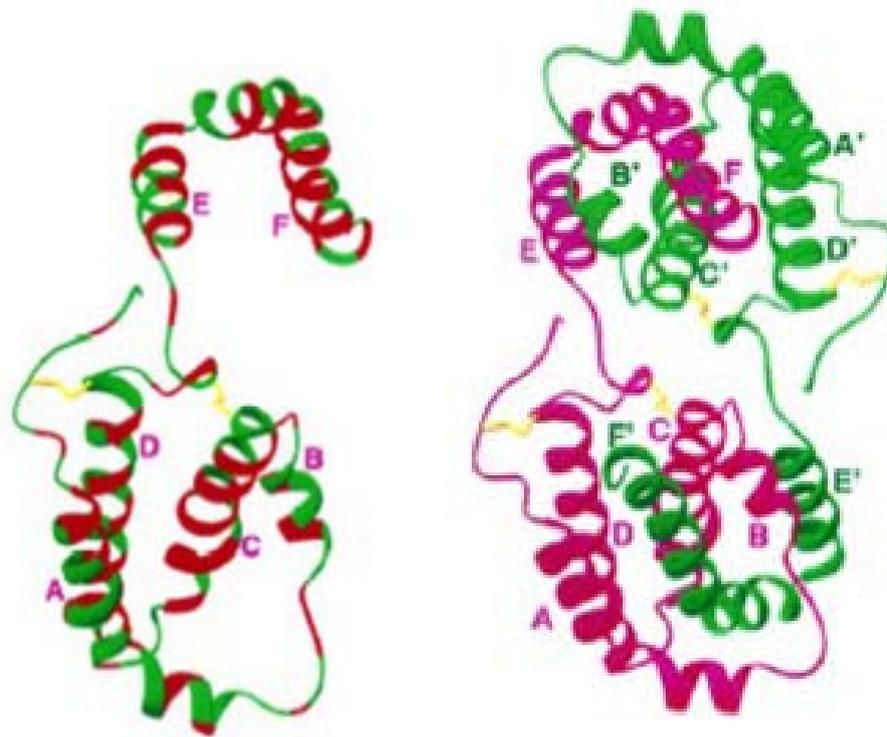


Figura 4. Estructura de un monómero A) y un dímero B) de interleucina-10. A-F, hélices anfipáticas. Los puentes disulfuro se muestran en amarillo.

2.4 Localización y estructura del gen IL-10

El gen que codifica para IL-10 humana al igual que el que codifica para IL-10 de ratón, se encuentra presente como una copia simple en el genoma. El gen IL-10 humano contiene cuatro exones, mientras que el de ratón presenta cinco. A nivel de nucleótidos, IL-10 humana presenta un 81% de identidad con IL-10 de ratón. La transcripción del gen IL-10 produce RNA mensajero de 1.4 kb en ratón y de 2 kb en humanos. La regulación de la transcripción de IL-10 aún no se explica por completo.

2.5 Producción de IL-10

IL-10 se produce principalmente por las células TH2, subgrupo de las células CD4⁺. Sin embargo también se produce por algunas células B activadas, algunas células TH1, macrófagos activados y algunas fuentes no hematopoyéticas como queratinocitos, cáncer de colon y melanoma. Algunos estudios han mostrado que IL-10 se sintetiza por células T activadas o monocitos después de otras citocinas inmunomoduladoras, lo cual podría revelar el papel regulador de IL-10 en fases tardías de la respuesta inmune (Delves *et al*, 1998). Numerosos estudios sobre la actividad de IL-10 tanto *in vivo* como *in vitro* han sugerido un importante papel de esta citocina en la regulación inmune. De interés particular es el posible uso clínico como terapéutico en el tratamiento de enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

En un estudio en el cual se desarrolló espontáneamente enterocolitis crónica en ratones IL-10^{-/-} de 3 semanas de nacidos, la enfermedad pudo prevenirse por la administración de IL-10 al ratón recién nacido. Sin embargo, IL-10 administrada por vía sistémica, puede ocasionar una gran cantidad de efectos

secundarios por lo cual IL-10 en este sentido no es mejor que el uso de inmunosupresores sintéticos convencionales. Un estudio realizado con ratones mostró que se podía dirigir esta proteína antiinflamatoria hacia tejidos específicos al utilizar una cepa de *Lactococcus lactis* transformada con el gen mhIL-10. A los ratones utilizados como modelo se les desarrolló colitis y cuando se les administró *L. lactis* por vía intragástrica, hubo reparación del daño celular sin que se presentaran alteraciones en el control sano (Figura 5) (Schotte *et al*, 2000). Este resultado con *Lactococcus lactis* aunado a varios trabajos entre los cuales se encuentran bacterias del género *Bifidobacterium* que también han sido transformadas y utilizadas como vehículos para dirigir pro-fármacos hacia tumores, han permitido reforzar la propuesta de utilizar bacterias lácticas, entre ellas *Bifidobacterium*, como vehículos de proteínas terapéuticas o de pro-fármacos que pueden ser administrados por vía oral o sistémica (Revisión en Fujimori, 2006).

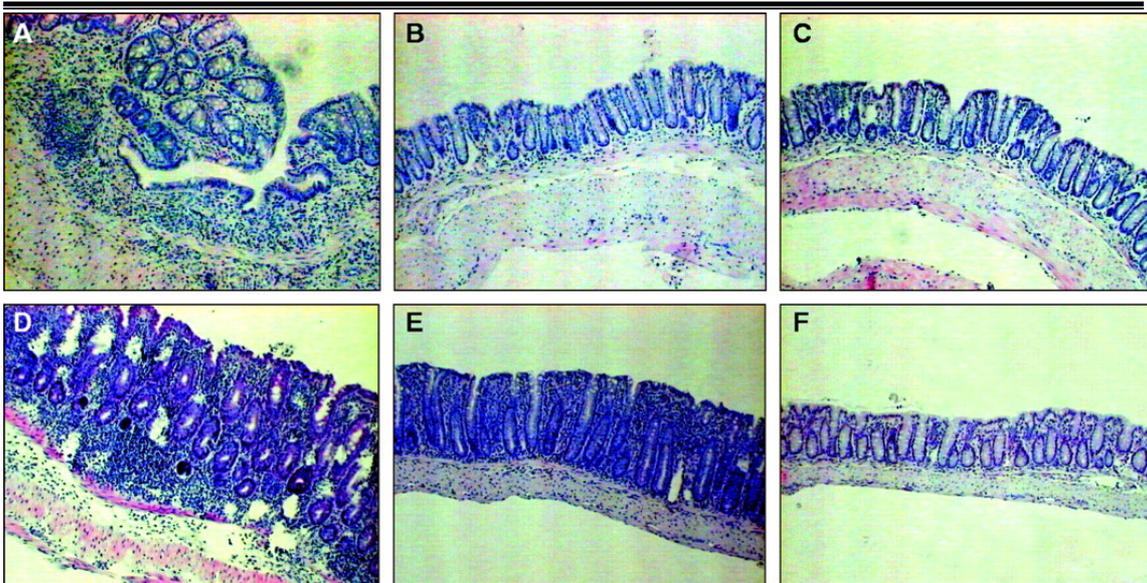


Figura 5. Histología de modelos de colitis murina. La imagen representa secciones del colon distal teñidos con hematoxilina y eosina. Inflamación en modelo de colitis inducida por DSS en ratas hembras Balb/c. (A) Se observa infiltrado linfocítico y disturbios de la arquitectura del tejido en ratas no tratadas. (B) Después del tratamiento por administración intragástrica de inóculos de 2×10^7 LL-mIL10 durante 14 días seguidos por 14 días de recuperación, el infiltrado linfocítico se redujo y la arquitectura celular se restauró. (C) Control sano. (D-F) Imágenes de ratas hembras de 7 semanas 129Sv/Ev IL-10^{-/-}. (D) El infiltrado linfocítico es aparente en ratas no tratadas y (E) ratas tratadas durante 4 semanas por administración intragástrica de inóculos de 2×10^7 de LL-TREX1. (F) El infiltrado disminuye en ratas tratadas por 4 semanas por administración intragástrica diaria de inóculos de 2×10^7 de LL-mIL10. **DSS** Dextran sulfato de sodio, **LL-mIL10** *Lactococcus lactis* transformada con el gen mIL10, **LL-TREX1** *Lactococcus lactis* transformada con el vector control sin el gen mIL10.

CAPITULO 2

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR pLR PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN *Bifidobacterium* spp

I. INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de vectores de clonación estructuralmente estables y eficientes para la clonación y conservación de fragmentos de ADN es crucial para la ingeniería genética. La característica más importante de un vector de clonación potencial es la capacidad de replicarse en la bacteria, en este caso, *Bifidobacterium* spp, para lo cual existen tres posibilidades: 1) que el vector esté basado en un replicón derivado de *Bifidobacterium*, 2) que los plásmidos utilizados sean derivados de bacterias relacionadas con *Bifidobacterium* o 3) que sean plásmidos que se repliquen en bacterias tanto Gram-negativas como Gram-positivas incluyendo bifidobacterias.

Los estudios que se han realizado hasta ahora sobre transformación de *Bifidobacterium* han mostrado que esta bacteria difícilmente acepta plásmidos que contienen replicones de otras bacterias, por lo que es recomendable que el vector se base en un replicón derivado de bifidobacteria. Por lo tanto, la búsqueda de plásmidos nativos de estas bacterias es un paso importante para la construcción de vectores de expresión. Se han aislado plásmidos de seis diferentes especies: *B. breve*, *B. pseudocatenulatum* y *B. longum* encontradas en tracto intestinal humano, *B. asteroides* y *B. indicum* aisladas de abejas y *B. globosum* encontrada en varios animales (Sgorbati *et al*, 1982; Sgorbati *et al*, 1986a; Sgorbati *et al*, 1986b; Iwata y Morishita, 1989; Matteuzzi *et al*, 1990; Bourget *et al*, 1993; Mattarelli *et al*, 1994; Park *et al*, 1997; Smeianov *et al*, 2002). Estas especies normalmente albergan varios plásmidos cuyos tamaños van de 1.25 a 9.5 kb, la mayoría son crípticos y no han sido caracterizados más allá de sus mapas de restricción. Seis plásmidos se han secuenciado

completamente: pMB1 de *B. longum* (Rossi *et al*, 1996), pAP1 de *B. asteroides* (Kaufmann *et al*, 1997), pCIBb1 de *B. breve* (O’Riordan y Fitzgerald, 1999), pKJ35 y pKJ50 de *B. longum* (Park *et al*, 1997) y p4M de *B. pseudocatenulatum* (Smeianov *et al*, 2002), sin embargo no todas las secuencias se encuentran disponibles en bases de datos, la Tabla 2 muestra una lista de plásmidos nativos de *Bifidobacterium* spp que se encuentran reportadas en la base de datos.

Tabla 2. Plásmidos nativos de *Bifidobacterium* spp que han sido completamente secuenciados y que se encuentran depositados en bases de datos.

Plásmido	Célula huésped	Referencia
pMB1 (1.9 kb)	<i>B. longum</i>	Rossi et al, (1996)
pKJ36 (3.6 kb) pKJ50 (4.9 kb)	<i>B. longum</i> KJ	Park et al, (2004)
pB44 (3.6 kb)	<i>B. longum</i>	Smeianov et al, (2004)
pNBb1 (5.6 kb)	<i>B. breve</i>	O’Riordan and Fitzgerald, (2005)
pTB6 (3.6 kb)	<i>B. longum</i>	Tanaka et al, (2005)
pMG1 (3.6 kb)	<i>B. longum</i>	Park et al, (2005)
pBLO1(3.6 kb)	<i>B. longum</i>	Schell et al, (2005)
pNAC1 (3.5 kb) pNAC2 (3.6 kb) pNAC3 (10.2 kb)	<i>B. longum</i>	Corneau et al, (2005)
pDOJH10S (3.6 kb) pDOJH10L (10.3 kb)	<i>B. longum</i>	Lee et al, (2005)

El primer plásmido completamente secuenciado fue pMB1 aislado de *Bifidobacterium longum* y la información obtenida permitió la caracterización de su replicón y la construcción de la primera familia de vectores de clonación para *Bifidobacterium* (Rossi *et al*, 1997). Con los resultados obtenidos de este trabajo se realizó la primera clonación de un gen heterólogo en *Bifidobacterium* y la construcción de vectores de clonación por Rossi *et al*, (1998) quienes construyeron el vector pDG7 de 7.2 kb, el cual está constituido por el replicón de *Bifidobacterium* pMB1, los genes de resistencia a ampicilina y cloranfenicol (*bla* y *cat* respectivamente) y un ori para *E. coli* (Figura 6). Para evaluar la eficiencia de pDG7 como vector de clonación, se clonaron los genes de la α -amilasa, colesterol oxidasa y lipasa y se transformaron varias especies de *Bifidobacterium* con cada una de las construcciones obtenidas, ninguno de los genes clonados se expresó debido a que el vector no tenía un promotor, pero las construcciones fueron estables en las bacterias.

Los vectores pDG7 y pMR3 se construyeron al clonar el plásmido pMB1 aislado de *B. longum* (Sgorbati *et al*, 1982) en el vector de *E. coli* pJH101 (Ferrari *et al*, 1983) y trataron en vano de transformar *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus reuteri* con estos vectores. Posteriormente Missich *et al*, (1994) introdujeron exitosamente el vector pRM2 en una cepa de *B. longum* de la cual se había aislado pMB1, esto dejó claro que el replicón pMB1 era específico para *Bifidobacterium*. Por otro lado, un estudio realizado por González *et al*, (2003) en el que construyeron una familia de vectores de diferentes tamaños, todos derivados del replicón pMB1, mostró que la estabilidad de estos plásmidos estaba relacionada con su tamaño, esto es, a menor tamaño del vector, mayor estabilidad.

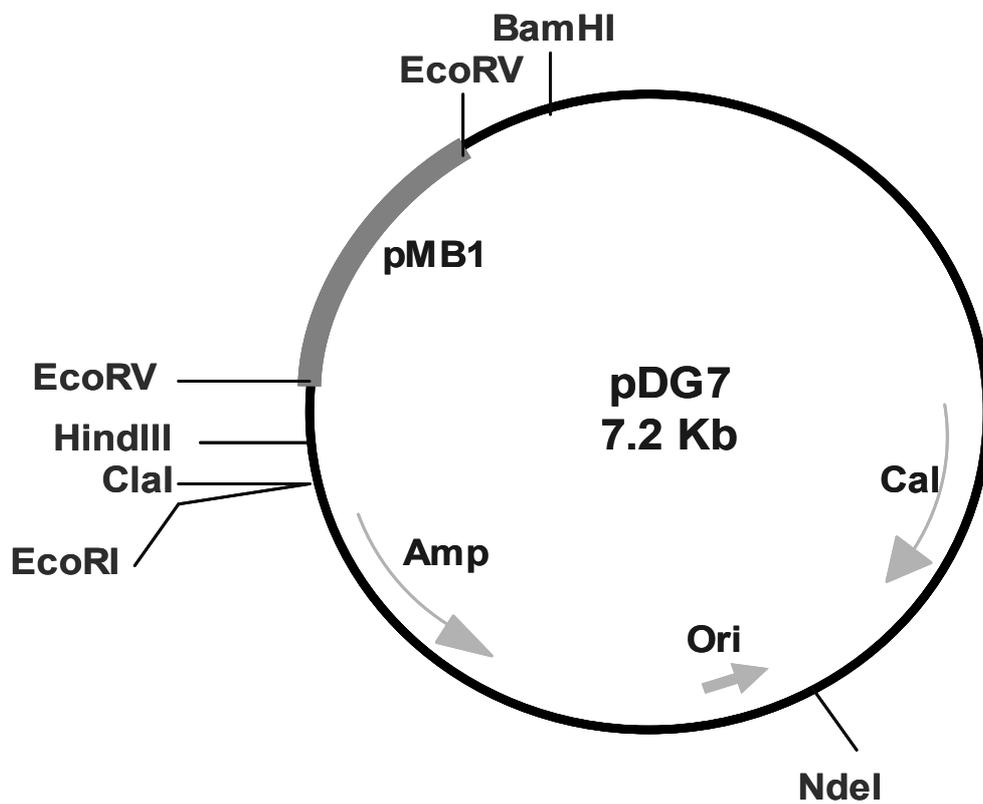


Figura 6. Estructura molecular del vector pDG7.

II. OBJETIVO

Construir un vector de expresión estable y funcional para la expresión de proteínas heterólogas en *Bifidobacterium* spp.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas y medios de cultivo

Las cepas bacterianas que se utilizaron fueron; *Escherichia coli* TOP10 como huésped de propagación y *Bifidobacterium longum* ATCC15707, como huésped de expresión. *E. coli* TOP10 se creció en medio LB con ampicilina ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) para selección de transformantes. Para cultivo de *Bifidobacterium longum* se utilizó el medio de Man Rogosa & Sharpe (MRS) suplementado con 0.05% de cisteína (p/v) y el cloranfenicol ($7.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) se utilizó como marcador de selección para transformantes.

3.2 Plásmidos

El plásmido pDG7 fue proporcionado por el Dr. Diego Matteuzzi de la Universidad de Bologna, Italia.

El plásmido PCR 4 (Invitrogen, Carlsbad, USA) se utilizó para propósitos de clonación.

3.3 Paquetes computacionales empleados

- Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) para alineamiento de secuencias
- SignalP3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para análisis de predicción de péptidos señal
- bprom (<http://www.softberry.com/cgi-bin/programs/gfindb/bprom.pl>), para análisis de promotores.

3.4 Diseño y síntesis del cassette de expresión

El promotor se analizó con el programa bprom para encontrar cada una de las secuencias regulatorias; regiones -10, -35 y Shine Delgarne (SD). El gen de IL-10 humana se optimizó y fusionó al péptido señal BIF3 y la secuencia fusionada se analizó con el programa SignalP3 Server para encontrar el motivo que es reconocido por la peptidasa encargada de realizar el corte de la proteína. La secuencia conformada por promotor, péptido señal, IL-10 y terminador (que se identifica como cassette de expresión) se sintetizó por la compañía Entelechon (Regensburg, Germany) quien nos proporcionó el cassette clonado en el vector de clonación PCR4 (Invitrogen, Carlsbad, USA).

3.5 Construcción del vector de expresión

Se digirieron por separado 10 μ l del cassette de expresión y 10 μ l del vector pDG7 (Figura 6) con la enzima *Eco RI*. Las digestiones se cargaron en un gel de agarosa al 0.8% y los fragmentos obtenidos se recuperaron con el kit de extracción Gene Clean (QIAquick, Qiagen, Alemania). El fragmento de pDG7 de 7.2 Kb se defosforiló adicionando fosfatasa alcalina (Invitrogen, Carlsbad, USA). Para la ligación, se mezclaron 10 μ l del cassette de expresión y 10 μ l de pDG7 defosforilado en un tubo eppendorf, se añadió 1 U μ l⁻¹ de la enzima T4 DNA *ligasa* (Invitrogen, Carlsbad, USA), la reacción se incubó a 16°C toda la noche y se transformó *E. coli* TOP 10 por choque térmico, se plaqueó sobre agar LB ampicilina (100 μ g ml⁻¹) para recuperar las células transformadas. La presencia del cassette de expresión se comprobó por PCR picando directamente las colonias que crecieron en las placas de agar LB. Los oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR se diseñaron previamente y

amplifican un producto de 719 pb que comprende desde el inicio del promotor hasta el término del gen IL-10, estos fueron: Forward; 5'-GGGGAAATAGA TGTGAAAAC-3' y Reverse; 5'-CCCGGGCATGCTCAGTTGCGG-3'. La amplificación de fragmentos específicos por PCR se realizó utilizando la siguiente mezcla de reacción; amortiguador de PCR 1X con 2.5 mM MgCl₂; 1 µg ml⁻¹ de ADN como templado, 0.3 mM de cada uno de los oligonucleótidos; 0.25 mM de cada dNTP; 2.5 U ml⁻¹ de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un Termociclador Modelo 2400 Gene Amplification PCR (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Alícuotas de 5 µl de la reacción de amplificación fueron analizadas en geles de agarosa al 0.8% teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.8 mg ml⁻¹) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). La captura de las imágenes fue realizada con un digitalizador GelDoc (Bio-Rad, Cal, USA). Las colonias con PCR positivo, se inocularon en medio LB ampicilina para hacer extracción de ADN plasmídico utilizando un kit comercial (QIAquick, Qiagen, Alemania). Con el ADN recuperado se realizó un ensayo de restricción para confirmar la presencia y el sentido del cassette de expresión dentro del plásmido pDG7. Se realizaron dos ensayos de restricción, uno con *Eco RI* para liberar el cassette completo y otro con *Hind III* y *Sma I* para conocer el sentido del cassette. Las mezclas de reacción fueron: 1 µg de ADN, 1 µl de la enzima correspondiente, 1 µl de buffer de reacción, se ajustó a un volumen final de 20 µl y se incubaron durante 1 hora a 37°C, excepto *Sma I* cuya temperatura de incubación fue de 30°C.

3.6 Confirmación de la funcionalidad del promotor

Las colonias de *E. coli* TOP10 que tenían el cassette de expresión se inocularon en medio LB ampicilina, se incubó toda la noche a 37°C con agitación (150 rpm). El cultivo se centrifugó y se separaron las células del medio de cultivo. Las células se resuspendieron en amortiguador (Tris 50 mM pH8, NaCl 300 mM y Tritón X-100 0.1%) y se lisaron con un sonicador (Ultrasonic Processor, Mon, Canada), se centrifugó para separar los restos celulares y el sobrenadante. Se mezclaron 10 µl de sobrenadante con 10 µl de Laemmli (Laemmli, 1970), se hirvieron por 2 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), el gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para realizar el Western Blot, la transferencia se realizó con el transblot (Bio-Rad, Cal, USA) a 10V/40 min. Después de la transferencia la membrana se lavó dos veces con buffer TBS (Tris 200 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5), posteriormente la membrana se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en la solución de bloqueo (leche al 4% en TTBS (Tris 200 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5, tween 0.1%), se realizaron dos lavados con TTBS y la membrana se incubó 1 hora con el anticuerpo primario anti conejo hIL-10 (Prepro Tech, México) diluído 1:1000, se volvieron a realizar dos lavados con TTBS y se incubó otra hora con el anticuerpo secundario anti conejo IgG (H+L) acoplado a la fosfatasa alcalina (Bio-Rad, Cal, USA) diluído 1:2000. Las bandas se revelaron con el sustrato NBT/BCIP (p-Nitro Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt) (Amersham, Biosciences, Pittsburgh, USA).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Construcción del cassette de expresión

El vector pDG7 está conformado por el replicón pMB1 de *Bifidobacterium longum*, los genes *bla* y *cat* que confieren resistencia a ampicilina y cloranfenicol respectivamente y el replicón *rep* responsable de la replicación del plásmido en *Escherichia coli* (Figura 6), este vector no contiene un promotor funcional en *Bifidobacterium*, por lo cual fue necesario diseñar y construir un cassette de expresión.

4.1.1 Promotor y terminador

Para construir el vector de expresión se realizó una búsqueda de proteínas producidas por *Bifidobacterium* que ya habían sido caracterizadas. Goshima *et al*, (1990) caracterizaron el gen *hup* que codifica para la proteína HU (proteína de unión a histonas), y posteriormente Takeuchi *et al*, (2002) reportaron la secuencia completa de aminoácidos e identificaron su promotor y terminador (Figura 7). El promotor está formado por 192 nucleótidos, se realizó un análisis computacional para reducir su tamaño conservando las regiones importantes (Regiones -10, -35 y SD). El análisis se realizó utilizando el paquete softberry disponible en línea (<http://www.softberry.com/cgi-bin/programs/gfindb/bprom.pl>) con el programa BPRM, útil para la predicción de promotores bacterianos de tipo sigma 70. Se identificaron tres factores transcripcionales pertenecientes a la familia sigma 70, homólogos a los de *E. coli*, dos son de tipo rpoD16 y uno de tipo rpoD15 los cuales se ubican en las posiciones 92, 94 y 108

respectivamente. Se eliminaron 71 nucleótidos del extremo N-terminal y se volvió a realizar el análisis (Tabla 3).

TGGGCGCGGCGGCCATGAAGTGGCTTGACAAGCATAATCTTGTCTGATTGGTCTATTTTCATACCCCCT
TCGGGGAAATAGATGTGAAAACCCTTATAAAACGCGGGTT**TTCGCA**GAAACATGCGCT**AGTATCAT**TG
ATGACAACATGGACTAAGCAAAAGTCCTTGTCCCCTGACCCA**AGAAGGA**TGCTTT**ATGGCATAACA**
AGTCTGACCTCGTTTCGAAGATCGCCAGAAGTCCAACCTGACCAAGGCTCAGGCCGAGGCTGCTG
TTAACGCCTCCAGGATGTGTTTCGTGAGGCTATGAAGTCCGGCGAAGGCCTGAAGCTCACCGGCC
TGTTCTCCGCTGAGCGCGTCAAGCGCCCGGCTCGCACCGGCCGCAACCCGCGCACTGGCGAGCAG
ATTGACATTCCGGCTTCTACGGCGTTCGTATCTCCGCTGGCTCCCTGCTGAAGAAGGCCGTCACCG
AGTGACTTCTGCTCGTAGCGATTACTTCGAGCATTACTGACGACAAAGACCCCGACCGAGATGGTCGG
GGTCTTTTGTGTGGTGTGACGTGTTGTCCAACCGTATTATTCCGGACTAGTTCAGCG

Figura 7. Secuencia del gen *hup* de *B. longum* (café); promotor (negro): Shine Delgarne (rosa), Región -10 (azul), Región -35 (rojo) y terminador (verde). (Adaptado de Takeuchi et al, 2002).

Tabla 3. Resultados obtenidos del análisis del promotor HU del gen de *Bifidobacterium longum*.

```
>HU
Length of sequence-      192
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      1
Promoter Pos:      142 LDF- 5.18
-10 box at pos.      127 TAGTATCAT Score      62
-35 box at pos.      108 TTTTCG      Score      28

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at      142:
  rpoD16: CCTTATAAA at position      92 Score - 21
  rpoD16: TTATAAAA at position      94 Score - 9
  rpoD15: TTTTCGCA at position     108 Score - 6
```

De acuerdo a este resultado la función del promotor no se afecta si se eliminan los 71 nucleótidos del N-terminal ya que se conservan las secuencias regulatorias. En la Figura 8 se muestra la secuencia del promotor la cual fue de 129 pb después del análisis realizado, se señalan cada uno de los componentes del promotor.

GGGGAAATAGATGTGAAAACCCTTATAAAAC
GCGGGTTTTCGCAGAAACATGCGCTAGTATC
ATTGATGACAACATGGACTAAGCAAAAGTGC
TTGTCCCCTGACCCAAGAAGGATGCTTTGTC
GACCC

Figura 8. Secuencia del promotor HU; las regiones Shine Delgarne, -10, y -35, se indican en azul, rojo y rosa respectivamente.

4.1.2 Péptido señal

Considerando la “gran maquinaria” que presentan las bacterias Gram-positivas para la secreción de proteínas, se decidió incluir un péptido señal para exportar la proteína de interés al medio extracelular. De acuerdo al análisis computacional del genoma completo de *Bifidobacterium longum*, alrededor de 200 proteínas son exportadas al medio extracelular por la vía de secreción general Sec (Schell *et al*, 2002). Se ha reportado para otras bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* que existen diversas vías para el transporte de proteínas (Figura 9) (Revisado en Tjalsma *et al*, 2000), por lo que en *Bifidobacterium* podrían encontrarse varias de ellas, sin embargo hasta ahora solamente se ha reportado la vía Sec. En el caso de *Bifidobacterium* no existe mucha información al respecto, lo poco que se conoce hasta ahora nos indica que algunos de los péptidos que se han identificado podrían actuar por la vía TAT debido a que presentan un motivo Arginina-Arginina (RR) en la región N del péptido, este tipo de péptidos también pueden ser reconocidos por peptidasas de tipo 1 que son las responsables de reconocer el sitio de corte en el péptido señal para liberar la proteína al medio extracelular (Tjalsma *et al*, 2000), sin embargo hasta ahora se cree que actúan por la vía de secreción general Sec debido a que no se han identificado proteínas que sugieran la existencia de una vía TAT. Se han reportado otros péptidos identificados como Tmp (proteína transmembrana) los cuales mantienen la proteína anclada a la pared celular, este tipo de péptidos encontrados en *Bifidobacterium spp* son en promedio más grandes que los encontrados en otras bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (MacConaill *et al*, 2003).

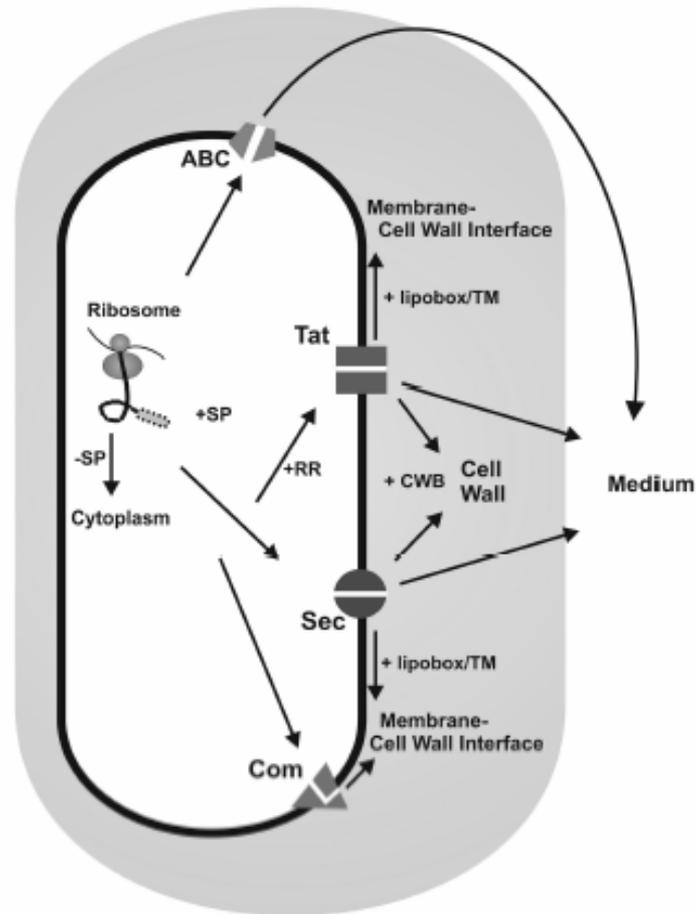
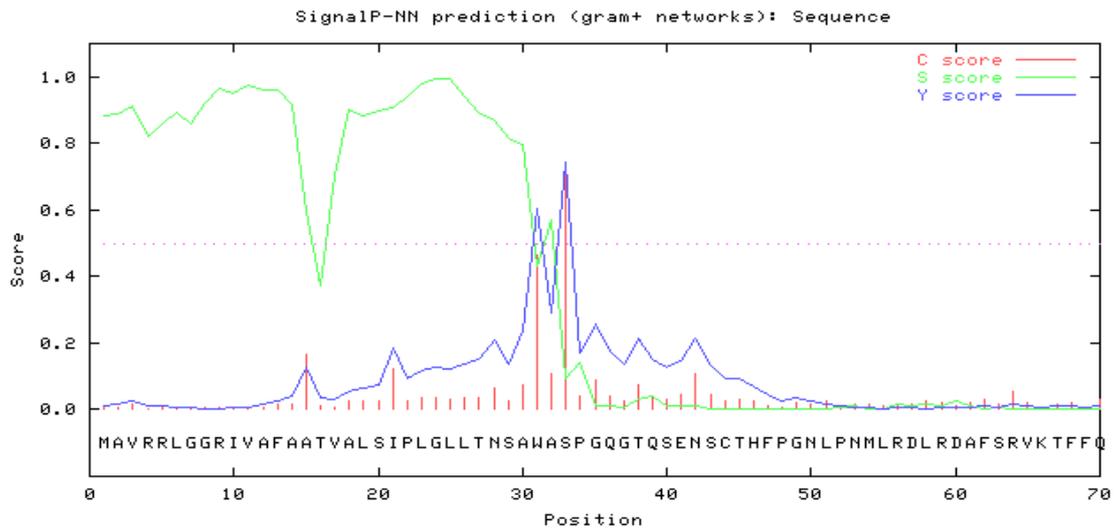


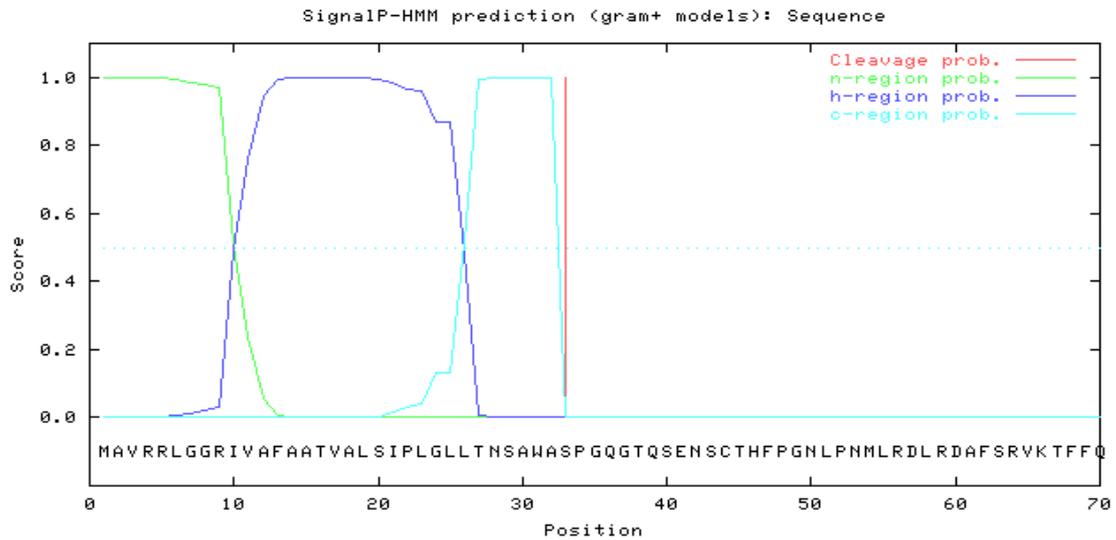
Figura 9. Principales vías de transporte de proteínas en la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*. Las proteínas sintetizadas ribosomalmente pueden ser dirigidas a varios destinos dependiendo de la presencia o ausencia de un péptido señal en su extremo N-terminal. Las proteínas que no tienen un péptido señal, permanecen en el citoplasma. Las proteínas que son retenidas en la región extra-citoplásmica de la membrana pueden presentar un segmento transmembranal o una modificación lipídica, estas proteínas pueden ser exportadas por vía Sec o por vía TAT.

El péptido BIF3 utilizado en este trabajo fue previamente identificado y caracterizado en una β -galactosidasa secretada por *Bifidobacterium bifidum* cepa DSM20215, su tamaño es de 32 aminoácidos, cuya secuencia es: MAVRRLGGRIVAF AATVALSIPLGLLTNSAWA, y se encuentra en la base de datos del GenBank con el número de referencia BIF3, Acceso No. AJ224435 (Moller *et al*, 2001). La secuencia del péptido se fusionó a la de la proteína humana hIL-10 y se analizó con el software SignalP 3.0 Server para la predicción de péptidos señal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). El resultado del análisis se muestra en la Figura 10. Con este análisis se identificaron las regiones N, H y C de un péptido señal clásico, en la región C se encuentra el motivo Alanina-Triptófano-Alanina-Serina (AWA-S), las peptidasas de tipo 1 reconocen motivos AxA como sitios de corte, en este análisis el sitio de corte se reconoció en la posición 32-33 entre Alanina y Serina (A-S). Por lo tanto, la probabilidad de que este péptido sea eficiente para el transporte de proteínas, es de 1.00 lo cual indica que potencialmente puede ser un péptido señal.



Measure	Position	Value	Cutoff	Signal peptide?
Max. C	33	0.703	0.52	YES
Max. Y	33	0.742	0.32	YES
Max. S	24	0.994	0.97	YES
mean S	1-32	0.852	0.51	YES
D	1-32	0.797	0.45	YES

Most likely cleavage site between pos. 32 and 33: AWA-SP



➤ Sequence

Prediction: Signal peptide

Signal peptide probability: 1.000

Max cleavage site probability: 0.999 between pos 32 and 33

Figura 10. Análisis del péptido líder fusionado a la secuencia de IL-10 para predecir la probabilidad de que el péptido siga siendo reconocido como péptido líder. El análisis muestra que se reconoce la posición entre 32-33 como sitio de corte, esto es entre Alanina-Serina (A-S).

4.1.3 Optimización del gen IL-10 de humano

Un aminoácido puede estar codificado por diferentes codones, y los organismos tienen preferencia por uno u otro codón. Para potenciar el nivel de expresión de una proteína heteróloga en un sistema de expresión específico (bacterias, levaduras, células de insecto o células de mamífero), es recomendable ajustar la frecuencia de codones de acuerdo a la preferencia del huésped de expresión. El gen IL-10 humano se optimizó en paralelo para su expresión en *Bifidobacterium longum* y en *Escherichia coli* (Entelechon company, Resengburg, Alemania). Se realizó un alineamiento a nivel de nucleótidos para determinar la homología entre los genes nativo y sintético utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), la identidad entre ambos genes fue del 82 % (Figura 11). La Tabla 4 muestra una comparación del uso de codón entre los genes nativo y sintético.

4.1.4 Diseño del cassette de expresión

El cassette de expresión se construyó utilizando las secuencias ya mencionadas, el promotor se fusionó al péptido señal y se incluyeron los sitios de restricción *Sal I* y *Nco I* entre estas dos secuencias, al péptido se fusionó la secuencia optimizada del gen de interleucina-10 humana, el codón de inicio ATG, se encuentra en el péptido señal y el codón de paro TGA al final de la secuencia del gen hIL-10, posteriormente se encuentra el terminador de la transcripción entre el gen IL-10 y el terminador se incluyeron los sitios de corte *Sph I* y *Sma I*. Entre el péptido líder y el gen hIL-10 se encuentra el sitio de corte *Eco 47III*. La secuencia completa tiene un tamaño de 796 pb (Figura 12).

TABLA 4. Comparación del uso de codón entre los genes nativo y sintético de hIL-10.

Aminoácido	Gen nativo	Gen sintético
Ala (A)	gca	0
	gcc	4
	gcg	4
	gcu	0
Arg (R)	aga	1
	agg	2
	cga	4
	cgc	1
	cgg	1
	cgu	0
Asn (N)	aac	10
	aau	2
Asp (D)	gac	5
	gau	3
Cys (C)	ugc	2
	ugu	2
Gln (Q)	caa	5
	cag	5
Glu (E)	gaa	2
	gag	11
Gly (G)	gga	0
	ggc	4
	ggg	1
	ggu	2
His (H)	cac	1
	cau	2
Ile (I)	aua	2
	auc	5
	auu	0
Leu (L)	cua	1
	cuc	3
	cug	8
	cuu	2
	uua	1
	uug	4

Aminoácido	Gen nativo	Gen sintético
Lys (K)	aaa	2
	aag	11
Met (M)	aug	7
Phe (F)	uuc	4
	uuu	6
Pro (P)	cca	3
	ccc	2
	ccg	0
	ccu	1
Ser (S)	agc	4
	agu	1
	uca	0
	ucc	2
	ucg	0
Ter	uga	1
	uau	2
Thr (T)	aca	1
	acc	3
	acu	1
	uac	0
Trp (W)	ugg	0
Tyr (Y)	uac	0
	uau	5
Val (V)	gua	0
	guc	1
	gug	4
	guu	0

1. Gen nativo AGCCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCT 60
2. Gen sintético TCGCCGGGCCAGGGCACGCAGAGCGAAAACAGCTGCACCCACTTCCCAGGCAACCTGCCT 60
** ***** **

1. Gen nativo AACATGCTGCGCGACCTGCGCGATGCCTTCAGCCGCGTGAAGACCTTCTCCAGATGAAG 120
2. Gen sintético AACATGCTGCGCGACCTGCGCGATGCCTTCAGCCGCGTGAAGACCTTCTCCAGATGAAG 120
***** ** ** ** ***** * ***** **

1. Gen nativo GATCAGCTGGACAACCTGTTG TTAAGGAGTCCCTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCTG 180
2. Gen sintético GACCAGCTGGACAACCTGCTGCTGAAGGAGTCCCTGCTGGAAGATTTCAAGGGCTACCTG 180
** ***** ** * * ***** ***** ** ** *****

1. Gen nativo GGTGCCAAGC CTTGTCT GAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCT 240
2. Gen sintético GGCTGCCAGGCGCTGAGCGAGATGATCCAGTTCTACCTGGAAGAGGTGATGCCCGAGGC 240
** ***** ** ** ***** ***** ***** ** **

1. Gen nativo GAGAACCAAGACCCAGACATCAAGGCGCATGTGAACTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACC 300
2. Gen sintético GAAAACCAGGACCCGGATATCAAGGCGCACGTGAACAGCCTGGCGAAAACCTGAAGACC 300
** ***** ** ***** ***** ***** ** *****

1. Gen nativo CTCAGGCTGAGGCTACGGCGCTGTCATCGATTT CTTCCCTGTGAA AACAGAGCAAGGCC 360
2. Gen sintético CTGCGCCTGCGCCTGCGCCGCTGCCATCGCTTCTGCCGTGCGAGAACAAAAGCAAGCC 360
** * ** * ** ** ***** ***** ** ** ** ** ** ***** ***** **

1. Gen nativo GTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCT CCAAGAGAAGGCATCTACAAAGCCATG 420
2. Gen sintético GTCGAACAGGTGAAGAACGCCTTCAACAAGCTGCAGGAGAAAGGCATCTATAAAGCCATG 420
** ** ***** ***** ** ***** ** ***** ***** *****

1. Gen nativo AGTGAGTTTGACAT CT TCATCAACTACA TAGAAGC CTACATGACAATGAAGATACGAAAC 480
2. Gen sintético AGCGAGTTGACAT CT TCATCAACTACA TCGAGGCGTACATGACCATGAAAATCCGCAAC 480
** ***** ***** ***** ** ** ***** ***** ** ** **

1. Gen nativo TGA 483
2. Gen sintético TGA 483

Figura 11. Alineamiento de los genes nativo y sintético de IL-10 humana.

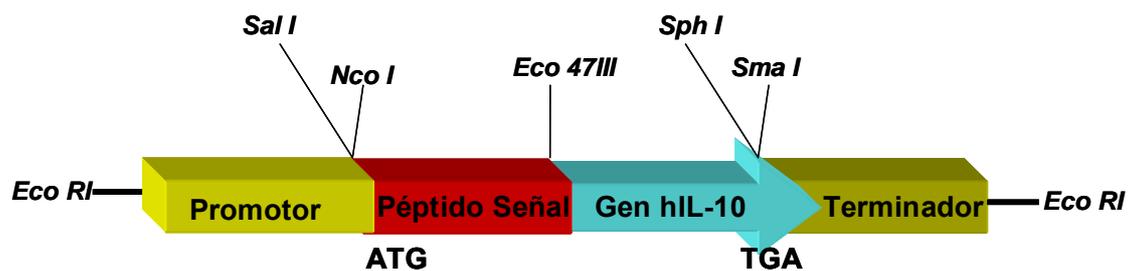


Figura 12. Cassette de expresión diseñado para la expresión del gen sintético de interleucina-10 humana. El codón de inicio ATG se encuentra al inicio de la secuencia del péptido señal, el codón de término está al final del gen hIL-10.

4.2 Construcción del vector de expresión

El vector pDG7 (7.2 Kb) presenta los sitios de clonación, *Eco RI*, *Cla I*, y *Hind III*, el cassette de expresión clonado en PCR4 se digirió con *Eco RI* y se clonó en el sitio *Eco RI* de pDG7. El nuevo vector de expresión presentó un tamaño de 8.0 kb y se nombró pLR (Figura 13).

Con pLR se transformó *E. coli* TOP10 por choque térmico, se plaqueó sobre agar LB con ampicilina ($100\mu\text{g ml}^{-1}$), antibiótico para selección de transformantes, se recuperaron 7 clonas en las cuales se confirmó la presencia del cassette de expresión por PCR. Los oligonucleótidos diseñados para

amplificar fueron: Forward 5'-GGGGAAATAGATGTGAAAAC-3' y Reverse 5'-CCCGGGCATGCTCAGTTGCGG-3', los cuales amplificaron un fragmento de 719 pb, el producto de la amplificación comprende el promotor, el péptido señal y el gen IL-10 (Figura 14).

Se seleccionaron las clonas positivas al PCR y la construcción se verificó purificando el plásmido que posteriormente fue digerido con la enzima de restricción *Eco RI* liberando un fragmento de 800 pb (Figura 15A). También se realizó una doble digestión con *Hind III* y *Sma I* (Enzima externa e interna al cassette de expresión respectivamente) para elucidar el sentido en el que se clonó el cassette de expresión. La Figura 15B muestra que se obtuvieron construcciones con el cassette insertado en ambos sentidos; estas construcciones fueron identificadas como pLR1 y pLR2 tomando como referencia la orientación del promotor del gen *bla*. Las estructuras moleculares de pLR1 y pLR2 se muestran en la Figura 16.

La funcionalidad del promotor se comprobó al realizar un ensayo de expresión en la misma bacteria que se utilizó como huésped de propagación, *E. coli* TOP10. La presencia de hIL-10 se mostró realizando un Western blot de los extractos celulares. En la Figura 17 se observan dos bandas, una de ellas corresponde al tamaño de la hIL-10 sin el péptido señal (proteína madura o procesada) y la otra corresponde al de hIL-10 fusionada al péptido señal (proteína inmadura o no procesada). Este resultado sugiere que el vector es funcional en *E. coli* y que el péptido señal es reconocido por el sistema de secreción de *Escherichia coli*. Se realizó un estudio más detallado sobre la funcionalidad de pLR1 y pLR2 en *E. coli*, esto se discutirá en el capítulo 4.

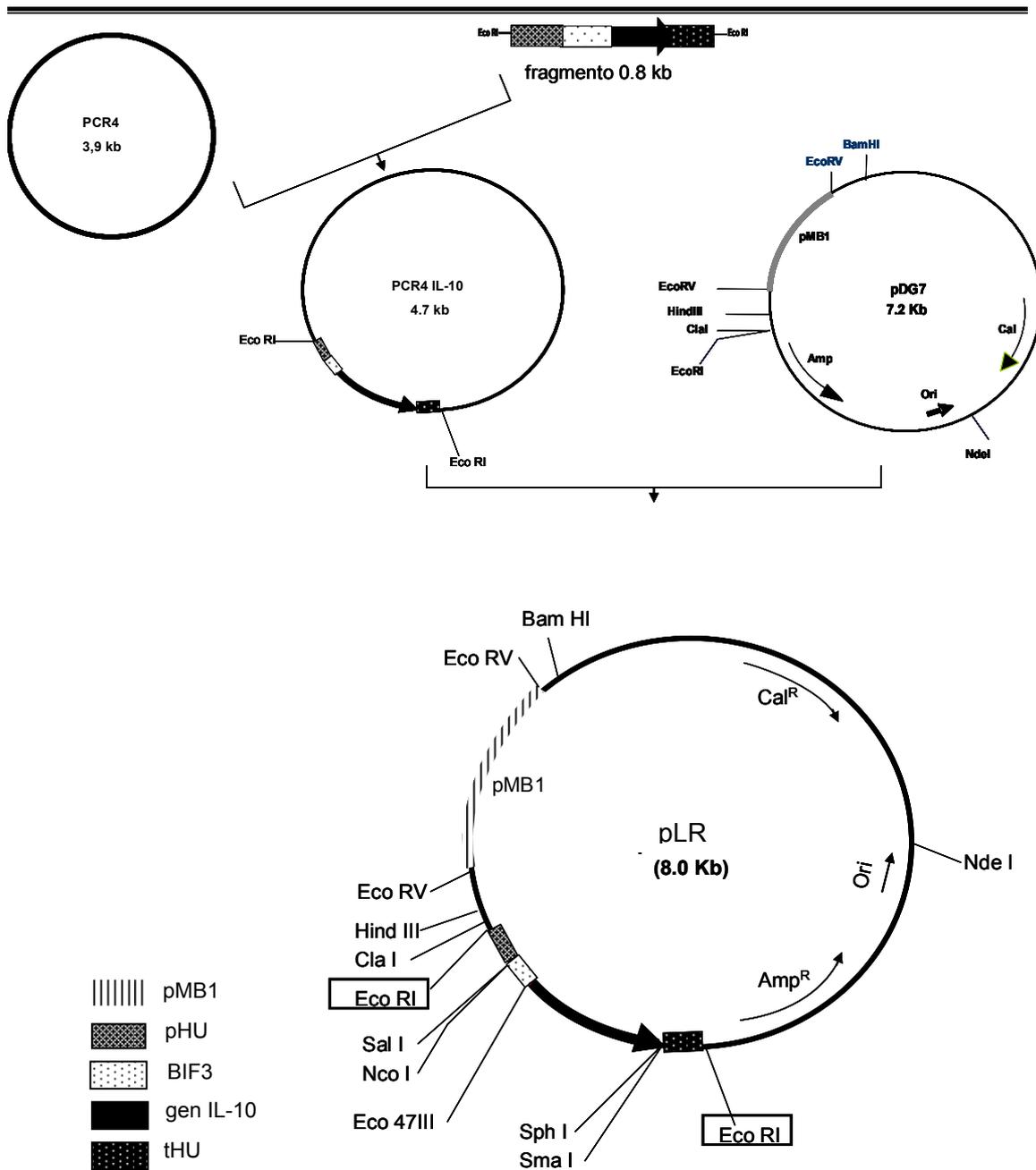


Figura 13. Proceso para la construcción del vector de expresión pLR-hIL10. pMB1 es el replicón para *Bifidobacterium*; pHU, promotor; BIF 3, péptido señal; tHU, terminador de la transcripción.

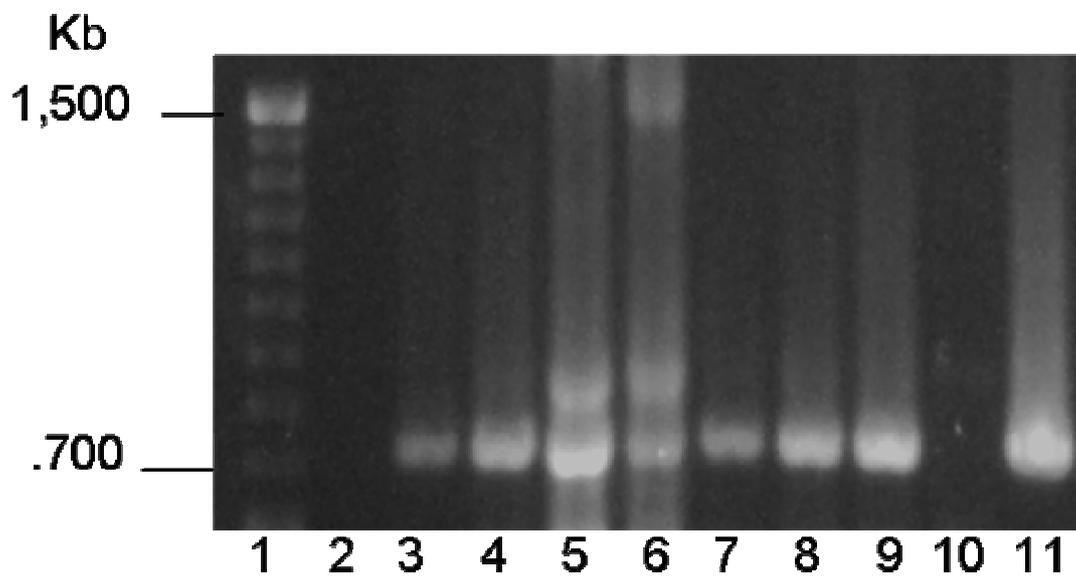
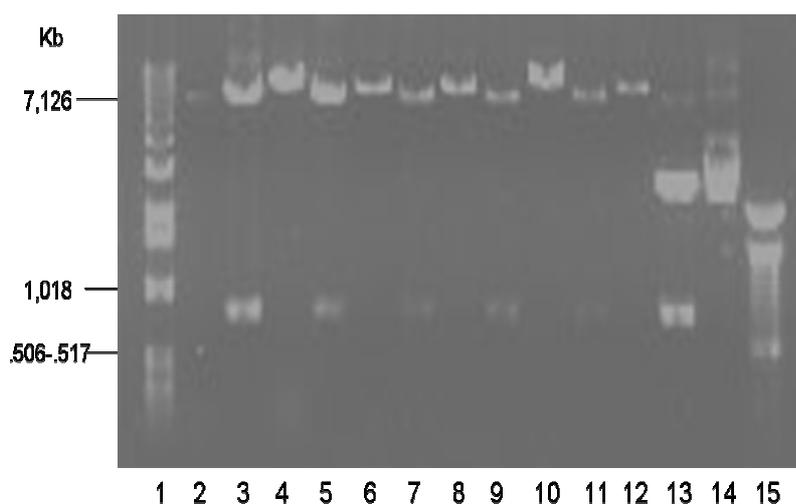


FIGURA 14. Productos de la amplificación por PCR del ADN de diferentes clones de *E. coli* TOP10 transformadas con la ligación pLR-hIL10. Carril 1; MPM 1 Kb, Carriles 2-9; clones de *E. coli* TOP10, Carril 10; Control negativo, Carril 11; Control positivo.

A)



B)

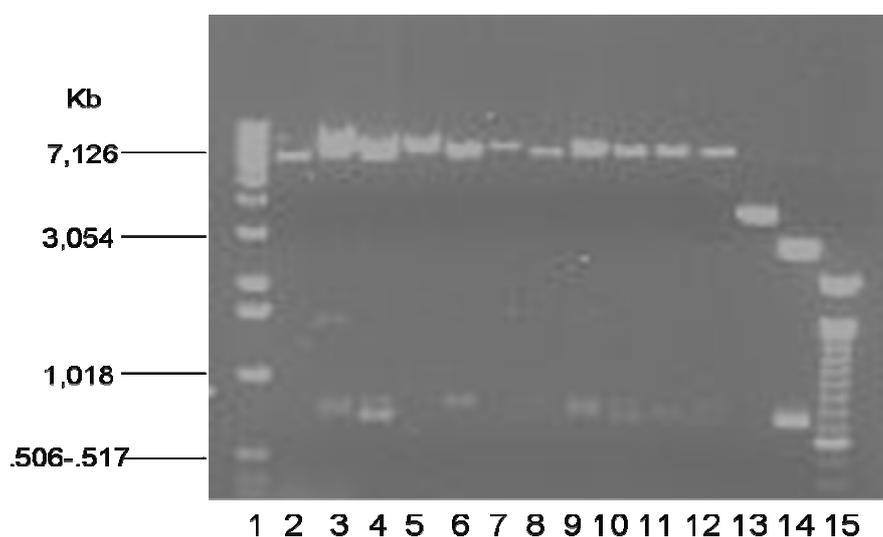


FIGURA 15. Digestión de las construcciones obtenidas de diferentes clonas para comprobar la presencia del cassette de expresión. **A)** Digestión con *EcoRI* (Libera el cassette de expresión de 800 pb) y digestión con *HindIII* (lineariza la construcción 8kb). **B)** Digestiones con *HindIII* y *SmaI* para verificar el sentido del cassette de expresión. Carril 1; MPM 1Kb, Carril 2, Vector pDG7 linearizado, Carriles 3 y 4; construcción 1, Carriles 5 y 6; construcción 2, Carriles 7 y 8; construcción 3, Carriles 9 y 10; construcción 4, Carriles 11 y 12, construcción 5, Carriles 13 y 14, construcción 6, Carril 15; MPM 100 pb.

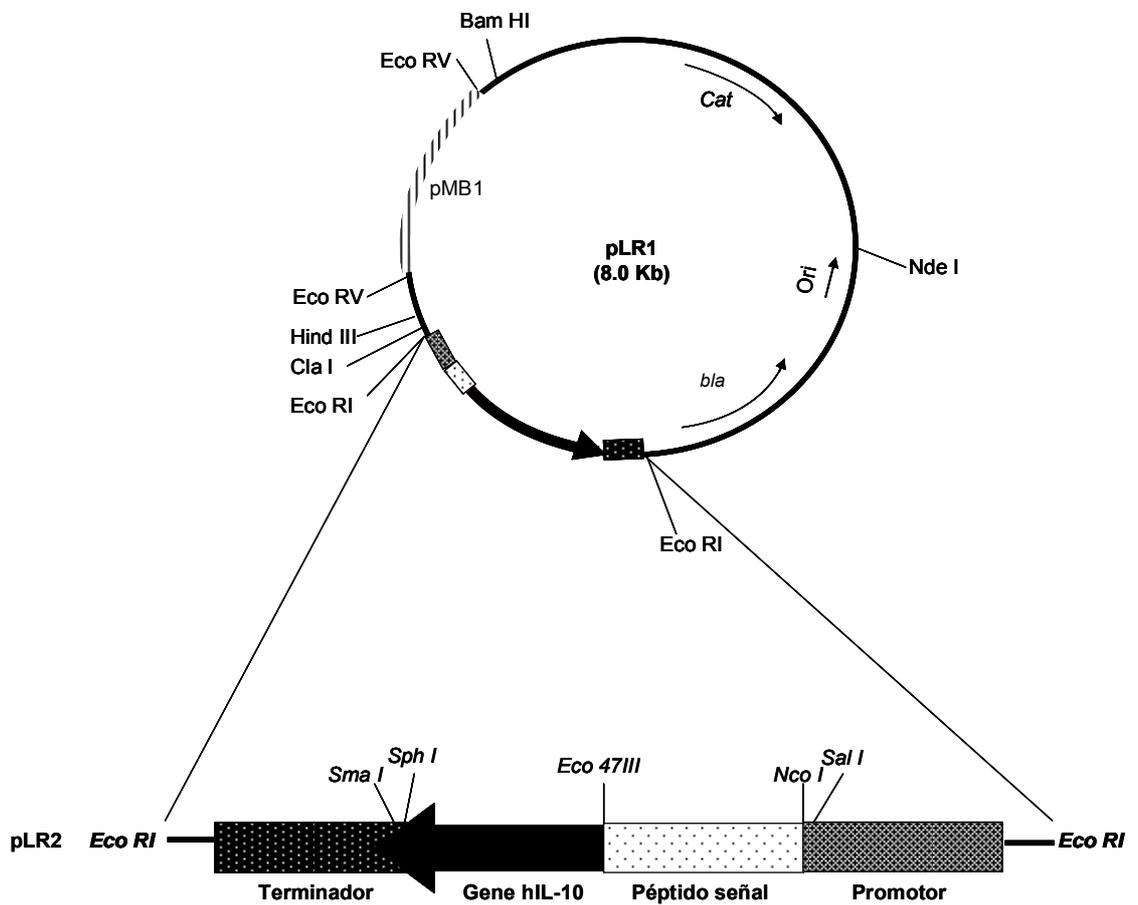


Figura 16. Orientación del cassette de expresión en las dos construcciones obtenidas, pLR1 (cassette orientado en el mismo sentido) y pLR2 (orientación en sentido contrario), con respecto al promotor del gen *bla*.

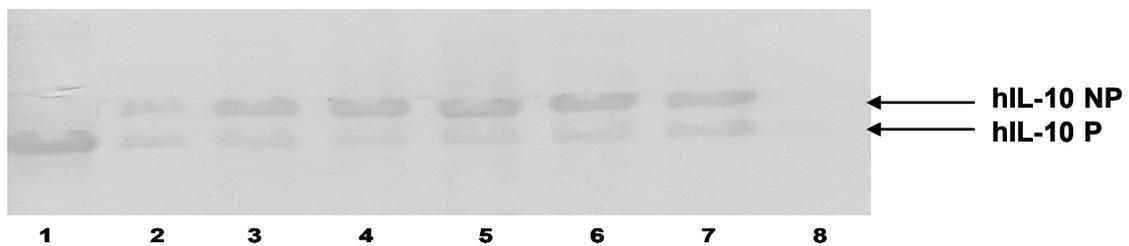


Figura 17. Análisis de Western blot de extractos celulares de las clonas de *E. coli* TOP10 obtenidas de la transformación con pLR1 y pLR2. Carril 1; Standard comercial de IL-10 (Pre-protech), Carriles 2-5; Extractos celulares de *E. coli* TOP 10 transformadas con pLR1, Carriles 6-7; Extractos celulares de *E. coli* TOP 10 transformadas con pLR2, Carril 8; Extractos celulares de *E. coli* TOP 10 sin transformar. hIL-10 NP (Proteína no procesada), hIL10 P (Proteína procesada).

CAPITULO 3

EXPRESIÓN DE INTERLEUCINA-10 HUMANA (HIL-10) EN *Bifidobacterium longum* ATCC15707

I. INTRODUCCIÓN

Algunas cepas de *Bifidobacterium* son ampliamente utilizadas en la preparación de leches fermentadas en varios países. Para explotar el potencial de estos microorganismos se requiere el conocimiento detallado de varios procesos biológicos básicos, como son el metabolismo celular, la expresión génica y la secreción de proteínas entre otros. Sin embargo, fue hasta la década de los 90's que los estudios a nivel molecular dieron inicio. Al mismo tiempo se empezaron a plantear protocolos de transformación y se inició con la construcción de vectores de clonación. En cuanto a transformación, la técnica de electroporación funciona bien para la transformación genética de cepas bacterianas de varios géneros pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas como; *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* (Hatlander, 1987; Chassy, 1987; Luchansky, 1988; Holo, 1989; Cruz, 1990; Posno, 1991), corynebacteria y brevibacteria (Chassy, 1998; Bonnassie, 1990), sin embargo en cepas de *Bifidobacterium* la eficiencia de transformación es baja, se ha logrado la transformación de *Bifidobacterium*, pero los protocolos utilizados no son reproducibles (Argnani *et al*, 1996). Recientemente se ha logrado la expresión de proteínas heterólogas como son; Pediocina PA-1 (Moon *et al*, 2005), glutamato descarboxilasa (Park *et al*, 2005), citosina deaminasa (Yi *et al*, 2005), y α -amilasa (Rhim *et al*, 2006) utilizando esta técnica.

II. OBJETIVO

El objetivo en este trabajo fue transformar *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 con la construcción pLR para expresar interleucina-10 humana recombinante.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Plásmidos, cepas y medios de cultivo

Se utilizó el plásmido pLR como plásmido de expresión. La cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 se utilizó como huésped de expresión. El medio de cultivo empleado fue MRS (de Man Rogosa and Sharpe) (Difco, Sparks, MD, USA) suplementado con L-cisteína 0.05% (p/v) (Sigma Aldrich, St Louis MO, USA) y cloranfenicol ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) como marcador de selección.

3.2 Transformación de *Bifidobacterium longum* ATCC15707

La construcción pLR que contiene el gen sintético de hIL-10 fusionado al péptido líder BIF3 se utilizó para transformar la cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 utilizando la técnica de electroporación y aplicando el protocolo previamente reportado por Argnani *et al*, (1998). El protocolo fue modificado como se describe a continuación; *B. longum* ATCC 15707 se inoculó en 5 ml de medio MRS con 0.05% (p/v) de cisteína (MRSC) y se incubó toda la noche a 37°C en una jarra de anaerobiosis con sistema generador de CO_2 (BBL GasPak Plus, BD, Cockesville, USA), el cultivo se diluyó 1:25 en medio nuevo y se incubó a 37°C aproximadamente por 3 horas hasta alcanzar una DO_{600} de 0.2-0.4. El cultivo se centrifugó 8,000 rpm por 15 minutos a 4°C en una Centrifuga Sorvall Modelo Super T21 (Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, USA) se descartó el sobrenadante y el paquete celular se lavó dos veces con amortiguador de sacarosa 0.5 M a 4°C , las células se resuspendieron en 1/320 del volumen original del cultivo en amortiguador de sacarosa 0.5 M. En la cuveta de electroporación previamente enfriada se mezclaron $80 \mu\text{L}$ de la

suspensión bacteriana con 0.5-1.5 μg del plásmido, la mezcla se incubó en hielo por 5 minutos y se realizó la electroporación en un electroporador BTX ECM 830 (San Francisco, CA, USA) aplicando los siguientes parámetros; 2.0 KV, 200 Ω , 25 μF y de 3-4 ms, inmediatamente después de electroporar se agregaron 800 μl de MRSC y se incubó a 37°C por 3 horas para recuperar las células, posteriormente se inoculó en placas de agar MRSC con cloranfenicol (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y las placas se incubaron de 3-4 días a 37°C en jarra de anaerobiosis (BBL GasPak Plus, BD, Cockesville, USA).

3.3 Comprobación de la presencia de pLR en *Bifidobacterium longum* ATCC 15707

Las células transformadas de *B. longum* se inocularon en medio MRSC líquido con cloranfenicol, se incubaron de 24-48 h a 37°C en anaerobiosis y se realizó extracción de ADN plasmídico siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial (Qiagen, Hilden, Alemania), con una modificación la cual consistió en la adición de lisozima (30 mg ml^{-1}) al amortiguador de resuspensión e incubando a 37°C por 1 hora, después de incubar se continuó con el protocolo de la casa comercial. Con el ADN extraído se realizó una amplificación por PCR con las siguientes condiciones: amortiguador de PCR 1X con 2.5 mM MgCl_2 ; 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ADN como templado, 0.3 mM de cada oligonucleótido (Forward; 5'-GGGGAAATAGATGTGAAAAC-3' y Reverse; 5'-CCCGGGCATGCTCAGTTGCGG-3'); 0.25 mM de cada dNTP; y 2.5 U ml^{-1} de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Modelo 2400 Gene Amplification (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Se analizaron 5 μl de la reacción de amplificación en geles de

agarosa al 0.8% teñidos con una solución de bromuro de etidio (0.8 mg ml^{-1}) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). La captura de las imágenes se realizó con un digitalizador GelDoc (Bio-Rad, Cal, USA).

3.4 Ensayos de expresión de hIL-10

3.4.1 Preparación de muestras. De un cultivo de toda la noche de *B. longum* ATCC 15707 transformada se inocularon 20 ml de medio MRSC con cloranfenicol ($10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$), el medio se ajustó a pH 8 con amortiguador de carbonatos 50 mM. El cultivo se incubó durante 8 horas a 37°C en anaerobiosis (BBL GasPak Plus, BD, Cockesville, USA). Células y medio se separaron por centrifugación, las células se resuspendieron en amortiguador de lisis (EDTA 1M, Na_2HPO_4 50 mM, Glicerol 5%, pH 7.4) y se lisaron con perlas de vidrio 30 segundos vortex/30 segundos hielo (se realizaron 8 ciclos). En un tubo eppendorf se mezclaron 10 μl de las células lisadas y 10 μl de Laemmli, se cargaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), para posteriormente teñir con azul de Coomasie (USB Corporation, Cleveland USA) o con sypro ruby (Bio-Rad, Cal, USA). Las proteínas presentes en medio de cultivo se extrajeron con 0.5 volúmenes de fenol y se precipitaron con 3 volúmenes de metanol incubando por 2 horas a -20°C , se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y el precipitado se dejó secar, posteriormente se resuspendió en 10 μl de Laemmli. Con las muestras anteriores se cargó un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) el cual se tiñó con azul de Coomasie o sypro-ruby (Bio-Rad, Cal, USA).

3.4.2 Identificación de hIL-10 por Análisis de Western blot. El gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, la transferencia se realizó en el trans-blot SD (Bio-Rad, Cal, USA) a 10V/40 min. Después de la transferencia la

membrana se lavó dos veces con buffer TBS (Tris 200 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5), y después la membrana se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en la solución de bloqueo (leche al 4% en TTBS (Tris 200 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5, tween 0.1%), se realizaron dos lavados con TTBS y la membrana se incubó por 1 hora con el anticuerpo primario anti conejo hIL-10 (Prepro Tech, México) diluído 1:1000, se realizaron dos lavados con TTBS y se incubó otra hora con el anticuerpo secundario, anti conejo IgG acoplado a la fosfatasa alcalina (Bio Rad, Cal, USA) diluído 1:2000. La actividad enzimática se reveló con el sustrato NBT/BCIP (p-Nitro Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt) (Amersham, Bioscience, Pittsburgh, USA).

3.4.3. Cuantificación de hIL-10 por ELISA. Se utilizó un kit comercial para la cuantificación de hIL-10 por ELISA (e-Bioscience, San Diego CA, USA). Se añadieron 100 µl de muestra a cada pozo de una microplaca y se incubó toda la noche a 4°C. Después de 5 lavados con solución de lavado se agregaron 100 µl del anticuerpo de detección (Anti IL-10 humana conjugado a biotina). La placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente y se realizaron 5 lavados nuevamente con la solución de lavado. Se añadieron 100 µl de avidina conjugada a peroxidasa y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Después de 7 lavados se añadieron 100 µl del sustrato TMB (Tetrametilbencidina) y se incubó durante 15 minutos, se desarrolló un color azul de diferente intensidad, la reacción de color se detuvo añadiendo 50 µl de la solución de paro, cambiando el color de azul a amarillo. La microplaca se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplaca Modelo 550 (Bio-Rad, Cal, USA).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos aminoácidos son codificados por diferentes codones y cada microorganismo tiene preferencia por uno u otro, este es un aspecto que se debe considerar para el diseño de genes sintéticos. El gen de interleucina 10 humana se optimizó en paralelo para su expresión en *Bifidobacterium longum* y en *Escherichia coli*. La comparación a nivel de nucleótidos de la secuencia optimizada (gen sintético) y la del gen nativo presentó una identidad del 82%. Hasta ahora *Bifidobacterium* se ha utilizado como probiótico de administración oral; sin embargo, ya se han realizado estudios en los cuales se utilizó como vehículo para dirigir pro-drogas hacia superficies tumorales causando la muerte del tumor o inhibiendo su crecimiento (Theys *et al*, 2003) y en los últimos años se propuso como sistema de expresión de proteínas heterólogas (Park *et al*, 2005; Moon *et al*, 2005). Sin embargo, hasta ahora no existen reportes de expresión de genes humanos en esta bacteria. Previamente se construyeron los vectores pLR1 y pLR2 (Capítulo 2) que contienen el gen sintético de la interleucina-10 humana y cuya diferencia entre ambos es el sentido de orientación de este gen con respecto al gen *bla*. Una cepa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 se transformó por electroporación con pLR1 y pLR2. Se obtuvieron 5 clonas con pLR1 de las cuales en dos se confirmó por PCR la presencia del gen hIL-10, el producto amplificado comprende el promotor HU, el péptido señal y el gen hIL-10, por lo que los productos de la amplificación fueron de 719 pb (Figura 18).

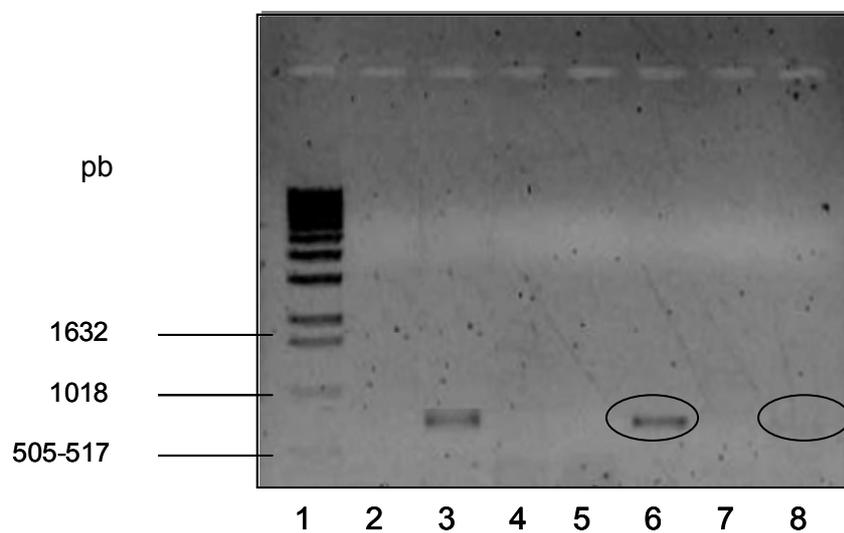


Figura 18. Productos de la amplificación por PCR de las 5 clonas de *Bifidobacterium longum* obtenidas por la transformación con pLR1. Línea 1; MPM 1 kb, Línea 2; Control negativo, Línea 3; Control positivo, Líneas 4-8; clonas de *B. longum*.

Se realizaron ensayos de expresión de hIL-10 a nivel de matraz. La interleucina-10 es una proteína que a un pH inferior a 5.5 pierde su actividad. *Bifidobacterium longum* acidifica el medio de crecimiento disminuyendo el pH hasta 4.0, por lo tanto para los ensayos de expresión se utilizó medio de cultivo con amortiguador de carbonatos que nos permitió ajustar y mantener un pH de 8.0. *B. longum* se creció en este medio durante 8 horas y posteriormente se evaluó la presencia y cantidad de hIL-10 por Western blot y por ELISA en extractos celulares y en medio de cultivo. Se detectó hIL-10 por Western blot en los extractos celulares (Figura 19). La cantidad que se cuantificó por ELISA en extractos celulares fue de 22 pg ml⁻¹ (Figura 20). En el medio de cultivo no se detectó hIL-10 por ninguno de los dos ensayos, al parecer si la proteína sale al medio de cultivo es degradada por algún o algunos productos metabólicos de la bacteria o por proteasas debido a que *B. longum* produce varias que aún no se han caracterizado (Schell *et al*, 2002). También podría ser que la proteína no sale al medio de cultivo, sino que permanece anclada a la membrana o a la pared celular de la bacteria. Se realizó un análisis con el paquete computacional psortb versión 2.0.4 (<http://www.psort.org/psortb/>), este paquete es utilizado para predecir la localización subcelular de algunas proteínas considerando la composición de la proteína y la presencia de péptido señal. Este análisis nos mostró que la proteína podría localizarse en varios sitios, por lo cual es concebible la idea de que la proteína podría permanecer anclada a la membrana citoplásmica y por lo tanto no se detectó en el medio de cultivo pero si en el extracto celular. Las investigaciones que se están realizando actualmente para el conocimiento de *Bifidobacterium* avanzan lentamente, si bien ya se conoce el genoma completo de *B. longum* (Schell *et al*, 2002) solo

se conoce aproximadamente el 50% de las proteínas que produce. A medida que el conocimiento avance en cuanto a metabolismo, promotores, péptidos señal y condiciones de crecimiento, se obtendrán las herramientas necesarias para lograr establecer a *Bifidobacterium* como un buen sistema de expresión de proteínas heterólogas, principalmente de proteínas dirigidas a tratamientos terapéuticos de humanos.

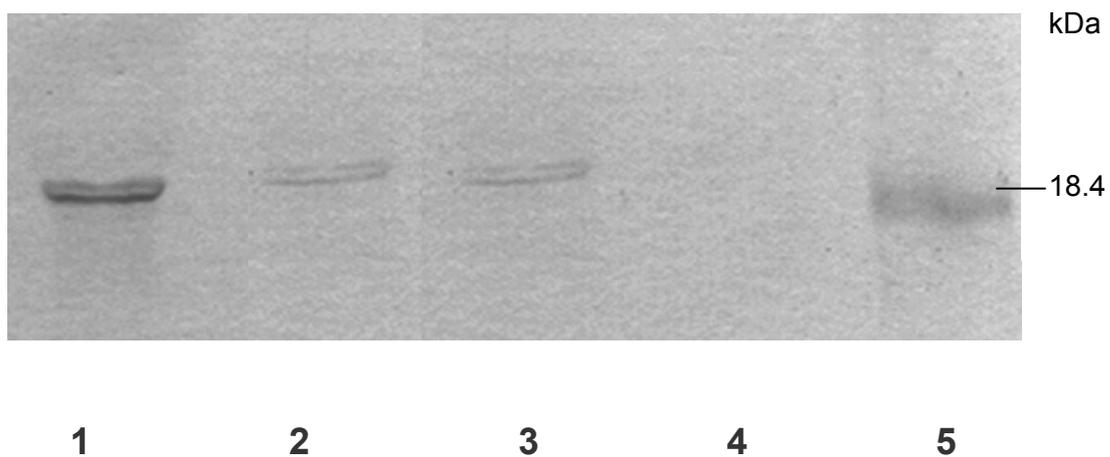


Figura 19. Western blot de células de *Bifidobacterium longum* transformadas con pLR1. Línea 1; Standard de hIL-10 comercial, Líneas 2 y 3, células de *B. longum* transformadas, Línea 4; células de *B. longum* no transformada, Línea 5; MPM.

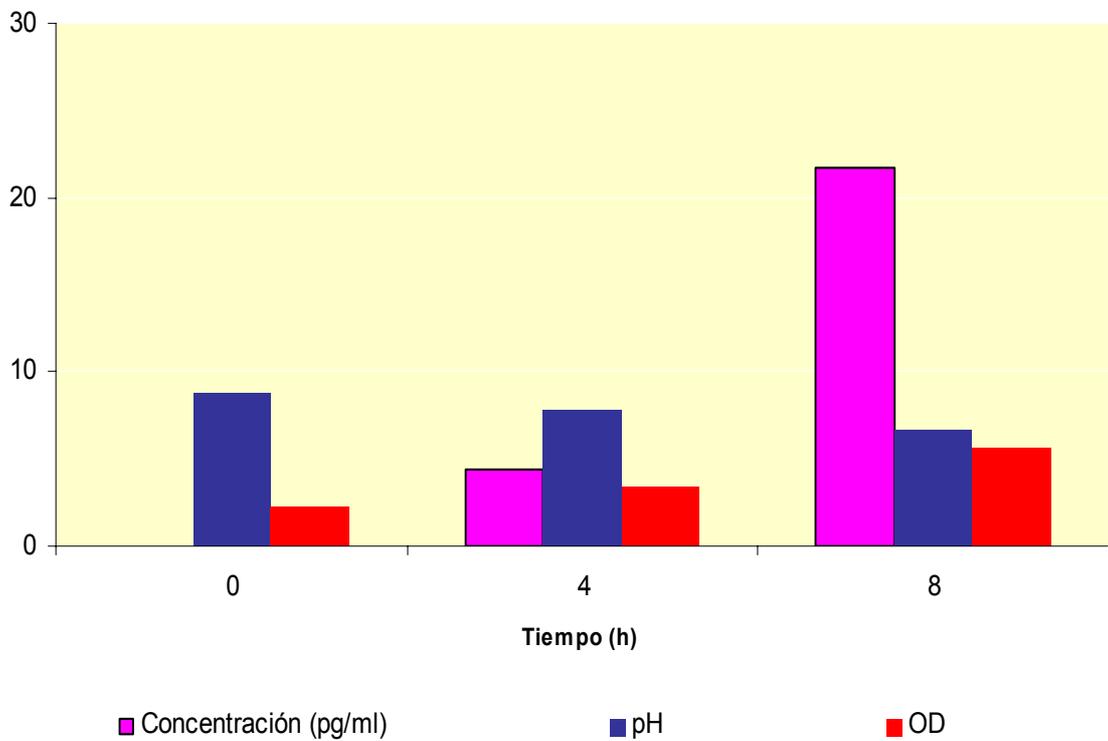


Figura 20. Cuantificación intracelular de hIL-10 por Elisa en *B. longum* transformada con el vector pLR1.

CAPITULO 4

EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE hIL-10 EN *Escherichia coli*
UTILIZANDO EL VECTOR pLR

I. INTRODUCCIÓN

Existen diversos sistemas de expresión de proteínas heterólogas; entre los que se encuentran bacterias, levaduras, hongos y células de insecto. La bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* es uno de los sistemas más atractivos para la producción de proteínas recombinantes debido a que crece rápido en sustratos económicos, se conoce bien su genética y se dispone de vectores de clonación y de diversas cepas con genotipos específicos. Sin embargo, esto no es garantía de que la proteína recombinante sea producida en grandes cantidades y en forma biológicamente activa (Baneyx, 1999). Para elegir un sistema de expresión se tienen que considerar ciertos factores como son; características de crecimiento, niveles de expresión, modificaciones postraduccionales y la actividad biológica de la proteína de interés, sin olvidar las regulaciones existentes para la producción de proteínas terapéuticas (Makrides, 1996).

La selección de un sistema de expresión en particular requiere de un bajo costo en términos de diseño de procesos. Sin embargo, a pesar del extenso conocimiento en la genética y biología molecular de *E. coli*, no todos los genes se expresan eficientemente en este organismo. Esto se debe a las características estructurales y particulares de la secuencia del gen, la estabilidad y eficiencia transcripcional del mRNA, el procesamiento de la proteína, la degradación de la proteína por proteasas de la célula huésped, diferencias en el uso de codón entre los genes nativo y foráneo y la toxicidad potencial de la proteína a la célula huésped. Por otro lado, la rápida producción de proteínas recombinantes puede ocasionar la formación de agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión (Betts and King, 1999), la

sobreproducción de la proteína puede ser suficiente para la formación de los cuerpos de inclusión. La mayoría de las proteínas heterólogas que se producen en *E. coli* son de forma intracelular, por lo que se tienen que utilizar métodos de extracción y purificación de proteínas para recuperarlas originando pérdidas de producto. Una opción para disminuir las pérdidas además de los costos de producción, es el uso de péptidos señal cuya función es dirigir la proteína de interés hacia el medio extracelular facilitando así su recuperación. Los polipéptidos destinados al exporte son sintetizados como pre-proteínas que contienen una secuencia señal amino-terminal (péptido líder) que es cortada por peptidasas durante el proceso de translocación a través de la membrana. Las secuencias señal tienen una longitud entre 18 y 30 aminoácidos y están compuestos por dos o más residuos básicos en el extremo N-terminal, un centro hidrofóbico de siete o más aminoácidos y un extremo C-terminal que presenta un motivo hidrofílico el cual es reconocido por peptidasas (*Spasas*) que realizan el corte entre el péptido líder y la proteína madura (Baneyx, 1999). Existen diferentes vías de secreción de proteínas, las más conocidas son la vía de secreción general Sec y la vía TAT (Twin Arginine Translocation).

Las subunidades que componen la maquinaria del traslocón Sec son; SecY, SecE y SecG, SecD, SecF y YajC; que forman un poro de 15 a 20 Amstrongs. Las proteínas son dirigidas hacia el traslocón Sec post-traduccionally o co-traduccionally por vía SecB o por vía SRP respectivamente. SecB es una chaperona citoplásmica que mantiene al precursor en una conformación de translocación competente e interactúa con el extremo C-terminal de otra proteína, SecA, para dirigir la pre-proteína a través de la membrana por ciclos repetidos de inserción y de inserción a través del poro SecYEG. Durante el

transporte, la proteína precursora es expuesta a ambos lados de la membrana simultáneamente en donde debe mantenerse un gradiente iónico para la síntesis de ATP, que es necesario para que el transporte a través de la maquinaria Sec sea eficiente.

El complejo SRP está conformado por una *GTPasa* de 48 kDa conocida como Fth, SRP reconoce el péptido señal de la proteína que empieza a emerger del ribosoma cuando esta se está sintetizando formando un complejo SRP-cadena naciente, SRP de este complejo se une a FtsY que es un receptor de membrana. SRP y la cadena naciente se disocian permitiendo que la cadena naciente entre al complejo SecYEG (traslocón) y posteriormente por hidrólisis de GTP se disocia el complejo SRP-FtsY, SRP se recicla y FtsY permanece unido a la membrana (Figura 21) (Driessen *et al.* 2001).

La vía TAT se encuentra en la membrana citoplásmica de muchas bacterias y la característica más relevante de esta vía es su habilidad para transportar proteínas plegadas. En estos sistemas biológicos, las proteínas están usualmente asociadas a péptidos que poseen en el extremo N-terminal una secuencia común de aminoácidos, el llamado motivo “twin-arginina” que presenta una secuencia consenso SRRxFLK (Serina-Arginina-Arginina-X-Fenilalanina-Leucina-Lisina) en donde los residuos de arginina (RR) son invariables y esenciales para la eficiencia del transporte, los péptidos de ambas vías difieren principalmente en la longitud e hidrofobicidad de la región H (Cristóbal *et al.*, 1999).

En bacterias Gram-positivas las proteínas que son exportadas por las vías Sec y TAT se acumulan en el medio de cultivo, en las bacterias Gram negativas, las proteínas que se exportan por estas dos vías se acumulan en el espacio

periplásmico, posteriormente intervienen otras vías que dan continuidad al transporte de la proteína a través de la membrana externa hacia el medio extracelular.

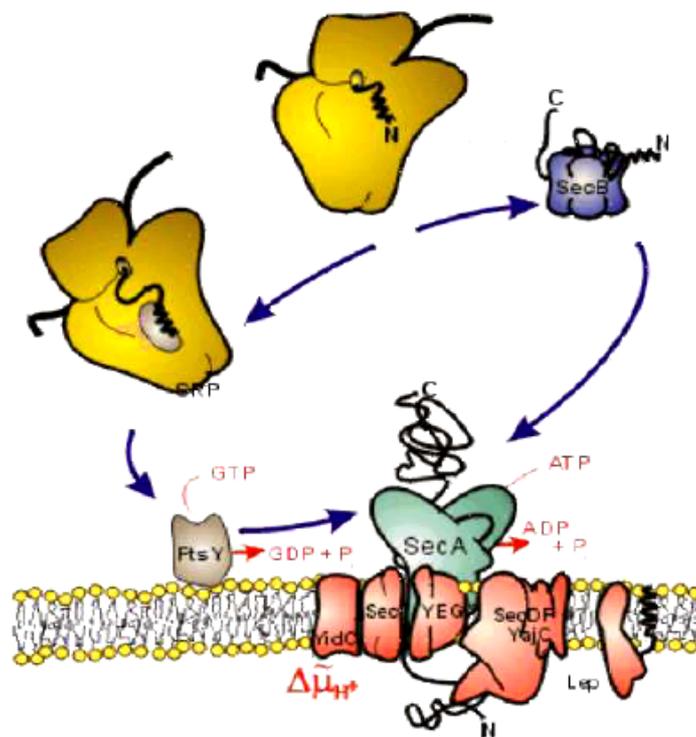


Figura 21. Modelo de las vías de translocación de proteínas en *E. coli*. Las proteínas pueden dirigirse al translocon Sec por vía SRP (co-traduccion) o por vía SecB (post-traduccion).

II. OBJETIVO

Expresar Interleucina-10 humana recombinante en *Escherichia coli* utilizando el vector de expresión pLR.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo

Se utilizaron las cepas de *E. coli* MC4100 (F^{-} araD139 Δ (argF-lac)U169 rspL150 relA1 flbB5301 fruA25 deoC1 ptsF25 e14-) y MC4100 Δ tat (F^{-} araD139 Δ (argF-lac)U169 rspL150 relA1 flbB5301 fruA25 deoC1 ptsF25 e14-) como huéspedes de expresión. Se utilizaron los plásmidos de expresión pLR1 y pLR2 que contienen el gen hIL-10 fusionado al péptido señal BIF3. El medio de cultivo utilizado fue LB con ampicilina (100 μ g ml⁻¹).

3.2 Preparación y transformación de las células competentes de *Escherichia coli* MC4100

Las cepas de *Escherichia coli* MC4100 y MC4100 Δ tat se inocularon en 3 ml de medio LB y se incubaron de 16-18 horas a 37°C con agitación. Se inocularon 25 ml de medio LB con 1 ml del cultivo anterior y se incubaron a 37°C, a 130 rpm, por aproximadamente 2 horas hasta alcanzar una DO_{600 nm} de 0.6. Cuando se alcanzó la DO deseada se prepararon las células competentes por cloruro de rubidio (RbCl) siguiendo el protocolo que a continuación se describe; el cultivo se transfirió a tubo de centrifuga estéril y se incubó en hielo durante 15 minutos, se centrifugó a 3,000 rpm a 4°C por 15 minutos en un rotor 50T, se decantó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 11 ml de solución RF1 y se incubó por 15 minutos en hielo, se centrifugó nuevamente con las condiciones ya mencionadas, se decantó y el paquete celular se resuspendió en 2.6 ml de solución RF2. Se distribuyó en tubos eppendorf en alícuotas de 200 μ l y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Se mezclaron 200 μ l de suspensión celular con 4 μ l de ADN plasmídico (pLR1 o pLR2), la mezcla se incubó de 15-30 minutos en hielo y la transformación se realizó por choque térmico, incubando 45 segundos a 42°C y 2 minutos en hielo, después del choque se agregaron 250 μ l de medio LB y se incubaron 1 hora a 37°C, 130 rpm. Se plaqueó sobre agar LB ampicilina (100 μ g ml⁻¹), incubando las placas toda la noche a 37°C para recuperar las células transformadas.

3.3 Comprobación de la presencia de pLR en las cepas de *E. coli* MC4100 y *E. coli* MC4100 Δ tat

Las colonias que crecieron en las placas se seleccionaron y amplificaron por PCR para comprobar rápidamente si se encontraban las construcciones en las cepas de *E. coli*. Las clonas positivas al PCR se inocularon en medio líquido LB con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C, con agitación a 130 rpm. Se recuperaron las células de estos cultivos y se les extrajo el ADN plasmídico por miniprep (QIAquick, Qiagen, Alemania), se realizaron ensayos de restricción con *Eco* RI para confirmar la presencia de las construcciones.

3.4 Expresión en matraz de hIL-10 en las cepas de *E. coli* MC4100 y *E. coli* MC4100 Δ tat transformadas con pLR1 y pLR2

3.4.1 Expresión de hIL-10 en Medio LB. Para la expresión de hIL-10 en medio LB se realizaron dos ensayos a diferente temperatura, 28°C y 37°C. Células transformadas de *E. coli* se inocularon en 5 ml de medio LB líquido con ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C a 130 rpm. Se inocularon 25 ml

de medio LB ampicilina con 1 ml del cultivo anterior y se incubaron a 28°C o a 37°C a 150 rpm, tomando muestras de 2 ml cada 3 horas durante 24 horas.

3.4.2 Extracción de hIL-10 de medio de cultivo. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 2 minutos separando medio y paquete celular, las células se resuspendieron en 200 µl de buffer tris 50 mM, pH 8.0. A los 2 ml del medio de cultivo se les agregaron 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua grado milliQ, se centrifugó a 12,000 rpm, 10 minutos retirando la fase acuosa con cuidado, a la fase oleosa se la agregaron 3 volúmenes de metanol y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos para precipitar las proteínas, se decantó el sobrenadante, el precipitado se dejó secar y se resuspendió en 10 µl de buffer tris 5 mM y 10 µl de buffer de carga Laemmli, se hirvieron por 5 minutos en baño de agua y se cargaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% y se corrió a 20 mA por gel .

3.4.3 Extracción de hIL-10 de las diferentes fracciones celulares. Las proteínas de periplasma y citoplasma (fracciones soluble e insoluble) se prepararon por el método reportado por Robbins *et al* (2006); se centrifugaron 1.5 ml del cultivo (8000 rpm por 2 min), la pastilla celular se resuspendió en 200 µl de buffer (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4, sacarosa 20% (p/v) y EDTA 10 mM), se incubó por 5 minutos en hielo y se centrifugó (8000 rpm por 2 min). Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 200 µl de agua agitando vigorosamente, se volvió a incubar en hielo 5 minutos. Se centrifugó (16,000 rpm por 2 min), recuperando el sobrenadante que contenía la fracción periplásmica. La pastilla celular se resuspendió en 200 µl de agua y

se sonicaron por 2 minutos. Se centrifugo (16,000 rpm por 2 min) y se recuperó el sobrenadante que contenía la fracción soluble. El precipitado se lavó y se resuspendido en 200 µl de agua destilada, este contenía la fracción insoluble de la proteína.

3.4.4 Identificación por Western Blot. Las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para realizar el Western Blot, la transferencia se realizó con el transblot (Bio-Rad, Cal, USA) a 10V/40 min. Después de la transferencia la membrana se lavó dos veces con buffer TBS (Tris 200 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5), posteriormente la membrana se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en la solución de bloqueo (leche al 4% en TTBS (Tris 200 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5, Tween 0.1%), se realizaron dos lavados con TTBS y la membrana se incubó 1 hora con el anticuerpo primario hIL-10 (Prepro Tech, México) diluído 1:1000, se volvieron a realizar dos lavados con TTBS y se incubó otra hora con el anticuerpo secundario el cual fue anti conejo IgG acoplado a la fosfatasa alcalina (Bio-Rad, Cal, USA), diluído 1:2000. La actividad enzimática se reveló con el sustrato NBT/BCIP (p-Nitro Blue Tetrazolium Chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt) (Amersham, Biosciences, Pittsburg, USA).

3.4.5 Cuantificación de hIL-10 por ELISA. Se utilizó un kit comercial para cuantificación de hIL-10 por Ensayo inmunológico ligado a enzimas (ELISA) (e-Bioscience, San Diego CA, USA). Se añadieron 100 µl de muestra a cada pozo de una microplaca y se incubó toda la noche a 4°C. Después de 5 lavados con

solución de lavado se agregaron 100 μ l del anticuerpo de detección (Anti IL-10 humana conjugado a biotina). La placa se incubó 1 hora a temperatura ambiente y se realizaron 5 lavados nuevamente con la solución de lavado. Se añadieron 100 μ l de avidina conjugada a peroxidasa y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Después de 7 lavados se añadieron 100 μ l del sustrato TMB (Tetrametilbencidina) y se incubó durante 15 minutos, se desarrolló un color azul de diferente intensidad, la reacción de color se detuvo añadiendo 50 μ l de la solución de paro, cambiando el color de azul a amarillo. La microplaca se leyó a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplaca Modelo 550 (Bio-Rad, Cal, USA).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una parte fundamental de cualquier vector de expresión es el promotor, existen promotores derivados de bacterias Gram-positivas que se han utilizado en *E. coli* con buenos resultados, por ejemplo: el promotor *nprM-lac* de *Bacillus spp* (Yamada *et al*, 1991) y el de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (Hogset *et al*, 1990). En la construcción de pLR se utilizó el promotor HU de *Bifidobacterium longum*, este promotor presenta una estructura similar a los promotores típicos de *Escherichia coli* (Takeuchi *et al*, 2002). En la Tabla 5 se presenta una lista de las secuencias típicas de los promotores utilizados en vectores de expresión para *E. coli* que son reconocidos por el factor σ^{70} (Schumann and Ferreira, 2004). En la misma Tabla se muestran las secuencias del promotor HU en donde se puede observar que hay homología. La secuencia Shine Delgarno (SD) del cassette de expresión es AAGGA, este es una secuencia típica de *E. coli*, por otro lado la distancia entre SD y el codón de inicio ATG en esta bacteria varia entre 5 y 13 nucleótidos, esta distancia influye en la eficiencia de la transcripción (Gold, 1988) y se ha establecido una distancia óptima para la transcripción de 5 a 7 nucleótidos (Rinquist *et al*, 1992). En pLR esta distancia es de 14 nucleótidos por lo que no se esperaría una transcripción eficiente ya que se ha reportado que con más de 14 nucleótidos la eficiencia disminuye. Sin embargo, nuestros resultados demostraron que el promotor HU de *B. longum* es funcional en *E. coli*.

Tabla 5. Secuencias de promotores usados en vectores de expresión reconocidos por el factor σ^{70} .

Promotor	Región -35	Distancia -35 y -10	Región -10
P_{lac}	TTTACA	18 pb	TATGTT
P_{lacUV5}	TTTACA	18 pb	TATAAT
P_{trp}	TTGACA	17 pb	TTAACT
P_{tac}	TTGACA	17 pb	TATAAT
λP_L	TTGACA	17 pb	GATACT
λP_R	TTGACT	17 pb	GATAAT
CONSENSO	TTGACA	17 pb	TATAAT
* P_{HU} <i>B. longum</i>	TTCGCA	14 pb	TATCAT

* P_{HU} – Promotor HU

Algunas ventajas de la producción extracelular es que no se requiere del rompimiento de la membrana externa para recuperar las proteínas lo que evita la proteólisis intracelular por proteasas presentes en periplasma y permite una producción continua de las proteínas recombinantes (Shokri *et al*, 2003). Considerando estas ventajas, se han desarrollado varias estrategias para la producción extracelular de proteínas recombinantes en *E. coli* entre las que se encuentran el uso de métodos físicos (choque osmótico, congelación-descongelación), tratamientos con lisozima y choque con cloroformo, otra opción es el estudio de las vías naturales de secreción que presenta *E. coli* ya que secreta algunas proteínas de forma natural. Las proteínas secretadas pueden salir del espacio periplásmico al medio de cultivo debido al aumento en la permeabilidad de la membrana celular después de un largo periodo de incubación (Tong *et al*, 2000). En *E. coli* existen dos sistemas involucrados en el transporte de proteínas hacia el espacio periplásmico, la vía general Sec y la vía TAT. En ambos sistemas las proteínas que son translocadas contienen una secuencia señal en su extremo N-terminal, esta secuencia señal varía en longitud de 15 a 30 aminoácidos (Schumann and Ferrera, 2004), el péptido señal es procesado después de la traslocación al espacio periplásmico y después la proteína utiliza otra vía de secreción para salir al espacio extracelular. Se realizó un ensayo de ELISA de medio y células totales de un cultivo de toda la noche a 37°C de *E. coli* TOP10 transformada con pLR1 y pLR2, en este ensayo las cantidades de hIL-10 fueron de 0.143 $\mu\text{g l}^{-1}$ y de 0.020 $\mu\text{g l}^{-1}$ para pLR1 y de 0.268 $\mu\text{g l}^{-1}$ y 0.068 $\mu\text{g l}^{-1}$ para pLR2 en medio y extractos celulares respectivamente. Este resultado es interesante ya que a pesar de la poca cantidad de proteína, al parecer se exporta hacia el medio de

cultivo independientemente del vector utilizado, siendo ligeramente mayor la cantidad de proteína en la cepa transformada con pLR2. BIF3 es un péptido señal que presenta un motivo Arginina-Arginina (RR) en su región N, este motivo RR es característico de péptidos que utilizan la vía TAT en *E. coli*. Por lo que para conocer la vía de secreción utilizada por BIF3 en esta bacteria se transformaron las cepas MC4100 y MC4100 Δ tat (Vía TAT mutada) con los vectores pLR1 y pLR2, obteniendo 4 diferentes transformantes (Tabla 6). Cada una de ellas se cultivó a 37°C en medio LB ampicilina durante 12 horas, y se cuantificó hIL-10 presente en el medio y en células totales observando una mayor cantidad en el medio de las cepas transformadas con el vector pLR2 (Figura 22, Tabla 7). De acuerdo a estos resultados es posible que BIF3 utilice la vía general Sec en *E. coli* ya que la cantidad de proteína presente en el medio de las cepas con la vía TAT mutada es similar a las cepas que no presentan esta mutación.

Tabla 6. Combinaciones de las transformantes obtenidas

Transformante	Cepa	Vector
1	<i>E. coli</i> MC4100	pLR1
2	<i>E. coli</i> MC4100Δ<i>tat</i>	
3	<i>E. coli</i> MC4100	pLR2
4	<i>E. coli</i> MC4100Δ<i>tat</i>	

Tabla 7. Cuantificación de hIL-10 por ELISA en medio de cultivo y extractos celulares de las cepas de *E. coli* MC4100 y MC4100 Δ tat transformadas con pLR2 y cultivadas por 12 horas a 37°C.

Transformante	hIL-10 (μg l⁻¹)	
	Medio de cultivo	Extractos celulares
1	0.31	0.048
2	0.40	0.020
3	0.46	0.008
4	0.57	0.019

Las transformantes obtenidas de *E. coli* MC4100 y MC4100 Δ *tat* con pLR2 se utilizaron para los siguientes experimentos debido a que se observó mayor cantidad de hIL-10 en las transformantes con pLR2 que con pLR1. Se cuantificó la cantidad de hIL-10 presente en los compartimentos celulares de la bacteria, para lo cual se cultivaron ambas cepas transformadas a 37°C por 15 horas y la hIL-10 se cuantificó por ensayo de ELISA. La cantidad de hIL-10 presente en estos compartimentos fue mínima a comparación de la que se encontró en el medio de cultivo (Figura 23), esto puede significar que la bacteria secreta la proteína hacia el medio de cultivo sin permanecer mucho tiempo en el periplasma. Como el promotor HU es de una proteína de choque térmico, se realizó un ensayo de expresión a 28°C y otro a 37°C, en medio LB ampicilina para determinar si la temperatura influía en la secreción de la proteína al medio de cultivo. Se cuantificó por ELISA la cantidad de hIL-10 en el medio a las 15, 18 y 21 horas (Figura 24), los resultados obtenidos muestran que la temperatura no afecta la secreción de la proteína.

De acuerdo a lo que se observa en la Figura 25, la producción de hIL-10 está asociada al crecimiento, y a partir de las 12 horas la cantidad de proteína presente en el medio empieza a aumentar considerablemente con respecto a la cantidad presente en las células observando un máximo en la cantidad de hIL-10 entre las 15 y 18 horas, esta cantidad disminuye después de las 18 horas posiblemente debido a que la proteína empieza a ser degradada por las proteasas. Se realizó un Western blot del medio de cultivo de la muestra tomada a las 15 y 18 horas de la cinética para confirmar que la proteína fue procesada (Figura 26).

Este es el primer reporte en el cual se utilizan un promotor y un péptido señal de *Bifidobacterium* en *E. coli* y ambos fueron funcionales. Además de la funcionalidad de éstos, fue muy novedoso que la proteína se exportara hasta el medio extracelular casi inmediatamente lo cual se puede deducir debido a que la cantidad de proteína presente en el espacio periplásmico fue mínima.

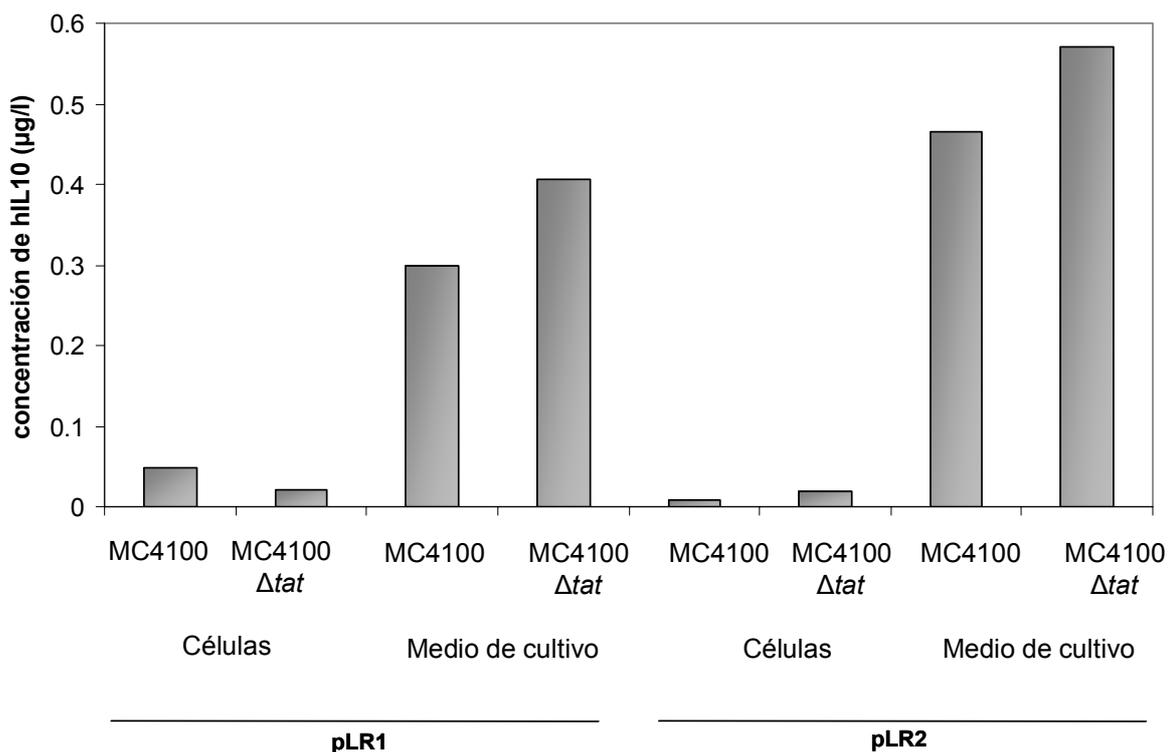
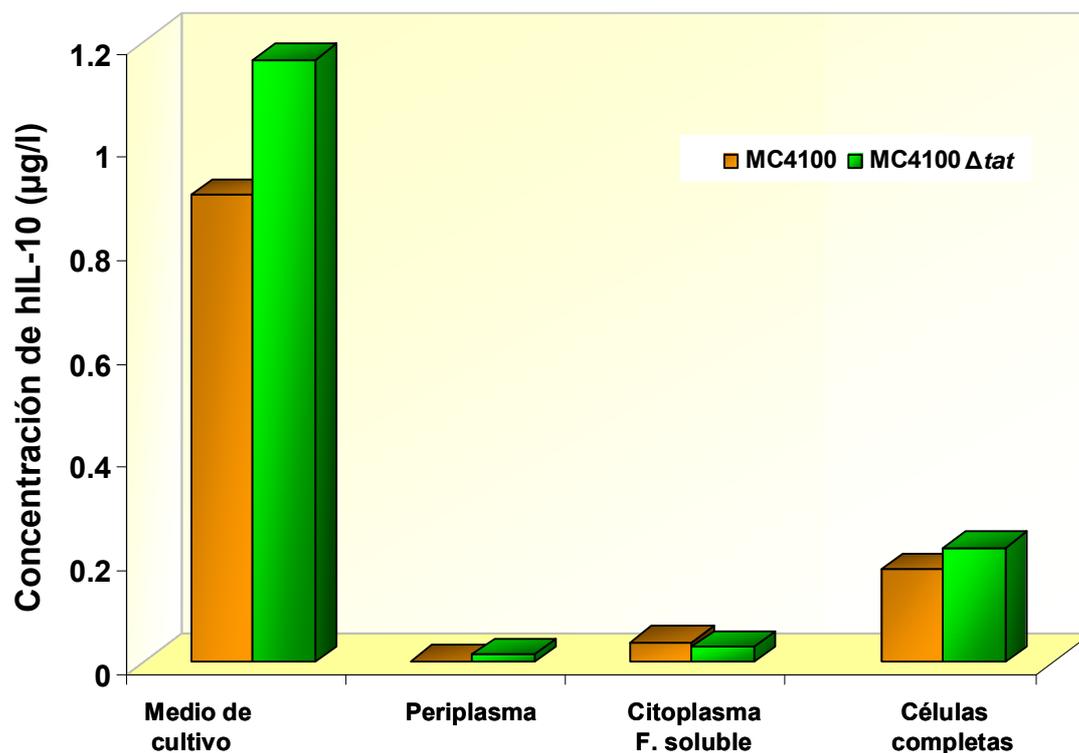


Figura 22. Cuantificación de hIL-10 presente medio y células completas de *E. coli* MC4100 y MC4100Δtat transformadas con pLR1 y pLR2 (Cultivo de 12 h a 37°C). Como se observa, la mayoría de la proteína se encuentra en el medio extracelular en ambos sistemas aunque la cantidad es ligeramente mayor en las cepas transformadas con pLR2.

A)



B)

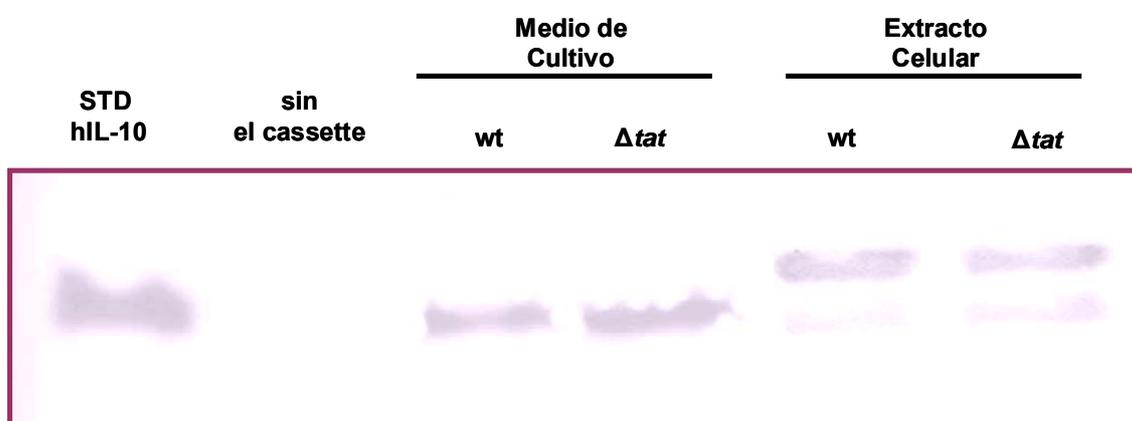


Figura 23. **A)** Cuantificación de hIL-10 presente en medio de cultivo, periplasma, fracción soluble y células totales en un cultivo de 15 horas de *E. coli* MC4100 (wt) y MC4100 Δ tat (Δ tat) transformadas con pLR2. **B)** Western blot de medio de cultivo y extractos celulares de las dos cepas, wt y Δ tat. La hIL-10 se encuentra procesada en medio de cultivo. En extractos celulares se encuentra en su mayoría como no procesada.

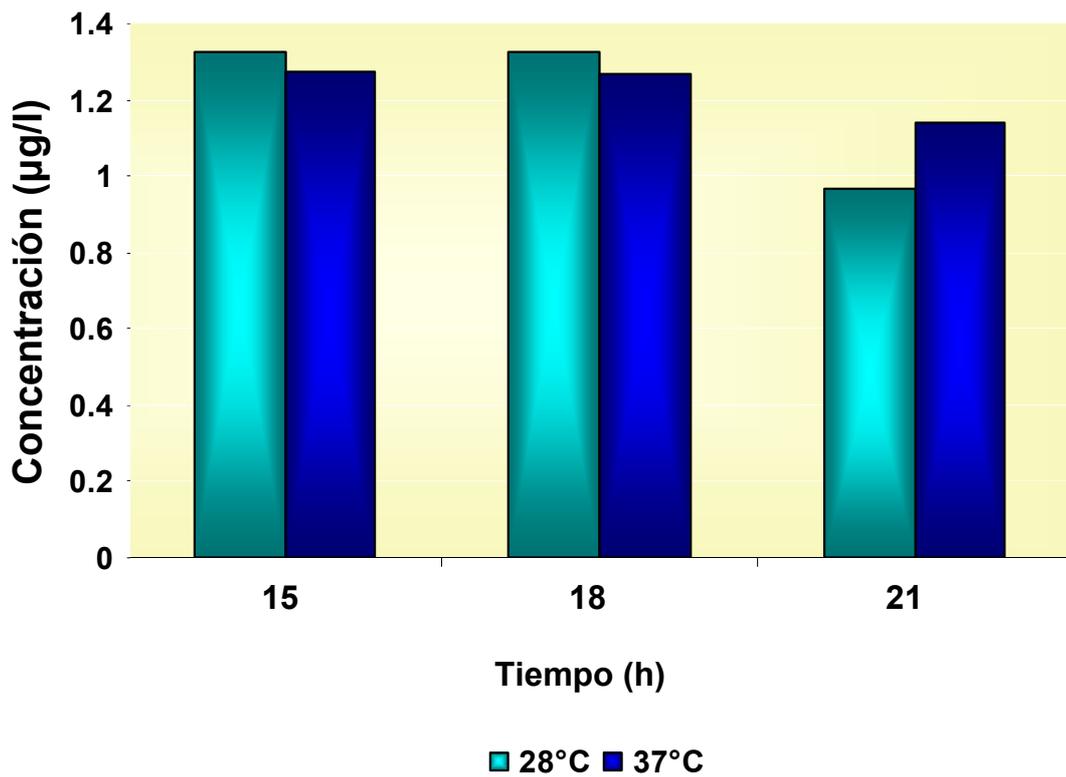


Figura 24. Comparación de las cantidades de hIL-10 extracelular de dos cultivos a diferentes temperaturas (28 y 37°C). Se puede observar un comportamiento similar en ambas temperaturas comparable con el comportamiento de la cinética mostrada en la Figura 21.

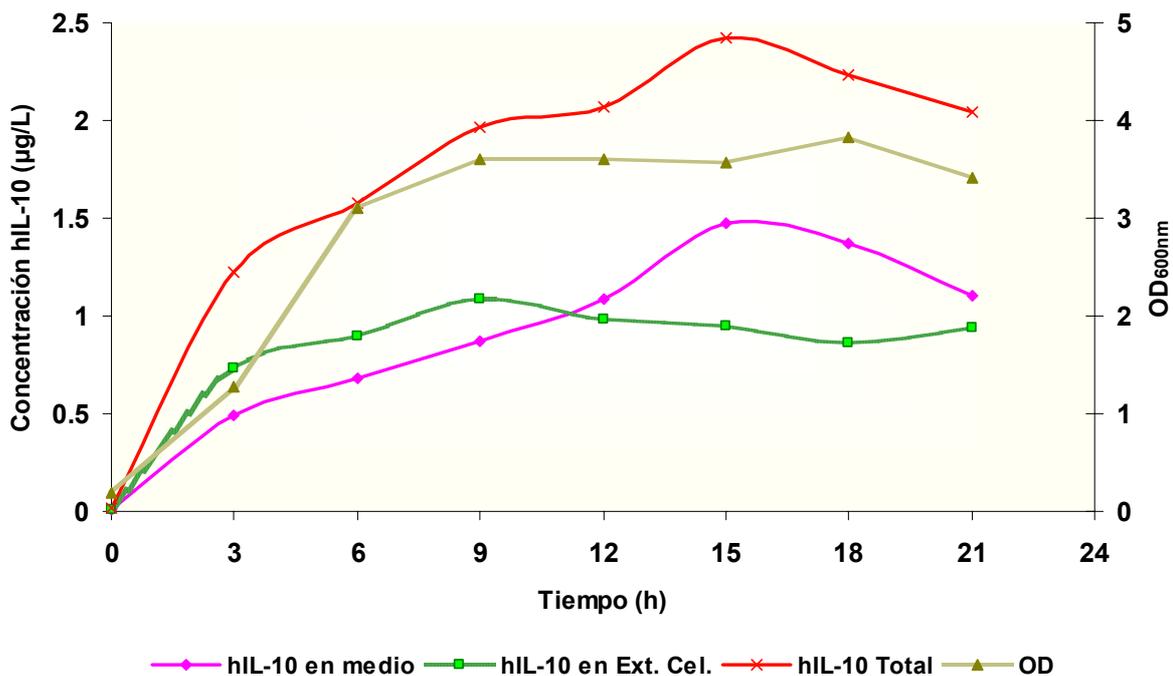


Figura 25. Cinéticas de crecimiento celular y producción de hIL-10 en *E. coli* MC4100Δtat transformada con pLR2 (Cultivo a 28°C).



Figura 26. Western blot de medio de cultivo de 15 y 18 horas de *E. coli* MC4100 Δ *tat* transformadas con pLR2. Carril 1, STD; Carril 2, *E. coli* MC4100 Δ *tat* sin el cassette de expresión; Carril 3, Medio de cultivo de 15 h; Carril 4, Medio de cultivo de 18 h.

CONCLUSIONES GENERALES

La poca disponibilidad de vectores de expresión funcionales y estables en *Bifidobacterium sp* es un obstáculo para el estudio y mejoramiento de cepas a las cuales se les atribuyen características probióticas. En este trabajo se construyó un vector de expresión que resultó ser bifuncional, esto es, activo en *Bifidobacterium longum* y en *E. coli* para la expresión de hIL-10. En relación a *Bifidobacterium* los resultados obtenidos permiten concluir que es necesario realizar estudios de la bacteria como sistema de expresión ya que hay muchas características que aún no se conocen y que impiden que se establezcan condiciones de expresión óptimas, se tiene que considerar el metabolismo de la bacteria debido a que algunos de sus productos, como los ácidos láctico y acético afectan a la hIL-10. *Bifidobacterium* puede llegar a ser un buen sistema de expresión de proteínas recombinantes a nivel industrial a medida que la investigación nos permita ir conociendo a esta bacteria. Otro microorganismo de interés es *Escherichia coli*, que contrario a *Bifidobacterium*, es un sistema de expresión conocido y muy utilizado en la producción de proteínas recombinantes a nivel industrial. Sin embargo, *E. coli* secreta pocas proteínas hacia medio de cultivo, por lo que actualmente existen estudios dirigidos al conocimiento de los mecanismos implicados en la secreción de proteínas. Adicionalmente se recomienda realizar estudios con el péptido señal BIF3 en vectores de expresión diseñados para *E. coli* y además utilizar cepas mejoradas para la sobreexpresión de proteínas, además de establecer las condiciones óptimas de expresión por lo que se esperaría que la cantidad de la proteína exportada sea mayor. Hasta ahora no existe reporte de péptidos señal

de Bifidobacterias que exporten proteínas en *E. coli* siendo este el primer trabajo que se realiza al respecto, sin embargo lo más novedoso es que el exporte de la proteína sea hasta el medio extracelular y sobre todo que la proteína esté procesada. En conclusión, *E. coli* sigue siendo un sistema atractivo para la producción de proteínas recombinantes debido a su simplicidad y propiedades bien conocidas que exceden por mucho a las de otros sistemas ya utilizados o que se encuentran en desarrollo como *Bifidobacterium*. Sin embargo es necesario realizar más investigación en ambos microorganismos para optimizar condiciones de producción y principalmente de secreción de las proteínas recombinante

REFERENCIAS

1. Argnani A, Leer R.J, Luijk N, Pouwels P.H. 1996. A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium*. Microbiol. 142: 109-114.
2. Asadullah K, Sterry W, Volk H.D. 2003 Interleukin-10 therapy review of a new approach. Pharmacol. Rev. 55:241.
3. Ballongue J. 1993. Bifidobacteria and probiotic action. In: Lactic acid bacteria. S. Salminen and A. von Wright (eds.). New York, Marcel Dekker Inc: 357-428.
4. Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr. Op. Biotechnol. 10:411-421.
5. Bazan J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6934.
6. Berg R.D. 1998. Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'? Trends Microbiol. 6: 89-92.
7. Betts S and King J. 1999. There's a right way and a wrong way: *In vivo* and *in vitro* folding, misfolding and subunit assembly of the P22 tailspike. Structure. 7:R131-R139.
8. Biavati B, Mattarelli P. 1991. *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 163-168.
9. Biavati B, Mattarelli P, Crociani F. 1991. *Bifidobacterium saeculare*: a new species isolated from feces of rabbit. System. Appl. Microbiol. 14: 389-392.
10. Blumberg H, Conklin D, Xu W.F, Grossman A, Brender T, Carollo S. 2001. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. Cell. 104:9.
11. Bonnassie S, Burini IT, Moglia I, Trautwetter A, Patte I.C, Sicard A. M. 1990. Transfer of plasmid DNA to *Brevibacterium lactofermentum* by electroporation. J Gen Microbiol. 136:2107-2112.
12. Bourget N, Simonet J.M, Decaris B. 1993. Analysis of the genome of the five *Bifidobacterium breve* strains: plasmid content, pulsed-field gel

-
- electrophoresis genome size estimation and *rrn* loci number. FEMS Microbiol. Lett. 110: 11-20.
13. Chassy B.M, Flickinger J.L. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. FEMS Microbiol Lett. 44:173-177.
 14. Chassy B.M, Mercenier A, Flickinger J.L. 1988. Transformation of bacteria by electroporation. Trends Biotechnol. 6:303-309.
 15. Cristóbal S, de Gier J-W, Nielsen H, von Heijne G. 1999. Competition between Sec- and TAT- dependent protein translocation in *Escherichia coli*. EMBO J. 18:2982-2990.
 16. Crociani F, Biavati B, Alessandrini A, Chiarini C, Scardovi V. 1996. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 564-571.
 17. Cruz A.L. Gilmore M.S. 1990. High introduction of plasmid DNA into glycine treated *Enterococcus faecalis* by electroporation. Mol. Gen Genet. 224:152-154.
 18. Deguchi Y, Morishita T, Mutai M. 1985. Comparative studies on synthesis of watersoluble vitamins among human species of bifidobacteria. Agric. Biol. Chem. 49: 13-19.
 19. Delves P, Roitt I. 1998. Encyclopedia of immunology. 2nd ed. San Diego: Academic Press.
 20. De Vries, W. and A. H. Stouthamer (1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. J. Bacteriol. 93: 574-576.
 21. de Waal M.R, Moore K.W. 1998. Interleukine-10. In The cytokine handbook, third edition. San Diego CA: Academic Press. 333-364.
 22. Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D. 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 119-125.
 23. Driessen AJM, Manting EH, van der Does C. 2001. The structural basis of protein targeting and translocation in bacteria. Nat. Struct. Biol. 8:492-498.
 24. Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renault J.C. 2000. Human interleukin-10 related T cell-derived inducible factor: molecular cloning

-
- and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:10144.
25. Fiorentino D.F, Bond M.W, Mosmann T.R. 1989. Two types of mouse T helper cell: IV.Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J. Exp. Med. 170:2081.
 26. Fu G.F, Li X, Hou Y.Y, Fan Y.R, Liu W.H, Xu G.X. 2005. *Bifidobacterium longum* as an oral delivery system of endostatine for gene therapy on solid liver cancer. Cancer Gene Ther. 12: 133-140.
 27. Fujimori M, Amano J, Taniguchi S. 2002. The genus Bifidobacterium for cancer gene therapy. Curr. Op. Drug Disc. Dev. 5: 200-203.
 28. Fujimori M. 2006. Genetically Engineered *Bifidobacterium* as a Drug Delivery System for Systemic Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients. Breast Cancer. 13:27-31.
 29. Fleming S.B, McCaughan C.A, Andrews A.E, Nash A.D, Mercer A.A. 1997. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. J Virol. 71:4857.
 30. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378.
 31. Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J, Izotova L.S, Mirochnitchenko O.V, Peat J.D. 2000. Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). Genes Immun. 1:442.
 32. Gesser B, Leffers H, Jinquan T, Vestergaard C, Kirstein N, Sindet-Pedersen S, Jensen SL, Thestrup-Pedersen K, and Larsen C. 1997. Identification of functional domains on human interleukin 10. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 14620-14625.
 33. Gold L. 1988. Posttranscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli*. Ann. Rev. Biochem. 57:199-233.
 34. González V.A, Rossi M, Altomare L, Erikmanns B, Matteuzzi D. 2003. Stability of recombinant plasmid in the continuous culture of *Bifidobacterium animalis* ATCC 27536. Biotechnol. Bioeng. 84:145-150.
 35. Guarner F, Malagelada J.R. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet 361: 512-519.

-
36. Harlander S. 1987. Gene transfer systems in lactic streptococci. In *Streptococcal Genetics*, pp 229-233 Edited by JJ Ferretti and R.C. Curtiss. Washington D.C. American Society for Microbiology.
 37. Havenaar R, Huis In't Veld, J. M. J. 1992. Probiotics: a general view. In: *Lactic acid bacteria in health and disease*, Vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers, 1992.
 38. Ho A.S, Liu Y, Khan T.A, Hsu D-H, Bazan J.F, Moore K.W. 1993. A receptor for interleukin-10 is related to interferon receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11267.
 39. Hogset A, Blingsmo O, Saether O, Gautvik V, Holmgren E, Hartmanis M, Josephson S, Gabrielsen O, Gordeladze J, Alestrom P, Gautvik K. 1990. Expression and characterization of a recombinant human parathyroid hormone secreted by *Escherichia coli* employing the staphylococcal protein A promoter and signal sequence. *J. Biol. Chem.* 265:7338-7344.
 40. Holo H, Nes IF. 1989. High frequency transformation by electroporation of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media. *Appl. Environ. Microbiol.* 12:3119-3123.
 41. Hsu D.H, de Waal Malefyt R, Fiorentino D.F, Dang M.N, Vieira P. De Vries J. 1990. Expression of interleukin 10 activity by Epstein Barr virus protein BCRFI. *Sci.* 250:830.
 42. Iwata M, Morishita T. 1989. The presence of plasmids in *Bifidobacterium breve*. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 165-168.
 43. Jiang H, Su Z.Z, Lin J.J, Goldstein N. I, Yong C.S, Fisher P.B. 1996. The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:9160.
 44. Jones B.C, Longsdon N.J, Josephson K, Cook J, Barry P.A, Walter M.R. 2002. Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:9404.
 45. Kaufmann P, Pfefferkorn A, Teuber M, Meile L. 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1268-1273.

-
46. Khun R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 75:263-74. Comment in: *Cell*. 1993. 75(2):203-205.
 47. Knappe A, Hor S, Wittmann S, Fickenscher H. 2000. Induction of a novel cellular homolog of interleukin 10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri. *J Virol*. 74:3881.
 48. Kotenko S.V, Krause C.D, Izotova L.S, Pollack B.P, Wu W, Pestka S. 1997. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J*. 16:5894.
 49. Kotenko S.V, Sacconi S, Izotova L.S, Mirochnitchenko O.V, Pestka S. 2000. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97(4):1695 – 1700.
 50. Kotenko S.V. 2002. The family of IL10 related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine growth factor Rev*. 13:223
 51. Kotenko S.V, Gallagher G, Baurin V.V, Lewis-Antes A, Shen M, Shah N.K. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat. Immunol*. 4:69.
 52. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nat*. 227:680-685.
 53. Lauer E. 1990. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 40: 100-102.
 54. Lee H.J, Essani K, Smith G.L. 2001. The genome sequence of Yaba-like disease virus, a yatapoxvirus. *Virology*. 281:170.
 55. Li X, Fu G.F, Fan Y.R, Liu W.H, Liu X.J, Wang J.J, Xu G.X. 2003. *Bifidobacterium adolescentis* as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: Selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth. *Cancer Gene Ther*. 10: 105-111.
 56. Li M-C, He S-H. 2004. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 10:620-625.
 57. Lilly D. M, Stillwell R. H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Sci*. 147:747-748.
 58. Liu Y, Wei S. H, Ho A.S, Malefyt R.W, Moore K.W. 1994. Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor. *J Immunol*. 88:1821.

-
59. Luchansky J.B, Muriana P.M, Klaenhammer T.R. 1988. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. Mol. Microbiol. 2:637-646.
 60. MacConaill L.E, Fitzgerald G.F, van Sinderen D. 2003. Investigation of protein export in *Bifidobacterium breve* UCC2003. Appl. Environ. Microbiol. 69:6994-7001.
 61. Makrides S. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 60:512-538.
 62. Mattarelli P, Biavati B, Alessandrini A, Crociani F, Scardovi V. 1994. Characterization of the plasmid pVS809 from *Bifidobacterium globosum*. New Microbiol. 17:327-331.
 63. Matteuzzi D, Brigidi P, Rossi M, Di Gioia D. 1990. Characterization and molecular cloning of *Bifidobacterium longum* cryptic plasmid pMB1. Lett. Appl. Microbiol. 11:220-223.
 64. Meile L, Ludwig W, Rueger U, Gut C, Kaufmann P, Dasen G, Wenger S, Teuber M. 1997. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. System. Appl. Microbiol. 20: 57-64.
 65. Metchnikoff E. 1907. The prolongation of life: optimistic studies. London, Heinemann.
 66. Missich, R, Sgorbati B, LeBlanc D.J. 1994. Transformation of *Bifidobacterium longum* with pRM2, a constructed *Escherichia coli*-*B. longum* shuttle vector. Plasmid 32:208-211.
 67. Mitsuoka T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. J. Ind. Microbiol. 6: 263-267.
 68. Mitsuoka T. 1992. Intestinal flora and ageing, Nutr. Rev. 50:438-446.
 69. Mitsuoka T. 1982. Ecology of the Intestinal Flora in Recent Trends in Research on Intestinal Flora. Bifidobacterium Microbiol. 1:3-24.
 70. Moller P.L, Jorgensen F, Hansen O.C, Madsen S.M, Stougaard P. 2001. Intra and extracellular β -galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: Molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2276-2283.

-
71. Moon G.S, Pyun Y.R, Park M.S, Ji G.E, and Kim W.Y. 2005. Secretion of recombinant pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum*, using the signal sequence for bifidobacterial α -amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5630-5632.
 72. Moore K.W, Vieira P, Fiorentino D.F, Trounstein M.L, Khan T.A, Mosmann T.R. 1990. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr Virus gene BCRF1. *Sci.* 248:1230.
 73. Naidu A.S, Bidlack W. R, Clemens R. A. 1999. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38:13-126.
 74. Nakamura T, Sasaki T, Fujimori M, Yazawa K, Kano Y, Amano J, and Taniguchi S. 2002. Cloned cytosine deaminase gene expression of *Bifidobacterium longum* and application to enzyme/pro-drug therapy of hypoxic solid tumors. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 66: 2362-2366.
 75. Olsen G. J, Woese C.R, Overbeek R. 1994. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol.* 176: 1-6.
 76. O'Riordan K, Fitzgerald G.F. 1999. Molecular characterisation of a 5.75-kb cryptic plasmid from *Bifidobacterium breve* NCFB 2258 and determination of mode of replication. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 285-294.
 77. Orla-Jensen M. (1924). La classification des bactéries lactiques. *Le Lait* 4: 468-474.
 78. Ozaki K, Leonard W.J. 2002. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. *J. Biol. Chem.* 277:29355.
 79. Park M.S, Lee K.H, Ji G.E. 1997. Isolation and characterization of two plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 25:5-7.
 80. Parker R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutr. Health.* 29:4-8.
 81. Posno M, Leer R.J, van Luijk N, van Giezen M.J.F, Heuvelmans P.T.H.M, Lokman B.C, Pouwels P.H. 1991. Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1822-1828.

-
82. Reuter G. 1963. Vergleichende Untersuchung über die Bifidus-flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. I Abt. Orig. 191: 486-501.
 83. Ringquist S, Shinedling S, Barrica D, Green L, Binkley J, Stormo GD, Gold L. 1992. Translation initiation in *Escherichia coli*: Sequences within the ribosome-binding site. Mol. Microbiol. 6:1219-1229.
 84. Robbens J, De Coen W, Fiers W, Remaut E. 2006. Improved periplasmic production of biologically active murine interleukine-2 in *Escherichia coli* through a single amino acid change at the cleavage site. Process Biochem. 41: 1343-1346.
 85. Rode H.J, Janssen W, Rosen-Wolff A, Burgert J.J, Thein P, Becker Y. 1993. The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene. Virus Genes. 7:111.
 86. Rossi M, Brigidi P, Matteuzzi D. 1998. Improved cloning vectors for *Bifidobacterium* spp. Lett. Appl. Microbiol. 26: 101-104.
 87. Rossi M, Brigidi P, Gonzalez V, Matteuzzi D. 1996. Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. Res. Microbiol. 147:133-143.
 88. Rossi, M, Brigidi P, Matteuzzi D. 1997. An efficient transformation system for *Bifidobacterium* spp. Lett. Appl. Microbiol. 24: 33-36.
 89. Sanders M.E. 2003. Probiotics: Considerations for human health. Nutr. Rev. 61: 91-99.
 90. Scardovi V, Trovatelli L.D. 1969. New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* A. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. Hyg. I. Abt. Orig. 123:64-88.
 91. Scardovi V. (1986). Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In: Bergery's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.) Baltimore, Williams & Wilkins: 1418-1434.
 92. Schaafsma G. 1996. State of art concerning probiotic strains in milk products. 5:23-4.
 93. Schell M. A, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen M-C, Desiere F, Bork P, Delley M., Pridmore R. D., Arigoni F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its

-
- adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:14422-14427.
94. Schotte L, Steidler L, Vandekerckhove J, Remaut E. 200. Secretion of biologically active murine interleukin-10 by *Lactococcus lactis*. Enzyme Microbial Technol. 27: 761-765.
95. Schrezenmeir J, de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. Am .J. Clin. Nutr. 73 (suppl): 361S-4S.
96. Schumann W, Ferreira L. 2004. Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Gen. Mol. Biol. 27: 442-453.
97. Sgorbati B, Scardovi V, LeBlanc D.J. 1982. Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. J. Gen. Microbiol. 128:2121-2131.
98. Sgorbati B, Scardovi V, Leblanc D.J. 1986a. Related structures in the plasmid profiles of *Bifidobacterium asteroides*, *B. indicum* and *B. globosum*. Microbiol. 9: 443-454.
99. Sgorbati B, Scardovi V, Leblanc D.J. 1986b. Related structures in the plasmid profiles of *Bifidobacterium longum*. Microbiol. 9: 415-422.
100. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore T.E. 2003. IL-28, IL-29 and their class cytokine receptor IL-28R. Nat. Immunol. 4:63.
101. Shokri A, Sandén A, Larsson G. 2003. Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:654-664.
102. Smeianov V.V, Efimov V.A, Korschunov V.M, Steele J.L. 2002. Characterization of plasmid p4M from *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Gen EMBL Accession number AF359574.
103. Stackebrandt E, Rainey F.A, Ward-Rainey N. L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 479-491.
104. Steidler L. 2002. In situ delivery of cytokines by genetically engineered *Lactococcus lactis*. Antonie van Leeuwenhoek. 82:323-331.
105. Syto R, Murgolo N.J, Braswell E.H, Mui P, Huang E, Windsor W.T. 1998. Structural and biological stability of the human interleukine-10 homodimer. Biochem. 37:16943-16951.

-
106. Takeuchi A, Matsumura H, Kano Y. 2002. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a gene, *hup*, encoding the histone-like protein HU of *Bifidobacterium longum*. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 66: 598-603.
 107. Tan J.C, Indelicato S.R, Narula S.K, Zavodny P.J, Chou C-C. 1993. Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. *J. Biol. Chem.* 268:21053.
 108. Tannock G.W. 1999. *Probiotics: A critical review.* Wymondham, Horizon Scientific Press.
 109. Theys J, Barbé S, Landuyt S, Nuyts L, Mellaert V, Wouters B, Anné J, Lambin P. 2003. Tumor specific gene delivery using genetically engineered bacteria. *Curr. Gene Ther.* 3: 207-221.
 110. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, van Dijk. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:515-547.
 111. Tong L, Lin Q, Wong WKR, Ali A, Lim D, Sung WL, Hew CL, Yang DSC. 2000. Extracellular expression, purification, and characterization of a winter flounder antifreeze polypeptide from *Escherichia coli*. *Prot. Exp. Purif.* 18:175-181.
 112. Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang M.N, Johnson K. E, Kastelein R, Fiorentino D.F, de Vries J.E, Roncarolo M.G, Mosmann T.R, Moore K.W. 1991. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88:1172-1176.
 113. Villaverde A, Carrio MM. 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* 25:1385-1395
 114. Walter M.R, Nagabhushan T.L. 1995. Crystal structure of interleukin 10 reveals an interferon gamma like fold. *Biochem.* 34:12118.
 115. Watabe J, Benno Y, Mitsouka T. 1983. *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from the ceca of chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33: 127-132.
 116. Windsor W.T, Syto R, Tsarbopoulos A, Zhang R, Durkin J, Baldwin S. 1993. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. *Biochem.* 32:8807.

-
117. Yamada M, Kubo M, Miyake T, Sakaguchi R, Higo Y, Imanaka T. 1991. Promoter sequence analysis in *Bacillus* and *Escherichia*: Construction of strong promoters in *E. coli*. *Gene*. 99:109-114.
118. Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. 2001. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res. Treat.* 66: 165-170.
119. Yi C, Huang Y, Guo Z.Y, Wang S. 2005. Antitumor effect of cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide gene therapy system mediated by *Bifidobacterium infantis* on melanoma. *Acta Pharmacol. Sin.* 26: 629-634.
120. Zdanov A, Schalk-Hihi C, Menon S, Moore K.W, Wlodawer A. 1997. Crystal structure of Epstein Barr virus protein BCRF1, a homolog of cellular interleukin-10. *J. Mol. Biol.* 268:460.
121. Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weathererbee J, Wlodawer A. 1995. A crystal structure of interleukin 10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon γ . *Structure*. 3:591.

ANEXOS

1. Registro de patente NL/a/2006/000035

“Plásmido pLR para la expresión de proteínas recombinantes en bacterias del género *Bifidobacterium*”.