



“Estudio del transporte de proteínas de interés biotecnológico al periplasma de *Escherichia coli* recombinante por la vía Tat”

Emilio Medina^{1,2}, Víctor E. Balderas¹, Leandro G. Ordoñez¹, Luz M. T. Paz¹, Ana P. Barba¹ y Antonio De León Rodríguez¹.

¹Depto. de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. Camino a la presa San José 2055, Col. Lomas 4 sección, 78216, San Luis Potosí S.L.P., México
Tel: 52 (444) 834 20 00, Fax: 52 (444) 834 20 10, mail: aleonr@ipicyt.edu.mx.

²Dirección actual: Probiomed S.A. de C.V., Carr. Acatzingo-Zumpahuacan S/N Tenancingo, Edo. de Mex., 52400, 52 (55) 11662277, mail: emilio.medina@probiomed.com.mx.

Palabras clave: péptido señal, proteína terapéutica, vía Tat

Introducción. La secreción de proteínas recombinantes al periplasma de *E. coli*, permite obtener proteínas con el N-terminal correcto después de que se corta el péptido señal, formar puentes disulfuro por las oxidoreductasas del periplasma, disminuir la degradación proteolítica y facilitar la recuperación de la proteína para su purificación (1). El transporte de proteínas por la vía Tat tiene ventajas con respecto a la vía Sec, debido a que puede transportar proteínas complejas que contengan FeS, Ni-Fe, centros de molibdoterina y grupos hemo (2). El consenso SRRxFLK de los péptidos señal Tat contienen un par de argininas continuas que son esenciales para el transporte de las proteínas al periplasma, sin embargo, existen excepciones como es el caso del péptido señal de la penicilino acilasa (*Sppac*) en donde el par de argininas está separado por una asparagina, a pesar de este cambio es un péptido señal Tat-dependiente (3). En este trabajo se diseñó el vector de expresión pEMR, que contiene el *Sppac* y el promotor T7, se utilizaron como proteínas modelo interleucina-2 humana (rhIL-2) e interferon- γ humano (rhINF- γ) para evaluar su transporte al periplasma por la vía Tat.

Metodología. *E. coli* BL21-SI/pEMR-hINF γ y *E. coli* BL21-SI/pEMR-hIL2 fueron crecidas en matraces de 250 mL con 50 mL de medio mínimo a 37°C y 250 rpm. Los cultivos fueron inducidos con 0.3 N NaCl cuando la densidad óptica fue de 0.6. Las fracciones del periplasma soluble e insoluble fueron obtenidas por la técnica de Robbins y col. (2006).

Resultados y Discusión. El rhINF- γ se encontró en el periplasma y en las fracciones soluble e insoluble en una proporción de 5.34, 2.86 y 91.80 %, respectivamente (Fig. 1A). Este resultado demostró que el *Sppac* permitió la secreción de rhINF- γ por la vía de transporte Tat. Sin embargo para el caso de rhIL-2, la proteína recombinante madura fue detectada en las fracciones soluble e insoluble (9.82 y 7.28 %, respectivamente) y como pre-proteína en las fracciones soluble e insoluble (3.58 and 79.32 %, respectivamente) (Fig. 1B). Sin embargo, no se encontró rhIL-2 en el periplasma. Estos resultados muestran que el vector de expresión pEMR es una alternativa para clonar y transportar proteínas al periplasma de *E. coli* por la vía de secreción Tat.

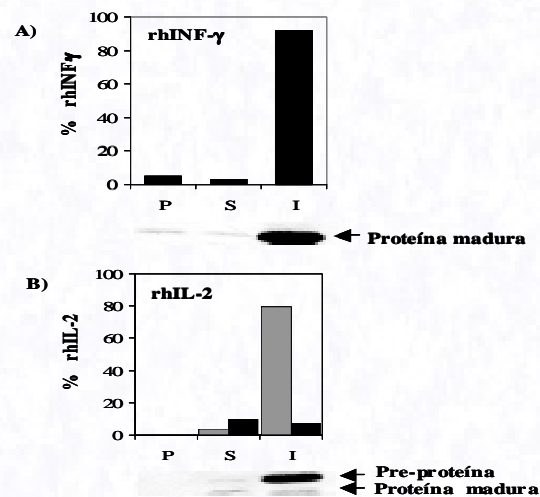


Fig. 1. Análisis del transporte de proteínas recombinantes por la vía Tat. A) rhINF- γ . B) rhIL-2. P: Fracciones del periplasma, S: fracción soluble, I: fracción insoluble. Las columnas negras y grises corresponden a la proteína madura y pre-proteína, respectivamente.

Conclusiones. Los estudios del transporte de rhIL-2 y rhINF- γ por la vía Tat, sugieren que el transporte de proteínas recombinantes depende de las características nativas de la proteína.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por los proyectos CONACYT J39639-Q y FOMIX FMSLP-2002-4100. E.M. agradece el apoyo de la beca de doctorado CONACYT No. 157496.

Bibliografía

1. Makrides, S.C. (1996) Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**: 512-538.
2. Palmer, T., Sargent, F., and Berks, B.C. (2005) Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *TRENDS Microbio.* **13**: 175-180.
3. Ignatova, Z., Hörnle, C., Nurk, A., and Kasche, V. (2002) Unusual signal peptide directs penicillin amidase from *E. coli* to the Tat translocation machinery. *Biochem. Biophys. Commun.* **291**: 146-149.
4. Robbins, J., De Coen, W., Fiers, W. and Remaut, E. (2006) Improved periplasmic production of biologically active murine interleukin-2 in *Escherichia coli* through a single aminoacid change at the cleavage site. *Process Biochem.* **41**: 1343-1346.