



CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE hIL-2 EN *Bacillus subtilis*.

Juan Antonio Rojas Contreras¹, Mario Pedraza Reyes², Antonio De León Rodríguez¹

¹ Depto. de Biología Molecular, IPICYT, Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4^a secc. CP 78216, San Luis Potosí, S.L.P. Tel. 01(444)8342000 Ext. 2057, Fax 01(444)8342010. E-mail: aleonr@ipicyt.edu.mx

² Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., 36060.

Palabras clave: Proteínas heterólogas, proteasas, plásmidos integrativos.

Introducción. Debido a la capacidad de *Bacillus subtilis* para secretar una gran cantidad de enzimas al medio de cultivo, resulta un huésped atractivo para la producción de proteínas heterólogas que tienen diversos usos terapéuticos como es el caso de la interleucina 2 humana (hIL-2). Algunas de las ventajas que ofrece *B. subtilis* como sistema de producción son que las proteínas heterólogas suelen permanecer biológicamente activas, su purificación se ve considerablemente simplificada y carece de lipopolisacáridos (endotoxinas) de pared celular. Sin embargo, existen dos inconvenientes principales que impiden utilizar a *B. subtilis* como sistema de producción, la secreción de altos niveles de proteasas extracelulares que pueden degradar las proteínas de interés y la escasez de vectores de expresión estables. El objetivo de este trabajo es la construcción de un sistema optimizado para la producción y secreción de hIL-2 en una cepa de *B. subtilis* carente de proteasas extracelulares empleando un plásmido integrativo.

Metodología. El gen de la hIL-2 se fusionó mediante PCR splicing, con un fragmento de 107 pb que codifica para el péptido señal de una α -amilasa de *B. licheniformis* (*amyL*). El producto de fusión *amyL*-hIL-2 se sub-clonó en el plásmido pGEMT-EasyVector (Promega) y posteriormente se recuperó como un fragmento *Bam*HI-*Not*I (sitios agregados en las secuencias de los iniciadores de la PCR) y se clonó en el plásmido integrativo pAX01 (denominado pAXIL2). Un casete de resistencia a neomicina (*Neo*^R) se extrajo del plásmido pBEST501 con las enzimas de restricción *Pst*I-*Eco*RI y se sub-clonó en el plásmido pDG1515 (denominado pDBEST), finalmente el casete de *Neo*^R se recuperó del plásmido pDBEST como un fragmento *Not*I-*Not*I y se clonó en el plásmido pAXIL2 dando como resultado el plásmido pRC01. Se transformaron células competentes de *B. subtilis* con el plásmido pRC01 y se determinó la integración de la construcción plasmídica mediante PCR.

Resultados y discusión. El análisis mediante PCR de las cepas de *B. subtilis* transformadas con el plásmido pRC01, demuestra que el vector es capaz de integrar el gen de la hIL-2 en el cromosoma de *B. subtilis*. En la fig. 1 se muestra el plásmido integrativo pRC01. En la fig. 2 se muestra el análisis por PCR de las cepas de *B. subtilis* que portan el gen de la hIL-2.

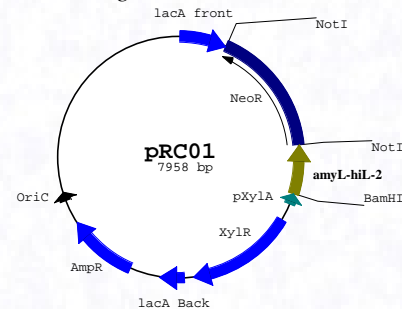


Fig. 1. Esquema del plásmido pRC01.

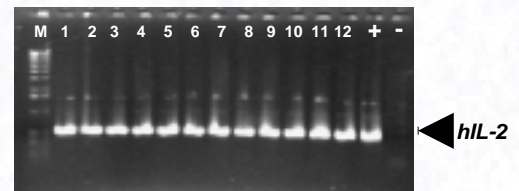


Fig.2. Análisis de la integración de hIL2 en el cromosoma de *B. subtilis*.

Conclusiones. Hasta el momento se logró la construcción de un vector que permite integrar el gen de la hIL-2 en el cromosoma de *B. subtilis*, se están realizando estudios de expresión y producción de hIL-2.

Agradecimientos. J. A. Rojas Contreras agradece al CONACYT por la Beca No. 204213.

Bibliografía.

1. Wu X. C, Lee W, Tran L, Wong S. L. (1991). Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *J. Bacteriol.* 173(16):4952-4958.
2. Hartl B, Wehrl W, Wilegert T, Homuth G, Schumman W. (2001). Development of a New Integration Site within the *Bacillus subtilis* Chromosome and Construction of Compatible Expression Cassettes. *J. Bacteriol.* 183(8): 2696-2699.
3. Westers L, Dijkstra D. S, Westers H, van Dijn J. M, Quax W. J. (2005). Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology.* 123: 211-224.