

COMUNICACIÓN CORTA

Purificación de los cuerpos de inclusión que contienen a la proteína L1 del Virus del Papiloma Humano 16 producidos en la cepa Rosetta de *Escherichia coli*.

Alina Falero-Morejón, Susana Brito-Molina, Danay González-Acevedo-Forte, Yunier Serrano-Rivero, Giovet Aldama-Paz, Elsa Pimienta-Rodriguez y Karen Marrero-Domínguez.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave 25 y 158, Cubanacán, Playa, La Habana.
alina.falero@cnic.edu.cu

Recibido: 14 de septiembre de 2015.

Aceptado: 23 de septiembre de 2015.

Palabras clave: *proteínas recombinantes, Escherichia coli, cuerpos de inclusión, proteína L1 HPV.*

Key words: *recombinant proteins, Escherichia coli, inclusion bodies, HPV L1, protein.*

INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas recombinantes es muy utilizada actualmente en la industria biotecnológica para la obtención de diferentes vacunas. Uno de los hospederos más importantes para la producción de estas proteínas es la bacteria *Escherichia coli*, por su fácil manipulación genética, lo que posibilita la expresión de una amplia gama de proteínas, mediante procedimientos relativamente económicos.^{1,2} Esta bacteria ha sido caracterizada genética y fisiológicamente y puede ser transformada con una gran variedad de vectores de expresión estables. Por otra parte, *E. coli* permite cumplir con las regulaciones vigentes en esta rama de la industria ya que está aprobada por las entidades reguladoras para su utilización como hospedero en la producción de biofármacos.^{3,4}

Las proteínas recombinantes pueden ser expresadas de forma soluble o insoluble. Las proteínas insolubles se acumulan intracelularmente formando cuerpos de inclusión en el citoplasma bacteriano, y eventualmente en el periplasma.⁵ Los cuerpos de inclusión son agregados altamente específicos y están compuestos fundamentalmente por la proteína recombinante de interés, por lo que su aislamiento y purificación, previo a la solubilización y renaturalización, contribuye significativamente al incremento del grado de pureza de la proteína.

Para la purificación de los cuerpos de inclusión se han descrito varios protocolos,⁶⁻¹⁰ que incluyen la lisis bacteriana mediante métodos mecánicos, no mecánicos o la combinación de ambos, así como varios pasos de lavado con bajas concentraciones de agentes desnaturalizantes, sacarosa o detergentes.¹¹ La separación de los cuerpos de inclusión del resto de los componentes presentes en el lisado celular se puede lograr también mediante la centrifugación,⁶ la ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa⁷ y la microfiltración.⁸ La solubilización y la renaturalización de proteínas en cuerpos de inclusión relativamente puros también reducen el número de pasos cromatográficos durante

la purificación final de la proteína expresada. Dado que la presencia de proteínas contaminantes reduce el rendimiento del proceso de renaturalización de proteínas desnaturalizadas, el aislamiento y purificación de los cuerpos de inclusión hasta la homogeneidad antes de la solubilización mejora el rendimiento de la proteína bioactiva a partir de los cuerpos de inclusión.

En el laboratorio de los autores se obtuvo una construcción genética que permite la producción de la proteína L1 del virus del papiloma humano 16 en la cepa Rosetta de *E. coli*. Estudios iniciales indicaron que la proteína L1 se expresa fundamentalmente de manera insoluble, en cuerpos de inclusión. Se ha descrito que el establecimiento de un proceso apropiado de aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión en *E. coli* permite obtener preparaciones con más de un 95% de pureza.¹² Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la eficiencia de los detergentes Tritón X-100, Sarcosyl y Tween 80 para eliminar las proteínas contaminantes presentes en las preparaciones de los cuerpos de inclusión contentivos de la proteína L1 del VPH 16, producidos en la cepa *E. coli* Rosetta.

Para obtener los cuerpos de inclusión, la cepa de *E. coli* Rosetta (DE3) transformada con el plasmidio pETHPV1611-Myc-6xHis, que codifica para una proteína L1 fusionada en el C-terminal a 6 residuos de histidina y el epitope Myc, se cultivó en 1 L de medio de autoinducción¹³ durante 16 h a 37°C, 250 rpm. Se centrifugó a 6 000 rev min⁻¹ durante 20 min a 4°C y el precipitado celular se resuspendió en 30 ml de disolución estabilizadora Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, NaCl 300 mM. Las células se lisaron en una prensa francesa, empleando una presión de entre 1200-1500 Kgf/cm², durante tres ciclos de 1 min, aproximadamente. Para los lavados de los cuerpos de inclusión con los diferentes detergentes se tomaron alícuotas de 500 µl del lisado celular. Estas alícuotas se centrifugaron a 14 000 rev min⁻¹ durante 20 min a 4°C y el precipitado correspondiente a cada alícuota se resuspendió a razón de 10 mg/mL⁹ en disolución estabilizadora de fosfato de sodio (PBS) con los siguientes aditivos: Tritón X-100 (0,5; 1 y 2,5 %), Sarcosyl (0,05; 0,1 y 0,2 %) o Tween 80 (0,05 %). Las muestras se incubaron durante 1 h en zaranda a 100 rev min⁻¹ a temperatura ambiente y se centrifugaron a 14 000 rev min⁻¹ durante 20 min a 4°C. El precipitado y el sobrenadante (lavado 1) se evaluaron por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10 %, empleando azul brillante de Coomassie para visualizar las bandas proteicas. Posteriormente se realizó un segundo lavado a cada una de los precipitados con 1 mL de PBS y se evaluaron por SDS-PAGE. Las proteínas se aplicaron al gel junto con una muestra aislada anteriormente de la proteína L1 de HPV 16, usada como control interno en este ensayo.

El análisis mediante SDS-PAGE evidenció que de los tres detergentes evaluados, el que extrajo más proteínas contaminantes fue el sarcosyl, y que el Tritón X-100 y el Tween 80 extrajeron muy pocas contaminantes. No obstante, en los sobrenadantes de los lavados de los cuerpos de inclusión con sarcosyl se encontró una banda con similar migración electroforética que el control interno (Fig. 1), observándose un incremento en la intensidad de esta banda en la medida que aumenta la concentración de sarcosyl.

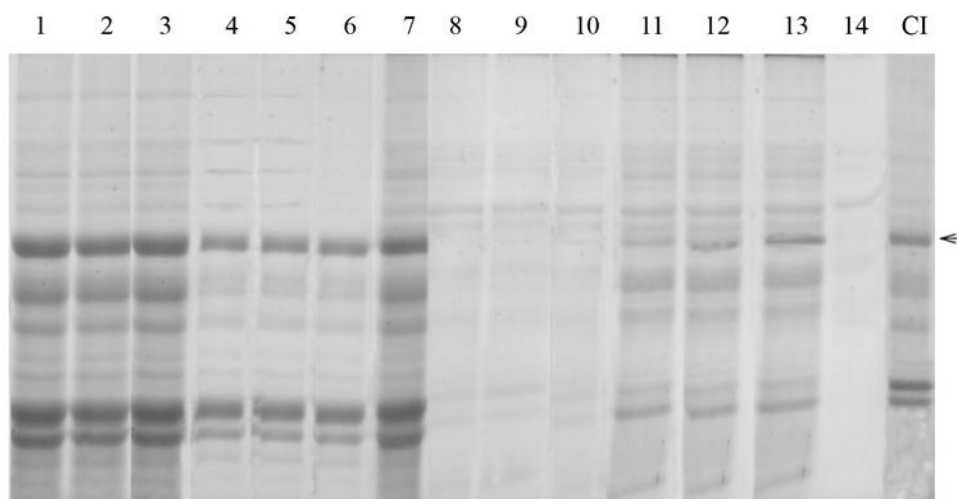


Fig 1. Perfil electroforético de las proteínas totales presentes en los lavados de los cuerpos de inclusión de *E. coli* (Rosetta (DE3), transformada con el plasmidio pETHPV1611-Myc-6xHis para la obtención de L1 de HPV16. Carriles 1-3: precipitado de PBS + Tritón X-100 0,5; 1 y 2,5 %; carriles 4-6: precipitado de PBS + Sarcosyl 0,05; 0,1 y 0,2 %; carril 7: precipitado de PBS + Tween 80 0,05 %. Carriles 8-14: sobrenadantes de los lavados en el mismo orden de aplicación de los precipitados, CI: control interno.

Los resultados correspondientes al segundo lavado no se muestran porque en ninguno de los casos se observaron bandas de la proteína L1, lo que indica, como era de esperar que este segundo lavado puede emplearse para remover el exceso de detergente en cada uno de los lavados sin afectar el rendimiento de la proteína.

Para verificar la identidad de la proteína L1 en los sobrenadantes de cada tratamiento, se realizó un análisis de *Western-blotting* con 20 μg de proteínas totales, las cuales fueron separadas previamente por SDS-PAGE (10 % de acrilamida) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (SIGMA-ALDRICH), en una cámara de transferencia (BIO-RAD, USA). La membrana se incubó durante 1 h en zaranda a 50 rev min^{-1} a temperatura ambiente en solución de leche descremada en polvo al 5% (P/V) en PBS, pH 7,4. Seguidamente, se incubó en condiciones similares a las anteriores con el anticuerpo monoclonal anti-Myc (CB9E10, CIGB Sancti Spiritus), 10 $\mu\text{g/mL}$ en tampón PBS-Tween-20 0,05 % (PBST), como anticuerpo primario y finalmente se repitió el proceso de incubación con el anticuerpo de conejo anti-IgG ratón conjugado con la peroxidasa (1:1000), como anticuerpo secundario. El revelado se realizó en la oscuridad con 500 μL de una solución de 3,3'-diaminobencidina (DAB) 1,38 mM (Sigma) y 6 μL de H_2O_2 4,1 mM (Sigma). Previo a la incubación con los anticuerpos, la membrana se lavó tres veces durante 5 min con PBST, además de un lavado adicional con agua destilada antes del revelado.

Se comprobó que la proteína L1 está presente en los sobrenadantes de los lavados de los cuerpos de inclusión con Sarcosyl (Fig. 2) y en los lavados con Tritón X-100 al 1 % y 2,5 %, a pesar de no ser detectada mediante SDS-PAGE. Por tanto, se descarta el uso de estos detergentes para incrementar la purificación de los cuerpos de inclusión ya que se afectaría el rendimiento de la proteína L1. En cambio, cuando se usa 0,5 % de Tritón X-100 y 0,05 % de Tween 80 la proteína L1 no se solubiliza, pero son pocas las proteínas contaminantes extraídas por lo que no amerita incluir este paso de lavado en el protocolo de purificación de la L1, ya que la reducción de los niveles de contaminantes por esta vía, incrementa los costos y la complejidad del proceso cuando sea llevado a escala industrial.

Estos resultados indican que a pesar de que el sarcosyl contribuye a la pureza de la L1, no es posible emplearlo en el lavado de los cuerpos de inclusión para la purificación de la proteína recombinante HPV16 L1 de la cepa *E. coli* porque disminuiría su recobrado final. Será necesario realizar experimentos adicionales con otros agentes que permitan una remoción efectiva de los contaminantes en los cuerpos de inclusión.



Fig 2. Western-blotting de las proteínas totales presentes en los sobrenadantes de los lavados de los cuerpos de inclusión de la proteína L1 con: PBS + 0.5 %, 1 % y 2.5 % de Tritón X-100 (carriles 1-3), PBS + 0.05 %, 0.1 % y 0.2 % de Sarcosyl (carriles 4-6) y PBS + 0.05 % de Tween 80 (carril 7). CI: control interno. Con una flecha se indica la banda correspondiente a la proteína L1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lara AR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2011;10 (2):209-223.
2. Ferrer N, Domingo J, Corchero J, Vázquez E, Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* 2009;8(1):17-8.
3. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Ståhl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem* 2002;35(2):91-105.
4. Choi JH, Keum KC, Lee SY. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science* 2006;61:876-85.
5. Marston FA. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J* 1986, 240:1-12.
6. Upadhyay AK, Murmu A, Singh A, Panda AK. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2012;7:e33951.
7. Upadhyay AK, Singh A, Mukherjee K.J. and Panda AK. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of *E.coli* into active tetrameric protein. *Frontiers in Microbiology* 2014,5(486):1-10.
8. Venkiteshwaran A, Heider P, Matosevic S, Bogsnes A, Staby A, Sharfstein S, et al. Optimized removal of soluble host cell proteins for the recovery of met-human growth hormone inclusion bodies from *Escherichia coli* cell lysate using crossflow microfiltration. *Biotechnol Prog*. 2007;23:667-72.
9. Xingmei Q, Yifan S. and Sidong XX. A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form. *Microbial Cell Factories*. 2015;DOI 10.1186/s12934-015-0208-6.

10. Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microb Cell Fact.* 2004, 3:11.
11. Patra AK, Mukhopadhyay R, Mukhija R, Krishnan A, Garg LC, Panda AK. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2000;18:182–92.
12. Singh SM y Panda AK. Solubilization and refolding of bacterial inclusión body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2005;99(4):303-310.
13. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005;41(1):207–234.