

Inmunoidentificación del patrón electroforético en la proteína fusionada CIGB550-E7

Maelys Miyares Estrada*, Dayana Soler Sanchez, Laura Varas Sarzo, Yasser Zarate Rivera, Lázara Muñoz Hernández, Miladys Limonta Fernández, Aniurka M. Panfet Aulan, Milaid Granadillo Rodríguez, Ailen Batte Figueredo.
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) Ave. 31 entre 158 y 190,
Cubanacán, Playa, La Habana, Cuba. CP 10600.
email: maelys.miyares@cigb.edu.cu

Resumen

La proteína E7 del virus del papiloma humano (HPV16) es el mayor factor oncogénico asociado con el desarrollo del cáncer cervical. La proteína E7 representa un blanco ideal en el desarrollo de vacunas terapéuticas; pero su principal desventaja es la baja inmunogenicidad. Esta limitación ha sido resuelta con el uso de moléculas inmunoestimuladoras que facilitan la internalización de los antígenos por las células presentadoras y una consecuente inducción de la respuesta inmune.

El CIGB550-E7 es un novedoso candidato vacunal terapéutico obtenido por vía recombinante; que consiste en la fusión del péptido penetrador a células (CIGB 550) con el antígeno E7 del virus del papiloma humano (VPH 16).

En este trabajo se evaluaron dos aspectos de las propiedades físico-químicas de la proteína. Se determinó la talla molecular aparente por electroforesis reducida y el patrón de isoformas por isoelectroenfoque.

El perfil electroforético de la proteína fusionada consistió en: agregados (entre 43- 54 kDa), monómero (24kDa) y una especie (16 kDa) propia de la proteína E7. También se observó una señal a la altura de (34kDa) característica del contaminante del hospedero *E. coli*. Se inmunoidentificó el patrón de bandas con anticuerpos específicos que reconocieron cada segmento de la proteína. Se observó cuatros isoformas con punto isoelectrico estimado experimentalmente entre 6,6-7,0.

Este estudio forma parte de la caracterización analítica de la proteína CIGB550-E7, que permite apoyar y guiar las decisiones tomadas en el desarrollo del proceso de obtención. Los resultados han sido un elemento clave en el establecimiento de las especificaciones del producto.

Palabras Claves: proteína E7, propiedades físico-químicas, perfil electroforético

Abstract

The E7 protein of the human papillomavirus (HPV16) is the major oncogenic factor associated with the development of cervical cancer. The E7 protein represents an ideal target in the development of therapeutic vaccines; but its main disadvantage is low immunogenicity. This limitation has been resolved with the use of immunostimulatory molecules that facilitate the internalization of antigens by the presenting cells and a consequent induction of the immune response.

CIGB550-E7 is a novel therapeutic vaccine candidate obtained by recombinant route; which consists of the fusion of the cell-penetrating peptide (CIGB 550) with the E7 antigen of the human papillomavirus (HPV 16).

In this work, two aspects of the physical-chemical properties of the protein were evaluated. The apparent molecular size was determined by reduced electrophoresis and the pattern of isoforms by isoelectric focusing.

The electrophoretic profile of the fused protein consisted of: aggregates (between 43-54 kDa), monomer (24kDa) and a species (16 kDa) typical of the E7 protein. A signal at the height of (34kDa) characteristic of the contaminant of the host *E. coli* was also observed. The pattern of bands was immunoidentified with specific antibodies that recognized each segment of the protein. Four isoforms with an experimentally estimated isoelectric point between 6.6-7.0 were observed.

This study is part of the analytical characterization of the CIGB550-E7 protein, which allows to support and guide the decisions made in the development of the production process. The results have been a key element in establishing the product specifications.

Key Words: E7 protein, physical-chemical properties, electrophoretic profile

Introducción

La proteína E7 del virus del papiloma humano (HPV16) es el mayor factor oncogénico asociado con el desarrollo del cáncer cervical. (Mirecka, et al. 2006). Esta proteína ha sido ampliamente estudiada debido a sus implicaciones en esta patología de alto riesgo. La importancia de la E7 se confirma por el hecho de que su expresión es constante en la mayoría de los tumores malignos positivos al VPH. (Vallejo, et al. 2015). E7 se le denomina oncoproteína ya que posee la capacidad de transformar la célula que la expresa. (Smal 2010). También se ha definido como una fosfoproteína, por sus modificaciones postraduccionales a nivel celular.

La proteína E7 representa un blanco ideal en el desarrollo de vacunas terapéuticas. (Howley et al. 1991; zur Hausen, 2002). Sin embargo, la principal desventaja es su baja inmunogenicidad. Esta limitación ha sido resuelta con el uso de moléculas inmunoestimuladoras que facilitan la internalización de los antígenos por las células presentadoras y una consecuente inducción de la respuesta inmune. (Alfonso, 2016).

En este sentido, el uso de péptidos penetradores a células (PPC) son una elección novedosa para el diseño de acoplamiento con antígenos, lo cual puede desarrollarse mediante los métodos de unión química mediante enlaces covalentes o la fusión por vía recombinante en vectores de expresión en bacteria.

En el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) se obtuvo un novedoso candidato vacunal terapéutico por vía recombinante para el tratamiento de lesiones asociadas al VPH. El CIGB550-E7 consiste en la fusión del péptido penetrador a células LALF32-51 (CIGB 550) con el antígeno E7 del VPH 16. Esta proteína es termodinámicamente estable y forma agregados de alta talla molecular deseados para generar la respuesta celular.

El desarrollo de nuevas moléculas requiere de una adecuada caracterización; un requerimiento exigido por las autoridades regulatorias para proteínas recombinantes. Las propiedades físico-químicas son características esenciales en el análisis de

proteínas y se pueden determinar mediante varias técnicas analíticas.

La proteína CIGB550-E7 es una molécula novedosa y se trabaja en la caracterización analítica que es un elemento clave para el establecimiento de las especificaciones del producto. En este estudio se determina la talla molecular aparente por electroforesis reducida y el patrón de isoformas por isoelectroenfoque de la proteína fusionada.

Materiales y Métodos

Sustancias

- Proteína CIGB 550-E7 cepa BL 21
- Patrón de talla molecular para electroforesis de proteína (SDS-PAGE): Lisozima (14,4 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa), Anhidrasa carbónica (29,0 kDa), Ovoalbúmina (45,0 kDa), Albúmina (66,0 kDa).
- Anticuerpo Policlonal: VPH16 E7(C-20) Santa Cruz. Biotechnology.
- Anti-Human Papillomavirus 16 (E7) anticuerpo monoclonal Abcam.
- Suero policlonal anti CIGB550-BSA: Suero que contiene AcP anti-péptido 550 a partir de inoculaciones del conjugado BSA-550 en conejos, liberado de proteínas *E.coli*.
- Conjugado Policlonal anti histidina .Santa Cruz. Biotechnology.

Obtención de la Proteína CIGB550-E7

La proteína CIGB550-E7 se expresó en la bacteria *E coli* BL21DE3 transformada con el plásmido pPEPE7M-7 en un medio químicamente definido con glucosa y kanamicina. Los parámetros de operación de la fermentación son: 35°C; pH=6,6; 700 rpm de agitación, flujo de aire de 5 L/min, volumen de cultivo 5 L y un tiempo de 24 h. La biomasa se homogeneizó en la solución de ruptura: NaH₂PO₄ 5 mmol/L; NaCl 30mmol/L pH8 a razón de 10 mL de solución/g de biomasa con un homogeneizador vertical. La ruptura celular se desarrolló mediante 3 ciclos en un homogeneizador de alta presión tipo prensa francesa. El precipitado resultante se

homogenizó con la solución de extracción: 6mol/L Urea; Na₂CO₃ 81,1 mmol/L /NaHCO₃ 19mmol/L pH10,6 a razón de 5 mL/g biomasa inicial. Se centrifugó la muestra y el precipitado obtenido se desechó y se midió el volumen del sobrenadante de la etapa de extracción. Posteriormente se solubilizó la muestra en igual volumen con la solución de NaCl 1 mol/L. Se realizó una cromatografía de iones metálicos (IMAC) y se utilizó la matriz His-Select® Nickel Affinity. La detección se realizó a 280nm de longitud de onda. La purificación final se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular y se estabilizó la proteína en: Tris 10 mM/ tween 80 0.01% pH8. (Soler 2014).

Electroforesis de proteínas.

La técnica se llevó a cabo siguiendo el método descrito por (Laemmli, 1970). Se realizaron tres tipos de electroforesis: en condiciones reducidas, no reducidas y nativa, para ello se prepararon geles al 13,5% y de gradiente de 4-17% de acrilamida-bisacrilamida de 1,5 mm de espesor respectivamente. Se evaluaron los lotes de CIGB550-E7 en estudio, incluyendo el patrón de talla molecular compuesto por cinco proteínas: lisozima (14,4 kDa); β-lactoglobulina (18,4 kDa); anhidrasa carbónica (29 kDa); ovoalbúmina (45 kDa) y albúmina (66 kDa). Para la corrida en condiciones reductoras las muestras se trataron con β-mercaptoetanol 65% (v/v) y en la corrida en condiciones no reductoras las muestras se trataron con Tris (hidroximetil) aminometano 0,014M y SDS 0,004% (m/v). En el caso de la corrida en condición nativa sólo se trataron las muestras con Tris (hidroximetil) aminometano 0,014 M. Se aplicaron en el gel 20µg de proteínas totales por pocillo. La corrida se efectuó a 15mA y voltaje libre (250V). Posterior a la corrida, se tiñó el gel 1 hora con la solución de tinción de Coomassie (Ácido acético 10 %; Azul brillante de coomassie G-250 0,25%; Metanol 50%), y se destiñó durante 4 horas con la solución de destinción (Ácido acético 10%; Metanol 15%).

Inmunoidentificación de la proteína por Western Blott.

Esta técnica se realizó siguiendo el método descrito por (Towbin et al. 1979). Se emplearon geles de 13,5% y de gradiente de

4-17% con las muestras en condiciones reducidas, no reducidas y nativa respectivamente. Las proteínas contenidas en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, U.K.) mediante el empleo del Transfer húmedo bajo un campo eléctrico de 400mA y 20V por 1h. Posterior a la transferencia, la membrana se incubó con solución de bloqueo (leche descremada 5% en Tampón Fosfato Salino pH 7,2 (Cloruro de sodio 0,137 M; Cloruro de potasio 2,68mM; Hidrogenofosfato de disodio 8,45 mM; Dihidrogenofosfato de potasio 1,68 mM) a 37°C durante 1 hora.

Para inmunoidentificar la proteína CIGB550-E7 se utilizaron tres tipos de anticuerpos específicos. Después del paso de bloqueo, la membrana fue incubada en agitación con las soluciones de anticuerpos comerciales policlona y monoclonal anti-E7 a la dilución recomendada por el fabricante en el Tampón Fosfato Salino-Leche descremada 1% durante toda la noche a 4°C respectivamente. Posteriormente se incubó en agitación con los conjugados: anticuerpo policlona anti-carnero unido a la enzima peroxidasa y conjugado anticuerpo monoclonal anti-ratón unido a la enzima peroxidasa respectivamente durante 2 horas a 37°C. En el caso del anticuerpo policlona específico anti CIGB550 obtenido en conejo por nuestro laboratorio, diluido 1:1000 en el Tampón Fosfato Salino-Leche descremada 1%, durante 2h a 37°C. Luego se incubó en agitación con el conjugado anticuerpo policlona anti-conejo unido a la enzima peroxidasa, en una dilución 1:2000, durante 1 hora a 37°C.

Para la identificación de proteínas contaminantes del hospedero se empleó una solución de anticuerpo suero anti-*E. coli* obtenido en conejo por nuestro laboratorio diluido 1:100, en el Tampón Fosfato Salino-Leche descremada 1%, durante 2 horas a 37°C. Luego se incubó en agitación con el conjugado anticuerpo policlona anti-conejo unido a la enzima peroxidasa, en una dilución 1:4000, durante 1 hora a 37°C. Finalmente, las membranas fueron reveladas con solución sustrato (Tampón Fosfato Salino, 0,05 % (m/v) de diaminobencidina (DAB) y 0,05 % (v/v) de peróxido de hidrógeno H₂O₂).

Electroforesis Bidimensional.

Focalización isoelectrica.

La muestra reducida se diluyó en 260µL de urea 8M, DTT 1%, anfólitos 3-10 al 2% y se aplicó para la rehidratación de una tira IPG 3-10, 17 cm (Biorad) durante 16 h. La focalización isoelectrica se realizó en un equipo 3100 Off Gel Fractionator (Agilent). La corrida se mantuvo hasta acumular 70 kVh con una corriente máxima de 50 µA por tira. Posteriormente a la focalización isoelectrica, se incubó la tira durante 10 min en una solución de urea 6M, SDS 3%, glicerol 30%, DTT 1%, Tris/HCl 50mM, pH 8,8. Seguidamente se incubó con la solución sin DTT pero con acrilamida al 2.5% durante 10 min con agitación suave.

La tira se colocó encima de un gel al 15%T según las condiciones descritas por (Laemmli, 1970). y se fijó con agarosa al 2%. La segunda dimensión se corrió a corriente constante de 30mA hasta que el bromofenol azul alcanzó el borde inferior del gel.

La tinción de los geles se realizó utilizando el método de tinción con plata descrito por (Heukeshoven and Dernick 1988). El gel se incubó en etanol al 40%, ácido acético al 10%, 30 min, seguido de tiosulfato de sodio 0,2%,

acetato de sodio 4%, etanol al 30% y glutaraldehído 0,5%, durante 2h.

Seguidamente se lavó tres veces con agua durante 15 min cada uno y se incubó en solución de nitrato de plata 0.1%, formaldehído 0.007% durante 30 min. Posteriormente se lavó con agua 5s y se reveló con carbonato de sodio 2,5%, formaldehído 0.0035 %. La reacción se detuvo con EDTA 1,5%.

Resultados y Discusión

Estimación de la talla molecular aparente de la proteína

En este estudio se estimó la talla molecular aparente de la proteína CIGB550-E7 (Figura 1) por electroforesis reducida (SDS-PAGE) a partir de patrones de talla moleculares.

En la Figura 2 (A-E) se observó la talla molecular y el patrón electroforético de la proteína CIGB550-E7 mediante una electroforesis reducida (SDS-PAGE) y la identificación por western Blot. En la Figura 3 se muestra la relación del logaritmo y la distancia recorrida de los patrones de talla moleculares. En la Tabla 1 se muestra la estimación de las tallas moleculares de las especies de la proteína.



Figura 1. Esquema de la secuencia de la proteína CIGB550-E7.

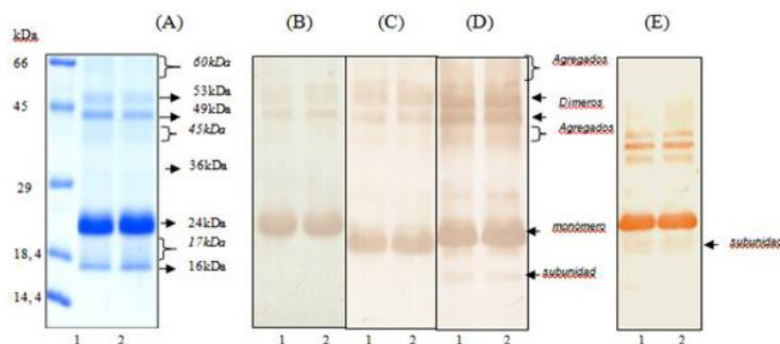


Figura 2. (A) SDS-PAGE. Carril 1: Patrón de tallas moleculares. Carril 2 y 3: Lotes de la proteína CIGB550-E7. (Western Blot revelado con anticuerpos: (B) Suero Policlonal Anti péptido. (C) Anticuerpo Monoclonal Anti E7. (D) Anticuerpo Policlonal Anti E7. (E) Conjugado Anti-histidina.

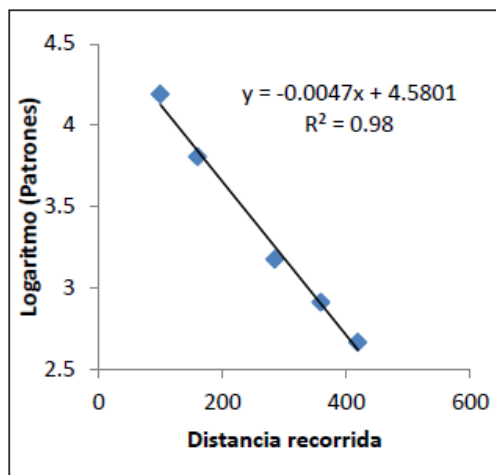


Figura 3. Relación del logaritmo y la distancia recorrida de los patrones de talla molecular.

Tabla 1. Talla molecular del CIGB550-E7 estimado a partir de los patrones de talla molecular.

	Proteína/Especie	Talla (kDa)	Logaritmo	Distancia
Patrones	Albumina	66	4.2	100
	Ovalbumina	45	3.8	160
	Anhidrasa Carbónica	29	3.2	265
	β -Lactoglobulina	18.4	2.9	359
	Lizosima	14.4	2.7	419
	CIGB 550-E7	Fondos(Agregados)	~ 60	4.1
		53	3.9	151
Dímero		49	3.8	171
Fondos(Agregados)		~ 45	3.7	196
<i>E. coli</i>		36	3.4	252
Monómero		24	3.1	323
Fondos(Subunidad)		~17	2.9	366
Subunidad		16	2.8	376

Mediante SDS-PAGE se observó el monómero con una talla molecular aparente de 24kDa situado entre la β -lactoglobulina(18,4 kDa) y la anhidrasa carbónica (29 kDa). Los dímeros correspondieron a una talla de (49 y 53 kDa) entre la ovalbumina (45 kDa) y la albumina (66 kDa) con un fondo de alta talla molecular (\approx 45 kDa) asociado a degradaciones de éstas especies de agregados. También se observó una banda tenue a la altura de (36 kDa) como una especie de contaminante del hospedero. Así como una banda de menor talla molecular (16 kDa) con un fondo de (\approx 17kDa).

La inmunoidentificación de las formas proteicas de la proteína CIGB550-E7 se realizó mediante Western Blotting con tres anticuerpos policlonales (AcP) y un monoclonal (AcM). Se identificó de forma

específica todas las especies de la proteína observadas en SDS-PAGE.

Estimación experimental del punto isoeléctrico e identificación de las isoformas.

La estimación experimental del punto isoeléctrico (pI) de la proteína CIGB550-E7 se realizó por Electroforesis bidimensional (E2D). En la figura 4 se muestra el análisis del punto isoeléctrico y la identificación de las isoformas de la proteína CIGB550-E7.

Se observó una señal de interés que migra a la altura aproximada de 23,5kDa correspondiente al monómero de la proteína CIGB550-E7. Adicionalmente se observaron señales de menor talla molecular y se puede inferir que son degradaciones de la proteína (<18kDa).

Artículos

No se detectaron bandas de mayor talla debido probablemente a una reducción total de los enlaces disulfuro (1h de procesamiento de muestra y alrededor de 24h entre los pasos de rehidratación y focalización en presencia de DTT 1%).

A la altura de migración reportada para el CIGB550-E7 se observaron cuatros isoformas. El cálculo de sus pI en función de la distancia de focalización permitió la estimación experimental de: 6,6; 6,8; 6,9; 7,0 para las cuatros isoformas respectivamente. En la Tabla 2 se reportan los valores de pI estimado por diferentes métodos para la proteína CIGB550-E7.

El pI teórico de la proteína CIGB550-E7 oscila entre 6,1 y 6,6 dependiendo del método de cálculo que se emplee y el grupo de valores de pKa de los aminoácidos ionizables que se

utilicen para su cálculo. Para este cálculo se considera que los residuos de cisteínas no están formando parte de enlaces disulfuro y no están modificados, lo que coincide con las condiciones de Isoelectroenfoco (IEF) que se emplearon durante el análisis. El pI teórico calculado por el método iterativo (Audain et al. 2014), los valores de pKa por (Sillero 2006) y los utilizados por el sitio EMBOSS (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web>) se acercan al valor de la isoforma más ácida encontrada experimentalmente (6,5 y 6,6 respectivamente vs 6,6). El resto de los valores calculados teóricamente se encuentran entre 0,4 y 0,5 unidades de pH por debajo de la estimada experimentalmente para la isoforma más ácida. El resto de las isoformas tienen valores de pI ligeramente superior (6,8; 6,9 y 7,0).

Tabla 2. Puntos Isoelectricos (pI) teóricos del CIGB550-E7 estimado por diferentes métodos y valores de pKa de sus aminoácidos.

Método	Grupo de valores de pKa	Valor calculado
Iterativo (Audain, 2014).	Según (Nelson, et al. 2012).	6,1
	Según (Rodwell, 1982).	6,1
	Según (Sillero. and Maldonado 2006).	6,5
	Según (Solomons, 2017)	6,1
	Según EMBOSS (https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web)	6,6
Bjellqvist	Según (Bjellqvist, et al.1993).	6,2
	Según Bjellqvist, et al.1993). Calibrado	6,1
	Expasy (http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam)	6,1



Figura 4. Electroforesis bidimensional de la proteína CIGB550-E7, la flecha indican las manchas que migran a la altura (kDa) reportada.

La proteína CIGB550-E7 es la fusión covalente del extremo N terminal de la oncoproteína E7 del VPH-16 (98 aminoácidos) con el extremo C terminal del péptido penetrador a células CIGB550 (LALF32-51 20 aminoácidos) e incluye 3 sitios de restricción en diferentes posiciones del fragmento de ADN. La molécula fusionada presenta seis histidinas en su extremo C terminal, que favorece su purificación por iones metálicos. Esta cola residual de histidinas no supone un elemento que impida la actividad o interacción de la proteína, por tanto no se elimina en ningún paso cromatográfico.

La secuencia contiene 134 aminoácidos, 20 cargados negativamente y 15 cargados positivamente. La estructura de esta fusión carece de las bandas de ion zinc (Zn 2+) propios de la proteína E7. Es por esto que las seis cisteínas de la proteína CIGB550-E7 forman enlaces disulfuro intra e intermoleculares.

La diferencia en la migración electroforética de la proteína CIGB550-E7 respecto a la masa molecular intacta (15,7 kDa por ESI-MS) pudiera asociarse con el comportamiento anómalo de la proteína E7. Se puede decir que VPH16 E7 es una proteína modular con dos dominios que presentan propiedades fisicoquímicas totalmente diferentes. (Smal 2010). El dominio N-terminal (E7N) con propiedades de proteínas intrínsecamente desordenadas (Uversky, et al. 2000, Uversky 2002) y el dominio C-terminal (E7C) globular y de plegamiento independiente. (Smal 2010).

Aunque la proteína E7 del VPH-16 tiene una talla molecular teórica de 11 kDa, migra en electroforesis de poliacrilamida como una molécula de 18-20 kDa relativo a su carácter ácido. (Armstrong and Roman 1993). En particular la región más ácida en la proteína E7 está dada en aminoácidos 25-40 (Smal 2010), que en la fusión CIGB550-E7 corresponde (aminoácidos 52-67). El segmento de E7 en la proteína fusionada tiene su extremo N-terminal entre (aminoácidos 28-76) y C-terminal (aminoácidos 77-124).

Por su parte el (CIGB550 péptido LALF) con una secuencia de (20 aminoácidos) cargados positivamente, también pudiera influir en la migración electroforética de la proteína CIGB550-E7. Se conoce que la cantidad de aminoácidos básicos (arginina y lisina) presentes en la secuencia de las proteínas,

hacen que migren por talla molecular. (Pestana 2013).

Como patrón electroforético de la proteína CIGB550-E7 se describió el monómero y agregados en forma de dímeros resultantes de una reducción parcial de los enlaces disulfuro. Inicialmente se describió la banda de menor talla molecular como una subunidad monomérica propia de E7. Sin embargo se confirmó por ESI-MS que dicha banda correspondió al extremo C-terminal de E7 en el perfil de la proteína CIGB550-E7.

Esta especie (16 kDa) es similar a la proteína E7 VPH16 fusionada a una secuencia de seis histidinas en el extremo C- terminal (E7-H6) descrita por (Mirecka, et al. 2006). Incluso esta banda en la proteína CIGB550-E7 fue reconocida tanto con el AcP anti E7 como con el Conjugado anti histidina. Éste último reconocimiento confirmó la región hidrofílica de seis histidinas en el extremo C-terminal de la secuencia aminoacídica en la proteína. Las características de este segmento de aminoácidos básicos impidieron el procesamiento e identificación de las histidinas en el análisis de la banda (16 kDa) de la proteína CIGB550-E7 por ESI-MS. (Resultados no Mostrados).

Sin embargo se plantea que el dominio C-terminal en la proteína E7 posee una movilidad de aproximadamente 7.5 kDa mientras que su peso molecular es de 6.5 kDa. (Smal 2010). La diferencia en la talla molecular de este dominio respecto a la especie (16 kDa) en la proteína CIGB550-E7, está dada por el átomo de Zn coordinado con cuatro cisteínas en el dominio C- terminal y el segmento de histidina en la proteína fusionada.

Se plantea que la fosforilización en los residuos serinas (Ser S 31 y 32) es una modificación postraducional de la proteína E7 (Smal 2010) que genera bandas con diferentes tallas moleculares. (Valdovinos, et al. 2008). El N-terminal de E7 (E7N) presenta una secuencia en el vector de expresión (PEST) que puede estar relacionada con la degradación mediante fosforilación. (Smal 2010). También se ha descrito esta modificación en (Ser S 71) del dominio C-terminal de E7. (Massimi and Banks, 2000). En este caso, podemos inferir que la especie (16 kDa) es una banda fosforilada del segmento C-terminal de la proteína E7 en la

fusión CIGB550-E7. Esta banda no fue reconocida con el mAs anti E7, ya que estas especies tiene distintas propiedades antigénicas debido a los cambios conformacionales. (Valdovinos, et al. 2008).

Por su parte, el suero anti-péptido CIGB550 (LALF) reconoció todo el perfil electroforético de la proteína CIGB550-E7 menos la banda fosforilada debido a la ausencia en la secuencia aminoacídica del péptido.

Este resultado esperado permitió corroborar la unión del péptido CIGB550 con la proteína E7 correspondiente a la fusión CIGB550-E7.

La E7GST es otra fusión con características electroforéticas similares a CIGB550-E7. Aunque ésta, corresponde a la unión de una enzima (glutación S-transferasa GST) por el extremo N-terminal de E7 (Fernando, et al. 1999); las especies monoméricas de las proteínas fusionadas migran en SDS-PAGE a una talla molecular de 24 kDa.

La banda adicional (36 kDa) fue secuenciada como la proteína Aminoglycoside 3'-phosphotransferase de *E. coli* e identificada con el suero anti *E. coli* (cepa BL21). Esta especie contaminante del hospedero fue mayoritaria en la talla molecular mencionada. Aunque se ha identificado por ESI-MS que co eluye con los agregados de la proteína CIGB550-E7. Como el revelado con AcP anti E7 (comercial) también reconoció la banda de *E. coli* (36 kDa); podemos inferir que esta especie de contaminante migra unida al dímero de la banda C-terminal de E7 (16 kDa). Se conoce que la proteína de VPH16 E7 presenta un valor de *pI* teórico de 4,05, pero cuando se mide esta característica en dicha proteína recombinante producida en bacteria presenta un valor de 5,4. (Valdovinos, et al. 2008). Por otra parte se plantea que el N-terminal de la proteína E7 (E7N) presenta un valor de 3,4 y el C-terminal (E7C) un valor de 6 (Smal 2010).

Mientras que el péptido CIGB550 (LALF32-51) posee un valor de *pI* teórico de 11 y las histidinas un valor de 7.59. (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

La fusión CIGB550-E7 está favorecida por los residuos acídicos (19 aminoácidos) de la proteína E7. En este caso no influyen en el *pI* ni el péptido CIGB550 (LALF32-51) con (20 aminoácidos) ni la etiqueta de histidina con seis aminoácidos cargados positivamente. En

esta proteína fusionada, la elongación de la cadena polipeptídica y el aumento en la secuencia aminoacídica originan un valor de *pI* teórico que oscila entre 6,1 y 6,6 como se mencionó anteriormente.

Se plantea que tanto las bandas de isoformas con igual talla molecular y diferentes *pI*, como las diferencias entre los valores teóricos y experimentales son patrones típicos de la fosforilación originados por modificaciones post-traduccionales en la proteína E7 (Valdovinos, Orozco et al. 2008).

Teniendo en cuenta esto, podemos inferir que los resultados obtenidos con la proteína CIGB550-E7 están asociados a las modificaciones descritas para la proteína E7.

Conclusiones

En este estudio se determinó el patrón electroforético y la talla molecular aparente de la proteína fusionada. Las especies proteicas de la proteína fueron inmunoidentificadas con anticuerpos específicos para cada segmento de la fusión. Se identificó la banda resultante de la modificación postraducional de la proteína E7. También se estimó las isoformas y el punto isoeléctrico de la proteína. Estos resultados forman parte de las propiedades físico-química, aspecto esencial en la caracterización analítica de la proteína CIGB550-E7.

Referencias

Alfonso, C. A. B. (2016). Evaluación de la combinación del candidato vacunal CIGB550-E7 con Al(OH)₃ para el tratamiento de tumores transformados por el Virus del Papiloma Humano tipo 16. Tesis de Maestría: Tendencias de la Biotecnología Contemporánea. Investigación de Nuevos Productos.

Armstrong, D. J. y A. Roman (1993). "The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192(3): 1380-1387.

Audain, E., Sanchez A., Vizcaino J. A. et al. (2014). "A survey of molecular descriptors used in mass spectrometry based

Artículos

proteomics." *Curr Top Med Chem* 14(3): 388-397.

Bjellqvist, B., et al. (1993) *Electrophoresis*,14(10): 1023-1031.

Fernando, G. P., Murray B, Z. J and F. I. H (1999). "Expression, purification and immunological characterization of the transforming protein E7, from cervical cancer-associated human papillomavirus type 16." *Clin Exp Immunol* 115: 397-403.

Howley, P. M., K. Munger, H. Romanczuk, et al. (1991). "Cellular targets of the oncoproteins encoded by the cancer associated human papillomaviruses." *Princess Takamatsu Symp* 22: 9.

Heukeshoven, J. and R. Dernick (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." *Electrophoresis* 9(1): 28-32.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227: 680 – 685.

Mirecka, E. A., R. Rudolph and T. Hey (2006). "Expression and purification of His-tagged HPV16 E7 protein active in pRb binding." *Protein Expr Purif* 48(2): 281-291.

Múnger, K. and A. L. Halpern (1997). "HPV16 E7: Primary Structure and Biological Properties " *E7 Protein III*: 20.

Nelson, D. L., et al. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan.

Pestana, V. Y. (2013). "Identificación de modificaciones químicas en la proteína HCcAg.120 del VHC: impacto en la estabilidad e inmunogenicidad" *Maestria*.

Rodwell, J. D. (1982) *AnalBiochem*, 119(2): 440-449. Smal, C. (2010). "Oligomerización de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano y su interacción con el regulador de transcripción y replicación viral E2." *Universidad de Buenos Aires*.

Sillero, A. and A. Maldonado (2006). "Isoelectric point determination of proteins and other macromolecules: oscillating method." *Comput Biol Med* 36(2): 157-166.

Solomons, T. G. and C. Fryhle (2000) *Organic chemistry*. John Wiley & Sons.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4354.

Uversky, V. N. (2002). "What does it mean to be natively unfolded?" *Eur J Biochem* 269(1):2-12.

Uversky, V. N., J. R. Gillespie and A. L. Fink (2000). "Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiological conditions?" *Proteins* 41(3): 415-427.

Valdovinos, T. H., M. M. Orozco, S. A. Pedroza, N. L. Padilla, G. F. Esquivel and X. L. Gutierrez (2008). "Different Isoforms of HPV-16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus." *The Open Virology Journal* 2: 9.

Vallejo V, Velázquez N, Sánchez P, Santos G, Reyes J (2015). "La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular." *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53.Supl 2:S172-7

zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." *Nat Rev Cancer* 2(5): 342-350.