



## ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN INTERFERÓN $\gamma$ e INTERLEUCINA 2 EN *Escherichia coli*

Araceli Álvarez Cruz, Antonio De León Rodríguez

Dpto. de Biología Molecular, IPICYT, Camino a la Presa San José 2055, Col. Lomas 4ª Secc. C.P. 78216, San Luís Potosí, S.L.P. Tel. 01(444)8342000 Ext. 2057, Fax 01(444)8342010. e-mail: aleonr@ipicyt.edu.mx

*Palabras clave:* Proteínas terapéuticas, Proteínas de Fusión, Expresión.

**Introducción.** Una proteína de fusión es una proteína creada a través de la ingeniería genética a partir de dos o más proteínas o péptidos, esto se consigue al eliminar el codón de paro de la secuencia de ADN de la primera proteína y colocando en fase la secuencia de la segunda proteína; sin embargo, en el caso de proteínas de fusión se ha observado que el uso de puentes o espaciadores entre las secuencias conlleva ciertas ventajas como plegamiento independiente y correcto<sup>1</sup>. El empleo de proteínas de fusión es una alternativa atractiva desde el punto de vista funcional, estructural, biotecnológico y práctico, al sinergizar o complementar funciones<sup>2</sup>, estabilizar las estructuras proteínicas<sup>3</sup>, permitir caracterizar un solo proceso y producto y al facilitar su purificación o transporte. La construcción de una proteína de fusión entre dos proteínas terapéuticas que compartan aplicaciones médicas es de gran interés; tal es el caso de la construcción de la proteína de fusión entre las citocinas Interferón  $\gamma$  humano (hIFN $\gamma$ ) e Interleucina 2 humana (hIL2) dirigida a pacientes con carcinoma renal<sup>4, 5</sup>. El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión de la proteína de fusión hIFN $\gamma$ -hIL2 unidos mediante un puente molecular a base de glicinas.

**Metodología.** Los genes sintéticos optimizados de las citocinas hIFN $\gamma$  e hIL2 fueron amplificados por PCR para agregar los sitios de clonación *NdeI-AscI* y *AscI-HindIII* y el puente molecular de glicinas, respectivamente. El gen de la proteína de fusión hIFN $\gamma$ -hIL2 fue subclonado en el vector de expresión pET28a (Novagen) (Figura 1) y utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3) inducible con IPTG. Las células transformadas fueron seleccionadas por resistencia a kanamicina en medio LB. Las fracciones proteínicas de los cultivos después de 3h de inducción se analizaron por Western-Blot partiendo de electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida en gradiente de 4% a 20%.

**Resultados y discusión.** La correcta inserción del gen de fusión hIFN $\gamma$ -hIL2 en el vector de expresión pET28a se comprobó mediante digestión, PCR y secuenciación. La cola de histidinas añadida en el amino terminal de la proteína de fusión permite su purificación mediante cromatografía de afinidad. Tres horas después de la inducción con 1mM de IPTG en los cultivos de *E. coli* BL21(DE3)/pET28a/hIFN $\gamma$ -hIL2 crecidos a 30° C, se colectó la biomasa y se obtuvieron las fracciones proteínicas totales, solubles e insolubles. En la fig. 2 se muestran los porcentajes de las fracciones proteínicas soluble (30%) e insoluble (70%) de la expresión de la proteína de fusión hIFN $\gamma$ -hIL2 obtenidos mediante

densitometría en la membrana del Western-Blot. Debido a que es de interés obtener un mayor porcentaje de proteína soluble, se evaluarán protocolos para solubilizar *in vitro* la fracción insoluble, también se procederá a la optimización del proceso de producción de la proteína de fusión y su escalamiento a biorreactor.



Fig. 1. Esquema del plásmido pET28a(+)/hIFN $\gamma$ -hIL2

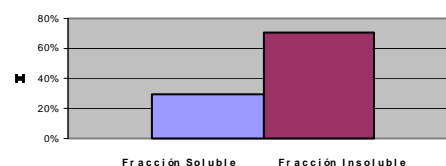


Fig. 2. Porcentajes de las fracciones proteínicas de la expresión de la proteína de fusión hIFN $\gamma$ -hIL2

**Conclusiones.** En este trabajo se fusionó el interferón gama humano y la interleucina 2 humana para su expresión como una proteína de fusión (hIFN $\gamma$ -hIL2) en *Escherichia coli*, encontramos la proteína de fusión tanto en la fracción soluble como insoluble.

**Agradecimientos.** Araceli Álvarez Cruz agradece al CONACYT por la Beca No. 201855 y al Proyecto SALUD-05-13993.

### Bibliografía.

1. Encyclopedia of Science and Philosophy. [En línea]: [http://www.iscid.org/encyclopedia/Fusion\\_Protein](http://www.iscid.org/encyclopedia/Fusion_Protein) [Fecha de consulta: 20 de marzo de 2006]
2. Curtis BM, *et al.* (1991). Enhanced hematopoietic activity of a human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-interleukin 3 fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 88:5809-5813.
3. Liang, H, Sandberg, WS and Terwilliger, TC. (1993). Genetic Fusion of Subunits of a Dimeric Protein Substantially Enhances its Stability and Rate of Folding. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 90:7010-7014.
4. Turner PK, *et al.* (2003). Interferon-gamma pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* (2004) 53: 253-260.
5. Fishman, M and Seigne, J. (2002). Immunotherapy of Metastatic Renal Cell Cancer. *Cancer Control* 9:293-30.