

79
2 eje.

03072

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

U.A.C.P y P./CCH

**DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN SISTEMA GENETICO PARA LA
PRODUCCION DE PROINSULINA HUMANIZADA EN *Escherichia coli*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA:

JORGE OLMOS SOTO

Cuernavaca, Morelos; Marzo de 1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:

- * Al Dr. Francisco Bolívar Zapata por su confianza y apoyo.
- * Al Dr. Fernando Valle Baheza por siempre tratar de inculcarme el significado de la palabra objetividad y por la dirección de este trabajo.
- * A la Dra. Alejandra Bravo y al Dr. Edmundo Calva por su crítica constructiva.
- * Al Maestro Norberto Cruz porque sin su ayuda, parte de este trabajo no hubiera sido posible.
- * A Marcela y Minerva, también por su colaboración en la realización de este trabajo.
- * Pedro Saucedo por la elaboración de las figuras
- * Y a Lidia por su ayuda con la ortografía y por su apoyo.

"NUNCA HAY QUE MENOSPRECIAR A NADIE

NI A NADA PORQUE HASTA UN ATOMO

HACE SOMBRA"

INDICE

GLOSARIO	1
I.-INTRODUCCION	3
II.-ANTECEDENTES	4
2.1. Proinsulina	4
2.2. Ingeniería genética en <i>E. coli</i>	5
2.2.1. Aspectos generales	5
2.3. Promotor de triptófano y péptido acarreador TrpLE.....	6
2.4. Cuerpos de inclusión	7
OBJETIVOS	8
III.-ENFOQUE EXPERIMENTAL	8
3.1. Producción de Proinsulina en <i>E. coli</i>	8
3.1.1. Materiales y métodos	9
3.1.1.1. Construcción del gene MMRPI	9
3.1.1.2. Construcción del plásmido pW-MMRPI	10
3.1.1.3. Cepa y medio de cultivo	11
3.1.1.4. Enriquecimiento de los cuerpos de inclusión	11
3.1.1.5. Purificación de Proinsulina	11
3.1.1.5.1. Intercambio iónico, desalado y HPLC	11
3.1.1.5.2. Secuencia de aminoácidos de la proinsulina purificada	12
3.1.1.5.3. Digestión de la proinsulina con tripsina para analizar la liberación de las cadenas A y B	13
3.1.1.5.4. Cromatografía líquida para cadena A	13

IV.-RESULTADOS Y DISCUSIONES	14
4.1. Producción de Proinsulina en <i>E. coli</i>	14
4.1.1. Construcción del gene MMRPI	14
4.1.2. Fermentación	15
4.1.3. Purificación de Proinsulina	16
4.1.3.1. Enriquecimiento de los cuerpos de inclusión	16
4.1.3.2. Liberación de Proinsulina con CNBr	16
4.1.3.3. Intercambio iónico, desalado y HPLC	17
4.1.3.4. Secuencia de aminoácidos de la proinsulina purificada	18
4.1.3.5. Digestión de proinsulina con tripsina para analizar la liberación de las cadenas A y B	19
4.1.3.6. Cromatografía líquida para cadena A.....	19
V.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	20
FIGURAS	23
VI.-BIBLIOGRAFIA	42

GLOSARIO

CaCl₂- Cloruro de Calcio

cDNA- DNA obtenido de RNAm a través de una reacción con transcriptasa reversa.

CH₃CN- Acetonitrilo

CNBr- Bromuro de Cianógeno

DEAE- Dietilaminotetraetil

D.I. Diámetro interno

GRAS- Generalmente Reconocido Como Seguro

HCl- Acido Clorhídrico

HPI- Proinsulina humana

HPLC=CLAP- Cromatografía Líquida de Alta Precisión

M- Molaridad

MRPI- Gene que codifica para una proinsulina de rata con cambios en 2 residuos de aminoácidos en la región que codifica para la cadena B, esto con el fin de humanizarla, una adición en el extremo 5' de un sitio de restricción para la enzima *EcoRI* y un codon para metionina.

MMRPI- Gene de proinsulina que codifica para las cadenas A y B humanas y el péptido C de rata.

mut L- cepa de *E. coli* la cual es deficiente en su sistema de reparación.

Na₂S₄O₆- Tetratato de Sodio

NH₄HCO₂- Bicarbonato de Amonio

PB10- Cepa de *E. coli* (triptófano mas) derivada de una K12 triptófano menos.

PI- Proinsulina

pMMRPI.- Vector derivado del fago M13mp18 que codifica para el gene humanizado de proinsulina,

pW.- Vector derivado del pBR322 que codifica para la proteína de fusión TrpLE.

pW-MMRPI.- Vector derivado del pBR322 que codifica para la proteína de fusión TrpLE-Proinsulina.

trpE.- Gene que codifica para la proteína E de triptófano

trpLE.- Gene híbrido que codifica para el péptido de fusión TrpLE el cual, fue originado de la fusión del gene que codifica para el péptido líder de triptófano con el gene que codifica para la proteína E de triptófano.

trpLE-MMRPI.- Gene híbrido que codifica para la proteína de fusión TrpLE-Proinsulina.

yvm.- Administración de un litro de aire por min, por cada litro de medio de cultivo.

DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN SISTEMA GENETICO PARA LA PRODUCCION DE PROINSULINA HUMANIZADA EN *Escherichia coli*.

INTRODUCCION

La producción de insulina humana fue uno de los primeros logros comerciales de la tecnología del DNA recombinante. El procedimiento original fue basado en la síntesis de las cadenas A y B de insulina en experimentos por separado, como fusiones químicas con un fragmento de la proteína β -galactosidasa en *E. coli* K12 (fig. 1) (Goeddel et al, 1979). Dos procesos de fermentación y varios pasos de purificación son necesarios para obtener en forma soluble las cadenas A y B. Una vez que se producen estas dos cadenas es necesario que se asocien en su forma correcta para obtener insulina funcional. Este es uno de los problemas principales de esta tecnología, ya que el número de combinaciones que se pueden obtener entre las cadenas A y B durante este proceso de asociación es muy grande (fig. 2). Aún así, si este proceso se trabaja bajo condiciones de asociación controladas (fig. 3) puede dar rendimientos aproximados del 70%, lo cual hace rentable esta tecnología (Goeddel et al, 1979; Frank y Chance, 1983; Cruz, 1991).

Una segunda metodología desarrollada mas tarde para obtener insulina recombinante, es la que se lleva a cabo a través de la producción de proinsulina humana (el precursor natural de la insulina) en un solo proceso de fermentación en *E. coli* (fig. 4). Ambos métodos producen preparaciones equivalentes de insulina, pero tomando en cuenta que este último método reduce los procesos de fermentación y los pasos de purificación, se puede decir que el método para producir insulina a partir de proinsulina es el más atractivo. Sin embargo, la producción de proinsulina en *E. coli* no ha sido bien documentada en la literatura, especialmente los protocolos de fermentación, así como los procedimientos detallados de purificación, ni los rendimientos.

Por otra parte el grupo de investigación de los Dres. Bolivar y Valle han

estado interesados por varios años en la producción de insulina humana usando microorganismos recombinantes. Este ha reportado la producción de insulina humana usando las cadenas A y B producidas con la tecnología del DNA recombinante (Balbás et al, 1988; Cruz et al, 1990; 92;). Así, en este trabajo se presenta la producción y procesos de purificación de proinsulina producida en *E. coli*, la cual codifica para las cadenas A y B humanas y el péptido C de rata.

II.-ANTECEDENTES

2.1. INSULINA

La insulina (fig. 1) es una hormona hipoglucemiante que favorece los mecanismos de transporte de glucosa hacia el interior de la célula (Harper, 1978). La deficiencia de esta hormona produce la enfermedad llamada *Diabetes mellitus*, la cual se controla mediante la administración de insulina. La insulina es una hormona peptídica de la cual se conoce su estructura tridimensional, así como sus propiedades fisicoquímicas (Klostermeyer y Humbel, 1966). Esta hormona es producida en las células-β de los islotes de Langerhans en el páncreas (Tager et al, 1981), esta formada por dos cadenas peptídicas; A y B, unidas entre sí por dos puentes disulfuro. Es sintetizada como un precursor llamado preproinsulina, este consta de un péptido señal que permite la excreción de la proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico. También posee un péptido "conector" o C, situado entre las cadenas A y B. Cuando la preproinsulina atravieza la membrana, el péptido señal es removido, quedando solo las cadenas B, C y A, (la Proinsulina) unidas por enlaces peptídicos. El péptido C favorece el doblamiento adecuado de la molécula en la que quedarán unidas las cadenas A y B mediante puentes disulfuro. Posteriormente, el péptido C es removido generando así la molécula de insulina madura. Hasta la fecha la(s) enzima(s) encargada(s) de remover *in vivo* el péptido C son desconocidas. Sin embargo, desde 1971 se conoce que las enzimas Tripsina y Carboxipeptidasa B pueden llevar a cabo la conversión de PI a insulina *in vitro* (Kemmler et al, 1971). Por esta razón y

porque la producción de insulina humana a partir de PI es un método más barato y más rápido que la producción de las cadenas A y B por separado, esta tecnología esta siendo investigada en diferentes clases de microorganismos y bacterias entre las cuales se encuentran *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *E. coli*.

Cabe mencionar que en el laboratorio, ya se cuenta con un cDNA de proinsulina de rata el cual fue obtenido por (Vichido y Bolívar, 1982) y que además, a este cDNA ya se le hicieron modificaciones en la cadena B con el fin de hacerla más parecida a la humana (Sánchez, 1985). Dando como resultado un gene híbrido de PI rata/humano (MRPI), el cual es el gene con el que se va a llevar a cabo este trabajo.

2.2. INGENIERIA GENETICA EN *E. coli*

2.2.1. ASPECTOS GENERALES

Escherichia coli es una bacteria Gram (-) aislada del intestino humano. Este es uno de los microorganismos mejor caracterizados genéticamente y por esta razón el más utilizado para la clonación de genes. Virtualmente, todas las herramientas de la ingeniería genética y sus procedimientos han sido desarrolladas y perfeccionadas en este microorganismo. Consecuentemente, continúa siendo el organismo de primera elección para la clonación inicial y la caracterización de la gran mayoría de los genes provenientes de diferentes fuentes. Pero esto no necesariamente significa que sea el microorganismo adecuado para la producción comercial de proteínas. Frecuentemente, algunos de los inconvenientes que se encuentran cuando se piensa en *E. coli* como un microorganismo para producir a nivel industrial son: a) las consideraciones de salud en los productos obtenidos a partir de este microorganismo, ya que *E. coli* es una bacteria gram (-), que no es considerada como GRAS (Generalmente Reconocida Como Segura) y b) no realiza modificaciones post-traduccionales por lo que proteínas que requieren de alguno de estos procesamientos no pueden ser producidas en *E. coli*. Sin embargo, la lista de genes heterólogos clonados y

expresados en *E. coli* continúa creciendo. Por otro parte, es importante mencionar que las características de crecimiento de este microorganismo son bien conocidas, por lo que es posible, producir a nivel industrial hasta 150 gr de peso seco del organismo por litro, en un medio relativamente simple (Nicaud et al, 1986). En general la producción de insulina y de muchas proteínas heterólogas en *E. coli* se basa en la utilización de un promotor fuerte tal como P_L del bacteriofago *lamda* (Ptashne, 1986) ó el promotor Trp del operon de triptófano (Yanofsky et al, 1981; Yansura, 1990). Por otra parte, para evitar la degradación y facilitar la acumulación y/o la purificación de las proteínas heterólogas se utilizan péptidos acarreadores tales como; TrpE o TrpLE los cuales permiten la formación de cuerpos de inclusión (Yanofsky et al, 1981; Yansura, 1990; Georgiou y Bowden, 1991).

2.2.2 PROMOTOR DE TRIPTOFANO Y PEPTIDO ACARREADOR TrpLE.

La expresión de una proteína de fusión constituye un sistema fácil y rápido para lograr la síntesis de una proteína en particular, no es un sistema tan elegante como la secreción al medio de cultivo, pero sigue siendo comunmente utilizado. Este sistema presenta algunas ventajas sobre la excreción de proteínas al medio de cultivo, como por ejemplo; para muchas proteínas o péptidos pequeños, las fusiones parecen ser la única manera práctica para acumular niveles adecuados de proteína y también la manera de eliminar pérdidas debido a proteólisis. Sin embargo, proteínas mucho más grandes pueden también beneficiarse de este principio. Una segunda ventaja de una fusión con respecto a una expresión directa, es que los problemas debidos a la pobre iniciación de la traducción pueden ser evitados.

En los últimos años, las fusiones con péptidos truncados, que sirven “como acarreadores” como por ejemplo TrpE o TrpLE, se han utilizado exitosamente para producir más de 30 proteínas o péptidos (Yansura, 1990). El alto nivel de expresión de la mayoría de estas fusiones puede atribuirse a dos factores: el primero; es que el promotor del operon de *trp* es relativamente fuerte

comparado con el promotor P_L el cual es uno de los promotores mas fuertes, pero además el promotor del operón de *trp* se puede controlar dependiendo de la cantidad de triptófano que se le agregue al cultivo, y la segunda; es que las fusiones con los péptidos TrpE o TrpLE producen péptidos insolubles, que comunmente forman cuerpos de inclusión resistentes a proteólisis. En términos de expresión, las fusiones con *trpE* y *trpLE* parecen ser comparables, siendo la diferencia principal a nivel de control transcripcional. Mientras que las fusiones con el péptido TrpE se encuentran bajo el control de un represor y de un atenuador, las fusiones con el péptido TrpLE solo tienen el control de la represión porque al hacer la fusión de *trpL* con *trpE* se elimina la atenuación que ejerce *trpL*. La fusión *trpLE* tiene deleciones en el final del fragmento de DNA que codifica para el péptido líder y la parte inicial del gene del péptido *trpE* (fig. 5) (Yanofsky et al, 1981; Yansura, 1990).

2.2.3. CUERPOS DE INCLUSION

La agregación de proteínas fue documentada por primera vez en células de *E. coli* crecidas en presencia de análogos de aminoácidos que causaban la formación anormal de proteínas. Posteriormente, se observó que las proteínas recombinantes sobreproducidas algunas veces se encuentran en forma insoluble dentro de la célula huésped. Estos agregados son conocidos como cuerpos de inclusión. Cuando las células se observan al microscópio, los agregados aparecen como áreas altamente refráctiles, y por esta razón también se llaman cuerpos refráctiles. Los cuerpos de inclusión se han observado en bacterias Gram (-) y Gram (+) como *B. subtilis*. La formación de cuerpos de inclusión en *E. coli* esta bien documentada, se ha demostrado que una gran cantidad de proteínas heterólogas se acumulan en forma insoluble en el citoplasma. Entre los productos biológicos más significativos que forman cuerpos de inclusión son: la somatotropina de bovino, la uroquinasa y la interleucina 2. (Georgiou y Bowden, 1991).

OBJETIVO GENERAL

Utilizando como sistema de producción a *Escherichia coli* diseñar y construir un sistema genético para sobreproducir la hormona proinsulina.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Diseñar y construir secuencias de DNA que codifiquen para una molécula de proinsulina que contenga las cadenas A y B humanas.

2.- Colocar al gene estructural de proinsulina humanizada, bajo control de las señales de regulación del promotor de triptófano y lograr su expresión en *Escherichia coli*

3.- Diseñar la purificación de proinsulina producida en *E. coli*.

III.-ENFOQUE EXPERIMENTAL

3.1. PRODUCCION DE PROINSULINA EN *E. coli*

RESUMEN.-

El gene híbrido de proinsulina, el cual cuenta con las cadenas A y B humanas, y el fragmento que codifica para el péptido C de rata (MMRPI), fue obtenido de un gene de proinsulina híbrido rata/humano (MRPI), el cual cuenta con cuatro modificaciones en la cadena B. Estas modificaciones colocaron un sitio de restricción para la enzima *EcoRI* en el extremo 5' y un codon para un residuo de metionina en seguida del sitio de restricción, así también, se cambiaron dos residuos de aminoácidos con el fin de humanizar esta cadena (Sánchez, 1985). Este gene MMRPI, fue clonado y fusionado en fase con el gene *trpLE* y expresado como una proteína de fusión TrpLE-PI, en *E. coli*. En la unión entre las dos proteínas, hay un residuo de metionina (Sánchez, 1985) que permite que la

proinsulina sea liberada de la fusión por medio de una reacción con Bromuro de Cianógeno (CNBr). La fusión se expresó en la cepa *PB10* triptófano (+) la cual es un derivado de la cepa *K12* triptófano (-) de *E. coli*. La producción de la proteína de fusión se indujo por medio de una disminución de triptófano y de glucosa del medio mínimo M9. La proteína de fusión dentro de la célula, formó cuerpos de inclusión, los cuales fueron solubilizados con Acido Fórmico, y digeridos con Bromuro de Cianógeno, los productos fueron sulfonados, purificados por intercambio iónico y cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) (Cruz et al, 1990; 91; 92; Gosset et al, 1993). Por último se comprobó la secuencia de aminoácidos de la PI.

3.1.1. MATERIALES Y METODOS

3.1.1.1. CONSTRUCCION DEL GENE MMRPI

Este trabajo se inició con el gene *MRPI* el cual fue construido por (Sánchez, 1985). Este gene híbrido fue clonado en el fago M13mp18 para una posterior manipulación, con el propósito de cambiar la secuencia del gene de rata para producir un gene (*MMRPI*) que codificara para las cadenas A y B humanas. Para poder realizar la conversión del gene *MRPI* al gene *MMRPI*, las secuencias de los genes *MRPI* y el de *PI* humana (*HPI*) se compararon para visualizar sus diferencias en codones (fig. 6). Una vez realizada esta comparación, se encontró que existían dos diferencias importantes en el gene *MRPI* con respecto al gene *HPI*; una en el codon 30 de la cadena B, y la segunda en el codon 69 en la cadena A. Por esta razón se sintetizaron dos oligonucleótidos de 27 bases cada uno, para ser utilizados en la generación de mutaciones dirigidas en el bacteriofago M13 (Sambrook et al, 1989) que permitieran efectuar los cambios deseados (fig. 7). Estos oligonucleótidos fueron sintetizados por la unidad de síntesis de acuerdo a la técnica convencional usando un Modelo 394 (Applied Biosystems). El oligonucleótido 1 lleva una secuencia que porta el cambio de base para crear la mutación en el codon 30, la cual cambió el residuo del aminoácido Serina por Treonina. Así mismo, este

oligonucleótido lleva otro cambio para crear una mutación silenciosa en el codon 32, la cual dió lugar a la creación de un sitio de restricción para la enzima *NruI*, facilitando así la localización de las colonias mutadas. De la misma manera, el oligonucleótido 2, lleva un cambio de base para crear una mutación en el codon 69, la cual permitió cambiar el residuo del aminoácido Aspártico por Glutámico. También este oligonucleótido lleva otro cambio para una mutación silenciosa en el codon 68 la cual dió lugar a la creación de un sitio de restricción para la enzima *TaqI*.

3.1.1.2. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pW-MMRPI

El plásmido pW precursor del plásmido pW-MMRPI (fig. 8), codifica para el péptido acarreador TrpLE de 191 aminoácidos (Yanofsky et al, 1981; Yansura, 1990). Esta construcción elimina la atenuación y sólo deja la represión en el promotor de *trp* como sistema de control, permitiendo así una transcripción y traducción mayor. También el gran tamaño de la proteína que se produce y sus propiedades hidrofóbicas permiten asegurar una alta probabilidad de formación de cuerpos de inclusión. Este vector pW fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI* en el buffer H (ambos de la compañía boehringer mannheim), a 37°C durante 2 hrs (Sambrook et al, 1989), después con la mezcla de digestión se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, la banda de interés fue cortada del gel y la extracción del DNA de la agarosa se llevó a cabo con la técnica de GlassMax. Por último el vector fue defosfatado para evitar que se ligara sobre sí mismo (Sambrook et al, 1989). El gene MMRPI, fue aislado y purificado del vector pMMRPI (fig. 8) con la enzima de restricción *EcoRI* (con la técnica antes mencionada), y clonado (Sambrook et al, 1989) en el vector pW (fig. 8). Una vez clonado el gene MMRPI, este quedó en fase con el gene que codifica para el péptido TrpLE y bajo el control de las señales de regulación del promotor de *trp* (Fig. 8). Se sabía con anterioridad que una vez clonado el gene MMRPI en el vector, este gene iba a quedar en fase porque así fue diseñado (Sánchez, 1985).

3.1.1.3. CEPA Y MEDIO DE CULTIVO

La cepa *PB10* triptófano (+) (De Anda y Valle, 1992) es un derivado de la cepa K12 triptófano (-) de *E. coli*. Esta cepa se transformó con el vector pW-MMRPI de acuerdo con la técnica reportada por Sambrook et al, 1989. Esta cepa transformada, fue crecida en 20 ml de medio Luria (Sambrook et al, 1989) a 37°C hasta saturación. Posteriormente, estos 20 ml se usaron como inóculo para 1 L de medio mínimo M9 (Sambrook et al, 1989), suplementado con 4 g/L de glucosa y 2 g/L de casaminoácidos, a una velocidad de agitación de 500 rpm, con un vvm de aire, a 37°C durante 7 hrs. Las células se recolectaron por centrifugación durante 5 min.

3.1.1.4. ENRIQUECIMIENTO DE LOS CUERPOS DE INCLUSION

Las células fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas en 50 ml de buffer de lisis (10mM Tris/HCl pH 7, 1mM de EDTA y 1mM de β -mercaptoetanol). Una vez resuspendidas, para recuperar los cuerpos de inclusión, las células se lisaron por medio de sonicación a 4°C aplicando 5 pulsos de un minuto cada uno, se centrifugaron durante 10 min a 15 300 g y se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó por medio de 3 ciclos de resuspensión y centrifugación en las mismas condiciones; así mismo este proceso permitió el enriquecimiento de los cuerpos de inclusión.

3.1.1.5 PURIFICACION DE PROINSULINA.

3.1.1.5.1 INTERCAMBIO IONICO, DESALADO Y HPLC.

La fracción enriquecida en cuerpos de inclusión, se solubilizó con ácido fórmico al 70%. Posteriormente el rompimiento de la fusión TrpLE-Met-PI, se llevó a cabo con CNBr (Cruz et al, 1990; 91; 92). Los productos resultantes se convirtieron a su forma sulfonada por medio de sulfitólisis oxidativa (Cruz et al, 1990; 91; 92), este proceso duró 14 horas a temperatura ambiente. La solución se dializó en bolsas de celulosa Spectra/por con un cut-off de 1000, inicialmente

contra agua y finalmente contra un buffer de Tris/HCl 10mM pH 8. En esta parte del procedimiento se formó un precipitado el cual fue separado por centrifugación a 3840g durante 5 min. El precipitado y el sobrenadante se analizaron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 11% (Sambrook et al, 1989), encontrándose prácticamente toda la PI en el sobrenadante (fig. 14.B). La PI en su forma sulfonada se purificó con el sistema de Purificación Avanzada de Proteínas 650E de Waters Equipment, utilizando una columna AP-1 waters, empacada con un soporte de Protein-Pak 40 Hr de DEAE, equilibrada con buffer (Tris/HCl 20mM pH 8) y eluida en un gradiente no lineal de NaCl de 0-5 M en el mismo buffer, durante un período de 90 min a un flujo de 1.5 ml/min (fig. 15.A) (Cruz et al., 1992). Posteriormente, las fracciones (56.3, 59.2 y 62.0) que contenían un péptido con un peso molecular aproximado al de PI se desalaron en una columna de 2X100 cm, empacada con Biogel Aca 204, con un buffer de NH_4HCO_3 20mM, a un flujo de 30 ml/hr, y más tarde las fracciones colectadas se analizaron en un gel no desnaturizante de poliacrilamida al 11% para analizar su recuperación (Sambrook et al, 1989). Ya desaladas las fracciones de interés se liofilizaron. Estas fracciones liofilizadas y un estándar de PI humana de Sigma como control, fueron usados para verificar la existencia de PI en esas muestras. El sistema de HPLC utilizado fue de Waters, con una columna Nova-Pack C8 con un D.I. de 3.9 mm y una longitud de 150 mm. La fase móvil usada fue; eluyente A= 0.05% de ácido fórmico, eluyente B= eluyente A + acetonitrilo al 60%. El eluyente B fue suplementado con un gradiente lineal de 12-60% en un tiempo de 60 min, a un flujo de 1 ml/min.

3.1.1.5.2. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA PROINSULINA PURIFICADA.

La proteína obtenida después de la purificación por HPLC fue usada en secuencia de aminoácidos para comprobar que efectivamente era PI. Esto se llevó a cabo por medio de una reacción de Edman (Edman y Begg, 1967), usando un Pro-sequencer Milligen 660. La muestra fue adsorbida en una membrana pVDF.P

y la reacción se desarrolló automáticamente. Esta parte del trabajo fue desarrollada por la unidad de síntesis y secuenciación de péptidos.

3.1.1.5.3. DIGESTION DE LA PROINSULINA CON TRIPSINA PARA ANALIZAR LA LIBERACION DE LAS CADENAS A Y B.

Para llevar a cabo la digestión de PI con tripsina, primeramente cabe mencionar que las muestras de interés se desnaturalizaron, posteriormente estas muestras se diluyeron a una proporción de 5-10 mg/ml de proteína en un buffer de NH_4HCO_3 0.1 M con 0.1 mM de CaCl_2 y el pH se ajustó de 8 a 8.5 con NH_3 . La tripsina se agregó en una proporción de 1% con respecto a la cantidad de proteína a hidrolisar. La tripsina se preparó a una concentración de 10 mg/ml en una solución de HCl 0.1 M. Una vez que se agregó la tripsina, las muestras se incubaron a 37°C durante una hora y después de ese tiempo se volvió a agregar la misma cantidad de tripsina y las muestras se incubaron a 37°C toda la noche (Allen, 1983). Por último las muestras tratadas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 22% con 5% de bis-acrilamida, en el cual se utilizó a las cadenas A y B sulfonadas, digeridas y no digeridas como controles.

3.1.1.5.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA PARA CADENA A

Realizada la digestión de las muestras con tripsina la mitad de la digestión se utilizó para el gel y la otra mitad se guardó para la cromatografía líquida, la cual se realizó bajo las siguientes condiciones: para detectar la cadena A, se utilizaron las condiciones señaladas por Wetzel et al, 1981: eluyente A= acetato de amonio 50 mM pH 7.1, B= eluyente A + acetonitrilo al 68.57%, el eluyente B se aplicó con un gradiente no lineal de 5-68.57% de acetonitrilo el cual es mostrado con la línea punteada en la figura 18, en un tiempo total de 35 min, con un flujo de 1 ml/min, en una columna C8 de fase reversa, la cual tiene un D.I. de 3.9 mm y una longitud de 150 mm, el volumen utilizado de muestra fueron 50 μl . En este sistema, también se utilizó a cadena A sulfonada como control. Aquí cabe

mencionar que también se realizó la cromatografía líquida para cadena B en la cual no se detectó ningún péptido que tuviera el mismo tiempo de retención que el estandar control de cadena B.

IV.-RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. PRODUCCION DE PROINSULINA EN *E. coli*

4.1.1. CONSTRUCCION DEL GENE MMRPI

El gene MRPI de proinsulina fue mutagenizado (materiales y métodos), para obtener un gene MMRPI de proinsulina el cual contará con la secuencia que codifica para las cadenas A y B homólogas a las humanas. Una vez que se llevaron a cabo las dos reacciones de mutagénesis, el vector mutado pMMRPI el cual es un derivado de un fago M13, se utilizó para transformar la cepa de *E. coli mut L* (Kramer et al, 1984), la cual es deficiente en su sistema de reparación, lo que nos confiere una ventaja a la hora de transformar esta cepa con fagos M13 mutantes los cuales no se encuentran 100% hibridizados en la región que se desea mutar. Las colonias obtenidas fueron crecidas en 3 ml de medio Luria hasta la fase estacionaria para purificar el vector de interés. Para iniciar la búsqueda, primero se hizo una reacción de digestión con la enzima de restricción *NruI* (fig. 9.A) y posteriormente con la enzima *TaqI* (fig. 9.B), más tarde las muestras de DNA que tenían el patrón de restricción esperado en electroforesis de poliacrilamida al 7%, fueron seleccionadas para ser secuenciadas utilizando el método de Sanger (Sambrook et al, 1989); de esta manera se comprobó que las clonas escogidas tuvieran únicamente las mutaciones correctas.

Es importante mencionar que el sistema de mutagénesis utilizado dió un resultado positivo de aproximadamente el 50%, esto aunado a que la mutación deseada no se tuvo que clonar como sería el caso si se hubiera utilizado PCR para mutar, se puede decir que este sistema es muy conveniente cuando se quiere utilizar un solo oligonucleótido para mutagenizar.

4.1.2. FERMENTACION

El gene MMRPI fue ligado de acuerdo a la técnica reportada por (Sambrook et al, 1989) en el vector pW, obteniéndose el plásmido pW-MMRPI el cual llevaba el gene de proinsulina en ambas orientaciones. Una vez identificada la orientación correcta del gene MMRPI (fig. 10) (lo cual se llevó a cabo por análisis de restricción y electroforesis en gel de poliacrilamida al 7%), se transformó con el plásmido pW-MMRPI la cepa PB10 de *E. coli*, posteriormente, se preparó el inóculo (materiales y métodos) y la fermentación se llevó a cabo en medio mínimo M9. Durante la fermentación se tomaron muestras cada hora durante 6 hrs y se analizaron en un gel de poliacrilamida. La figura 11 muestra un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 11% de las muestras que se tomaron durante la fermentación, desde la fase inicial hasta la fase estacionaria la cual se alcanzó a las 7 horas. Para preparar las muestras se tomaron alícuotas de 1 ml durante cada hora de la fermentación y se centrifugaron para recuperar las células, las células fueron ajustadas a una misma densidad óptica con mezcla lítica, después se sonicaron y finalmente fueron calentadas para eliminar la formación de aglomerados protéicos. Posteriormente se aplicaron 5 µl de muestra a un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 11% (fig. 11). Así mismo, en esta misma figura se observó que esta cepa transformada con el plásmido pW-MMRPI, no mostró expresión de la proteína de fusión durante las 2 primeras hrs del crecimiento. La inducción del promotor de *trp* empezó a la tercera hora de la fermentación, observándose un alto nivel de la proteína de fusión TrpLE-PI. Posteriormente en un análisis densitométrico el cual, consiste en hacer un barrido de las proteínas totales para cuantificar las bandas en los diferentes tiempos y después calcular el % de la banda de interés con respecto al % total obtenido de las proteínas, se encontró como resultado que la proteína de fusión constituye alrededor del 20% de las proteínas totales de la célula. Por otra parte, se hizo una comparación de la cepa PB10 sin el vector pW con la cepa PB10 transformada con el vector pW y con el vector pW-MMRPI respectivamente (fig. 12). Esta comparación se llevó a cabo para asegurarnos que la proteína de fusión TrpLE-PI fué producida correctamente. En la figura 12, en el

primer carril, podemos observar la cepa *PB10* como patrón, en el siguiente carril (2), podemos observar que apareció una nueva banda, la cual no se presenta en la cepa *PB10* control, esta banda presentó un peso molecular aproximado de 22 000 Da, el cual era el esperado para el péptido TrpLE. Así mismo, en el último carril puede observarse una nueva banda con un peso molecular aproximado de 32 000 Da, el cual era el esperado para la proteína de fusión TrpLE-PI, la cual esta formada por el péptido TrpLE de 22 000 Da y PI, la cuál tiene un peso molecular aproximado de 9 600 Da.

4.1.3. PURIFICACION DE PROINSULINA

4.1.3.1. ENRIQUECIMIENTO DE LOS CUERPOS DE INCLUSION

El enriquecimiento de los cuerpos de inclusión se llevó a cabo como se indica en materiales y métodos. En la figura 13, se presenta un análisis electroforético del enriquecimiento de los cuerpos de inclusión y muestra como estos fueron purificados y concentrados. Ahora, si hacemos una comparación de los cuerpos de inclusión purificados (carriles 2 y 3), con los no-purificados (carriles 4 y 5), podemos observar que existe una gran diferencia entre ambos en lo que se refiere a pureza, dando como resultado que la purificación de los cuerpos de inclusión de los carriles 2 y 3 corresponde aproximadamente al 90% con respecto a los de los carriles 4 y 5. Por otra parte si tomamos en cuenta que aproximadamente un tercio de la proteína de fusión es PI, teóricamente podemos suponer que el 30% de la proteína híbrida que se produzca será PI.

4.1.3.2. LIBERACION DE PROINSULINA CON CNBr

La PI se purificó como se indica en materiales y métodos. Después del tratamiento con CNBr, la mezcla también se trató con $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ y Na_2SO_3 para obtener la forma sulfonada de los productos (Cruz et al, 1990; 1991; 1992), la cual evita la reacción de oxidación-reducción de los grupos -SH. Los grupos sulfonatos son estables para pasos posteriores de purificación y también son fácilmente

reversibles para regenerar los puentes disulfuro (Cruz et al, 1990; 1991; 1992). La figura 14.A primeramente muestra la proteína de fusión TrpLE-PI la cual cuenta con un peso molecular aproximado de 32 000 Da. En la figura 14.B se muestra la mezcla de péptidos que se obtuvo después del tratamiento de los cuerpos de inclusión con CNBr y sulfitolisis oxidativa. Así también un resultado muy favorable que muestra esta figura es que prácticamente toda la PI se encontró soluble en el sobrenadante. Este resultado nos confiere una gran ventaja a la hora de querer purificar la proteína de interés ya que esta puede ser aplicada directamente del sobrenadante de la solución de diálisis a la columna sin necesidad de buscar condiciones para disolverla y/o solubilizarla.

4.1.3.3. INTERCAMBIO IONICO, DESALADO Y HPLC

Después de la cianogenólisis, la mezcla de proteínas se convirtió a la forma sulfonada, lo cual dió lugar a que la PI presentara 6 grupos sulfonato después del tratamiento. Es de suma importancia conocer cuales y cuántos grupos se formaron en la proteína después del tratamiento con Na_2SO_3 y $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$, ya que con esta información es posible elegir adecuadamente el sistema de purificación a utilizar. En este caso fué intercambio aniónico en DEAE. Una vez que la columna estuvo equilibrada, la mezcla de péptidos se aplicó en la columna a un flujo de 1.5 ml/min., y la elución se llevó a cabo como se indicó en materiales y métodos. Posteriormente, se colectaron las fracciones, se desalaron y se analizaron en un gel desnaturante con un gradiente de poli(acrilamida) de 10-25% (fig. 15.A y B). En la figura 15.B, encontramos que hay varias fracciones (56.3, 59.2, 62.0), las cuales tienen un péptido que migra como el péptido mayoritario del patrón (mezcla completa carril 2), el cual cuenta con un peso molecular similar al de PI (9 600 Da). Estas tres fracciones fueron analizadas por HPLC usando las condiciones descritas en materiales y métodos. Y como se muestra en la figura 16 todas ellas tuvieron el mismo tiempo de retención que el estándar comercial de PI humana (resultado no mostrado). Lo que hasta este paso nos corroboraba que la proteína que habíamos estado purificando en los procesos

anteriores si era PI.

Así en la figura 15.B podemos observar que los péptidos de interés (56.3, 59.2, 62.0) se purificaron hasta en un 90% en el proceso de intercambio iónico lo cual es un resultado muy satisfactorio ya que nos dice que si pudieramos mejorar un poco mas la purificación de PI en este sistema podríamos tener una PI casi 100% purificada en un sistema que puede ser escalable y que además los solventes utilizados en él son muy baratos comparados con los solventes utilizados en HPLC.

También es importante mencionar que después de una purificación por intercambio iónico las fracciones obtenidas por lo general se encuentran muy saladas. La concentración de sal puede ser un impedimento en la mayoría de las reacciones enzimáticas por lo que es recomendable que después del intercambio iónico se desalen las fracciones antes de utilizarse en otro sistema o reacción.

4.1.3.4. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE LA PROTEINA PURIFICADA PARA VERIFICAR QUE SI ES PROINSULINA.

Para confirmar que la proteína purificada era PI se determinó su secuencia de aminoácidos usando las condiciones descritas en materiales y métodos. Y como era lo esperado, la secuencia de aminoácidos obtenida de la proteína presente en las fracciones 11, 12 y 13 de la cromatografía de intercambio iónico, confirman que la proteína purificada si es PI.

Algunos de los datos importantes a mencionar en este sistema es que la PI utilizada para la secuenciación de aminoácidos tenía que estar perfectamente bien desalada de lo contrario el pegado a la membrana no era muy eficiente lo cual nos impedía obtener resultados satisfactorios. Así también, se determinó que la membrana a utilizar para el mejor pegado de la PI era una que tuviera características hidrofóbicas.

4.1.3.5. DIGESTION DE PROINSULINA CON TRIPSINA PARA ANALIZAR LA LIBERACION DE LAS CADENAS A Y B.

En la figura 17 se muestra la digestión con tripsina de uno (56.3) de los tres (56.3, 59.2 y 62.0) péptidos de intercambio iónico que mostraron el peso aproximado de PI y que posteriormente fueron purificados por HPLC y confirmados por secuencia de aminoácidos. Así también, en esta figura podemos observar que la cadena B se esta digiriendo en tres fragmentos, no así la cadena A la cual si se esta liberando adecuadamente de PI con tripsina. Una forma de explicar porque la cadena B esta siendo digerida en varios fragmentos es que; B cuenta con argininas dentro de su secuencia y según datos de la literatura para evitar el corte de este aminoácido en la cadena B, se tienen que encontrar las concentraciones adecuadas de tripsina y además se tiene que utilizar en combinación con la enzima carboxipeptidasa B. Cabe mencionar que algunos experimentos utilizando las dos enzimas en las condiciones recomendadas (Kemmler et al, 1971) en la literatura se desarrollaron sin obtener ningún tipo de corte. Lo cual nos señala que carboxipeptidasa B esta inhibiendo a tripsina. Así, estos resultados nos indican que si en algún momento queremos liberar insulina de PI habrá que trabajar en la implementación de este sistema.

4.1.3.6. CROMATROGRAFIA LIQUIDA PARA CADENA A

En la figura 18 se muestra un cromatograma típico para la cadena A sulfonada; las condiciones utilizadas fueron las indicadas en materiales y métodos. En esta figura se puede ver que la cadena A sulfonada tiene un tiempo de retención de 12.3 minutos. Por otra parte, en la figura 19, la cual presenta un cromatograma de una de las fracciones (56.3) digeridas con tripsina, muestra un pico con un tiempo de retención igual (12.3 min) al que presentó el control sulfonado de cadena A en la figura anterior.

Estos resultados nos indican que efectivamente como ya se habia señalado en la figura 17, la PI digerida con tripsina si contiene cadena A. Lo cuál nos dice que aunque la concentración de tripsina estuvo en exseso cadena A si se liberó adecuadamente.

V.-CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el laboratorio se ha logrado la producción de una molécula de insulina asociando los péptidos A y B constituyentes, producidos de manera separada como proteínas de fusión en una cepa de *E. coli* triptófano (-). Así con el propósito de hacer mas rentable la producción de insulina y no tener que usar triptófano para inducir el crecimiento celular en una cepa triptófano(-). Nosotros decidimos caracterizar el sistema de expresión y purificación de PI en una cepa triptófano(+).

Una de las ventajas que presentó nuestro sistema de producción es que además de formar cuerpos de inclusión con la proteína híbrida y evitar proteólisis, el péptido acarreador también le permite aumentar su eficiencia de traducción gracias a su gran tamaño.

En una fermentación tipo lote en la escala de 1 L, la concentración celular final alcanzada fue de 1 g/L de peso seco, y el porcentaje de la proteína híbrida TrpLE-PI producida en relación a la proteína total celular correspondió al 20%. Por lo tanto se obtuvo una concentración final de la proteína de fusión de .11 g/L. De aquí aproximadamente una tercera parte corresponde a PI lo que significa que podría recuperarse hasta .036 g/L de la proteína en este sistema. Ahora, si comparamos estos resultados con los resultados obtenidos para las cadenas A y B. A fué producida a una concentración de .059 g/L en una fermentación de tipo lote alimentado en un medio rico a una escala de 10 L en la cual se produjeron 9 g/L de peso seco y el 12% de la proteína total correspondió a la proteína de fusión TrpLE-A de la cuál, A constituye un décimo. Para B también se utilizaron las mismas condiciones de fermentación, obteniéndose una producción de 20 g/L de peso seco, del cuál el 11% de la proteína total correspondió a la proteína de fusión TrpC1-B de la cuál B representa un sexto, lo que significa que B se produjo a .16 g/L (Gosset et al, 93a; 93b). Lo importante de estos datos es que si comparamos los porcentajes de proteína de fusión obtenida para los tres casos, podemos observar que para la fusión TrpLE-A fue del 12%, para TrpC1-B del 11% y para TrpLE-PI fue del 20%. Además de obtenerse aproximadamente el doble de proteína de fusión TrpLE-PI con respecto a TrpLE-A y TrpC1-B, se tiene otra ganancia en la

producción de PI con respecto a la de A y B si tomamos en cuenta que A constituye un décimo, B un sexto y PI un tercio de sus correspondientes proteínas de fusión. Ahora, si estos resultados tan favorables los aunamos con el hecho de que todavía falta optimizar el proceso de fermentación, podríamos esperar que al utilizar el sistema de fermentación desarrollado por Gosset et al, 93, en el cual alcanzan un promedio de 15 g/L de peso seco y si el porcentaje de proteína de fusión TrpLE-PI se mantuviera al 20% con respecto de la proteína total, la producción de PI se iba a mejorar mucho mas.

El método empleado para la liberación y purificación de la PI de la proteína de fusión, permitió en primera instancia liberar a la molécula de PI de el péptido acarreador por medio de una reacción de cianogénolisis. Y con un sistema de cromatografía de intercambio iónico usando resina preparativa, se definieron las condiciones para lograr una purificación de hasta en un 90% de la molécula de PI en un solo paso de purificación el cual puede ser escalable.

Al integrar los sistemas de regulación, los procesos de fermentación de la cepa recombinante, la liberación y los procesos de purificación tanto a nivel preparativo como analítico obtenidos para PI, se constituye una tecnología completa para poder obtener PI.

También es importante mencionar, que la producción de proteína híbrida TrpLE-PI además de estar regulada directamente por triptófano, también se observó un tipo de regulación indirecta por glucosa y digo indirecta por que hasta el momento no se sabe que glucosa regule directamente el promotor de triptófano. Esto lo menciono, por que al estar buscando las condiciones de triptófano que dieran la máxima producción de proteína híbrida en la fermentación, observé que si se aumentaba la concentración de glucosa con respecto a la concentración ya establecida, y la concentración de triptófano se mantenía en el nivel adecuado para llevar a cabo la activación, la producción de la proteína híbrida disminuía considerablemente. Una explicación para esto podría ser que al tener la célula glucosa en exceso esta iba a mantener ocupada la maquinaria de transcripción y traducción para los procesos esenciales de crecimiento. Un resultado que apoya esta hipótesis es el obtenido por Gosset et al,

93b. En una fermentación para cadena A donde a las cuatro horas tenía el triptófano en exceso 350 µg/ml y la glucosa a un nivel de 0 g/L, en este tiempo la producción de la proteína híbrida se inició aún y cuando la concentración de triptófano se encontrara en exceso, lo que podría apoyar que al momento en que la célula deja de estar ocupando su maquinaria de transcripción y traducción de una manera preferente para los procesos de crecimiento, las polimerasas pueden estar siendo atraídas hacia el promotor de triptófano el cual es un promotor fuerte, y que, aunque se encuentre bajo represión por producto no cuenta con el sistema de atenuación lo cual al parecer lo esta favoreciendo al momento de la activación.

Así con los resultados presentados en esta tesis, se espera mas adelante trabajar en el desarrollo de sistemas controlados de reasociación, los cuales nos permitan obtener una molécula de PI en su forma nativa para posteriormente liberar insulina por medio de digestión trípica. Una vez liberada insulina será necesario la purificación por intercambio catiónico con una partícula de carboximetilcelulosa en un buffer de acetatos. También sera necesario la purificación por RP-HPLC, este sistema además de aumentar su grado de pureza nos permitirá hacer una separación selectiva entre las moléculas de insulina asociadas correctamente con las no asociadas correctamente.

Una vez purificada por RP-HPLC la insulina recombinante sera necesario hacer las pruebas correspondientes de actividad con anticuerpos.

Por otro lado, si se quisiera hacer comercial este proceso de producción de insulina, habría que hacer una serie de pruebas tanto in-vitro como in-vivo para asi poder satisfacer las estrictas normas de control de calidad que especifica la FDA para productos que son para uso en humanos, algunas de estas pruebas son; una vez formulada la insulina comprobar que no provoque ningún tipo de respuesta inmunológica ni de toxicidad en animales ni en humanos, hacer pruebas de pirogenos, pruebas de estabilidad en solución, pruebas de absorción y distribución en el organismo (farmacocinética), etc.

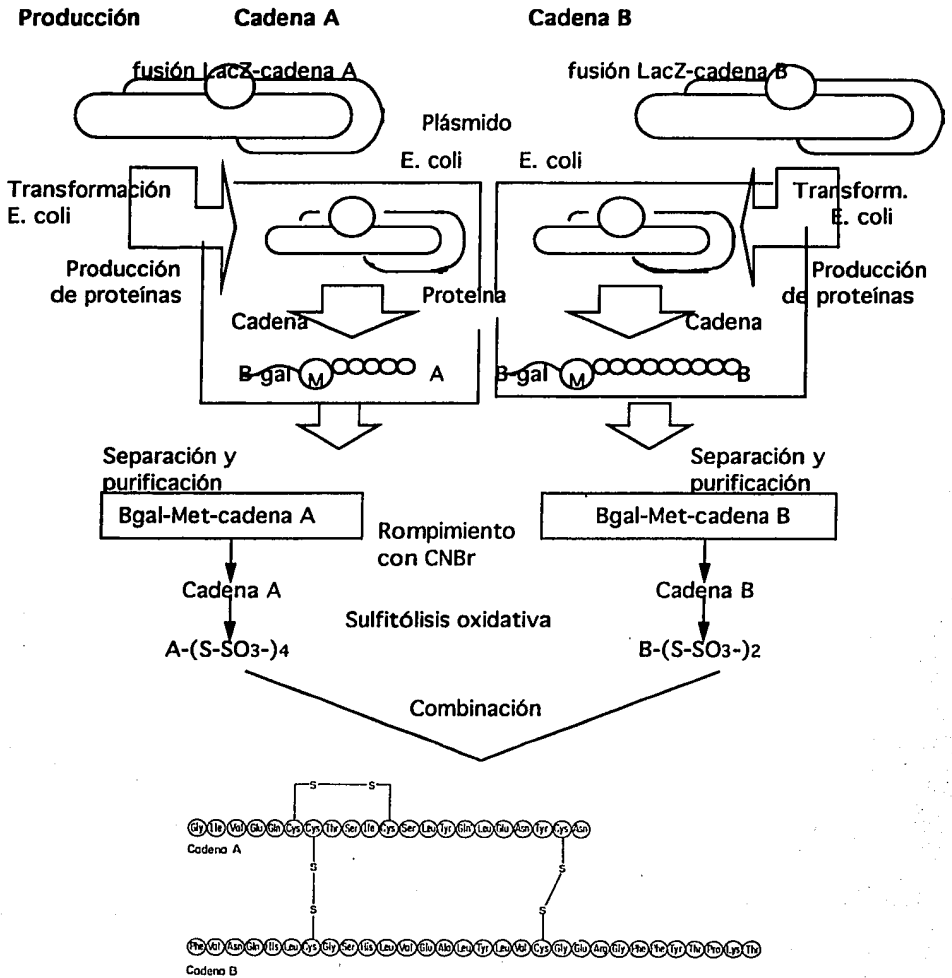


Fig. 1.- Ruta biosintética y química completa para la producción de insulina humana por ingeniería genética.

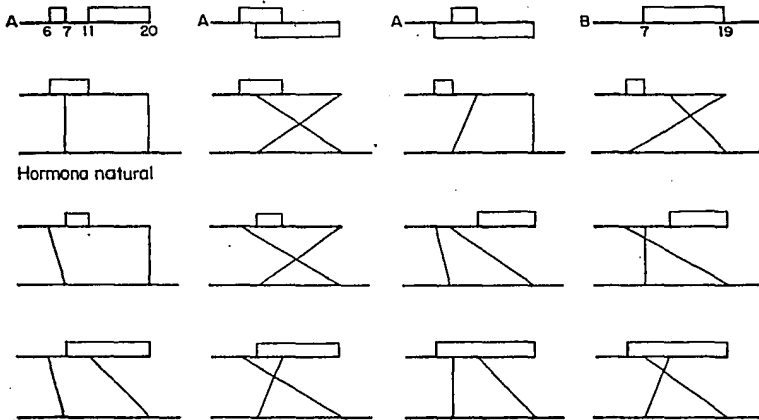


Fig. 2.- Probables combinaciones entre las cadenas A y B de la insulina.

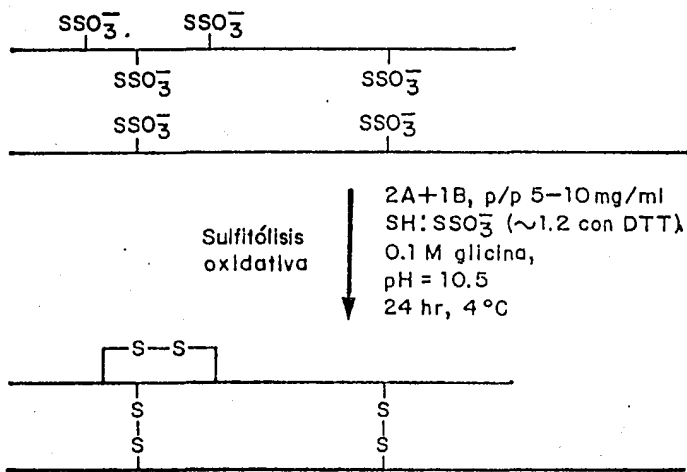


Fig. 3.- Combinación, bajo condiciones controladas de los derivados S-sulfonados de las cadenas de insulina humana.

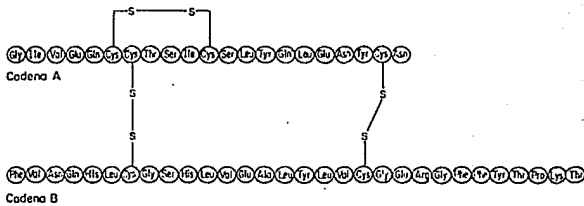
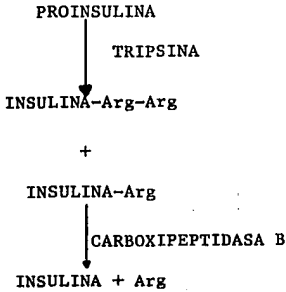
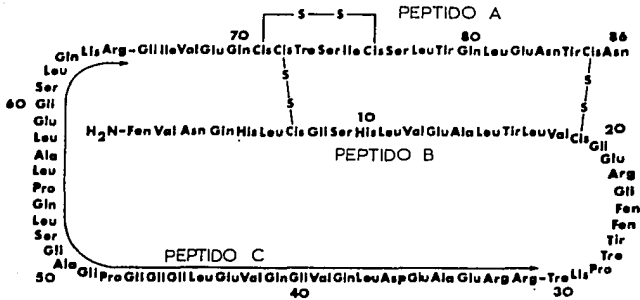
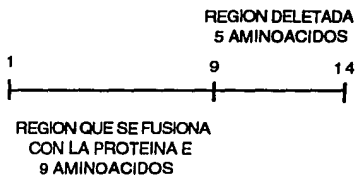


Fig. 4.- Obtención de insulina a partir de proinsulina por medio de digestión triptica.

PEPTIDO LIDER = 14 AMINOACIDOS



PROTEINA E = 520 AMINOACIDOS

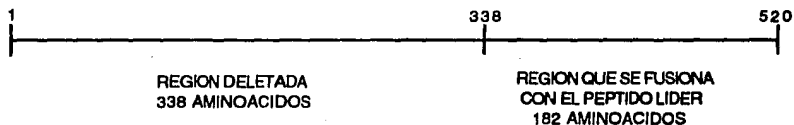


Fig. 5.- Obtención del péptido de fusión TrpLE de 191 aminoácidos, a partir del péptido líder de triptófano y la proteína E también de triptófano.


```

0                               10                               20
I                               I                               I
HPI      ATGTTTGTAAACCAACACCTGTCCGGCTCACACCTGTGTGAAAGCTCTTACCTAGTGTCCGGG
Met PheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGly
EcoRI
MRPI     GAATTCATGTTCCGTAAACCAAGCCTCTCCGGTCTCACCTGTGTGAGGCTCTTACCTAGTGTCCGGG
Met PheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGly
-----
                               CADENA B
                               |
                               |
GAACGAGGCTTCTTCTACACACCAAGACCCCGGGAGGCAGAGACCTGCAGTGGGG
GluArgGlyPhePheTyrThrProLysThrArgHisGluAlaGluAspLeuGlnValGly
|
|
GAACCTGGTTTCTTCTACACACCAAGTCCCGTCTCAAGTGTGAGGCTCTTACCTAGTGTCCGGG
GluArgGlyPhePheTyrThrProLysThrArgHisGluAlaGluAspLeuGlnValPro
-----
|
|
CAAGTGGAGCTGGCGGGGACCTCTGGTCAGGACCTTCAGCCCTTAACTTGAAGGG
GlnValGluLeuGlyGlyGlyProGlyAlaGlySerLeuGlnProLeuAlaLeuGluGly
|
|
CAACTGGAGCTGGCGGGGACCCCGAGGCCCGGATCTTACAGACCTTGGCACTGGAGGTT
GlnLeuGlnLeuGlyGlyGlyProAspAlaGlyAspLeuGlnThrLeuAlaLeuGluVal
|
|
*****
PEPTIDO C
|
|
TCCCTCAGAAAGCTGGCAATTGTGGACAATCTCTTACAGCAATCTCCCTTACCAAG
SerLeuGlnLysArgGlyIleValGluGlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGln
|
|
GCCCGGCAGAAAGCTGGCAATTGTGGATCAGTCTCCACAGCAATCTCCCTTACCAAA
AlaArgGlnLysArgGlyIleValAspGlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGln
|
|
*****I-----
                               CADENA A
                               |
                               |
CTGGAGAAGCTACTGCAACTAGACGACGACCCGAGGCAGCCCTCCCAACCCG-3'
LeuGluAsnTyrCysAsn---
|
|
CTGGAGAAGCTACTGCAACTAGGATCCCGGCTACCGAGCTCGAATTCG-3'
LeuGluAsnTyrCysAsn---
|
|
-----I-----

```

Fig. 6.- Comparación del gene de proinsulina humana (HPI), con el gene de proinsulina de rata modificado (MRPI) en su extremo 5' (Sanchez, 1985). En esta figura se puede observar que hay 12 diferentes residuos de aminoácidos (*), entre los genes HPI y MRPI; uno en la cadena B en el codon 30, 10 en el péptido C y uno más en la cadena A localizado en el codon 69.

10 20

| |

TTCGTTAACCAGCACCTCTGCGGTTCTCACCTCGTTGAGGCTCTTACCTGGTGTGTGGG
AAGCAATTGGTCTGGAGACGCCAAGAGTGGAGCAACTCCGAGAGATGGACCACACACC
PheValAsnGlnHisLeuCysGlySerHisLeuValGluAlaLeuTyrLeuValCysGly

Thr NruI

CACCCAAGACCCGTCGCGAAGTGGAGG

GAACGTGGTTCCTTCTACACACCCAAGTCCCGTCGTGAAGTGGAGGACCCGCAAGTGCCA
CTTGACCAAAGAAGATGTGTGGGTTGAGGGCAGCACATCACCTCCTGGGCGTTCACGGT
GluArgGlyPhePheTyrThrProLysSerArgArgGluValGluAspProGlnValPro

CAACTGGAGCTGGGTTGGAGGCCCGGACGCCGGGGATCTCAGACCTTGGCACATGGAGGTT
GTTGACCTCGACCCACCTCCGGGCTGCGGCCCTAGAAAGTCTGGAACCGTGACCTCCAA
GlnLeuGluLeuGlyGlyProAspAlaGlyAspLeuGlnThrLeuAlaLeuGluVal

TaqIGlu

CGTGGCATGTGCGAACAGTGTCTGCACC

GCCCGGCAGAAGCGTGGCATGTGGATCAGTGTCTGCACCAGCATCTGCTCCCTTACCAA
CGGGCCGTCTTCGACCCGTAAACACCTAGTACACGACGTGGTCTGACAGAGGGAGATGGTT
AlaArgGlnLysArgGlyIleValAspGlnCysCysThrSerIleCysSerLeuTyrGln

CTGGAGAACTACTGCAACTGA
GACCTCTTGATGACGTTGACT
LeuGluAsnTyrCysAsn---

Fig. 7.- Estrategia seguida para hacer cambio de codones en el gen MRPI, y así, convertirlo en el gen MMRPI, el cual codifica para las cadenas A y B humanas. El residuo del aminoácido Ser se cambió al de Thr con el oligonucleótido 1, el cual también creó el sitio de restricción para la enzima *NruI* para facilitar la identificación de las clonas mutadas. El oligonucleótido 2 se utilizó en la segunda reacción de mutagénesis, esta reacción cambió el residuo del aminoácido Asp en MRPI por el de Glu, en MMRPI y también creó el sitio de restricción para la enzima *TaqI*.

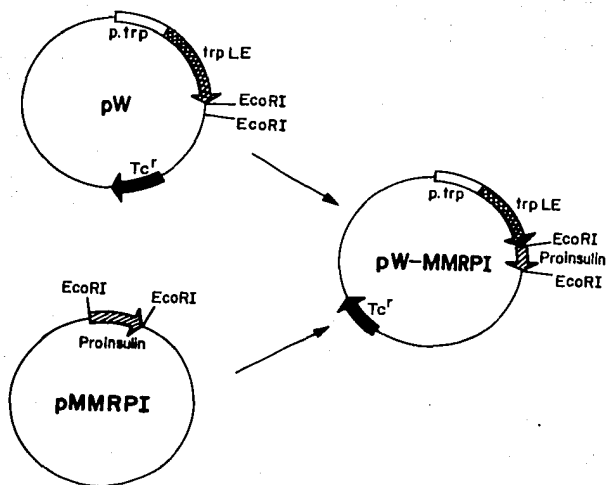


Fig. 8.- El plásmido pW contiene el promotor de triptófano, el gene del péptido TrpLE y el gene de resistencia a tetraciclina. Este plásmido fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*, defosfatado y purificado. El gene MMRPI fue obtenido del vector pMMRPI, el cual fue digerido también con la enzima de restricción *EcoRI*. Más tarde se hizo la reacción de ligado y se obtuvo el plásmido pW-MMRPI.

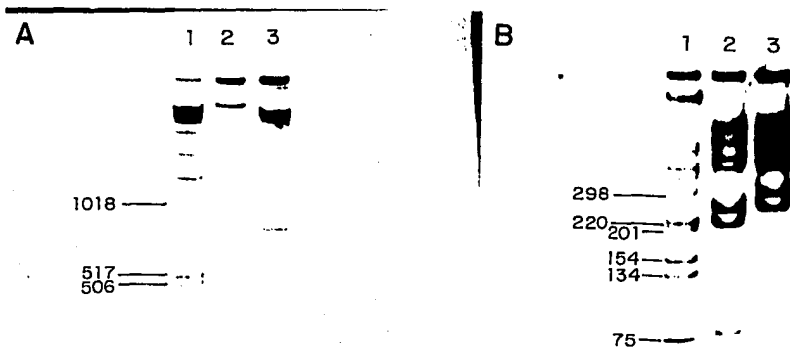


Fig. 9.A. Comprobación de la creación del sitio de restricción *NruI*. Carril 1: marcador de peso molecular 1kb, carril 2; DNA control de una clona antes de crear el sitio de restricción para la enzima *NruI*, digerido con las enzimas *BglII* y *NruI*, carril 3; DNA de una clona digerido con las enzimas de restricción *BglII* y *NruI*, este DNA ya cuenta con la mutación que creó el sitio de restricción *NruI*.

B.- Comprobación de la creación del sitio de restricción *TaqI*. Digestión de los DNAs con la enzima de restricción *TaqI*. Aquí, si el sitio de restricción para la enzima *TaqI* fue creado, una banda de 300 pb se debe convertir a una de 225 y otra de 75 pb. Lo cual se muestra en el carril 2, en el carril 3 se muestra el mismo DNA antes de crearse el sitio de restricción para la enzima *TaqI*.

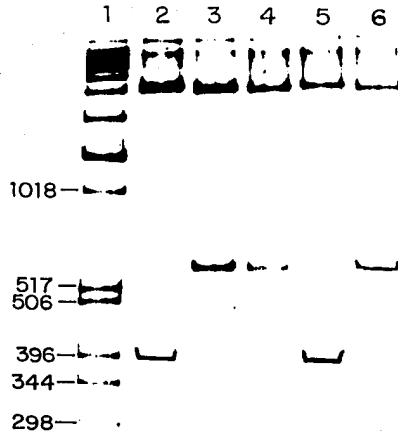


Fig. 10.- Corroboración de la orientación del gene MMRPI en el plásmido pWMMRPI. Las clonas de los vectores pW-MMRPI producidas fueron digeridas con la enzima de restricción *Bam*HI, esperándose una banda aproximada de 390 pb cuando la orientación fuera la correcta; lo cual se observa en los casos de los carriles 2 y 5.

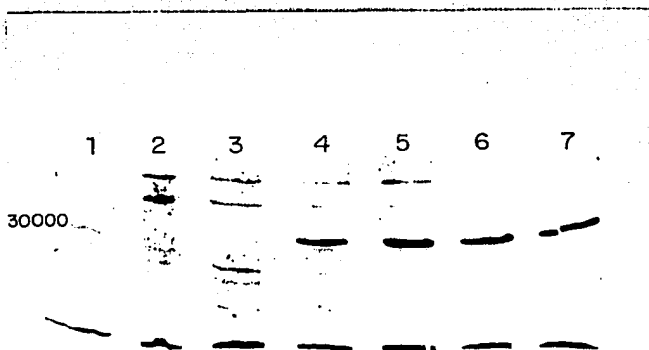


Fig. 11.- Electroforesis de proteínas totales en gel desnaturalizante de poliacrilamida muestras tomadas de una fermentación de la cepa *PB10* transformada con el plásmido pW-MMRPI. En esta figura se puede observar que mientras las condiciones de no-inducción estuvieron presentes (exceso de glucosa y triptófano), la proteína de fusión TrpLE-PI no se expresó (carriles 2 y 3). Sin embargo, cuando la fuente de glucosa y triptófano disminuyó, hubo una alta producción de la proteína de fusión (carriles 4-7). El carril 1 muestra marcadores de peso molecular.

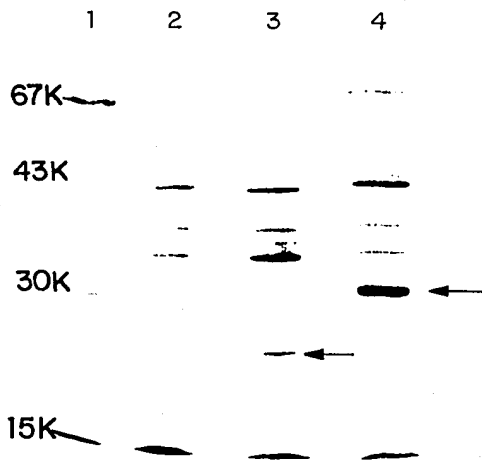


Fig. 12.- Comprobación del tamaño de la proteína de fusión TrpLE-PI. Carril 1: Marcadores de peso molecular; carril 2: Proteínas totales de la cepa *PB10* de *E. coli* ; carril 3: corresponde a las proteínas totales de la misma cepa ahora transformada con el vector pW. La flecha en este carril indica dónde migra el péptido TrpLE (péptido acarreador de proinsulina) el cual tiene un peso molecular de 22 000 Da. En el siguiente carril se muestra un patrón de proteínas totales de la cepa *PB10* de *E. coli* transformada con el vector pW-MMRPI, el cual contiene el gene MMRPI unido al gene del péptido TrpLE ; en el mismo carril, la flecha indica dónde migra la proteína de fusión TrpLE-PI de 32 000 Da.

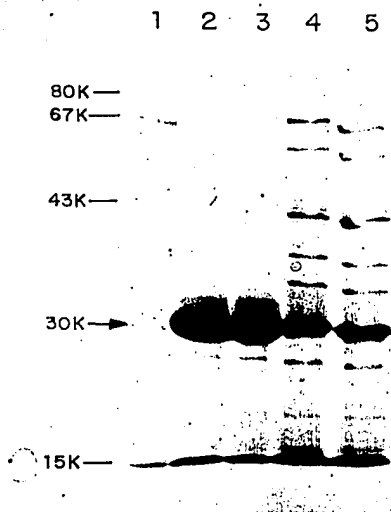


Fig. 13.- Análisis electroforético del enriquecimiento de cuerpos de inclusión. Carril 1: Marcadores de peso molecular; carriles 2 y 3: muestran un patrón de proteínas obtenido después de la purificación de los cuerpos de inclusión; carriles 4 y 5; mismas muestras sin enriquecer. La flecha indica la posición dónde migra la proteína de fusión TrpLE-PI.

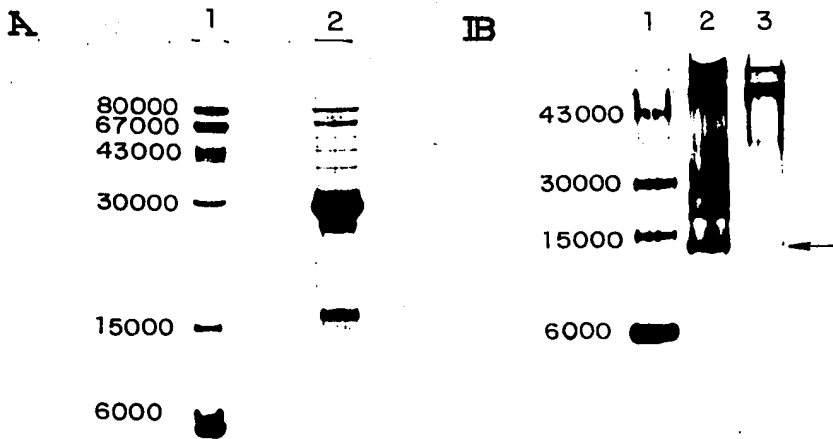


Fig. 14.A- Patrón electroforético del enriquecimiento de los cuerpos de inclusión en un gel desnaturante de poliacrilamida. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: enriquecimiento de la proteína de fusión TrpLE-PI (32000 Da).

B.- Mezcla de péptidos obtenida después del tratamiento de los cuerpos de inclusión con CNBr y sulfitolisis oxidativa analizada en un gel de poliacrilamida no desnaturante. Carril 1: Marcadores de peso molecular, carril 2: muestra tomada del sobrenadante de los cuerpos de inclusión tratados con CNBr, carril 3: precipitado de las muestras tratadas con CNBr. La flecha indica dónde migra una proteína con un peso molecular similar al de PI (9 600 Da).

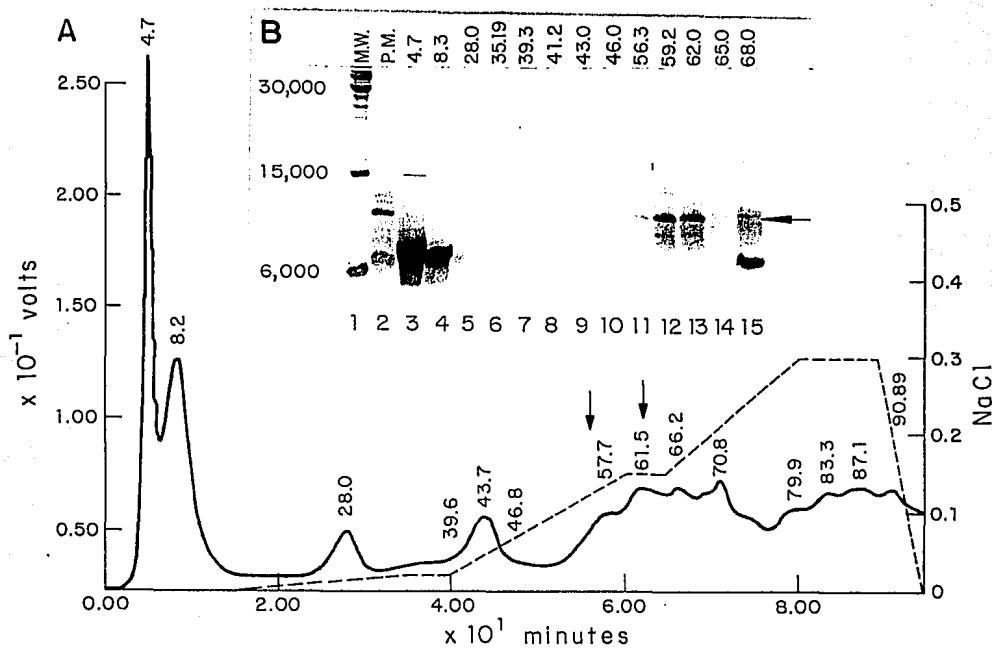


Fig. 15.A.- Cromatograma de una muestra de 2 ml de los cuerpos de inclusión solubilizados y tratados con CNBr y sulfitolisis oxidativa. Las flechas delimitan el fragmento del cromatograma donde eluyó la PI.

B.- Análisis de las muestras obtenidas por intercambio iónico en un gel desnaturalizante de poliacrilamida. Carril 1: Marcadores de peso molecular, carril 2; mezcla de péptidos después del tratamiento con CNBr, carriles 3 y 4; fracciones de proteínas no adsorbidas, carriles 5-10: fracciones que se eluyeron con el gradiente. Carriles 11, 12 y 13 corresponden a las fracciones donde eluyó un péptido con las características de retención y tamaño de la PI, carriles 14 y 15; últimas fracciones eluidas con el gradiente. La flecha indica donde migró la PI.

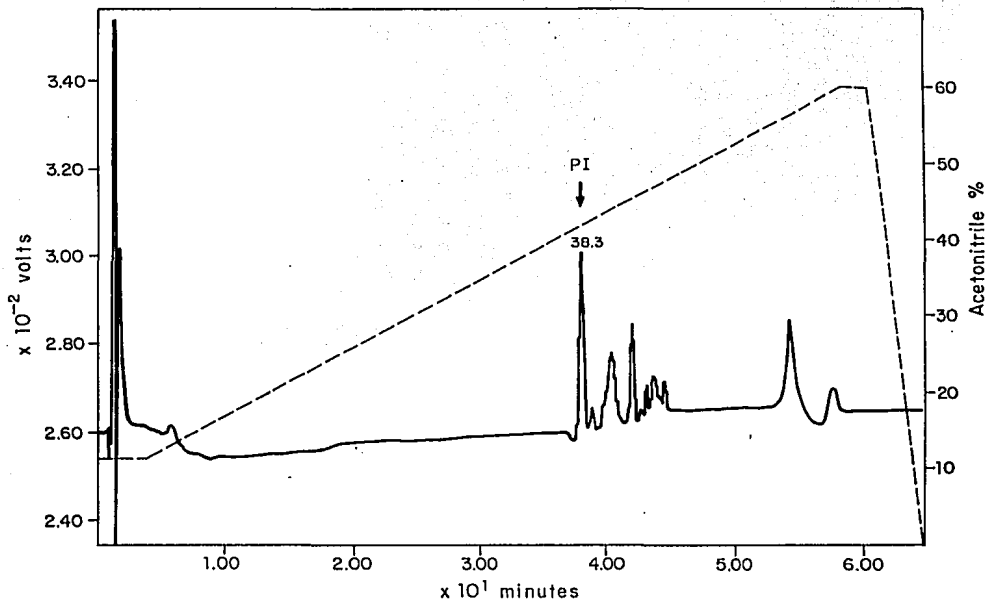


Fig. 16.- Verificación analítica de PI usando un sistema Waters de HPLC con una columna C8 Nova Pack.

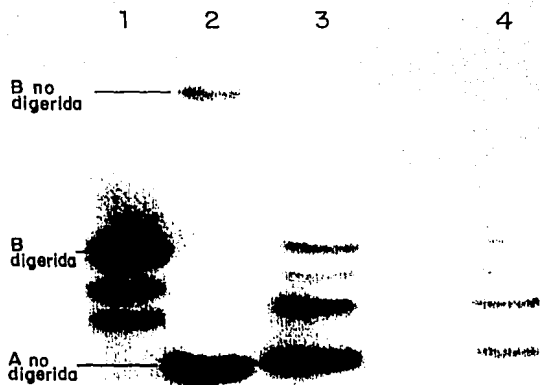


Fig. 17.- Gel no desnaturalizante de poliacrilamida de muestras tratadas con tripsina. En esta figura, en el carril 1 se muestra cadena B sulfonada y digerida con tripsina como control, carrile 2, se puede observar, como control la migración que tuvieron las cadenas A y B sulfonadas y no digeridas, en el carril 3 tenemos como control a la mezcla total de péptidos obtenida después de CNBr y digerida con tripsina; en el carril 4 se puede observar el patrón de bandas obtenido de la fracción (56.3) digerida con tripsina.

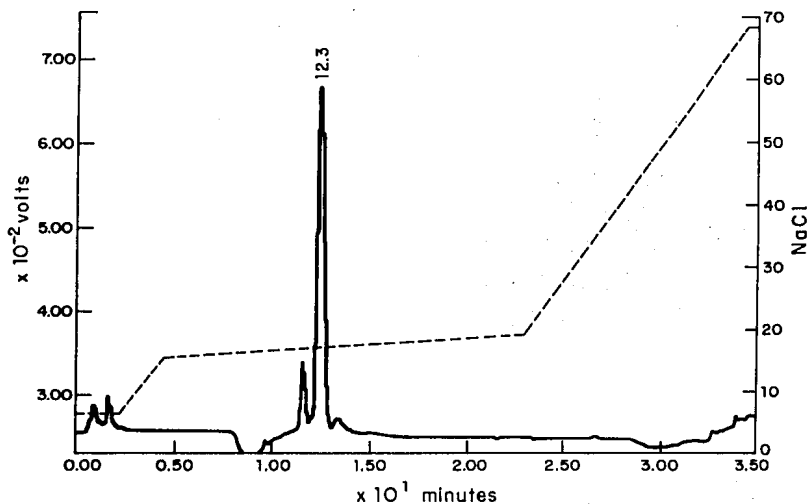


Fig. 18.- Cromatograma control de cadena A. En esta figura se puede observar que la cadena A de insulina humana, la cual se encontraba sulfonada, mostró un tiempo de retención de 12.3 min, en este sistema de cromatografía.

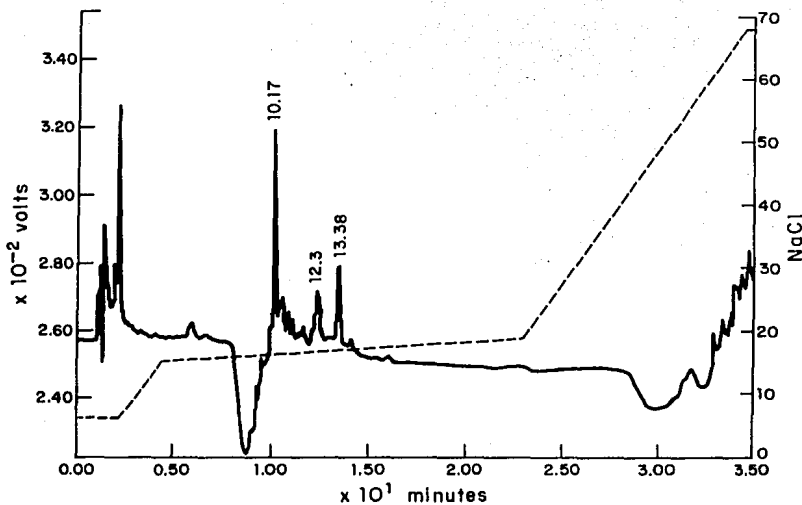


Fig. 19.- Cromatograma de la fracción 56.3 digerida con tripsina. En este cromatograma se puede observar claramente que en la mezcla de péptidos retenidos se encuentra uno que tiene el mismo tiempo de retención (12.3 min) que el control de cadena A sulfonada.

VI.-BIBLIOGRAFIA

Allen, G. (1983) Sequencing of proteins and peptides. p. 53-58. Work, T. and Burdon, R. (ed). laboratory techniques in biochemistry an molecular biology, 2da ed. Elsevier.

Balbas, P., De Anda, R., Flores, N., Alvarado, X., Cruz, N., Valle, F. and Bolivar, F. (1988) Overproduction of proteins by recombinant DNA: Human Insulin. p. 59-74. Cañedo, L.E., Todd, L.E., Packer, L. and Jaz, J. (ed.), Cell function and disease, 1ra ed. Plenum Press, New York and London.

Cruz, N., Antonio, S., De Anda, R., Gosset, G. and Bolívar, F. (1990) J. Liq. Chrom. 13, 1517-1528.

Cruz, N. (1991) Tesis de Maestria, UAEM.

Cruz, N., López, M., Estrada, G., Alvarado, X., de Anda, R., Balbás, P., Gosset, G. and Bolívar, F. (1992) J. Liq. Chrom. 15, 2311-2324.

De Anda, R. and Valle, F. (1992) Comunicación personal.

Edman, P. and Begg, G. (1967) Eur. J. Biochem. 1, 80-.

Frank, B. and Chance, R. E. (1983) Munch. Med. Wschr. 125, 14-20.

Georgiou, G. and Bowden, G. A. (1991) Inclusion Body Formation and the Recovery of Aggregates Recombinant Proteins. p. 333-356. Prokov, A., Bajpai, R. and Ho C. (ed.), Recombinant DNA technology and applications, 1ra ed. McGraw-Hill, New York, NY.

Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolívar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Krazewski, A., Itakura, K. and Riggs, A. D. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 106-110.

Gosset, L., G. (1993a) Tesis de Doctorado, UNAM.

Gosset, G., De Anda, R., Cruz, N., Martínez, A., Quintero, R. and Bolivar, F. (1993b) App. Microbiol. Biotechnol. 39, 541-546.

Harper, H., Rodwell, V. and Mayes, P. (1978) Manual de Química Fisiológica, 6a

ed. México.

Kemmler, W., Peterson, J. D. and Steiner, D. F. (1971) *J. Biol. Chem.* **216**, 6780-6791.

Klostermeyer, H. and Humbel, R. (1966) *Angew. Chem.* 802-822.

Kramer, B., Kramer, W. and Fritz, H. J. (1984) *Cell*, **38**, 879-887.

Nicaud, J.M., Mackman, N. and Holland, I.B. (1986) *J. Biotechnol.* **3**, 255-270.

Ptashne, M. (1986) *A Genetic Switch: Gene Control and Phage lamda*. 1ra ed. Cell and BSP.

Sambrook, J., Fritsch, F. E. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, **3**.

Sánchez-Pescador, R. (1985) Tesis Doctorado, UNAM.

Tager, H., Steiner, D. and Patzelt, C. (1981) *Methods Cell Biol.* **23**, 73-87.

Vichido, I. and Bolívar, F. (1982) Sobretiro del boletín de estudios médicos y biológicos, UNAM **32**, 13-29.

Wetzel, R., Kleid, D. G., Crea, R., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Hirose, T., Kraszewski, A., Riggs, A. D., Itakura, K. and Goeddel, D. V. (1981) *Gene*, **16**, 63-71.

Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, I. P., Nichols, B. P., Christie, G. E., Horowitz, H., VanCleemput, M. and Wu, A. M. (1981) *Nucleic Acids Reserch.* **9**, 6647-6668.

Yansura, D. (1990) *Methods. Enzymol.* **185**, 161-166.