



PRODUCCION DE INTERLEUCINA 6 HUMANA (h IL-6) SOLUBLE EN *E.coli*.

María Isabel Isordia Jasso¹, Manuel Díaz de León Cabrero¹, Sergio Casas Flores², Marco Antonio Sánchez Castillo¹ y Claudia Escudero Lourdes^{1*}.

¹Centro de Investigación y Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, UASLP.

²División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica
Tel (444) 8262440 Ext. 541, Fax (444) 8 262372, *cescuder@uaslp.mx

Palabras clave: Interleucina 6, *E. coli*, proteínas recombinantes

Introducción. La interleucina 6 humana (hIL-6), descrita como factor estimulador de células B-2 (BSF-2), es una citosina utilizada como antineoplásico y terapéutica en enfermedades asociadas al cáncer⁽¹⁾. Por otra parte, los sistemas de expresión en *E. coli* han sido utilizados ampliamente por su sencillez y alto rendimiento. Sin embargo, un problema vinculado a su aplicación en la producción de proteínas recombinantes es la obtención de grandes cantidades de proteína inactiva en forma de cuerpos de inclusión intracitoplásmicos⁽²⁾, los cuales requieren de procesos posteriores de resolubilización y replegamiento para recuperar la forma activa de la proteína. Estos procesos disminuyen el rendimiento aún en condiciones óptimas. Las diferentes metodologías para la obtención de la IL-6 en forma soluble y activa incluyen el diseño de vectores de expresión que favorecen la secreción de la IL-6 al espacio periplásmico de *E. coli*, o bien al medio de crecimiento bacteriano⁽³⁾; en ambos casos los resultados no han sido satisfactorios. En este trabajo se clonó el gen de la IL-6 en el vector de expresión pET43.1a, el cual permite generar una fusión traduccional con la proteína NusA como alternativa para obtener la proteína recombinante en forma soluble.

Metodología. El gen de la hIL-6 optimizado para su expresión en *E. coli* se obtuvo de la compañía GenArt. La cepa Top10 de *E. coli* se utilizó para la manipulación de ácidos nucleicos, y la cepa BL21 (DE3) se usó como hospedera para la sobreproducción de la hIL-6 de fusión. Se utilizó el plásmido Pet43.1a (+) para la clonación y sobreproducción de la proteína de fusión con NusA. Se diseñó y sintetizó un par de oligonucleótidos para la amplificación del gen de la hIL-6. Al oligonucleótido Sentido se incluyó el sitio de restricción para SacI y al Reverso el sitio de restricción EcoRI. El producto de la amplificación del gen de la hIL-6 y el plásmido pET43.1a (+) conteniendo el gen de la proteína NusA se ligaron en condiciones estándar, resultando en la obtención del vector denominado pET-NUS-IL-6. Este vector se utilizó para transformar a la cepa BL21 de *E. coli*. La expresión de la proteína se indujo por la adición de IPTG a los cultivos bacterianos de 50 mL en medio LB a 37°C. La producción de NusA/IL-6 en los cultivos se confirmó mediante análisis de Western blot e inmunodetección mediante quimioluminiscencia.

Resultados y discusión. Se construyó el sistema de expresión de fusión para NusA/IL-6. La Figura 1 es la

representación esquemática del vector obtenido pET-NUS-IL-6, el cual se funciona bajo el control del promotor T7 lac; el codón de inicio de la traducción (ATG) se encuentra frente del marco de lectura que incluye el gen de la IL-6. Seis residuos consecutivos de histidina (H) están incluidos entre el extremo 3' de NusA y 5' de las secuencias que codifican para un sitio de reconocimiento para trombina (Tb) y enteroquinasa (Ek) para facilitar la posterior recuperación y purificación de la proteína de fusión por cromatografía de afinidad metálica (IMAC) y la liberación de hIL-6 madura tras su paso por IMAC respectivamente. Este sistema se transformó en la cepa BL21 de *E. coli* y tras la inducción con IPTG se obtuvo más del 90% de NusA/hIL-6 en forma soluble.

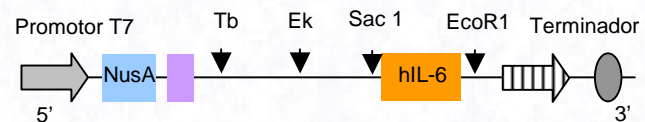


Figura 1. Vector de expresión pET-NUS-IL-6. Tb, Ek denotan los sitios de reconocimiento para trombina y enteroquinasa, respectivamente; H denota seis residuos consecutivos de histidina.

Conclusiones. El sistema de expresión utilizado en este trabajo para la expresión de hIL-6 en forma soluble mostró ser el adecuado para producir proteínas libres de cuerpos de inclusión. Este trabajo constituye la primera etapa de un proyecto para la producción de proteínas recombinantes de interés médico e industrial en biorreactores de semilote.

Agradecimiento. Este trabajo fue parcialmente apoyado por el programa de *Inmersión a la ciencia 2005* de la UASLP. con clave C05-PIFI-10-17.17

Bibliografía.

1. Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin. Pract. Rheumatol.* 2006. 2(11): 619-26.
2. Ejima D.; Watanabe M.; Sato Y.; Date M.; Yamaha N.; Takahara Y. High yield refolding and purification process for recombinant human interleukin-6 expressed in *Escherichia coli*. *Biotech. Bioeng.* 1999. 62(3): 301-10.
3. Li Y.; Chen C.; von Specht B.; Hahn H.P. Cloning and hemolysin-mediated secretory expresión of a codon-optimized synthetic human interleukin-6 gene in *E. coli*. *Protein Expression Purif.* 2002. 25, 437-447.