



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Expresión y purificación de tres proteínas de fusión
de hIL2 e hIFN γ en *Escherichia coli***

Tesis que presenta

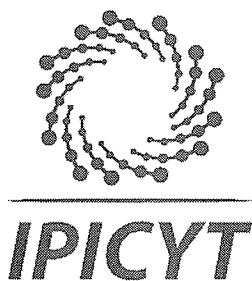
Jose Luis Ruiz Carrillo

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

**Director de la Tesis:
Dr. Antonio De León Rodríguez**

San Luis Potosí, S.L.P., agosto 2019



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión y purificación de tres proteínas de fusión de hIL2 e hIFN γ en *Escherichia coli***” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Jose Luis Ruiz Carrillo** y aprobada el seis de agosto del dos mil diecinueve 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. Antonio De León Rodríguez
Director de la tesis

Dr. Braulio Gutiérrez Medina
Miembro del Comité Tutorial

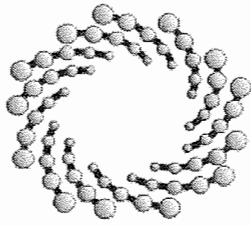
Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 636010 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 198 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 6 días del mes de agosto del año 2019, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández	Presidente	IPICYT
Dr. Braulio Gutiérrez Medina	Secretario	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Jose Luis Ruiz Carrillo

sobre la Tesis intitulada:

Expresión y purificación de tres proteínas de fusión de hIL2 e hIFN γ en Escherichia coli

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:15 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes de agosto de 2019.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

Dedico este trabajo a mi familia en especial a mis padres por siempre motivarme a seguir, a mis tios que fueron quienes me apoyaron estos dos años. A mis hermanos por confiar en mi, a "Chepito" por siempre alegrarme en los momentos que mas lo necesite. A mis amigos, los que conoci en este proceso y los que no me abandonaron, aunque hubiera distancia. A mi novia, gracias por aguantarme y darme animos de nunca rendirme te amo.

Sobre todo, a las personas que lograron que fuera quien soy: mis abuelos y mi tia Micaela que, aunque algunos ya no estan fueron el motivo de todo esto, ¡gracias!

Agradecimientos

Al Dr. Antonio De León Rodríguez por darme la oportunidad de trabajar en su equipo, muchas gracias por la confianza.

Al Dr. Víctor Balderas por su apoyo tecnico y asesorias siempre que tuve alguna duda.

A la Dra. Arlette Bohorquez por apoyarme a lo largo de mi tesis y asesorarme en todo momento.

A la Dra. Ana Paulina Barba por facilitarme el acceso a su equipo y laboratorio que fueron cruciales para el trabajo de tesis.

A la Sra. Sonia por su apoyo en la limpieza y esterilización del material del laboratorio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada durante toda mi estancia y al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. por aceptarme en su programa de posgrado.

A todos mis amigos y compañeros del IPICYT que me ofrecieron su ayuda cuando tuve necesidad de ella y me soportaron todo este tiempo.

A mis amigos del laboratorio 4 que hicieron este proceso mas divertido y facil, desde el principio ayudandome en todo y al paso del tiempo tener una buena relacion dentro y fuera del instituto sin importar el trabajo o estrés que en algunas temporadas siempre con una sonrisa para mi, se los agradezco mucho.

Al personal de posgrado e instituto que estuvieron involucrados en que esto se llevara acabo, desde profesores hasta personal administrativo.

A todos a quienes conoci y me brindaron su amistad en el insituto muchas gracias a todos.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales.....	iii
Agradecimientos (opcional)	vi
Tabla de figuras.....	ix
Índice de tablas	x
Resumen	xii
Abstract.....	xiii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Proteínas de fusión	1
1.2 Inmunoterapia para tratar Cáncer	1
1.3 Interleucina 2.....	2
1.4 Interferón gamma.....	3
2 Metodología.....	6
2.1 Extracción de plásmido de la cepa <i>E. coli</i> BL21DE3 y transformación de cepa <i>E. coli</i> BL21-SI	6
2.2 Ensayos de expresión para cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y BL21-SI.....	7
2.3 Lisis celular y separación de fracciones	8
2.4 Solubilización de fracción insoluble.....	8
2.5 Identificación de proteínas recombinantes por Western blot y tinción por azul de Coomassie.....	9
2.5 Cromatografía por afinidad.....	10
2.6 Análisis de cuantificación de biomasa.....	11
3 RESULTADOS	12
3.1 Expresión de proteínas recombinantes hIL2: hIFN γ , hIFN γ : hIL2 y hIFN γ : hIL2m en <i>E. coli</i> BL21DE3.....	12

3.2	Expresión de proteínas recombinantes hIL2: hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m en <i>E. coli</i> BL21-SI.....	15
3.3	Evaluación de la producción de la proteína total y biomasa post inducción en las cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y <i>E. coli</i> BL21-SI	19
3.4	Solubilización de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m producidas en <i>E. coli</i> BL21-SI	26
3.5	Purificación y cuantificación proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m expresadas en <i>E. coli</i> BL21-SI.....	28
4	DISCUSION.....	32
4.1	Expresión de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m en <i>E. coli</i> BL21DE3	32
4.2	Expresión de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m en <i>E. coli</i> BL21-SI.....	32
4.3	Comparación entre cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y <i>E. coli</i> BL21-SI.....	33
4.4	Solubilización de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m producidas en <i>E. coli</i> BL21-SI	33
4.5	Purificación y cuantificación de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m expresadas en <i>E. coli</i> BL21-SI.....	34
5	CONCLUSIONES.....	35
6	PERSPECTIVAS	36
7	BIBLIOGRAFIA.....	37
8	ANEXOS.....	43

Tabla de figuras

Figura 1. Identificación de proteínas de fusión IL2-IFN γ , IFN γ -IL2 y IFN γ -IL2m mediante Western blot	13
Figura 2. Localización de la proteína IL2-IFN γ en <i>E. coli</i> BL21 DE3 a diferentes tiempos en la fracción insoluble	15
Figura 3. Localización de la proteína de fusión hIL2-hIFN γ y en la cepa <i>E. coli</i> BL21SI a 28°C.....	16
Figura 4. Identificación de la proteína de fusión IL2-IFN γ y IFN γ - IL2 en la cepa <i>E. coli</i> BL21SI mediante WB.....	18
Figura 5. Evaluación de proteína total en cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y BL21-SI que contenían las construcciones hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m.....	22
Figura 6. Evaluación de biomasa en cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y BL21-SI que contenían las construcciones hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m.....	23
Figura 7. Ensayos de expresión de proteína recombinante en cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y BL21-SI a 20 °C.	25
Figura 8. Evaluación de biomasa y proteína total en cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y BL21-SI a 20 °C.	26
Figura 9. Western blot de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m solubilizadas	27
Figura 10. Purificación de la proteína recombinante hIL2:hIFN γ	29
Figura 11. Purificación de las proteínas recombinantes hIFN γ -hIL2 y hIFN γ -hIL2m	30

Índice de tablas

Tabla 1. Densitometría de las bandas correspondientes a las proteínas de fusión producidas en las cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y <i>E. coli</i> BL21-SI.	18
Tabla 2. Cuantificación de proteínas recombinantes hIL2-hIFN γ , hIFN γ -hIL2 y hIFN γ -hIL2m mediante ELISA, producidas en las cepas <i>E. coli</i> BL21DE3 y <i>E. coli</i> BL21SI.....	31

Anexos

Anexo 1. Formulación de medio mínimo mineral	43
Anexo 2. Formulación de elementos traza	43
Anexo 3. Formulación de PBS	43
Anexo 4. Formulación del buffer de solubilización	43
Anexo 5. Formulación del buffer de carga.....	44
Anexo 6. Formulación del buffer Towbin	44
Anexo 7. Formulación TBST	44
Anexo 8. Buffer AP	44
Anexo 9. Solución de teñido.....	45
Anexo 10. Solución de desteñido	45

Resumen

Expresión y purificación de tres proteínas de fusión hIL2 e hIFN γ en

Escherichia coli

La interleucina humana 2 (hIL-2) y el interferón gamma humano (hIFN- γ) son citoquinas relevantes como terapia conjunta contra el cáncer. Las cepas de *E. coli* BL21 DE3 y BL21-SI son capaces de expresar proteínas recombinantes por medio del sistema T7 utilizando IPTG para BL21 DE3 y NaCl para BL21-SI como inductores. La producción de proteínas de fusión recombinantes ofrece diversas ventajas, implica menos pasos durante la producción y purificación. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó la expresión de proteínas de fusión formadas por hIL-2 e hIFN- γ en *E. coli* BL21 DE3 y SI, estudiando tres proteínas de fusión: hIL2: hIFN γ , hIFN γ : hIL2 y hIFN γ : hIL2m, esta última contiene dos mutaciones puntuales realizadas en la fracción de hIL-2, T159S y K216E. Se evaluaron 20°C y 28°C como temperaturas de expresión, siendo esta la que mejor funcionó para producir las proteínas recombinantes. Utilizando anticuerpos específicos para hIFN γ y hIL2 se identificaron ambas citocinas en la fracción insoluble de los cultivos con las cepas *E. coli* BL21 DE3 y SI; observándose una concentración de 11.56 mg/L hasta 29.4 mg/L de proteínas al utilizar la cepa BL21-SI. Se requirió una etapa de solubilización antes de proceder con la purificación. Las tres proteínas de fusión se purificaron por separado mediante cromatografía de afinidad. Se recuperó entre el 35% y el 89% de la proteína recombinante del lisado celular, obteniendo porcentajes de pureza entre el 40% y el 85%, alcanzando 29.4 mg/L de proteína recombinante.

Palabras clave: *E. coli*, proteínas de fusión, hIFN γ , hIL-2, proteínas recombinantes.

Abstract

Expression and purification of three fusion proteins hIL2 and hIFN γ in

Escherichia coli

The human interleukin 2 (hIL-2) and human interferon gamma (hIFN- γ) are relevant cytokines used as combined cancer therapy. The strains of *E. coli* BL21 DE3 and BL21-SI are known to be capable of over expressing recombinant proteins by means of the T7 system using IPTG for BL21DE3 and NaCl for BL21-SI as inducers. The production of recombinant fusion proteins is advantageous, involves less steps during purification and production. Therefore, in this work we evaluated the expression of fusion proteins formed by hIL-2 and hIFN- γ in *E. coli* BL21 DE3 and SI in different arrays such as hIL2: hIFN γ , hIFN γ : hIL2 and hIFN γ : hIL2m, the latter contains two point mutations located in the fraction of hIL-2, T159S and K216E. We tested 20°C and 28°C as temperatures of expression, the last one improved the production of the recombinant proteins. The identity of these proteins was confirmed using specific antibodies for hIFN γ or hIL2 in the insoluble fraction of the cultures of *E. coli* strains BL21 DE3 and SI. Concentrations of recombinant proteins ranged of 11.56 mg / L up to 29.4 mg / L of proteins when using strain BL21-SI. A solubilization step was required prior proceeding with purification; all three fused proteins were purified separately by affinity chromatography. Between 35% and 89% of the recombinant protein from the whole lysate was recovered, obtaining a purity percentage between 40 % and 85 % and up to 29.4 mg/L of the fusion proteins.

Keywords: *E. coli*, fusion proteins, hIFN γ , hIL-2, recombinant proteins.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Proteínas de fusión

Los genes de fusión se originan uniendo partes de dos genes diferentes ya sean provenientes del mismo organismo o de organismos diferentes [1]. Las proteínas de fusión recombinantes ocupan un lugar central en el campo de la medicina al brindar una alternativa a diferentes problemas hasta ahora complicados de abordar [2], como el cáncer, en donde el uso de dos o más péptidos unidos en la misma proteína implica grandes ventajas al tener una o más actividades terapéuticas en una sola dosis, además de disminuir los costos de producción y mantener su actividad al momento de actuar sobre su blanco [3]. Se han producido proteínas de fusión uniendo diversas citocinas, un ejemplo es la unión de interleucina humana (hIL) -18 y 12 (hIL18-hIL2) para su uso como agente antitumoral y como activador del IFN γ , en este trabajo Du y col. demostraron que su efecto es equivalente al de suministrar por separado las citocinas, lo cual muestra la ventaja de administrar dos moléculas terapéuticas diferentes en una sola dosis [4]. Este tipo de proteínas de fusión se producen en organismos modelo, como *Escherichia coli*, utilizados para la producción de proteínas recombinantes [5].

1.2 Inmunoterapia para tratar Cáncer

Tan solo en el año 2015 se registraron un poco más de 85,000 muertes en México relacionadas con diferentes tipos de cáncer [6]. Actualmente se prueban y aplican

diferentes tratamientos para intentar combatirlo, entre estos tratamientos destaca la inmunoterapia. La inmunoterapia se enfoca principalmente, a promover la acción del sistema inmune que normalmente se ve disminuida en este tipo de patologías [7]. Se ha promovido su uso en formas de vacunas potenciales que actúen en la regresión de tumores y así tener procedimientos más eficientes contra el cáncer [8]. Se ha descubierto el gran potencial de la inmunoterapia desarrollando productos para tratar cáncer a base de anticuerpos y citocinas [9]. Dos de las proteínas de interés médico por su relevancia en el tratamiento de cáncer son: la interleucina-2 (hIL-2) [10] y el interferón gamma (hIFN- γ) [11]. Se ha observado que ambas proteínas promueven la actividad del sistema inmune para combatir cáncer, principalmente en melanomas o en cáncer renal metastasico [12], también se han probado en pacientes con cáncer gástrico, extendiendo la supervivencia de dichos pacientes [13].

1.3 Interleucina 2

La interleucina 2 (hIL-2) es una citocina producida por las células T, particularmente Th1, está compuesta por 153 aminoácidos, la cual actúa como factor de crecimiento de los linfocitos T, induciendo todos los tipos de subpoblaciones y activando la proliferación de linfocitos B [14]. La hIL-2 es indispensable en el funcionamiento del sistema inmune y la disminución de su producción o la de su receptor es responsable de patologías como inmunodeficiencias graves mixtas y la progresión de cáncer entre otras [15]

La hIL-2 se ha utilizado como un agente terapéutico contra algunos tipos de cáncer en forma de inmunoterapia logrando resultados positivos al aumentar las tasas de supervivencia y la regresión de tumores [16]. Existen reportes en donde se administró hIL-2 de forma simultánea con diferentes citocinas y se observó la activación de células del sistema inmune como las CD4⁺ y con ello evaluar el efecto que puedan tener en su conjunto sobre la disminución o hasta regresión parcial o total del cáncer [17]. Además, hIL-2 se ha empleado como proteína de fusión junto con hIL-18, obteniéndose resultados de actividad antitumoral favorables en una línea celular de cáncer de pulmón [4].

1.4 Interferón gamma

El interferón gamma (IFN- γ) es una citocina producida por células Th1, un tipo de linfocitos T, así como por las células NK (*Natural Killer*) [18]. Dentro del grupo de interferones, se considera el más abundante en condiciones normales en el organismo [19]. Se ha demostrado que tiene efectos pleiotrópicos activando la respuesta innata o adaptativa ante una infección [20], además se ha comprobado en ratones que la ausencia de esta citocina aumenta la sensibilidad ante agentes carcinogénicos, por lo que la aparición y progresión de cáncer es más rápida [21]. El hIFN- γ ha sido evaluado como proteína terapéutica para tratamiento de cáncer como melanomas o su implicación en la respuesta del sistema inmune frente al cáncer [22] con provocando la regresión de la lesión así como la muerte de las células identificadas como cancerosas al estimular la activación de macrófagos [23].

En condiciones patológicas los macrófagos se ven afectados de manera negativa evitando que realicen su tarea, el IFN- γ los activa propiciando que monten una respuesta inmunológica ante la amenaza de células anormales [24].

La presencia de IFN- γ es de suma importancia para combatir tumores relacionados a cáncer, ya que se han identificado que cuando su expresión disminuye las terapias contra el cáncer no surten el mismo efecto puesto que se relaciona directamente con la activación de la apoptosis [25].

Existen reportes de ensayos en pacientes en donde se probó hIFN- γ producido en *E. coli*, y se observó una notable actividad antitumoral [26]. Windbichler y col., suministraron hIFN γ de manera intraperitoneal en pacientes con cáncer de ovario y se observó un incremento en su tiempo de supervivencia. Por lo que se sugiere que podría usarse como terapia de segunda línea o bien al combinarse con quimioterapia después de una cirugía [27].

Considerando las actividades terapéuticas individuales de ambas citocinas, hIL2 y hIFN γ , llama la atención el poder generar una proteína de fusión que tenga ambas funciones en una sola construcción y con esto mejorar su acción terapéutica combinada [28]. En nuestro grupo de trabajo se hicieron tres diferentes construcciones que codifican a proteínas de fusión empleando hIL2 y hIFN γ , dos de ellas colocando Interferón gamma seguido de Interleucina 2, unidas mediante un puente molecular de glicinas: hIFN γ : hIL2 y hIFN γ :hIL2m, esta última con una mutación en la región cercana al extremo carboxilo de hIL-2, T159S y K216E, lo que podría conferirle características que favorezcan su efecto terapéutico. Y finalmente, la tercera construcción hIL2-hIFN γ unidas mediante un puente molecular[29].

Es con base a lo anterior que el objetivo principal de este trabajo fue expresar las proteínas de fusión hIL2: hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m en las cepas de *E. coli* BL21 DE3 y SI así como purificar las proteínas producidas en la cepa que tenga una mayor expresión. Así como establecer cual temperatura entre 20°C y 28°C funciona mejor para la producción de las proteínas recombinantes y evaluar si existe algún efecto del inductor de la expresión sobre la cantidad de proteína recombinante producida en las cepas *E. coli* BL21 DE3 y SI.

2 Metodología

2.1 Extracción de plásmido de la cepa *E. coli* BL21 DE3 y transformación de cepa *E. coli* BL21-SI

Se cultivó la cepa *E. coli* BL21 DE3 con cada una de las construcciones en 5 mL de medio LB durante 12 horas a 37°C y 185 RPM para obtener las tres diferentes construcciones hIL2-hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m. Posteriormente mediante lisis alcalina [30], se obtuvieron los plásmidos que fueron corroborados mediante restricción enzimática y corridas en un gel de agarosa al 1% [31]. Se hicieron células quimio-competentes utilizando cloruro de rubidio de la cepa *E. coli* BL21-SI [32], y fueron transformadas con las tres diferentes construcciones mediante choque térmico como se explica a continuación: en un tubo de 1.5 mL con 100 μ L de células competentes se le agregó el equivalente a 500 ng de plásmido, se mezcló gentilmente y se incubó en hielo por 30 minutos, después se colocó a 42°C por 45 segundos, se pasó a hielo por 2 minutos. Se le añadieron 500 μ L de medio LB y se incubaron a 37°C por 1 hora, 40 minutos sin agitación y 20 minutos con agitación leve (60 rpm), se recuperaron las células mediante centrifugación y se cultivaron en placas de medio LB adicionadas con kanamicina a 50 μ g/mL como antibiótico de selección a todas las construcciones. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche. Se realizó la selección de colonias las cuales se transfirieron a 5 mL de medio LB líquido adicionado con kanamicina a 50 μ g/mL, se incubaron a 37°C 12 horas en agitación. Se recuperaron las células mediante centrifugación y se realizó una extracción de plásmido casera para corroborar la presencia del plásmido, el

producto obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1%. La cepa BL21DE3 ya se encontraba transformada con los plásmidos de trabajo.

2.2 Ensayos de expresión para cepas *E. coli* BL21DE3 y BL21-SI

En los ensayos de expresión se utilizaron dos medios de cultivo, LB y medio mínimo mineral (Anexo 1), así como temperaturas de incubación de 20°C y 28°C, para encontrar las condiciones en las que las proteínas hIL2: hIFN γ , hIFN γ : hIL2 y hIFN γ : hIL2m se produjeran en mayor concentración. Para los preinoculos se utilizaron tubos tipo falcón de 15 mL, y para los ensayos de expresión se utilizaron matraces de 250 mL y 1 L.

Se utilizó como inductor isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM para la cepa BL21 DE3, mientras que para la cepa *E. coli* BL21-SI la inducción se hizo usando NaCl a 0.3 M. La inducción de la expresión se realizó al alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.6 a 0.7 en los cultivos.

Los ensayos de expresión se realizaron durante 15 horas post inducción después de las cuales se recuperaron las células por medio de centrifugación a una velocidad de 5000 rpm por 2 minutos a 4°C y se separaron las células (*pellet*) del medio de cultivo para su posterior procesamiento.

Se usaron cultivos de la cepa *E. coli* BL21 DE3, 24 horas post inducción para corroborar que existía expresión de las proteínas recombinantes. También se realizaron otros ensayos donde se tomaron muestras cada 3 horas para medir proteína total y producción de biomasa, así como para identificar la proteína de fusión mediante Western blot (WB).

2.3 Lisis celular y separación de fracciones

Las células recuperadas (*pellet*) fueron resuspendidas en 1 mL de PBS (Anexo 3) 0.1 M colocando 1 mL de buffer por cada 10 mL de cultivo colectado. Las células fueron lisadas usando un sonicador de punta (SONICS Vibracell™) con una amplitud del 40%, brevemente, se colocaron 100 µL de muestra en un tubo de 1.5 mL colocado en hielo y se sonicaron en intervalos de 10 segundos. Después, se realizó la separación de las fracciones, las muestras fueron centrifugadas a 11,000 rpm por 15 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante (fracción soluble) y se almacenó a -20°C para su posterior análisis. La pastilla (fracción insoluble) se resuspendió en 100 µL de PBS 0.1 M por cada 1 mL de cultivo y a ambas fracciones se les adicionó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF Sigma Aldrich™) como inhibidor de proteasas a una concentración final de 0.5 mM y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

2.4 Solubilización de fracción insoluble

La fracción insoluble se resuspendió en 1 mL del buffer de Solubilización (Anexo 4) por cada 20 mL de muestra original. Esta muestra se lisó utilizando un sonicador de punta a una amplitud de 40% por intervalos de 10 segundos para un volumen de 100 µL siempre manteniendo la muestra en hielo, se centrifugó a 11,000 rpm por 15 minutos a 4°C para recuperar lo solubilizado del lisado total, se recuperó la fracción soluble y se adicionó PMSF a una concentración final de 0.5 mM, las muestras se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

2.5 Identificación de proteínas recombinantes por Western blot y tinción por azul de Coomassie

Se realizó la cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford [33]. Las muestras se prepararon adicionándoles buffer de carga 6x (Anexo 5), después se colocaron a 95°C-100°C por diez minutos.

El gel de poliacrilamida SDS-PAGE se preparó con un gel concentrador a una concentración de 17% y un gel separador a una concentración de 4%. Se realizó la electroforesis a 140 V por 90 minutos, el gel se usó para análisis de proteínas por WB, o bien para tinción con Azul de Coomassie.

Para el análisis por WB, la transferencia del gel de poliacrilamida hacia la membrana de nitrocelulosa previamente activada en buffer Towbin (Anexo 6) con 20% de metanol por 20 minutos al igual que el gel de poliacrilamida, se realizó mediante transferencia semi seca a 10 V por 60 minutos. A continuación, la membrana se bloqueó con leche baja en grasa al 10% resuspendida en TBST (Anexo 7) durante una hora en agitación, posteriormente se realizaron 3 lavados con TBST de 7 minutos cada uno y se añadió el anticuerpo primario, se utilizaron anti-IL2 y anti-IFN γ (Peprotech) para las tres proteínas recombinantes en diferentes pasos del proceso, a una dilución de 1:2000 con respecto al TBST adicionado con 5% de BSA (Equitech-bio®). La membrana se incubó a 4°C toda la noche con agitación a 30 rpm, después se realizaron 3 lavados de TBST de 7 minutos cada uno, a continuación, se agregó el anticuerpo secundario el cual fue anti-IgG de conejo (Invitrogen) que contiene una fosfatasa alcalina conjugada, el cual fue resuspendido

en TBST con leche al 5%. Se incubó por 1.5 h en agitación a temperatura ambiente: Se realizaron 3 lavados más con TBST para agregar buffer AP (Anexo 8) y agitar por 15 minutos, después se reveló usando el substrato para la fosfatasa alcalina BCIP/NBT, agregando 66 μ l de BCIP y 33 μ l de NBT a una concentración ambos de 50 mg/ml por cada 10 ml de buffer AP, se mantuvo en agitación hasta que se observó señal y se inactivó la reacción con agua destilada. El análisis de intensidad de banda y porcentaje de pureza en las purificaciones se realizó con el software *ImageJ*.

Para llevar a cabo la identificación de las proteínas recombinantes se realizó Western blot utilizando anticuerpos policlonales específicos para cada proteína: anti-hIL-2 (Peprotech®) y anti-hIFN γ (Peprotech®).

Los geles de poliacrilamida se tiñeron usando Azul Coomassie, los geles se colocaron en solución de teñido (Anexo 9) toda la noche a temperatura ambiente en agitación, después fueron colocadas en solución de desteñido (Anexo 10) en agitación hasta que se pudieron observar bandas con claridad. Los geles de poliacrilamida se almacenaron a temperatura ambiente en agua destilada.

2.5 Cromatografía por afinidad

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó utilizando el kit Ni-NTA Purification System de Invitrogen™. Los sobrenadantes de la lisis celular solubilizados se pasaron por una columna de cromatografía con 3 mL de la resina Ni-NTA. Las proteínas se eluyeron usando diferentes concentraciones de imidazol

(20 mM - 500 mM) en una solución a pH 7.3. Se tomaron 4 fracciones de 1.5 mL de cada una de las concentraciones de Imidazol y fueron almacenadas a -20°C para su posterior análisis. La cuantificación de proteína recombinante se hizo mediante ELISA utilizando Human IFN- γ Standard ABTS ELISA Development Kit® de PEPROTECH™.

2.6 Análisis de cuantificación de biomasa

La cuantificación de biomasa se realizó tomando 1 mL de muestra, midiendo la densidad óptica mediante un espectrofotómetro (Varian Cary®) a una OD de 600nm. Después se utilizó el valor de la OD₆₀₀ para obtener el peso celular seco utilizando una curva estándar (1 OD₆₀₀=0.37 g/L de peso seco) y así obtener la biomasa de los cultivos.

3 RESULTADOS

3.1 Expresión de proteínas recombinantes hIL2: hIFN γ , hIFN γ : hIL2 y hIFN γ : hIL2m en *E. coli* BL21DE3

Se llevaron a cabo ensayos de expresión en la cepa *E. coli* BL21 DE3, después de 24 horas de inducción se realizó un análisis mediante WB para corroborar la expresión de las proteínas. Como se muestra en la figura 1 se detectaron las proteínas recombinantes tanto en la fracción soluble como en la insoluble. Se localizó la banda en un tamaño aproximado de 35 kDa que era lo esperado al de las proteínas de fusión. Las bandas fueron correspondientes a los ensayos de expresión inducidos durante 24 horas en medio LB y utilizando IPTG como inductor de la cepa BL21 DE3. La señal fue tenue y presente en ambas fracciones, aunque sin mostrar gran intensidad en las bandas, esto debido a que probablemente las proteínas comenzaban a degradarse o no se sobre expresaban como se esperaba, por ello se decidió evaluar qué tiempo post inducción nos permitía encontrar a las proteínas de fusión en mayor abundancia dado que 24 horas no fue el tiempo adecuado.

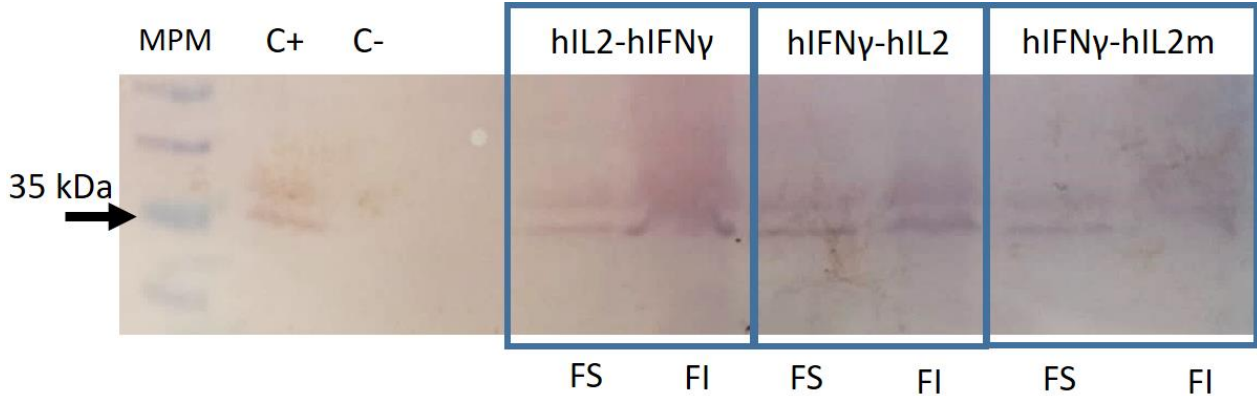
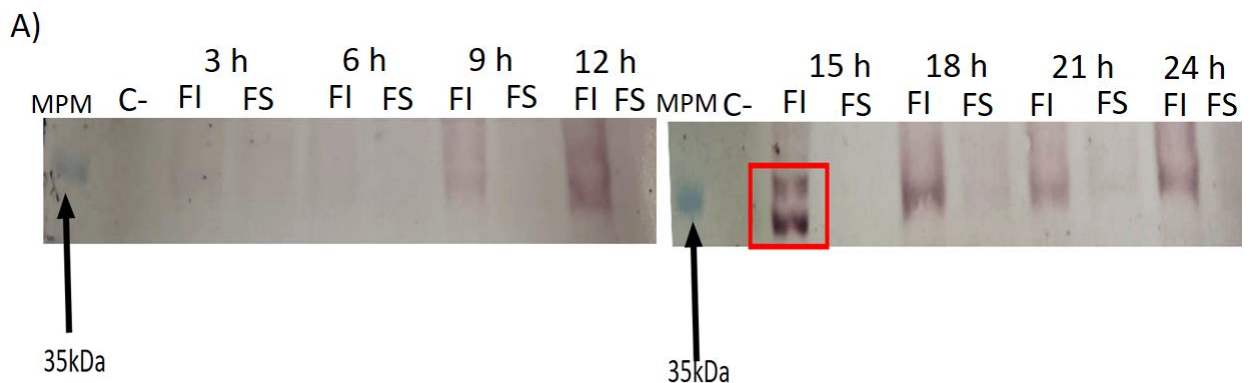


Figura 1. Identificación de proteínas de fusión hIL2-hIFN γ , hIFN γ -hIL2 y hIFN γ -IL2m mediante Western blot

Mediante la utilización un anticuerpo específico para hIFN γ se logró localizar a las tres proteínas recombinantes en la cepa BL21-DE3. Se observan bandas en ambas fracciones en un peso de 35 kDa. La colecta de muestra fue 24 horas después de la inducción. MPM: marcador de peso molecular, FI: Fracción insoluble, FS: Fracción soluble

Por lo cual se optó por realizar cinéticas de producción en las cuales se tomó muestra cada 3 h post inducción de los cultivos con cada una de las cepas evaluadas. En la figura 2A se observa el Western blot de la proteína recombinante hIL2:hIFN γ obtenida de la cepa BL21 DE3 como ejemplo representativo, usando un anticuerpo anti hIFN γ , se realizó la expresión a 28°C utilizando medio LB e IPTG a una concentración de 1 mM como inductor. Se analizaron las muestras obtenidas a diferentes tiempo post inducción, estas condiciones fueron utilizadas para las tres proteínas de fusión en esta cepa. Para los análisis por WB se cargaron con 500 μ g de proteína total, el resultado fue que la señal en la fracción insoluble fue claramente identificada, se observó una banda en el peso molecular correspondiente a 35 kDa a las 15 h después de la inducción, con una mayor intensidad con respecto al resto de los tiempos lo que permitió saber en qué tiempo existe una mayor cantidad de

proteína recombinante en el cultivo, mientras que en la fracción soluble no se detectó la señal correspondiente a nuestra proteína recombinante lo cual ocurrió en las tres construcciones utilizadas. En la figura 2B podemos apreciar el WB correspondiente a la fusión hIFN γ : hIL2 obtenida de igual manera de la cepa BL21DE3, se analizaron muestras obtenidas a diferentes tiempos post inducción, las condiciones mencionadas anteriormente fueron utilizadas en las tres proteínas expresadas en la cepa BL21DE3. Observamos que para esta proteína la expresión se concentró en la fracción insoluble lo que indica que la estructura no afectó la fracción en la que se identificó. Se localizaron las tres proteínas recombinantes solo en la fracción insoluble, pero no se logró localizarlas mediante tinción de Coomassie lo que podría indicar que no existe una expresión visible mediante este método.



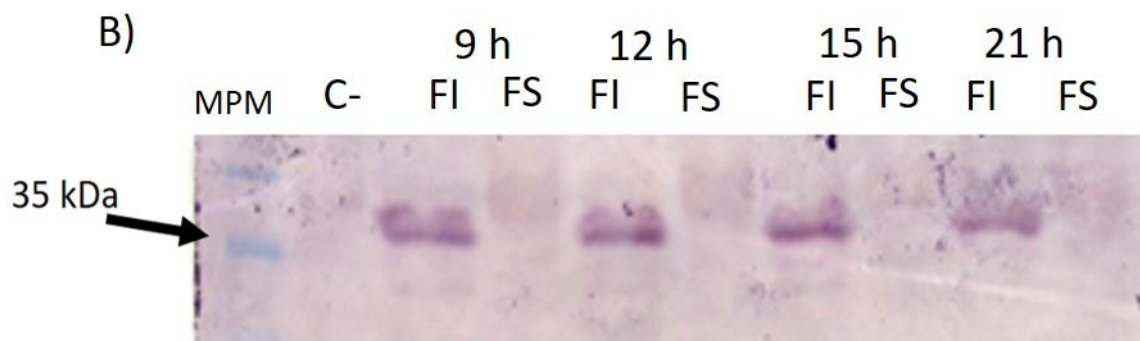


Figura 2. Localización de las proteínas hIL2-hIFN γ , hIFN γ -hIL2 en *E. coli* BL21 DE3 a diferentes tiempos en la fracción insoluble

Se observan muestras tomadas a diferentes tiempos después de la inducción en la cepa *E. coli* BL21 DE3. A) Proteína recombinante hIL2: hIFN γ . B) Proteína recombinante hIFN γ -hIL2. Las muestras utilizadas fueron tomadas de cultivos en medio LB, incubados a 28 °C y se utilizó IPTG como inductor. MPM: marcador de peso molecular, FI: Fracción insoluble, FS: Fracción soluble. C-: Control negativo

3.2 Expresión de proteínas recombinantes hIL2: hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m en *E. coli* BL21-SI

Se evaluó la cepa *E. coli* BL21-SI para producir las proteínas recombinantes mediante un inductor más económico y evaluar si las proteínas se expresaban en mayor cantidad, dado que en la cepa BL21DE3, aunque fue posible la identificación mediante WB, al tratar de localizar la proteína recombinante por tinción de Coomassie no se tuvo éxito lo que indicaría una baja expresión. Por lo cual se realizaron ensayos con la cepa BL21-SI con cada uno de los plásmidos que expresan las proteínas de fusión recombinantes. Esta cepa NaCl 0.3 M un inductor económicamente más favorable por su bajo costo. Se realizaron ensayos de expresión de las tres construcciones: hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m utilizando medio mínimo mineral a una temperatura de 28°C y NaCl 0.3 M como

inductor. La figura 3 muestra un gel de poliacrilamida SDS-PAGE con las fracciones solubles e insolubles correspondientes a los tiempos de 12, 15 y 18 h post inducción para la proteína hIL2:hIFN γ , el gel fue teñido con azul de Coomassie. Se observó una banda en el peso esperado (35 kDa) mayoritariamente a las 15 h, la cual no se observó en el control negativo (C-) (Fig. 3), y tampoco se observó en la fracción soluble lo cual al ser identificada en la cepa BL21-SI y no en la BL21DE3 se podría decir que existe una mayor proporción de las proteínas recombinantes en la cepa BL21-SI con respecto a la BL21DE3.

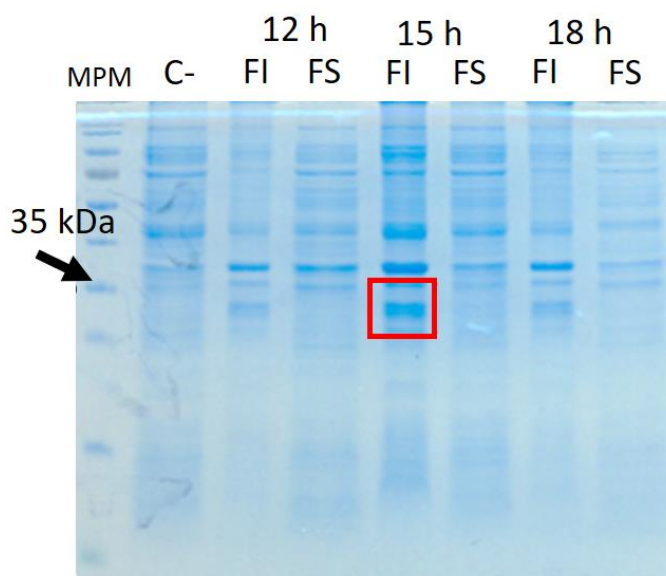


Figura 3. Localización de la proteína de fusión hIL2-hIFN γ producida en la cepa *E. coli* BL21 SI a 28°C.

Análisis de extracto de proteínas donde se observan las fracciones solubles e insolubles de muestras tomadas en diferentes tiempos tras la inducción de la proteína de fusión hIL2-hIFN γ en la cepa BL21-SI incubada a 28 °C, donde es evidente que en las fracciones insolubles resalta una banda aproximada a los 35 kDa que no se observa en las fracciones solubles. MPM: marcador de peso molecular, FI: Fracción insoluble, FS: Fracción soluble. C-: Control negativo

La identidad de las proteínas se confirmó mediante WB utilizando un anticuerpo específico que reconoce hIL-2. En la figura 4A podemos observar que se identificó la proteína hIL2-hIFN γ en la fracción insoluble principalmente en los tiempos de 12,15,18 y 24 h post inducción principalmente en fracción insoluble. Así mismo, en la figura 4B se identificó la proteína hIFN γ : hIL2 obtenida de igual manera de la cepa BL21-SI expresada a 28°C utilizando medio mínimo mineral y NaCl 0.3M como inductor, se analizaron muestras obtenidas a diferentes tiempos post inducción, estas condiciones fueron repetidas en todas las proteínas expresadas en la cepa BL21-SI. Se localizó en todos los casos la proteína solo en la fracción insoluble. Aunque al poder identificar al menos una proteína recombinante utilizando una tinción de Coomassie se consideró a la cepa BL21-SI como un modelo de expresión más adecuado con respecto a la BL21DE3, así que se realizó un análisis semi cuantitativo de las bandas obtenidas en ambas cepas para encontrar en donde se tenía una mayor expresión, este análisis mostró una mayor intensidad en las bandas que correspondían a la proteína recombinante, esto con respecto a la producida en la cepa *E. coli* BL21 DE3 (Tabla 1). Esto ayudó a definir que la cepa BL21-SI resultó más adecuada para llevar a cabo la expresión y purificación de las proteínas de fusión recombinantes al utilizarse una temperatura de 28°C y 15 horas podría ser el tiempo indicado para la expresión de las proteínas de fusión recombinantes de interés.

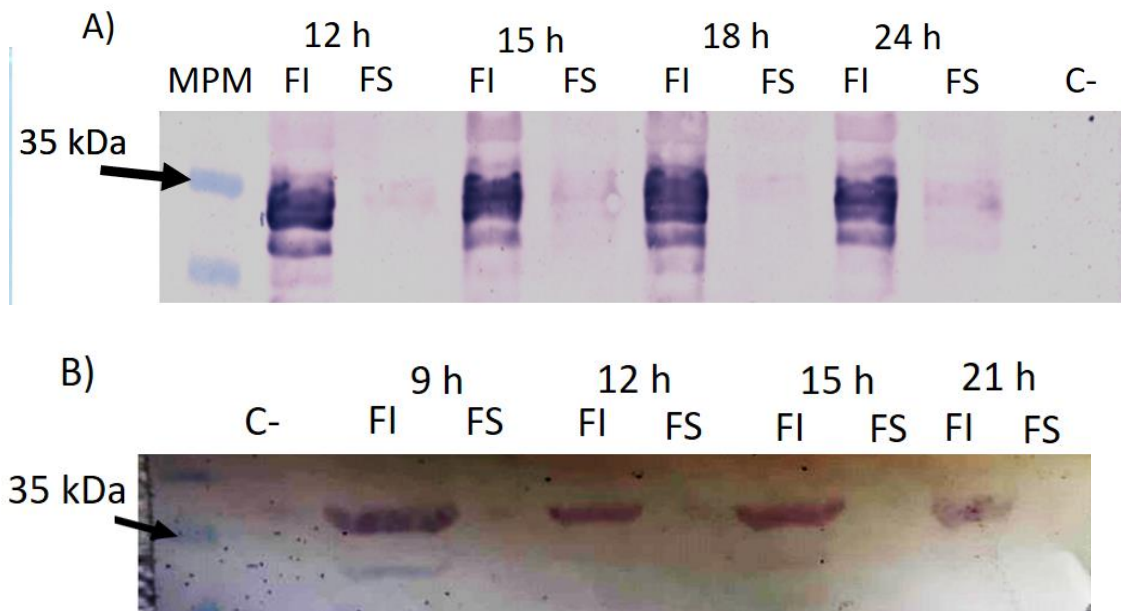


Figura 4. Identificación mediante Western blot de la proteína de fusión hIL2-hIFN γ y hIFN γ -hIL2 producidas en la cepa *E. coli* BL21 SI

Análisis de proteínas recombinantes mediante Western blot usando anti-IL2. A) Análisis correspondiente a la construcción hIL2-hIFN γ con muestras tomadas a las 9h,12h,15h, 18h y 24h después de la inducción. B) Proteína recombinantes hIFN γ :hIL2 con muestras tomadas a las 9 h,12 h,15 h, y 21 h después de la inducción. muestras incubadas a 28 °C en medio mínimo mineral utilizando NaCl 0.3M como inductor MPM: marcador de peso molecular, FI: Fracción insoluble, FS: Fracción soluble. C -: control negativo.

Tabla 1. Densitometría de las bandas correspondientes a las proteínas de fusión producidas en las cepas *E. coli* BL21DE3 y *E. coli* BL21-SI.

Proteína de fusión	Densitometría en cepa BL21 DE3 a 28°C	Densitometría en cepa BL21SI a 28°C
hIL2- hIFN γ	82	165
hIFN γ -hIL2	82	149
hIFN γ -hIL2m	77	144

*Los datos son el promedio de las lecturas n=3

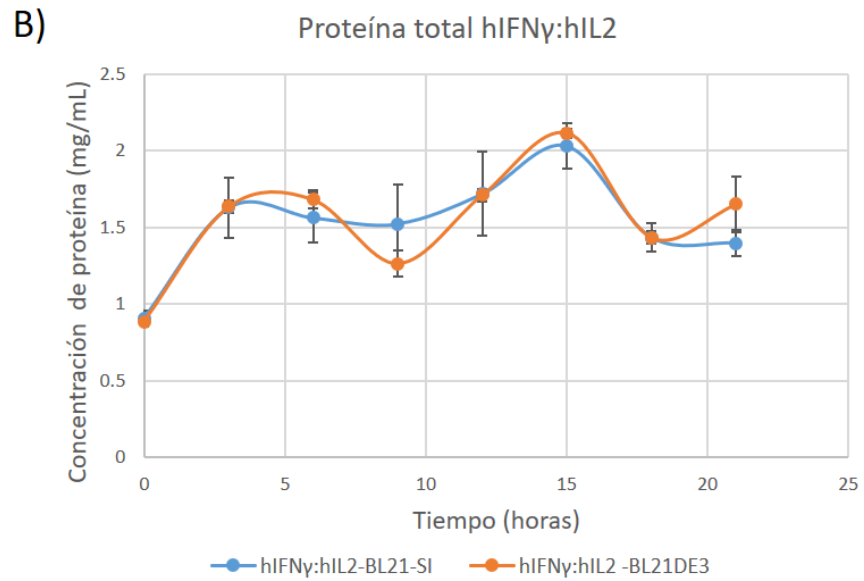
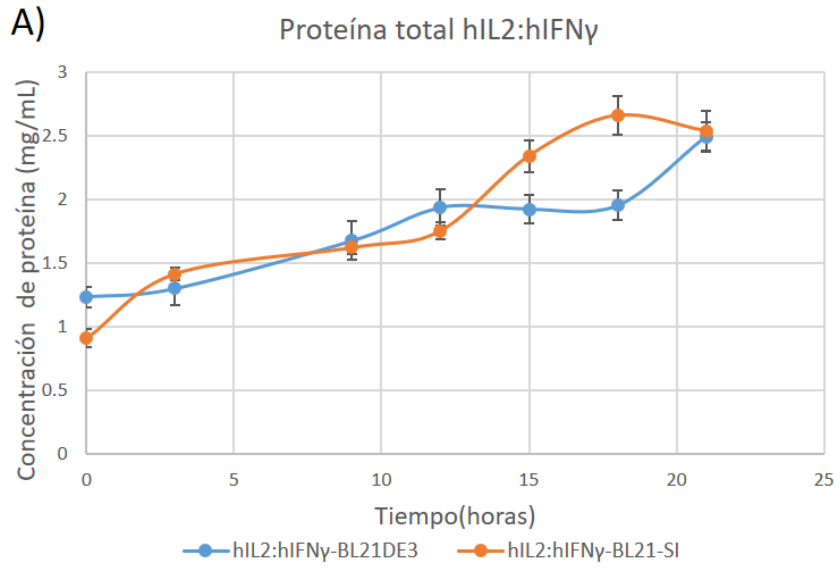
3.3 Evaluación de la producción de la proteína total y biomasa post inducción en las cepas *E. coli* BL21DE3 y *E. coli* BL21-SI

Para identificar si existía diferencia en utilizar las cepas de *E. coli* BL21 DE3 y SI sobre la producción de las proteínas totales, se realizaron ensayos de expresión con ambas cepas. La cepa BL21 DE3 se indujo con IPTG 1 mM, mientras que la cepa BL21-SI se indujo con NaCl 0.3 M. Como se aprecia en la Figura 5, se observó que no hay diferencia en lo que respecta a la proteína total producida por ambas cepas, aun cuando se utilizaron diferentes inductores, obteniendo a las 15 horas en ambas cepas entre 2 mg/mL y 2.5 mg/mL en todos los casos.

Por otra parte, se evaluó la biomasa producida por ambas cepas con cada una de las construcciones de proteínas de fusión. Como se muestra en la Figura 6, para hIL2:hIFN γ (Fig. 6A), hIFN γ :hIL2 (Fig. 6B) y hIFN γ :hIL2m (Fig. 6C), no muestran diferencias entre la cepa BL21DE3 y BL21-SI, produciendo un promedio de 0.6 g/L de biomasa a las 15 en todos los casos. Esto nos permitió establecer 15 horas como el mejor tiempo de expresión. Con base a los resultados anteriores, se puede observar que no hubo impacto por el tipo de inductor y/o el fondo genético de la cepa evaluada a 28°C.

La temperatura fue otro factor que se evaluó sobre la producción de las proteínas recombinantes, por ello se realizó un ensayo bajando la temperatura a 20°C, ya que esto podría aumentar la cantidad de proteína recombinante en la fracción soluble, lo que puede facilitar su posterior purificación. Como se puede observar en la figura

7A se llevó a cabo un ensayo de expresión para la fusión hIFN γ :hIL2 en la cepa *E. coli* BL21 DE3 utilizando IPTG 1 mM medio LB y una temperatura de 20°C donde las muestras tomadas 3 horas post inducción fueron teñidas por azul de Coomassi, sin poder observar ninguna banda que correspondiera a nuestra proteína recombinante, por su parte en el ensayo realizado en la cepa BL21-SI donde se utilizó medio mínimo mineral y NaCl 0.3M tampoco mostro ninguna banda que pudiera identificarse como nuestra proteína recombinantes (Fig.7B). Se procedió a realizar WB a las muestras de ambos ensayos y se lograron identificar la proteína de fusión en la cepa BL21 DE3 únicamente (Fig. 7C), en la cepa BL21-SI no fue posible la identificación por WB, lo que podría indicar que al bajar la temperatura afecta negativamente la expresión de las proteínas recombinantes. Para comprobar si la temperatura estaba implicada directamente en la producción de nuestras proteínas se realizaron análisis de producción de biomasa y proteína total en cultivos incubados a 20°C. La diferencia encontrada fue que el crecimiento celular se vio afectado en ambas cepas a los 20°C como se muestra en la Figura 8. Con esto se descartó la posibilidad de bajar la temperatura de expresión y se estableció 28°C como la temperatura para la producción y se eligió la cepa BL21-SI como la cepa a utilizar para la expresión de las tres proteínas recombinantes, además se decidió solubilizar las proteínas después de su recuperación ya que en todos los casos las proteínas de fusión se encontraron en la fracción insoluble.



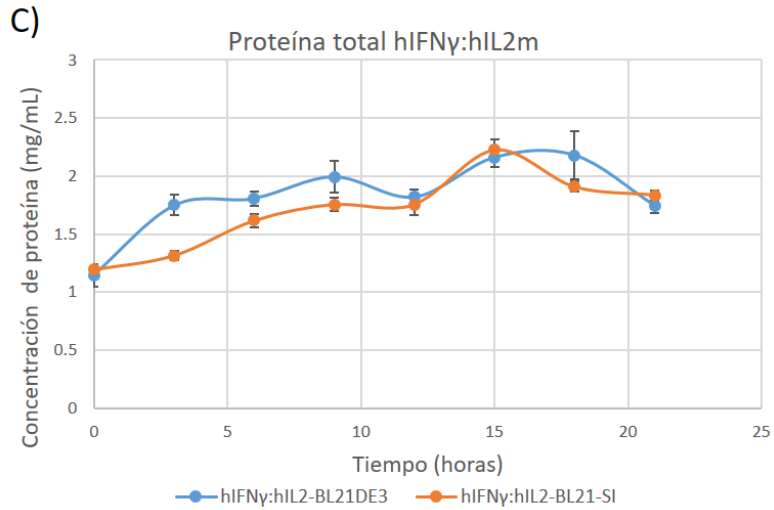
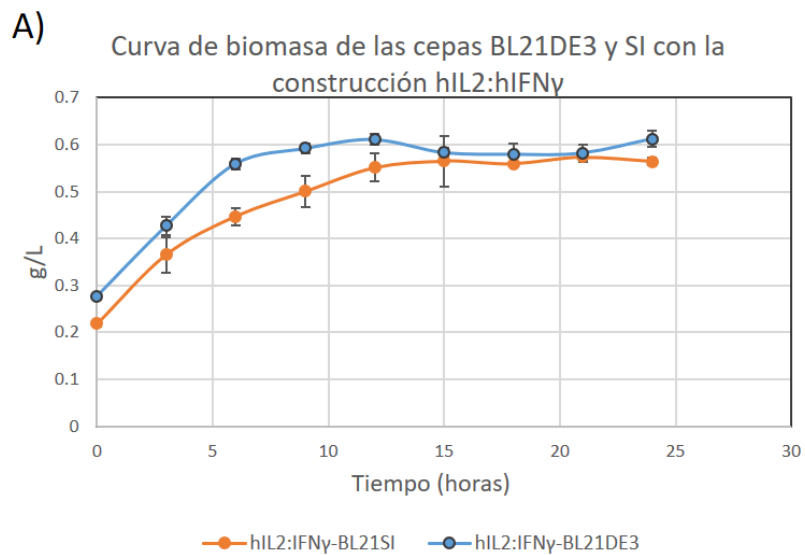


Figura 5. Evaluación de la producción de proteína total en cepas *E. coli* BL21 DE3 y BL21-SI que contenían las construcciones hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m

Las gráficas muestran curvas de proteína total de las tres construcciones con las cepas *E. coli* BL21 DE3 y BL21-SI. a) Proteína total de las cepas que contienen la construcción hIL2:hIFN γ evaluada cada 3 horas. b) Proteína total de las cepas que contienen la construcción hIFN γ :hIL2. c) Proteína total de las cepas que contienen la construcción hIFN γ :hIL2m. Los ensayos se realizaron a 28°C utilizando IPTG 1 mM para la cepa BLDE3 y NaCl 0.3 M para BL21-SI n=3, barras de error: desviación estándar.



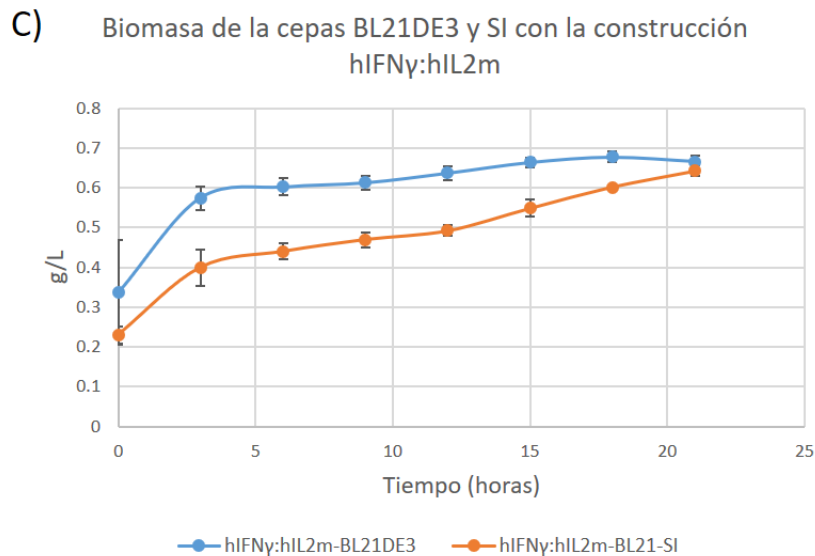
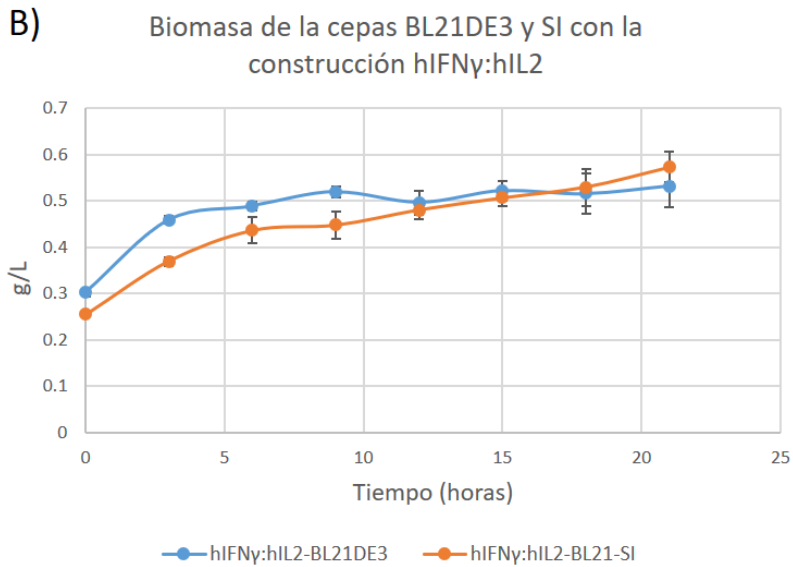


Figura 6. Evaluación de la producción de biomasa en cepas *E. coli* BL21DE3 y BL21-SI que contenían las construcciones hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m

Se evaluó la producción de biomasa de las tres construcciones con las cepas *E. coli* BL21 DE3 y BL21-SI cada 3 horas. a) Biomasa de las cepas que contienen la construcción hIL2:hIFN γ evaluada cada 3 horas. b) Biomasa de las cepas que contienen la construcción hIFN γ :hIL2. c) Biomasa de las

cepas que contienen la construcción hIFN γ :hIL2m. Los ensayos se realizaron a 28°C utilizando IPTG 1 mM para la cepa BLDE3 y NaCl 0.3 M para BL21-SI n=3, barras de error: desviación estándar.

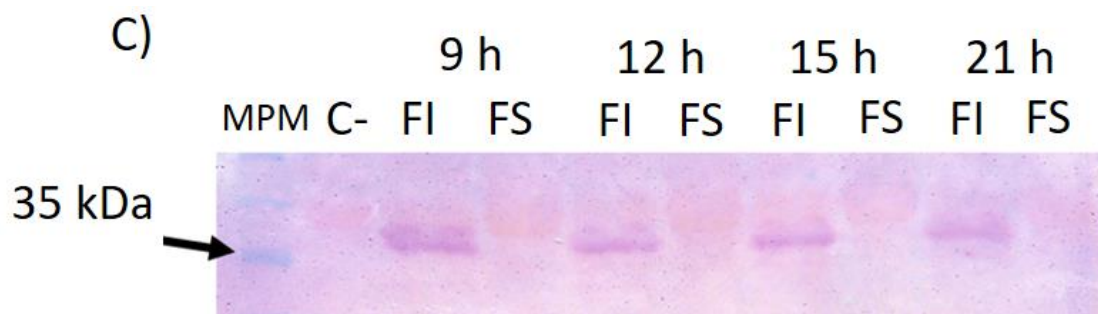
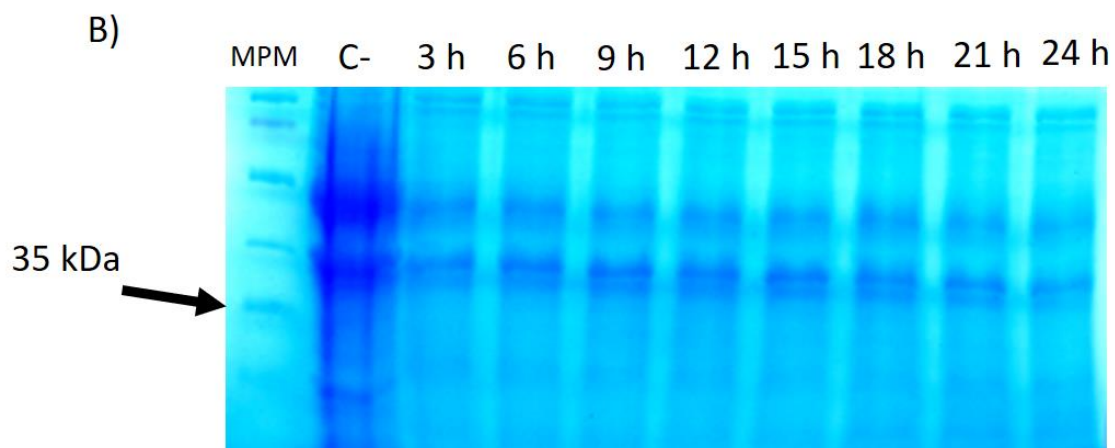
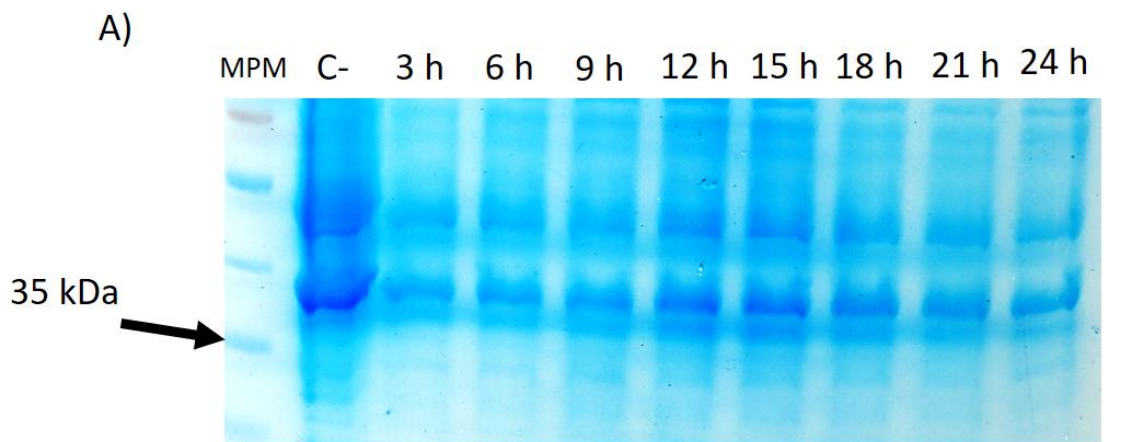
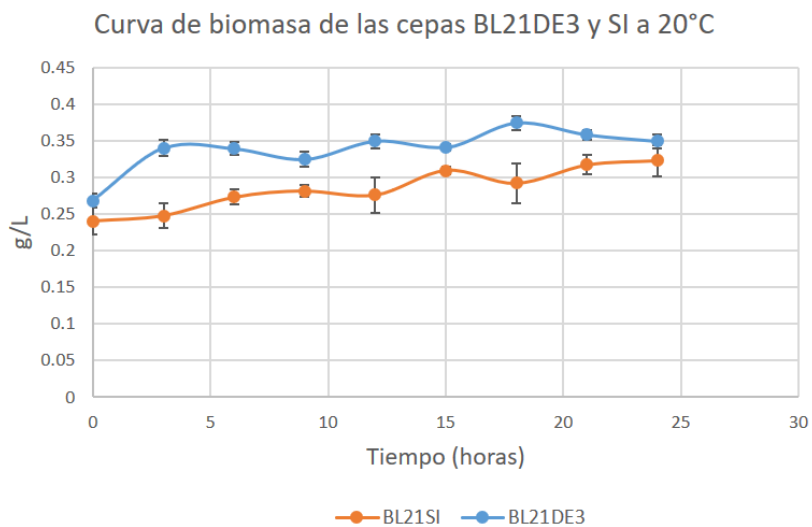


Figura 7. Ensayos de expresión de proteína recombinante en cepas *E. coli* BL21DE3 y BL21-SI a 20 °C.

a) y b) Geles de poliacrilamida teñidos con azul de coomassie de muestras obtenidas de ambas muestras cada tres horas post inducción. a) Extracto de proteínas total de *E. coli* BL21 DE3 que expresa la construcción hIFNy:hIL2 incubada a 20°C. b) Extracto de proteínas total de *E. coli* BL21-SI que expresa la construcción hIFNy:hIL2 incubada a 20°C. c) Western blot de extracto de proteína total de *E. coli* BL21DE3. MPM: marcador de peso molecular. C-: Cepa sin construcción.

A)



B)

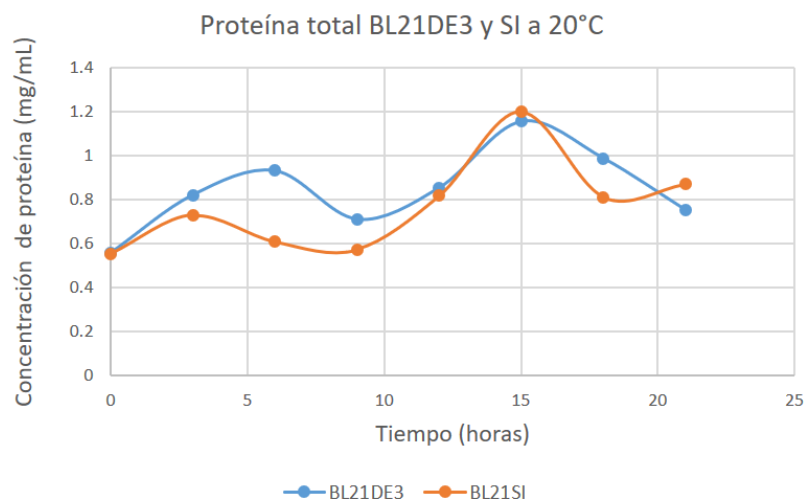


Figura 8. Evaluación de la producción de biomasa y proteína total en cepas *E. coli* BL21DE3 y BL21-SI a 20 °C.

Análisis de producción de biomasa y proteína total en cepas *E. coli* BL21DE3 y BL21-SI a una temperatura de 20°C. a) Evaluación de biomasa producida por ambas cepas. b) Concentración de proteína total en cepas a distintos tiempos post inducción a 20°C. n=3, barras de error: desviación estándar.

3.4 Solubilización de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m producidas en *E. coli* BL21-SI

Los cultivos de la cepa *E. coli* BL21-SI con cada una de las construcciones se incubaron a 28°C en medio mínimo mineral, al alcanzar una OD₆₀₀ de 0.7 se indujo la expresión de las proteínas recombinantes con NaCl 0.3 M, después de 15 horas se recuperó el pellet celular, y se solubilizo con urea 8M y sonicando. Para comprobar si el proceso de solubilización funcionó se realizó un WB del sobrenadante recuperado. La identidad de estas proteínas fue confirmada utilizando anti-hIL2 y como observamos en la figura 9A se identificó la proteína de fusión hIL2:hIFN γ , por su parte en la figura 9B se observa la identificación de las proteínas recombinantes hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m, se observa una sola banda para cada proteína lo que indica que el proceso de solubilización funcionó para las tres proteínas recombinantes. Se cuantificó la proteína total, antes y después del paso de solubilización, lo que nos permitió estimar que se logró obtener alrededor del 70% de la proteína total mediante el método de solubilización, para posteriormente tratar mediante una columna de cromatografía Ni-NTA.

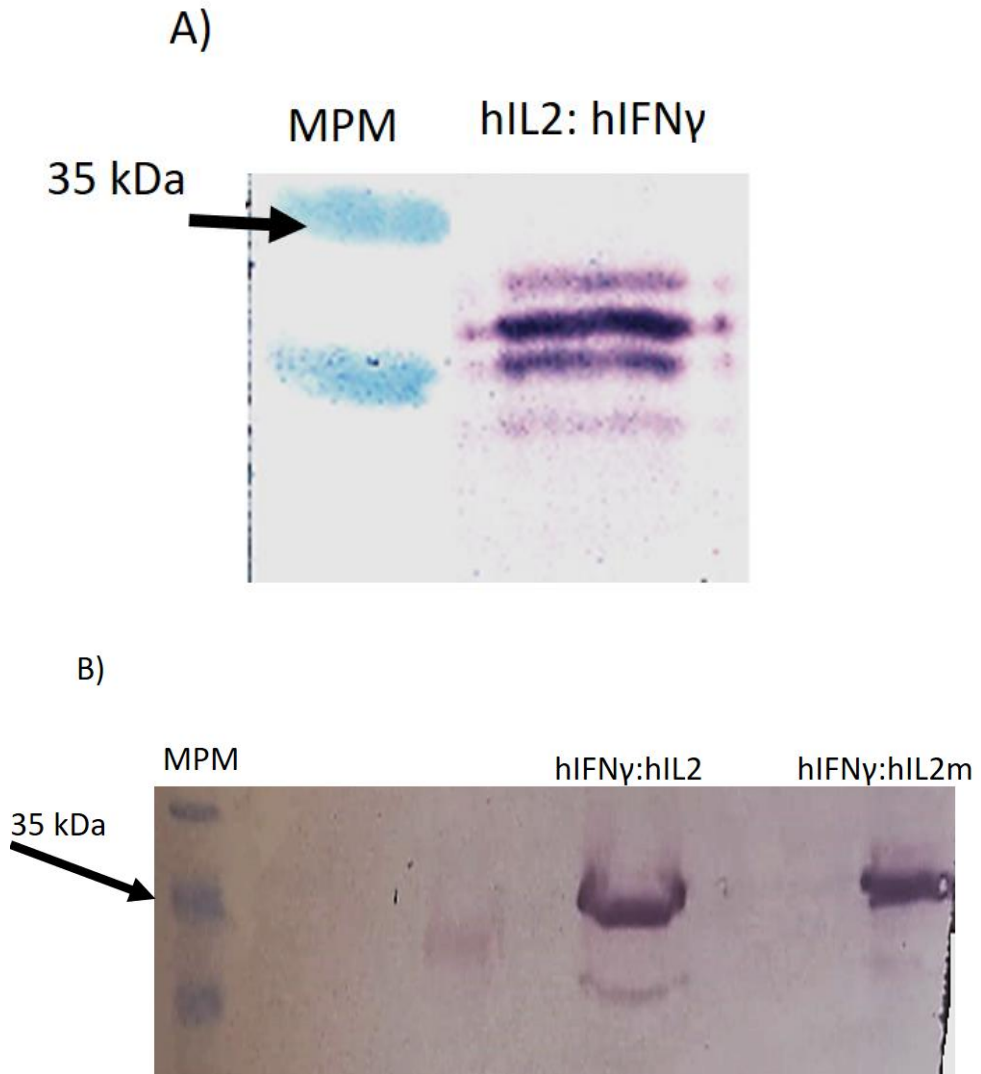


Figura 9. Identificación de las proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m solubilizadas

Western blot para corroborar la identidad de las proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m de muestras solubilizadas. a) Identificación de las proteínas recombinantes mediante un anticuerpo específico para hIL-2. b) Posibles isoformas de la proteína recombinante hIL2:hIFN γ . Se solubilizo con una solución que contenía urea 8 M, posteriormente se sónico y se recuperó el sobrenadante por centrifugación

3.5 Purificación y cuantificación proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m expresadas en *E. coli* BL21-SI

Las fracciones solubilizadas se purificaron mediante columna de cromatografía por afinidad. En la figura 10A se muestra un gel SDS-PAGE para la expresión de la proteína hIL2:hIFN γ donde se observa que esta proteína eluye en mayor proporción en 50 mM y 100 mM de imidazol, la identidad de la proteína se confirmó mediante WB (Fig.10B).

Las concentraciones de imidazol donde eluyeron hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m, son 150 mM y 200 mM (Fig. 11A), la identidad de las proteínas se confirmó mediante WB (Fig. 11B). Las fracciones recuperadas se obtuvieron con un porcentaje de pureza para hIL2:hIFN γ de hasta 40%, 55% para hIFN γ :hIL2 y 85% para hIFN γ :hIL2m, y fue semicuantificado mediante el programa *imageJ*.

Se obtuvo una producción de 11.56 mg/L de la proteína hIL2:hIFN γ , por el método de ELISA, la cual se produjo en la cepa BL21-SI. Por otro lado, la proteína hIFN γ :hIL2 se produjo 29.4 mg/L y al purificarla se recuperó un 63% y finalmente de la proteína hIFN γ :hIL2m se obtuvieron 26.4 mg/L de los cuales se recuperó un 89% al purificarse, estas cantidades superan a las producidas por la cepa *E. coli* BL21 DE3 como se aprecia en la tabla 2.

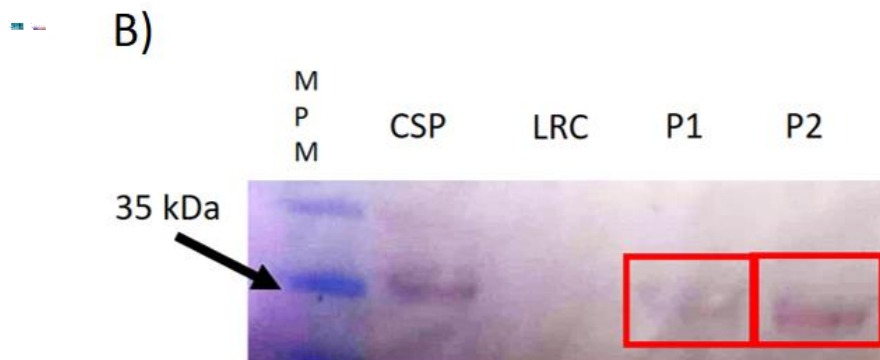
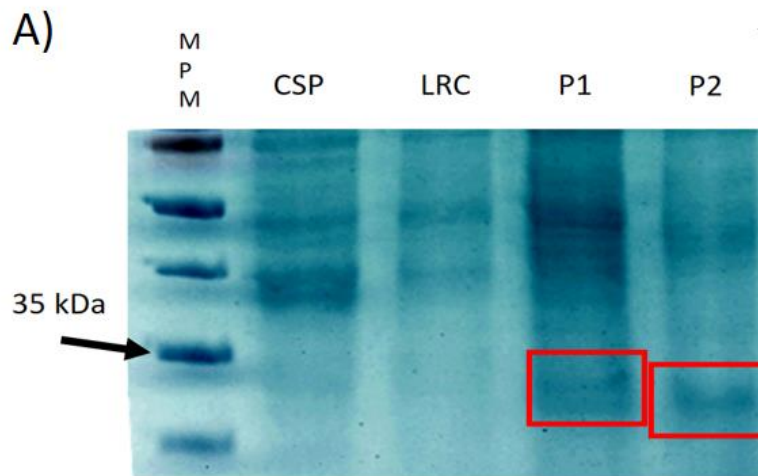


Figura 10. Purificación de la proteína recombinante hIL2:hIFN γ

Purificación de la proteína hIL2:hIFN γ mediante cromatografía de afinidad. a) Tinción de Coomassie de las fracciones eluidas 50 mM y 100 mM de imidazol. b) Western blot de las fracciones eluidas, además de un lisado celular sin purificar. Producidas en *E. coli* BL21-SI a 28°C con medio mínimo mineral.

MPM: Marcador de peso molecular CSP: Control de la proteína hIL-2:hINF- γ sin purificar. LRC: Lavado recuperado de la purificación. P1: Purificación 50mM de Imidazol P2: Purificación 100mM de Imidazol.

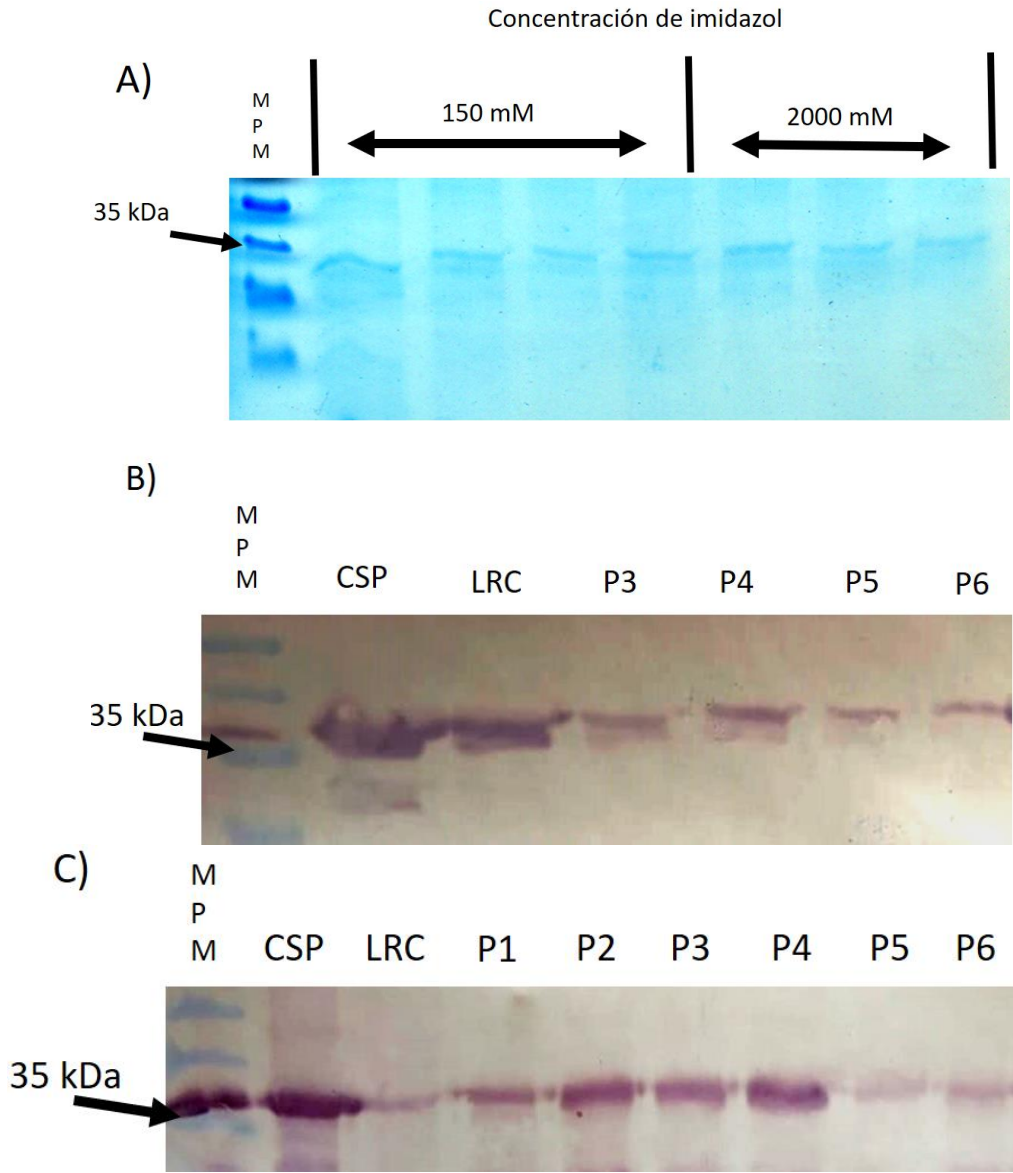


Figura 11. Purificación de las proteínas recombinantes hIFN γ -hIL2 y hIFN γ -hIL2m producidas en la cepa *E. coli* BL21-SI

Resultado de la purificación de las proteínas recombinantes hIFN γ -hIL2 y hIFN γ -hIL2m. a) Tinción de Coomassie de la proteína hIFN γ -hIL2m con concentraciones de imidazol 150 mM y 200 mM b) Western blot correspondiente a la proteína hIFN γ -hIL2m eluida a diferentes concentraciones de

imidazol usando anticuerpo contra hIL-2 para su identificación. c) Western blot de la proteína hIFN γ -hIL2 eluida con imidazol e identificada por medio de un anticuerpo específico contra hIL-2. CSP: Control de la proteína hIL-2:hINF- γ sin purificar. LRC: Lavado recuperado de la purificación. P1: Purificación 50mM de Imidazol P2: Purificación 100mM de Imidazol. P3: Purificación 150mM de Imidazol. P4: Purificación 200mM de Imidazol. P5: Purificación 250mM de Imidazol. P6: Purificación 500mM de Imidazol.

Tabla 2. Cuantificación de proteínas recombinantes hIL2-hIFN γ , hIFN γ -hIL2 y hIFN γ -hIL2m mediante ELISA, producidas en las cepas *E. coli* BL21DE3 y *E. coli* BL21SI.

Proteína de fusión	Concentración de proteína recombinante en cepa BL21 DE3 (mg/L)	Concentración de proteína recombinante en cepa BL21-SI (mg/L)	Concentración de proteína recombinante purificada en cepa BL21-SI (mg/L)
hIL2- hIFN γ	5.7	11.56	4.04
hIFN γ -hIL2	12.83	29.4	18.62
hIFN γ -hIL2m	14.5	26.4	23.6

*Los datos son el promedio de las lecturas por duplicado

4 DISCUSION

4.1 Expresión de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m en *E. coli* BL21DE3

Las proteínas hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m se encontraron únicamente en la fracción insoluble, esto podría deberse dado que la formación de cuerpos de inclusión está relacionada a las condiciones de expresión, una gran expresión de la proteína recombinante, además de la estructura y tamaño de la proteína [29, 34]. Estas proteínas se han producido de manera independiente en el mismo vector y se encontraron en la fracción soluble principalmente [35][36]. Se ha reportado que otras citocinas como la interleucina 3 expresada en una fusión con alguna otra proteína del mismo tipo en este caso la thioredoxina, se localiza principalmente en la fracción insoluble aunque la primera sea muy soluble de manera individual lo que significaría que el tipo de proteína afecta el grado de solubilidad [37].

4.2 Expresión de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m en *E. coli* BL21-SI

La cepa BL21-SI fue utilizada en otro trabajo para expresar hIFN γ concluyendo que la mayor expresión se lograba a las 16 horas [38], estos resultados se asemejan a los nuestros al obtener mayor cantidad de proteína a las 15 h post inducción. La cepa BL21-SI ha sido utilizada con éxito en la producción de una proteína de fusión Lsa21-DnaK [39], por esta razón se eligió para expresar las proteínas hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m, sin embargo como sucedió con las dos cepas que

utilizamos *E. coli* BL21DE3 y *E. coli* BL21-SI, la proteína fue localizada solo en la fracción insoluble.

4.3 Comparación entre cepas *E. coli* BL21DE3 y *E. coli* BL21-SI

Una razón de la posible mejora en la producción de las proteínas recombinantes en *E. coli* BL21-SI con respecto a la BL21 DE3 podría ser que se ha reportado que en esta última la expresión de las proteínas resulta tóxica por si sola [40], a esto se le agrega el hecho que se ha reportado que usar IPTG como inductor puede contribuir a esta toxicidad y alterar el metabolismo celular [41], a diferencia de la BL21-SI que usa NaCl como inductor y que en trabajos de expresión de proteínas ha producido diversas proteínas de manera exitosa [42].

Existe evidencia de que al disminuir la temperatura de expresión se incrementa la cantidad de proteína producida y se dirige la expresión de las proteínas a la fracción soluble al mejorar su plegamiento [43], sin embargo, las proteínas recombinantes se localizaron solamente en la fracción insoluble, además de que al bajar la temperatura de expresión disminuyó el crecimiento celular, lo que disminuyó también la producción de proteínas, por eso se decidió que una temperatura de incubación a 28°C era la más adecuada.

4.4 Solubilización de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m producidas en *E. coli* BL21-SI

Con respecto a los resultados obtenidos en la solubilización, logrando recuperar más de la mitad de la proteína total, esto concuerda con trabajos donde se recuperó una proteína recombinante beta amiloide de cuerpos de inclusión mediante el

método de disolución con urea 8 M donde se logró alrededor del 70% de la proteína total localizada en la fracción insoluble [44].

El método de solubilización con urea para recuperar proteína recombinante sigue siendo el más utilizado pues hay trabajos que comprueban que la actividad de la proteína se mantiene aún después de solubilizarse [45]. El proceso de solubilización ayudó a recuperar a ñas proteínas recombinantes localizadas en los cuerpos de inclusión.

4.5 Purificación y cuantificación de proteínas recombinantes hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m expresadas en *E. coli* BL21-SI

Los resultados obtenidos en la purificación de las tres proteínas producidas en la cepa *E. coli* BL21-SI fueron mejores que los que se obtuvieron con la cepa BL21 DE3 en este y trabajos anteriores [29]. La cepa BL21-SI resultó más eficiente para la producción de estas proteínas de fusión por el bajo costo de su inductor, existen trabajos donde el costo del inductor es un factor importante en la producción de proteínas recombinantes [47]. La producción con la cepa BL21-SI en específico es superior con respecto a otras proteínas de fusión que lograban solo hasta 0.83 mg/L[48] en comparación con las usadas en este trabajo que fueron expresadas en la cepa BL21-SI alcanzando hasta los 29.4 mg/L.

5 CONCLUSIONES

Usando la cepa *E. coli* BL21-SI se logra expresar una mayor cantidad de las proteínas de fusión hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m con respecto a la cepa *E. coli* BL21 DE3, esto representa una ventaja desde un punto de vista económico ya que el inductor (NaCl) que es utilizado para *E. coli* BL21-SI es más barato comparado con el IPTG que requiere la cepa BL21 DE3. La temperatura de 28°C resulta ser mejor que 20°C para la expresión de las proteínas, así como el uso de medio mínimo mineral. Además, se lograron solubilizar y purificar de manera exitosa las tres proteínas recombinantes de la fracción insoluble. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la cepa *E. coli* BL-SI puede ser una alternativa para la producción de proteínas de fusión de interés biomédico.

6 PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos celulares con las proteínas hIL2:hIFN γ , hIFN γ :hIL2 y hIFN γ :hIL2m para probar su actividad.
- Producir las proteínas recombinantes en un sistema eucariota para expresar proteínas humanizadas.
- Comparar la actividad entre las proteínas producidas en el sistema procariota y eucariota.
- Probar las proteínas en un modelo de cáncer.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Chen, X.; Zaro, J.L.; Shen, W.C. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 1357–1369.
2. Akash, M.S.H.; Rehman, K.; Tariq, M.; Chen, S. Development of therapeutic proteins: Advances and challenges. *Turkish J. Biol.* **2015**, *39*, 343–358.
3. Rosenberg, S.A.; Boel, P.; Wildmann, C.; Sensi, M.L.; Brasseur, R.; Renauld, J.C.; Coulie, P.; Boon, T.; Bruggen, P. Van der; Boon, T.; et al. A New Era for Cancer Immunotherapy Based on the Genes that Encode Cancer Antigens. *Immunity* **1999**, *10*, 281–287.
4. Du, G.; Ye, L.; Zhang, G.; Dong, Q.; Liu, K.; Tian, J. Human IL18-IL2 fusion protein as a potential antitumor reagent by enhancing NK cell cytotoxicity and IFN- γ production. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2012**, *138*, 1727–1736.
5. Baneyx, F. Recombinant protein expression in Escherichia coli. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999, *10*, 411–421.
6. Aldaco-Sarvide, F.; Pérez-Pérez, P.; Cervantes-Sánchez, G.; Torrecillas, L.; Erazo-V, A.E. Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *Gac Mex Onco* **2018**.
7. Blattman, J.N.; Greenberg, P.D. Cancer Immunotherapy : **2004**, *305*, 200–206.
8. Rosenberg, S.A.; Yang, J.C.; Restifo, N.P. Cancer immunotherapy : moving beyond current vaccines. **2004**, *10*, 909–915.
9. Focus, N. Cancer Immunotherapy. **2013**, *342*, 1432–1434.
10. Ouyang, G.F.; Saio, M.; Suwa, T.; Imai, H.; Nakagawa, J.; Nonaka, K.;

- Umemura, N.; Kijima, M.; Takami, T. Interleukin-2 augmented activation of tumor associated macrophage plays the main role in MHC class I in vivo induction in tumor cells that are MHC negative in vitro. *Int. J. Oncol.* **2006**, *28*, 1201–1208.
11. Dobrzanski, M.J.; Reome, J.B.; Dutton, R.W. Immunopotentiating role of IFN- γ in early and late stages of type 1 CD8 effector cell-mediated tumor rejection. *Clin. Immunol.* **2001**, *98*, 70–84.
 12. Smyth, M.J.; Kershaw, M.H. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. **2004**, *202*, 275–293.
 13. Shi, L.; Zhou, Q.; Wu, J. Efficacy of adjuvant immunotherapy with cytokine-induced killer cells in patients with locally advanced gastric cancer. **2012**, 2251–2259.
 14. Liao, W.; Lin, J.X.; Leonard, W.J. IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23*, 598–604.
 15. Minami, Y.; Kana, T.; Miyazaki, T.; Taniguchi, T.; Biology, C. THE IL-2 RECEPTOR COMPLEX : Its Structure , Function , and Target. **1993**.
 16. Rosenberg, S.A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 5451–5458.
 17. Paliard, X.; de Waal Malefijt, R.; Yssel, H.; Blanchard, D.; Chrétien, I.; Abrams, J.; de Vries, J.; Spits, H. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN- γ by activated human CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones. *J. Immunol.* **1988**, *141*, 849–855.

18. Marchi, L.F.; Sesti-Costa, R.; Ignacchiti, M.D.C.; Chedraoui-Silva, S.; Mantovani, B. In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: Increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *18*, 228–235.
19. Zaidi, M.R.; Merlino, G. The two faces of interferon- γ in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 6118–6124.
20. Bach, E.A.; Aguet, M.; Schreiber, R.D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* **1997**.
21. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 11–22.
22. Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. **2002**, *13*, 95–109.
23. Szabo, S.J. Distinct Effects of T-bet in TH1 Lineage Commitment and IFN-gamma Production in CD4 and CD8 T Cells. *Science (80-.)*. **2002**, *295*, 338–342.
24. Mantovani, A.; Sica, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* **2010**, *22*, 231–237.
25. Gao, J.; Shi, L.Z.; Zhao, H.; Chen, J.; Xiong, L.; He, Q.; Chen, T.; Roszik, J.; Bernatchez, C.; Woodman, S.E.; et al. Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell* **2016**, *167*, 397–404.e9.
26. Overacre-Delgoffe, A.E.; Chikina, M.; Dadey, R.E.; Yano, H.; Brunazzi, E.A.;

- Shayan, G.; Horne, W.; Moskovitz, J.M.; Kolls, J.K.; Sander, C.; et al. Interferon- γ Drives Treg Fragility to Promote Anti-tumor Immunity. *Cell* **2017**, *169*, 1130–1141.e11.
27. Windbichler, G.H.; Hausmaninger, H.; Stummvoll, W.; Graf, A.H.; Kainz, C.; Lahodny, J.; Denison, U.; Müller-Holzner, E.; Marth, C. Interferon-gamma in the first-line therapy of ovarian cancer: a randomized phase III trial. *Br. J. Cancer* **2000**, *82*, 1138–44.
28. Sørensen, H.P.; Mortensen, K.K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* **2005**, *115*, 113–128.
29. Cruz Álvarez, Araceli . De León Rodríguez, Antonio .Barba De la Rosa, A.P. EXPRESIÓN Y BIOACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN INTERFERÓN GAMA HUMANO E INTERLEUCINA 2 HUMANA. *Inst. Potos. Investig. Cient. y Tecnol. C.V S.A* **2007**, *51*.
30. ChinaliG., F.I. A Modified Alkaline Lysis Method for the Preparation of Highly Purified Plasmid DNA from *Escherichia Coli*. *Anal. Biochem.* **1993**, *212*, 394–401.
31. Ehrt S., S.D. *Isolation of Plasmids from E. coli by Alkaline Lysis*; Methods in.; MIMB, 2003;
32. Renzette, N. Generation of Transformation Competent *E. coli*. **2011**, 1–5.
33. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**.

34. Kane, J.F.; Hartley, D.L. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. **1988**, *6*.
35. Seno, M.; Hinuma, S.; Onda, H.; Igarashi, K. A hybrid protein between IFN-gamma and IL-2. *FEBS Lett.* **1986**, *199*, 187–92.
36. Medina-Rivero, E.; Balderas-Hernández, V.E.; Ordoñez-Acevedo, L.G.; Paz-Maldonado, L.M.T.; Barba-De La Rosa, A.P.; De León-Rodríguez, A. Modified penicillin acylase signal peptide allows the periplasmic production of soluble human interferon- γ but not of soluble human interleukin-2 by the Tat pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1369–1374.
37. Davis, G.D.; Elisee, C.; Newham, D.M.; Harrison, R.G. to Give Soluble Expression in *Escherichia coli*. **1999**, *3*.
38. Balderas Hernández, V.E.; Paz Maldonado, L.M.T.; Medina Rivero, E.; Barba de la Rosa, A.P.; Ordoñez Acevedo, L.G.; De León Rodríguez, A. Optimization of human interferon gamma production in *Escherichia coli* by response surface methodology. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2008**, *13*, 7–13.
39. Atzingen, M. V; Rodriguez, D.; Siqueira, G.H.; Leite, L.C.C.; Nascimento, A.L.T.O. Induction of Boosted Immune Response in Mice by Leptospiral Surface Proteins Expressed in Fusion with DnaK. **2014**, *2014*.
40. Wagner, S.; Klepsch, M.M.; Schlegel, S.; Appel, A.; Draheim, R.; Tarry, M.; Wijk, K.J. Van; Slotboom, D.J.; Persson, J.O.; Gier, J. De Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. **2008**, *105*, 14371–14376.
41. Dvorak, P.; Chrast, L.; Nikel, P.I.; Fedr, R.; Soucek, K.; Sedlackova, M.; Chaloupkova, R.; Lorenzo, V.; Prokop, Z.; Damborsky, J. Exacerbation of

- substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microb. Cell Fact.* **2015**, *14*, 1–15.
42. Li, X.; Alvarez, B.; Casey, J.R.; Reithmeier, R.A.F.; Fliegel, L. Carbonic anhydrase II binds to and enhances activity of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36085–36091.
 43. Hoffmann, F.; Rinas, U. Kinetics of Heat-Shock Response and Inclusion Body Formation During Temperature-Induced Production of Basic Fibroblast Growth Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. **2000**, 1000–1007.
 44. Singh, A.; Upadhyay, V.; Upadhyay, A.K.; Singh, S.M.; Panda, A.K. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **2015**, 1–10.
 45. Quaas, A.B.; Burmeister, L.; Li, Z.; Nimtz, M.; Hoffmann, A.; Rinas, U. SC. *Process Biochem.* **2018**.
 46. Smith, R.S.; Scholz, J.T.; Gray, W.; Burns, R.M.; Gray, W.B.; Ruder, T.; Mendeloff, J.; Lanoie, P.; Patry, M.; Marcin, J.P.; et al. Cost-Benefit Tradeoffs in Engineered. **2012**, *339*, 911–916.
 47. Karakus, C.; Uslu, M.; Yazici, D.; Salih, B.A. Evaluation of Immobilized Metal Affinity Chromatography Kits for the Purification of Histidine-Tagged Recombinant CagA Protein. *Elsevier B.V.* **2015**.
 48. Vazquez, G.; Carmen, R.; Rodriguez, A.D.L. Novel Fusion Protein Derived from Vasostatin 30 and Vasoinhibin II-14 . 1 Potently Inhibits Coronary Endothelial Cell Proliferation. **2013**, 920–929.

8 ANEXOS

Anexo 1. Formulación de medio mínimo mineral

Medio mínimo mineral 1 Lt	
Glucosa	5 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.5 g
KH ₂ PO ₄	3.5 g
MgSO ₄	1 g
Tiamina	40 µg
Elementos Traza	Anexo A2
Extracto de levadura	5 g

Anexo 2. Formulación de elementos traza

Elementos traza 1 Lt	
FeCl ₃	2.7 g
ZnCl ₂	2 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	2 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 g
CuCl ₂ · 2H ₂ O	1 g
H ₃ BO ₃	0.5 g
HCl	100 mL

Anexo 3. Formulación de PBS

PBS 0.1 M	
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Anexo 4. Formulación del buffer de solubilización

Buffer de solubilización	
Urea	8 M
NaH ₂ HPO ₄	0.1 M
Tris-HCl	0.01 M

Ajustar pH a 7.4 con NaOH

Anexo 5. Formulación del buffer de carga

Buffer de carga	
Tris-HCl 1 M pH 6.8	0.6 mL
Glicerol 50%	5 mL
SDS 10%	2 mL
2-β-mercaptoetanol	0.5 mL
Azul de bromofenol 1%	1 mL
H ₂ O destilada	0.9 mL

Anexo 6. Formulación del buffer Towbin

Buffer de transferencia Towbin	
Tris-base	25 mM
Glicina	192 mM

Disolver en metanol al 20%

Anexo 7. Formulación TBST

TBST 1X 1Lt	
Tris-HCl	2 mM
NaCl	15 mM
Tween-20	1 mL

Anexo 8. Buffer AP

100 ml Buffer AP 1x	
Tris base	1.21 g
NaCl	0.58 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.51 g

Anexo 9. Solución de teñido

Solución de Coomassie	
Azul de Coomassie	0.125 g
Ácido acético	22.5 mL
Metanol	22.5 mL
Agua destilada	c.b.p. 50 mL

Anexo 10. Solución de desteñido

Solución de desteñido 500 mL	
Ácido acético	37.5 mL
Metanol	125 mL
H ₂ O	c.b.p. 500 mL