

COMUNICACIÓN CORTA

## Expresión en *Escherichia coli* Shuffle C3026 del gen *l1* del virus del papiloma humano tipo16 procedente de un aislado clínico cubano.

Yunier Serrano-Rivero, Susana Miraidys Brito-Molina, Adriana Otero- Blanco, Danay González-Acevedo Forte, Elsa Teresita Pimienta- Rodríguez, Karen Marrero-Domínguez.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, La Habana, Cuba

Recibido: 29 de junio de 2017

Aceptado: 30 de octubre de 2017

Palabras clave: aislado clínico, *Escherichia coli*, proteínas recombinantes, proteína L1 HPV  
Key words: clinical isolate, *Escherichia coli*, recombinant proteins, HPV L1 protein.

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) es la enfermedad infecciosa de transmisión sexual más común en el mundo y prácticamente la causante del cáncer cérvico-uterino (CCU).<sup>1</sup> EL CCU actualmente constituye la tercera causa de muerte en el mundo,<sup>1-4</sup> y la quinta causa de muerte en Cuba.<sup>4</sup>

De entre los virus de alto riesgo oncogénico se destaca al VPH 16 como el principal responsable del cáncer cérvico-uterino y de fracciones variables de los cánceres de vulva, vagina, pene, ano, orofaringe y bucal.<sup>5</sup> En la actualidad, las vacunas preventivas que se encuentran en el mercado (Cervarix™, Gardasil™ y Gardasil 9™) se basan en estructuras complejas conocidas como Partículas Similares al Virus (PSV) formadas a partir del auto-ensamblaje de 360 moléculas de la proteína L1.<sup>6,7</sup> Estas PSV son seguras y proporcionan protección duradera, debido entre otras cosas, a que carecen de material genético del virus y poseen las mismas características inmunogénicas que la partícula viral.<sup>3</sup> Las vacunas, al ser producidas en sistemas de expresión eucariota poseen el inconveniente de los bajos niveles de producción y su elevado costo las hace inaccesible a la población que posee bajos recursos.<sup>3</sup> Por otro lado, *Escherichia coli* es un hospedero que posee entre otras ventajas, los elevados niveles de producción de proteínas recombinantes en medios de cultivo baratos y la facilidad de su manipulación genética.<sup>8</sup> Además existe una gran variedad de cepas que han sido manipuladas genéticamente, como es el caso de *E. coli* Shuffle C3026, la cual posee un ambiente citoplasmático que promueve la formación de puentes disulfuro y la solubilidad de proteínas que se producen en dicho compartimento.<sup>9</sup> En trabajos realizados por el grupo de Zhang en 1998 y posteriormente el de Bang en el 2016 encontraron que la proteína L1 de VPH 16 producida en forma de cuerpos de inclusión en *E. coli* puede ser renaturalizada, y que las PSV auto-ensambladas *in vitro* poseen características inmunológicas similares a las de las partículas virales.<sup>10,11</sup> El objetivo del siguiente trabajo es expresar en *Escherichia coli* Shuffle C3026 al gen *l1* del virus del papiloma humano tipo16 procedente de un aislado clínico cubano.

### Construcción del plasmidio pETHPV16L1myc-His

Para obtener la construcción pETHPV16L1myc-His, al plasmidio pBADHPV16L1myc-His previamente obtenido en nuestro laboratorio y en el que no se detectó producción de la proteína L1myc-6xHis (datos no mostrados), se le extrajo un fragmento de 2 472 pb que incluía al gen *l1* del VPH16 y a la secuencia nucleotídica que codifica para el epítotope myc y seis histidinas (etiqueta) con las enzimas de restricción *NcoI* y *ScaI*, y se ligó en el plasmidio pET28a(+) previamente digerido con *HindIII* rellenado con klenow y digerido con *NcoI*(Fig.1A). Dicha ligazón se transformó en *E. coli* Mach1 y los transformantes se seleccionaron mediante siembra en placas de agar LB suplementadas con kanamicina 100 µg/mL, y se incubaron a 37 °C durante 15 h.

Dicha transformación rindió 165 colonias, a cuatro de estas se le extrajo el plasmidio para análisis mediante doble digestión con las *NcoI* y *ScaI*, y simple digestión con *XbaI*. La digestión realizada con las enzimas *NcoI* y *XhoI* rindió dos fragmentos de aproximadamente 2 500 pb correspondiente al inserto y otro poco mayor de 5 000 pb correspondiente al vector, mientras que la digestión con la enzima *XbaI* sólo rindió un fragmento de aproximadamente 8 000 pb, lo cual está en correspondencia con los tamaños esperados. Dichas digestiones evidenciaron la presencia del fragmento de 2 472 pb en los sitios *NcoI* y *HindIII* del plasmidio pET28a (+) (Fig.1B.). Luego el plasmidio procedente del clon 2 previamente analizado por restricción se transformó en *E. coli* Shuffle C3026, los transformantes se sembraron en placas de agar LB suplementadas con kanamicina 100 µg/mL, se incubaron durante 14 h a 28 °C y cuatro de estos se conservaron en LB-glicerol al 20 % (v/v).

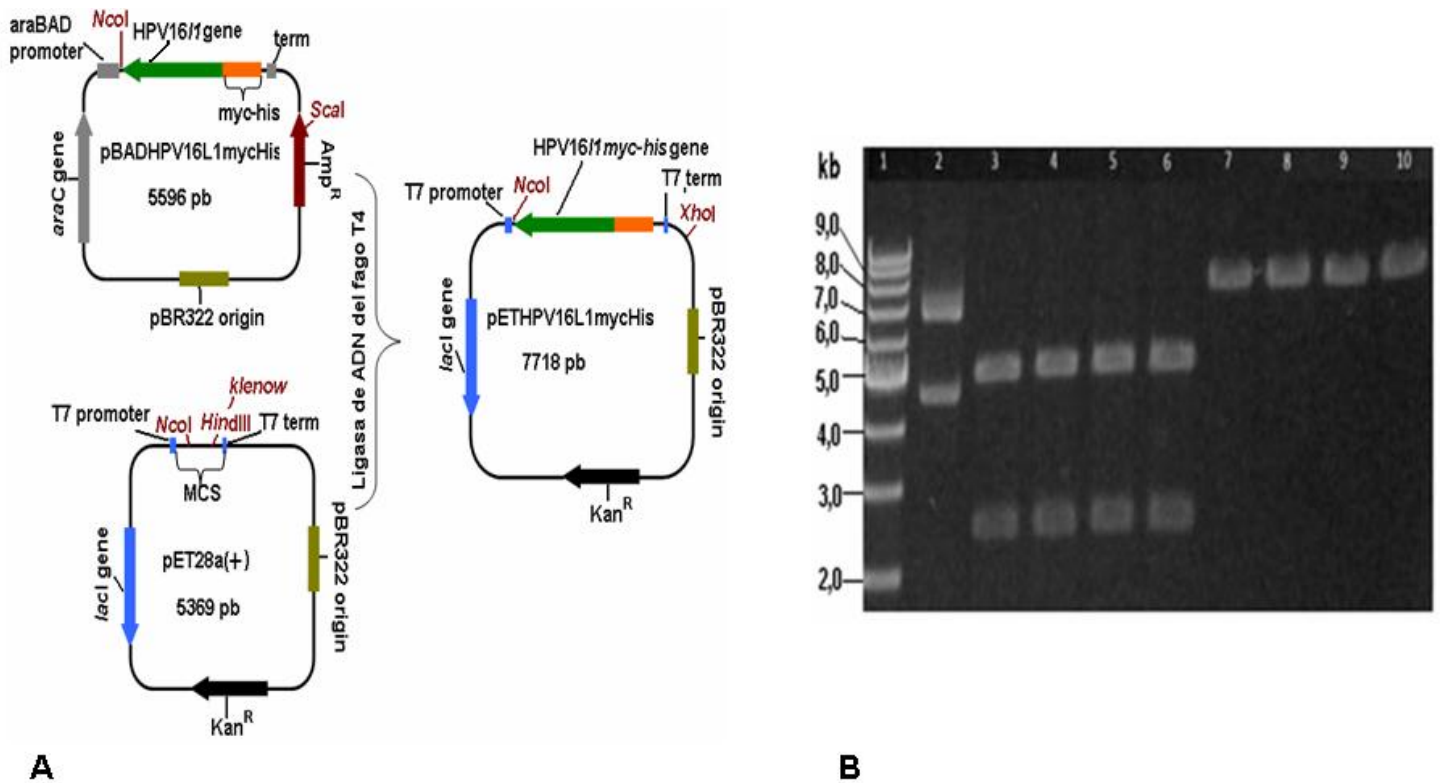


Fig.1. A: Estrategia de sub-clonaje del gen *l1* de VPH16 en el plasmidio pET28a(+). B: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de los plasmidios pETHPV16L1myc-His analizados mediante restricción. Carril 1, marcador de peso 1 kb DNA Step Ladder (Promega). Carril 2, plasmidio del clon1 sin digerir. Carriles 2 al 6, plasmidios de los clones 1 al 4 digerido con las enzimas *NcoI* y *XhoI*. Carriles 7 al 10 plasmidios de los clones 1 al 4 digerido con la enzima *XbaI*.

#### Expresión de la proteína L1Myc-6xHis en *E. coli* SHuffle C3026 mediante SDS-PAGE y western blot

Para la evaluación de la producción de la proteína L1Myc-6xHis en *E. coli* SHuffle C3026 una colonia de cada clon conservado incluyendo un clon portador del plasmidio pET28a(+) se inocularon en 5 mL de caldo LB suplementado con kanamicina a 100 µg/mL durante 12 h a 27 °C en agitación (200 r/min). Seguidamente, este preinóculo se diluyó 100 veces en 5 mL de caldo LB suplementado con el mismo antibiótico, y las células se crecieron en las mismas condiciones hasta que la absorbancia a 600 nm ( $A_{600}$ ) alcanzó el valor de 0,6. Luego la expresión del gen *l1* se indujo con 0,4 mmol/L de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante cuatro horas.

Las muestras se procesaron ajustándoles la  $A_{600}$  a 6,5 en tampón fosfato de sodio (PBS1X) (109439, Merck, Alemania). Seguidamente se mezclaron 80 µL de las mismas con 20 µL de tampón para muestra 6 X (Tris-HCl 375 mmol/L pH 6,8; bromofenol azul 0,03 % (m/v); glicerol 50 % (v/v); SDS 9 % (m/v) y β-mercaptoetanol 9 % (v/v)),<sup>12</sup> se incubaron a 95 °C durante 10 min y se conservaron a -20 °C para análisis mediante SDS-PAGE al 10 % y western blot.

Los resultados obtenidos en el análisis del SDS-PAGE mostraron una proteína intensamente teñida observada en los carriles 1 al 4 (*E. coli* Shuffle C3026/pETHPV16L1Myc-His) que no se observó en el carril 5 (*E. coli* Shuffle C3026/pET28a) (Fig.2 A), lo cual indica que la proteína intensamente teñida pudiera corresponder a la proteína L1Myc-His. A su vez el rendimiento de la misma se estimó mediante densitometría con la herramienta bioinformática ImageJ 58d,<sup>9</sup> constituyendo un 11-14 % respecto a las proteínas totales. En 1998, el grupo de Zhang obtuvo un 10-15 % de la proteína al expresarla fusionada en el extremo amino terminal a la señal de secreción *pelB* del vector pET-22b.<sup>11</sup> De modo similar procedió el grupo de Jeong Cho en el 2007 fusionándola a la enzima glutatión-S-transferasa (GST) y a la proteína de unión a maltosa (PUM).<sup>13</sup> Se conoce que la producción de la proteína L1 a partir del gen silvestre en *E. coli* no siempre ha sido posible lograrlo a niveles detectables en SDS-PAGE por lo que se ha necesitado fusionarlo en la región 5' a genes que codifican para proteínas o pépticos de fácil traducción.<sup>11</sup> La proteína GST por lo general se ha utilizado con este fin, siendo el empleo de un gen con uso optimizado de codones la mejor opción.<sup>14</sup> Los resultados obtenidos en nuestros experimentos mostraron que la producción de la proteína L1 del VPH16 no requirió de su fusión a proteínas de fácil traducción para hacerla detectable en SDS-PAGE a diferencia de los trabajos reportados por los grupos de Zang y de Ma.<sup>11-15</sup> Aunque las estrategias de fusión en ocasiones han logrado incrementar los niveles de producción de la proteína recombinante y facilitan su posterior purificación no son

rentables para un proceso de producción a escala industrial debido a que requeriría de grandes cantidades de enzima para separar la proteína de fusión de la proteína de interés.<sup>16</sup>

Igualmente, la identidad de la proteína L1Myc-His se verificó mediante *western blot* empleando el procedimiento previamente descrito por el grupo de Falero.<sup>17</sup> Para lo cual se utilizaron los anticuerpos primarios anti-Myc (CB9E10, CIGB Sancti Spiritus, Cuba) diluido 1: 500 y anti-L1 (MAB 885, Merck USA) diluido 1: 50 000 en tampón PBS1X-Tween-20 0,05 % (PBST) y como secundario el anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (CB10S0, CIGB Sancti Spiritus, Cuba) diluido 1:1 000 en PBST.

En la membrana de *western blot*, se observa una banda mayoritaria y otras de menor tamaño (Fig. 2. B y C), lo cual pudiera estar dado a causa del efecto combinado de la degradación proteolítica y terminaciones tempranas de la traducción,<sup>10</sup> así como a la degradación proteolítica y a la presencia codones alternativos de inicio de la traducción en el gen *L1*.<sup>15</sup> Estos resultados confirman que la proteína expresada en *E. coli* Shuffle C3026/pETHPV16L1Myc-His corresponde a la proteína L1 de VPH 16 y que el epítipo Myc y las seis histidinas se encontraban fusionados al extremo carboxilo terminal de la misma.

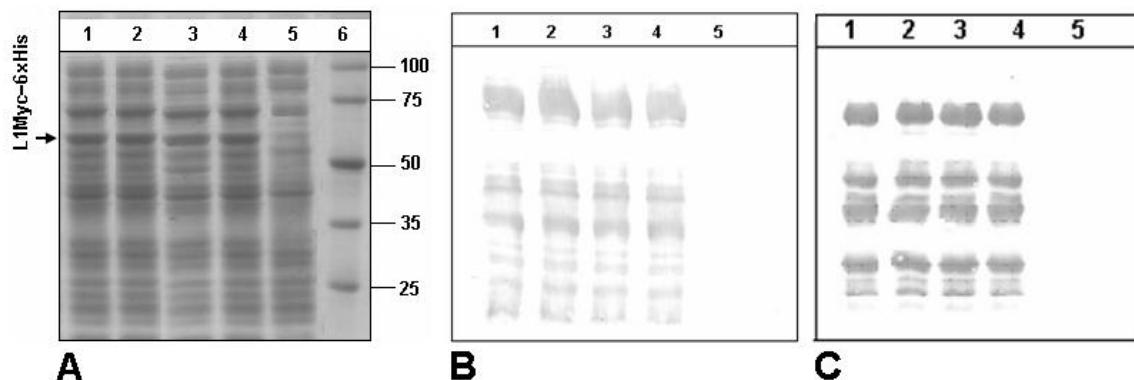


Fig.2. Análisis de la producción de la proteína L1Myc-His. Carriles 1 al 4, 5  $\mu$ L de extractos celulares de *E. coli* Shuffle C3026/pETHPV16L1myc-His. Carril 5, 5  $\mu$ L de extractos celulares de *E. coli* Shuffle C3026/pET28a (+). Carril 6, 3  $\mu$ L del marcador de peso Broad Range Molecular Weight Markers (Promega) en kDa. A: análisis mediante SDS-PAGE al 10 % de acrilamida. B y C: Análisis mediante *western blot* con los anticuerpos monoclonales anti-L1 (MAB 885) 1: 50 000 y anti-Myc (CB9E10) 1: 2 000.

De los resultados obtenidos se puede concluir que es posible expresar al gen *L1* silvestre del virus del papiloma humano tipo 16 procedente de un aislado clínico cubano a niveles detectables en SDS-PAGE y *western blot*, lo cual constituye un reporte preliminar que brinda la posibilidad de contemplar a *Escherichia coli* Shuffle C3026 (DE3) como un posible hospedero para la producción de altos niveles de la proteína L1myc-6xHis en vista a la elaboración de un candidato vacunal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zelada A, Fando RA. La pandemia subvalorada del siglo XXI: el virus del papiloma humano. Su repercusión en la patología del cáncer cervicouterino. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2013; 44(2):1-20.
2. Wang KL. Human papillomavirus and vaccination in cervical cancer. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007; 46(4):352-62.
3. Mariz FC, Coimbra EC, Jesus AL, Nascimento LM, Torres FA, Freitas AC. Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16 L1 Capsid Protein Using the *Pichia pastoris* PGK1 Promoter. *Biomed Res Int*. 2015;2015(8):1-11
4. Soto Y, Torres G, Kouri V, Limia CM, Goicolea A, Capo V, *et al*. Molecular epidemiology of human papillomavirus infections in cervical samples from cuban women older than 30 years. *Journal of Lower Genital Tract Disease*. 2014;18(3):210-7.
5. Malek Z. Human papilloma virus vaccination: Review article and an update. *World J Obstet Gynecol*. 2016; 5(1): 16-27
6. Bruni L, Serrano B, Bosch X, Castellsagué X. Human papillomavirus vaccine. Efficacy and safety. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015; 33(5):342-54.
7. Garland SM, Kjaer SK, Muñoz N, Block SL, Brown DR, DiNubile MJ, *et al*. Impact and Effectiveness of the Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine: A Systematic Review of 10 Years of Real-world Experience. *Clin Infect Dis*. 2016;63(4):519-27.
8. Joseph BC, Pichaimuthu S, Srimeenakshi S, Murthy M, Selvakumar K, Ganesan M, *et al*. An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia Coli*. *J Cell Sci Ther*. 2015; 6(221):1-7.
9. Fathi-Roudsari M, Akhavian-Tehrani A, Maghsoudi N. Comparison of Three *Escherichia coli* Strains in Recombinant Production of Reteplase. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2016; 8(1):16-22.
10. Bang HB, Lee YH, Lee YJ, Jeong KJ. High-Level Production of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 L1 in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*. 2016;26(2):356-63.

11. Zhang W1, Carmichael J, Ferguson J, Inglis S, Ashrafian H, Stanley M. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. *Virology*.1998;243(2):423-31.
12. Falero F, Suzarte E, Águila B, Campos J, Fando R. Expresión heteróloga de la proteína OmpU de *Vibrio cholerae* y su purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*.2008;39 (2):109-114.
13. Cho HJ, Hahm MS, Kim MK, Han IK, Jung WW, Choi HG, *et al*. Expression, purification, and antibody binding activity of human papillomavirus 16 L1 protein fused to maltose binding protein. *Protein Pept Lett*. 2007;14(5):417-24.
14. Chen Y, Liu Y, Zhang G, Wang A, Dong Z, Qi Y, *et al*. Human papillomavirus L1 protein expressed in *Escherichia coli* self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic *Virus Res*. 2016 ;220:97-103.
15. Ma Z, Chen B, Zhang F, Yu M, Liu T, Liu L. Increasing the expression levels of papillomavirus major capsid protein in *Escherichia coli* by N-terminal deletion. *Protein Expr Purif*. 2007;56 (1):72-9.
16. Wang HZ, Chu ZZ, Chen CC, Cao AC, Tong X, Ouyang CB, *et al* Recombinant Passenger Proteins Can Be Conveniently Purified by One-Step Affinity Chromatography. *PLoS One*. 2015 Dec 7;10(12):e0143598. doi: 10.1371/journal.pone.0143598.
17. Falero A, Brito S, González D, Serrano Y, Aldama G, Pimienta ET, *et al*. 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*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 2015; 46: 344-348.