

EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO FUSIONADO A LA PROTEÍNA P64K DE LA MEMBRANA DE *NEISSERIA meningitidis* EN *ESCHERICHIA coli*

Mariela Pérez e Idalmis Reverón

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología P.O.Box 6162, Cubanacán, Playa, Habana, Cuba.

Telefax: (53-7) 218070 / 336008. E.Mail: mariela.perez@cigb.edu.cu.

Palabras claves: *E.coli*, proteínas recombinantes, factor de crecimiento epidérmico humano

Introducción: La *E.coli* es muy utilizada como hospedero para la expresión de proteínas recombinantes. En este microorganismo la sobreproducción de proteínas heterólogas frecuentemente se acumula en forma de agregados insolubles dentro de las células (1), aunque en algunos casos se han logrado altos niveles de producción de proteínas solubles (2). La aparente contradicción en los resultados obtenidos por diferentes investigadores ha traído por consecuencia que la tendencia general en este hospedero sea investigar cada proteína como un caso particular.

El objetivo de este trabajo es evaluar diferentes condiciones de cultivo para establecer los parámetros que inciden en la solubilidad de la proteína de fusión (P64KEGF) en el citoplasma de *E. coli*.

Metodología:

Cepa: *E. coli* MM294 (F- *end A1*, *hsd R17* (*rk-*, *mn-*), *sup E 44*, *thi -1*, *rel A1*, *Pro-*). Plásmido: pM-EGF, contiene el gen que codifica para la expresión de la proteína P64KEGF bajo el control del promotor triptófano de *E. coli*. y los genes que le confieren a la cepa transformada la resistencia a la kanamicina.

Medios y condiciones de cultivo: Se utilizaron 5 medios de uso frecuente en *E. coli*. En zaranda (200 rpm, 37°C) se tomaron muestras cada 2 horas durante 12 horas y se determinó la densidad óptica (absorbancia a 530 nm) y la expresión mediante electroforesis SDS-PAGE. Se utilizaron fermentadores de 5 litros de volumen efectivo (B.E Marubishi, Japan) y los medios A y B. La aireación fue de 1vvm, la agitación 200 rpm, la temperatura varió según el experimento (28, 33 ó 37) °C y también el pH (6.6, 7.0 ó 7.4). Las muestras se tomaron cada 2 horas para determinar la curva de crecimiento y la cinética de expresión y la solubilidad de la proteína. La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Lowry, 1951 (3). Para la disruptión celular se realizaron 3 pases utilizando un homogenizador de alta presión tipo Prensa Francesa.. Todas las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm y 4°C durante 30 minutos para separar la fracción soluble de la insoluble y analizar los porcentos de proteína de interés en cada fracción.

Todas las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm y 4°C durante 30 minutos para separar la fracción soluble de la insoluble y analizar los porcentos de proteína de interés en

cada fracción. La densidad celular se midió en un fotolorímetro (Klet, USA) a 530 nm, el porcentaje de expresión se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) según describe Laemmli y cols. 1970 (4).

Resultados y Discusión: En zaranda el valor máximo de expresión se alcanzó en el medio B, (15%) En los medios A y D toda la proteína se obtiene en la fracción soluble, sin embargo para el resto de los medios se observa una banda en el gel de electroforesis correspondiente a la fracción insoluble que representa entre el 3 y el 7% de la proteína total. La aparición de esta pequeña fracción insoluble de la proteína coincide con el aumento de la expresión, lo que en este caso parece favorecer la formación de algún tipo de agregación o asociación a la membrana plasmática. Con el aumento de escala (5 litros) los niveles de expresión se incrementaron hasta el 35% para el medio B y un 18% para el medio A. En ambos casos encontramos que se obtiene un 50 % de la proteína soluble y un 50 % insoluble. Para conocer la influencia del pH (6.6, 7.0 y 7.4) y la temperatura (28, 33 y 37)°C en la solubilidad de P64KEGF se realizaron variantes de cultivos en el medio B, donde se obtiene los mayores niveles de expresión. La expresión fue dependiente del aumento de la temperatura pero no del pH. A pH 7.4 y temperatura de 33 y 37°C la fracción de proteína soluble aumenta hasta el 70 %. Con el objetivo de maximizar la fracción de proteína soluble se compararon ambas fracciones antes y después de diluir la muestra final de ruptura con una solución de urea 2M.

Conclusiones: Los resultados muestran que puede extraerse hasta un 30 % de la proteína que inicialmente se encontraba en la fracción insoluble, lo que permitió suponer que la proteína presentaba una débil agregación o que se encontraba asociada a la membrana plasmática. No obstante existe un 20% de la proteína que no es posible solubilizar empleando esta molaridad del agente desnaturante.

Bibliografía:

1. Nishi T, Fujita T, Nishi -Tacaoca C, Saito A. Matsumoto T, Sato M, Oka T, Itoh S y Yip Y. (1985) *J. Biochem.* Vol 9 (7):153-159.
2. Lin Lee-Fong, Oeun S, Houng A y Reed G. (1996) Mutation of lysines in a plasminogen binding region of streptokinase. *Biochemistry.* Vol 35 (51): 16879- 16885.
3. Lowry O H, Rosrbrough N J, Farr A L y Randall R J.
4. Laemmli U K. *Nature* Vol 227: 680-685
Biological Chemistry. Vol 193:265-275. 1951.