



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
FACULTAD DE QUÍMICA
ÁREA DE CONOCIMIENTO: BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

**CLONACIÓN, EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA Hev b 3
DE *Hevea brasiliensis***

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B MAYORGA FLORES MARLEN

TUTORA
DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
INSTITUTO DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F. ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Dra. Marina Gavilanes Ruíz	Presidente
Dr. Miguel Antonio Costas Basín	Vocal
Dr. Rafael Arturo Zubillaga Luna	Vocal
Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Vocal
Dra. Alejandra Hernández Santoyo	Secretario

El proyecto de tesis se realizó en el Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Laboratorio No. 3

Laboratorio de Biología Molecular

Laboratorio de estructura de Proteínas que también forma parte del Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas.

Q.F.B Marlen Mayorga Flores
Sustentante

Dra. Adela Rodríguez Romero
Tutora

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Coordinación de Estudios de Posgrado.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por el apoyo para la realización de este trabajo de tesis.

A los Dra. Patricia Cano Sánchez por sus aportaciones y comentarios.

A mis compañeros y amigos de laboratorio por sus consejos.

A los proyectos CONACYT(166472) y DGAPA-UNAM (Proyecto PAPIIT IN207613).

Al CONACYT por beca de manutención otorgada con el número 289035.

A mi madre María Luisa Flores Baranda

ÍNDICE

Resumen.....	1
Antecedentes.....	2
Caucho o hule natural.....	3
Plantas laticíferas.....	4
<i>Hevea brasiliensis</i>	4
Partículas de hule en <i>Hevea brasiliensis</i>	5
SRPP y REF.....	7
Justificación.....	9
Objetivo.....	9
Objetivos específicos.....	9
Metodología.....	10
Clonación y expresión de Hev b 3.....	10
Transformación de células competentes.....	10
Expresión.....	11
Lisis.....	11
Purificación de la proteína en la construcción genética pET32a-Hev b 3.....	12
Aislamiento del extracto celular.....	12
Protocolo optimizado para realizar la cromatografía de afinidad.....	12
Determinación de la concentración de proteína por espectroscopía UV...13	
Cromatografía de intercambio aniónico.....	13
Corte con enterocinasa.....	14
Purificación de la proteína en la construcción genética pET26-MM Hev b 3.....	14
Purificación por afinidad a Ni.....	14
Cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución.....	15
Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución.....	15
Caracterización.....	
Determinación del peso molecular.....	16
Determinación del contenido de estructura secundaria.....	16
Resultados y discusión.....	18
Obtención del plásmido pET32 a-Hev b 3.....	18
Expresión de la proteína de fusión.....	18
Purificación de la proteína de fusión.....	20
Corte enzimático de la proteína de fusión.....	20
Biosíntesis de MM-Hev b 3.....	23
Transformación de células competentes.....	23
Expresión.....	23
Purificación de la proteína en la construcción genética pET26-Hev b 3.....	24
Determinación del contenido de estructura secundaria.....	27
Determinación de la masa molecular.....	30
Predicción del modelo tridimensional de Hev b 3.....	31
Conclusión.....	33
Bibliografía.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Extracción de látex de *Hevea brasiliensis*.
Figura 2. Estructura del caucho natural.
Figura 3. Zonas del látex obtenidas por ultra centrifugación.
Figura 4. Fuentes naturales de caucho.
Figura 5. Partículas de hule de *Hevea brasiliensis*.
Figura 6. Secuencia primaria de SRPP y REF.
Figura 7. Modelo de interacción de REF y SRPP con la monocapa de las partículas de caucho.
Figura 8. Representación de la proteína de fusión.
Figura 9. Cinética de expresión de la proteína de fusión.
Figura 10. Gel SDS-PAGE al 14%, en donde se muestra el resultado de la reacción de corte con la enzima Ek.
Figura 11. Espectrómetro de masas para el producto de corte con Ek.
Figura 12. Espectro de dicroísmo circular para el resultado de corte de la proteína de fusión
Figura 13. Construcción de la proteína recombinante MM-Hevb3.
Figura 14. Cinética de expresión de la construcción génica pET26-MM-Hevb3 en la cepa BL21pLySDE3 de *E. coli*.
Figura 15. Purificación de la proteína MM-Hevb 3 utilizando la columna Q Sepharosa.
Figura 16. Cromatograma de la purificación de MM-Hevb3.
Figura 17. Separación electroforética en gel desnaturizante.
Figura 18. Espectro de masas de MM-Hev b 3 purificada en pH 8.0.
Figura 19. Separación electroforética en gel desnaturizante. El carril 1 muestra la fracción que tuvo que ser sometida a recirculación en la columna de intercambio aniónico.
Figura 20. Espectro de dicroísmo circular de MM-Hev b 3.
Figura 21. Espectro de dicroísmo circular de Hev b 1.
Figura 22. Espectro de masas MALDI-TOF para la proteína MM-Hevb3.
Figura 23. Predicción de la estructura tridimensional de Hev b 3.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del látex.

Tabla 2. Proteínas alergénicas de látex y su función reportados por la IUIS.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para cada construcción.

Tabla 4. Composición de amortiguadores de lisis.

Tabla 5. Composición de amortiguadores utilizados en cromatografía de intercambio aniónico.

Tabla 6. Composición de amortiguadores utilizados en cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución para la construcción genética pET26b-MM-Hev b 3.

Tabla 7. Condiciones utilizadas para la columna Mono Q 5/50.

Tabla 8. Condiciones de inducción utilizadas para expresar a Hev b 3 en diferentes cepas.

ABREVIATURAS

(His₆) etiqueta de seis aminoácidos de histidina

(m/z) relación masa/carga

ALI amortiguador de lisis

Ek Enterokinase[®]

FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)

Hb *Hevea brasiliensis*

HbSRPP (small rubber particle protein de *Hevea brasiliensis*)

IPTG isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

kDa kilo daltones

LB luria bertani

LRP (por sus siglas en inglés de Large Rubber Particles)

MALDI-TOF (del inglés Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization-time of flight)

NR (por sus siglas en inglés de natural rubber) caucho natural

OD₆₀₀ densidad óptica

PCR (del inglés polimerase chain reaction) reacción en cadena de la polimerasa

PF proteína de fusión

REF (del inglés rubber elongation factor)

rpm revoluciones por minuto

SDS-PAGE (del inglés sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

SRP (del inglés de Small Rubber Particles)

SRPP (del inglés small rubber particle protein)

Trx tiorredoxina

WHO-IUIS (de las siglas en inglés de World Health Organization and International Union of Immunological Societies)

RESUMEN

La proteína Hev b 3 o también denominada small rubber particle protein (SRPP) está involucrada en la regulación de la producción del caucho natural presente en el látex de *Hevea brasiliensis*. Para entender el mecanismo por el cual Hev b 3 favorece la síntesis bioquímica del cis-poliisopreno (caucho natural) es necesario biosintetizar y purificar a esta proteína para posteriormente obtener su estructura mediante técnicas de difracción de rayos-x.

En este trabajo la proteína Hev b 3 se clonó y sobre-expresó usando técnicas de Biología Molecular. En la purificación se utilizaron cromatografías de afinidad e intercambio aniónico. Esta proteína recombinante se caracterizó por espectrometría de masas MALDI-TOF, obteniendo una masa de 22,6 kDa, coincidente con la masa teórica y mediante la técnica de dicroísmo circular se estimó su contenido de estructura secundaria.

ANTECEDENTES

El árbol del hule *Hevea brasiliensis* presenta vasos laticíferos, que son un tejido vascular propio del reino *Plantae*. Estos vasos se componen de un tipo de célula vegetal que posee un citoplasma peculiar, denominado látex, y su función está estrechamente relacionada con la defensa hacia patógenos y agentes físicos (Hagel *et al.*, 2008).

Este citoplasma es de aspecto blanco y textura viscosa, contiene varios tipos de partículas, lípidos, minerales, proteínas y del 30 al 50% de la masa total corresponde al biopolímero *cis*-1,4-poliisopreno (d'Auzac *et al.*, 1989). En la Tabla 1 se encuentran los porcentajes aproximados de los componentes del látex. Así, esta mezcla compleja circula por los vasos laticíferos del árbol de hule y para su extracción se realiza una incisión en el tronco (Figura 1).

Tabla 1. Composición química del látex extraído de *Hevea brasiliensis*.

	Látex natural fresco %	Hule seco %
Cis-1,4-poliisopreno	20-45	93.5
Proteínas	1-2	2-3
Carbohidratos	1-2	0.4
Lípidos	0.9-1.7	3.3
Minerales	0.4-0.6	0.2
Aminoácidos, iminas	0.4	----
Agua	55-65	-----



Figura 1. Extracción de látex de *Hevea brasiliensis*

Caucho o hule natural

El caucho natural (NR, por sus siglas en inglés de *natural rubber*) es un polímero formado por unidades de isopreno, unidos a través de un enlace en configuración cis-1,4 (Figura 2), las cuales son producidas y empaçadas en partículas presentes dentro de la célula laticífera, además de ser el componente más abundante del látex.

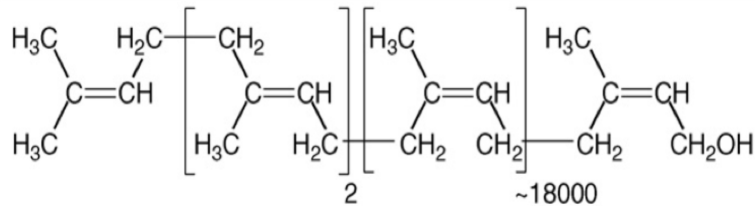


Figura 2. Estructura del caucho natural. La masa molecular de un monómero de isopreno (C_5H_8) es de 68 Da.

Las propiedades intrínsecas del cis-1,4-poliisopreno son atribuidas a su estructura química y elevada masa molecular cuando forma largas cadenas, además de la estabilidad que le confieren otros componentes del látex presentes en menor proporción.

Cuando el látex es recién extraído y sometido a ultracentrifugación se separa en tres fracciones mayoritarias (Figura 3), la superior (zona a) contiene al biopolímero de cis-1,4-poliisopreno y partículas de hule, la intermedia (zona b) o también denominada suero C contiene al citosol de las células laticíferas y el sedimento (zona c) o suero B contiene cuerpos lutoideos. Estos últimos y la zona marcada en rojo de la Figura 3 son ricos en proteínas alergénicas.

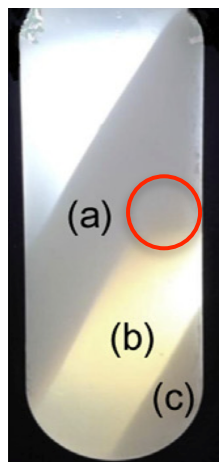


Figura 3. Zonas del látex obtenidas por ultra centrifugación (Berthelot *et al.*, 2014).

Plantas laticíferas

Hasta la fecha se han reportado más de 12500 especies de plantas que presentan células laticíferas (Evert *et al.*, 2006), entre ellas el guayule (*Parthenium argentatum*), el diente de león (*Taraxacum sp.*) y de mayor importancia económica *Hevea brasiliensis* (árbol del hule). La Figura 4 muestra a las principales plantas productoras de NR.

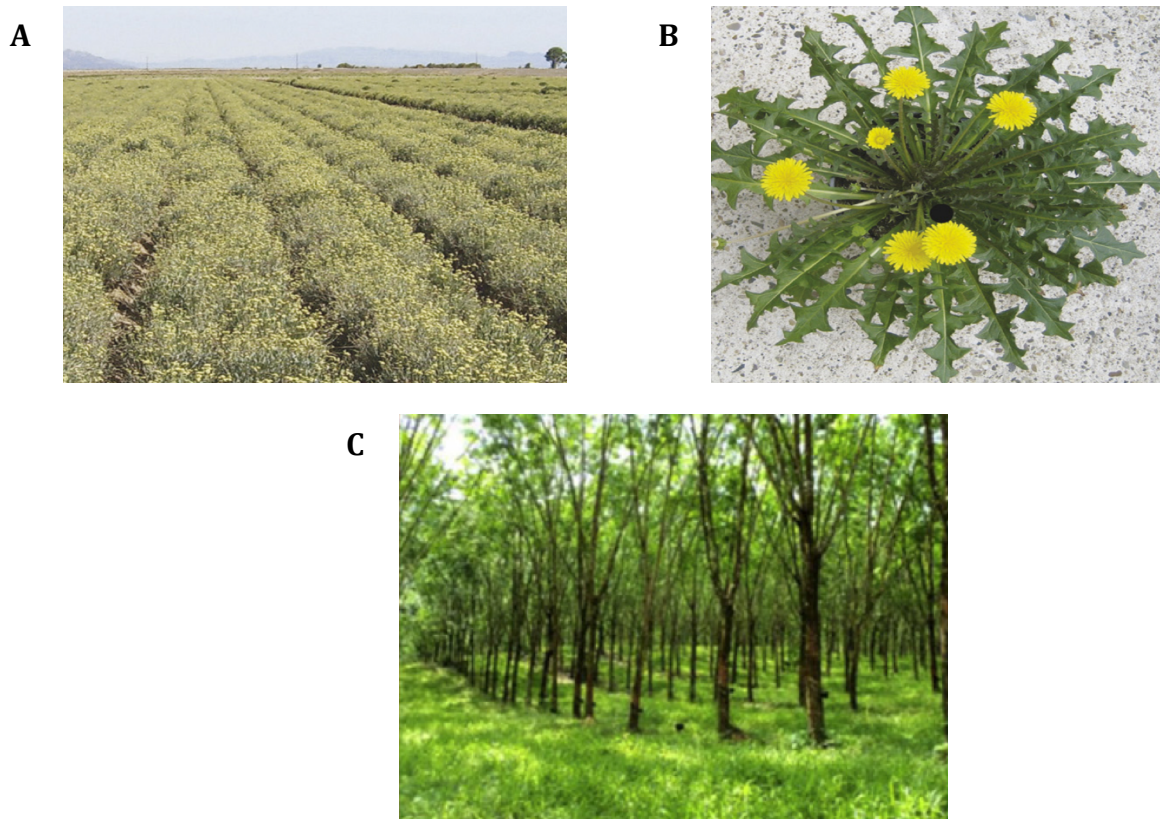


Figura 4 . Fuentes naturales de caucho. **A** Campo de cultivo de Guayule. **B** Diente de león (*Taraxacum koksaghyz*). **C** Zona de cultivo de *Hevea brasiliensis*.

Hevea brasiliensis

El árbol del caucho es una planta superior que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, es originaria de la Cuenca Baja del Río Amazonas en Brasil, es cultivada en todo el mundo para la producción de NR, mayoritariamente en Malasia, Tailandia e Indonesia, entre otros países tropicales.

Se considera a *Hevea brasiliensis* como la principal fuente de NR, su producción mundial en 2011 asciende a nueve millones de toneladas, lo que representa a más del 90% de la producción total. El hule obtenido de manera sintética no posee elasticidad,

resistencia ni poder de recobrar forma a baja temperatura (Cornish *et al.*, 2001). Todas estas características son indispensables para los múltiples productos manufacturados con caucho natural. *H. brasiliensis*, además de ser la especie que genera este material en grandes cantidades, comparada con otras plantas, produce el biopolímero con las mejores características de flexibilidad, resistencia y sensibilidad que lo hace ideal para la manufactura de productos tales como los guantes de cirujano y otros productos usados en medicina.

El NR es utilizado en más de 40 000 productos, incluyendo más de 400 dispositivos médicos, guantes quirúrgicos, productos de ingeniería y vestimenta. En general, el consumo de caucho natural se ha incrementado dramáticamente en las últimas décadas. Desde hace varios años se han realizado investigaciones para desarrollar métodos sintéticos que permitan la producción de un polímero con características similares al natural y con costos de fabricación competitivos, lo cual no se ha conseguido hasta el momento (van Beilen *et al.*, 2007).

Partículas de hule en *H. brasiliensis*

El látex de *H. brasiliensis* contiene partículas de hule donde se sintetiza y almacenan polímeros de cis-isopreno (Ohya *et al.*, 2000), éstas tienen forma esférica y se dividen en dos grupos con base en el tamaño: LRP (por sus siglas en inglés de Large Rubber Particles), con más de 0.4 μm de diámetro y SRP (del inglés de Small Rubber Particles) con menos de 0.4 μm (Singh *et al.*, 2003) (Figura 5).

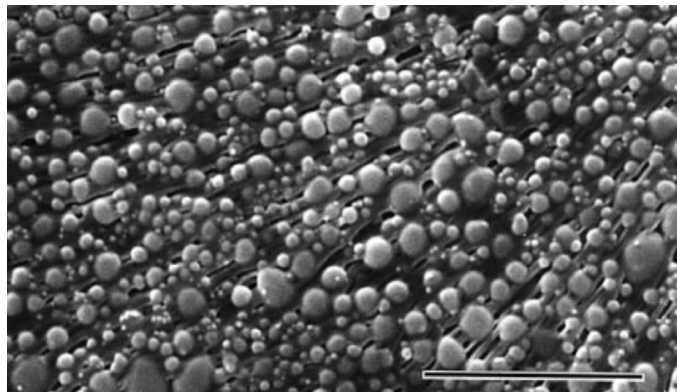


Figura 5. Partículas de hule de *Hevea brasiliensis*. La barra equivale a 5 μm .

La superficie de las partículas de hule está negativamente cargada (Sansatsadeekul *et al.*, 2011) debido a los grupos polares de los lípidos que conforman la monocapa membranal que tiene un grosor de 1,5 a 3,0 nm (Nawamawat *et al.*, 2011) y se ha demostrado que físicamente es fluida y permeable. No solamente los lípidos son responsables de la carga negativa global de la superficie de la partícula, las proteínas también contribuyen. El centro de la partícula de hule es de naturaleza hidrófoba y está constituido de

poliisopreno. Estas interesantes partículas de hule contienen de 1,6 a 3,7 % de lípidos, los cuales están clasificados como lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos; el contenido y composición de grasas es dependiente de la clona a la que pertenezca *H. brasiliensis* (*Hb*) (Hasma *et al.*, 1986 y Ho *et al.*, 1976).

El análisis proteómico del látex de Hb ha indicado la presencia de más de 1300 proteínas diferentes. En 2013, Dai L *et al.*, identificaron 186 proteínas en partículas de hule y del total presentes en látex 15 se clasifican como alérgenos. Dos proteínas de interés en este trabajo son las denominadas como REF (del inglés rubber elongation factor) y SRPP (del inglés small rubber particle protein) y como alérgenos Hev b 1 y Hev b 3, respectivamente, de acuerdo a la nomenclatura establecida por WHO-IUIS (de las siglas en inglés de World Health Organization and International Union of Immunological Societies). Ambas proteínas son las más abundantes en las partículas de hule (Dennis *et al.*, 1989 y Ho *et al.*, 1999). En la Tabla 2 se enumeran los alérgenos clasificados en la base de datos (www.allergen.org/allergen.aspx) establecida por el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas.

Tabla 2. Proteínas alérgicas de látex y su función reportados por la IUIS.

Alérgeno	Nombre del alérgeno	Masa molecular (kDa)	Localización	Función
Hev b 1	Factor de elongación del hule	14,7	Partículas largas de caucho	Biosíntesis de caucho natural
Hev b 2	Beta-1, 3 - glucanasa	35,1	Lutoides	Proteína de defensa
Hev b 3	Proteína de la partícula pequeña de látex	22,4	Partículas pequeñas de caucho	Biosíntesis de caucho natural
Hev b 4	Homóloga de lecitinasa	53 – 55	Lutoides	Componente de micro-hélices
Hev b 5	Proteína ácida de látex	16	Citoplasma	Proteína estructural
Hev b 6.01	Proheveína	21	Lutoides	Proteína de defensa
Hev b 6.02	Heveína	4,7	Lutoides	Proteína de defensa
Hev b 6.03	Heveína C-terminal	14	Lutoides	Proteína de defensa
Hev b 7	Homólogo a patatina	42,9	Citoplasma	Proteína de defensa
Hev b 8	Profilina del látex	15	Citoplasma	Proteína estructural
Hev b 9	Enolasa del látex	47,7	Citoplasma	Enzima glicolítica
Hev b 10	Manganeso superóxido dismutasa	26	Mitocondria	Enzima desactivadora de radicales
Hev b 11	Quitinasa de clase 1	33	Lutoides	Proteína de defensa (quitinasa)
Hev b 12	Proteína de transferencia de lípidos	9,3	Membranas	Proteína de defensa
Hev b 13	Esterasa del látex	43	Lutoides	Proteína de defensa
Hev b 14	Hevamina (quitinasa)	33,7	Lutoides	Proteína de defensa
Hev b 15	Inhibidor de serin-proteasas	7,5	Látex	Alérgeno

SRPP y REF de *Hevea brasiliensis*

SRPP y REF son proteínas presentes en las partículas de hule, pero no se encuentran en el mismo tipo de partícula, SRPP se restringe a las partículas con diámetro menor a 0,4 μm y REF se encuentra principalmente en aquellas partículas con más 0.4 μm de diámetro. Ambas son homólogas; comparten un 45% de similitud en secuencia primaria (Figura 6) y pertenecen a una familia de proteínas relacionadas al estrés (Sookmark *et al.*, 2002 y Berthelot *et al.*, 2013). En el árbol de hule se ha encontrado en mayor abundancia a los mRNA de SRPP y REF cuando se hiere su corteza, ya que se estimula la expresión de ambas proteínas.

La SRPP de *H. brasiliensis* (HbSRPP) presenta una similitud en secuencia con otras seis proteínas pertenecientes a distintas plantas productoras de látex, entre éstas se encuentran la proteína homóloga del guayule (GHS) y la proteína TbSRPP en *Taraxacum bravicorniculatum*, ambas también se encuentran en partículas de hule.

La síntesis del hule natural está regulada por la actividad de las proteínas asociadas a la monocapa membranal de las partículas. Hay tres principales pasos bioquímicos en la síntesis del hule en *H. brasiliensis*; iniciación, elongación de la cadena y terminación. La enzima cis-prenil transferasa ha sido caracterizada en el látex de *Hevea brasiliensis* y se considera responsable de la elongación del isopreno, ya que realiza la condensación del isopentenildifosfato (IPP) con el dimetilalildifosfato (DMAPP) (Berthelot *et al.*, 2012 y Chow *et al.*, 2012). También se ha planteado que las proteínas HbREF, HbSRPP, GHS y TbSRPP tienen un efecto positivo en la elongación y contenido de NR. Por otro lado, hay reportes que indican que en otras plantas productoras de látex REF y SRPP no son esenciales en la síntesis de NR, pero en *H. brasiliensis* pueden jugar un papel importante en el rendimiento y mejoramiento de la calidad de este material (Wahler *et al.*, 2012 y Wagner *et al.*, 1999).

En cuanto a la caracterización de HbREF y HbSRPP se ha demostrado que: son altamente hidrofóbicas (Yeang *et al.*, 1996), tienen puntos isoeléctricos ácidos y sus masas moleculares son de 14,6 y 22,4 kDa respectivamente, y hasta ahora no se conoce algún tipo de modificación postraducciona (Yeang *et al.*, 1996).

En 2013, Berthelot *et al* realizaron experimentos de interacción *in vitro* de las proteínas REF y SRPP, de origen recombinante, con varios tipos de membranas compuestas de lípidos encontrados en las partículas de hule. Con base en sus resultados estos investigadores proponen un posible modelo de interacción proteína-membrana: REF interactúa trans-membranalmente y SRPP se considera una proteína periférica, la Figura 7 esquematiza dichas propuestas.

REF : MAEDEDNQGGEGGLKYLGFVQDAATYAVTTFSNVYLAKDKSGPLQPGVDI EGPVKNVAVPLYNRFSYTPNGAKFVD :80
 SRPP : MAEEVE-----EERLKYLD FVRAAGVYAVDSESTLYLYAKDISGELKPGVDI ENVVKT VVTPVY-----YIPL EAVKFVD :71

REF : STVVASVTI IDRSLPPIVKDASTQVVS AIRAAPEAARSLAS-SLPGQTKI LAKV FYGEN----- :138
 SRPP : KTV DVS VTS DGVVPPVIKQVSAQTYSVAQDAPRIVLDVASSV FNTGVQEGAKALYANLEPKAEQYAVITWRALNKLPLV :151

REF : ----- :138
 SRPP : PXLEPKAEQYAVITWRALNKLPLVPQVANVVVPTAVYFSEKYNDVVRGTT EQGYRVSSYLPLL PTEKITKVFGEAS :204

Figura 6. Secuencia primaria de SRPP y REF, los aminoácidos enmarcados en negro están presentes en ambas proteínas.

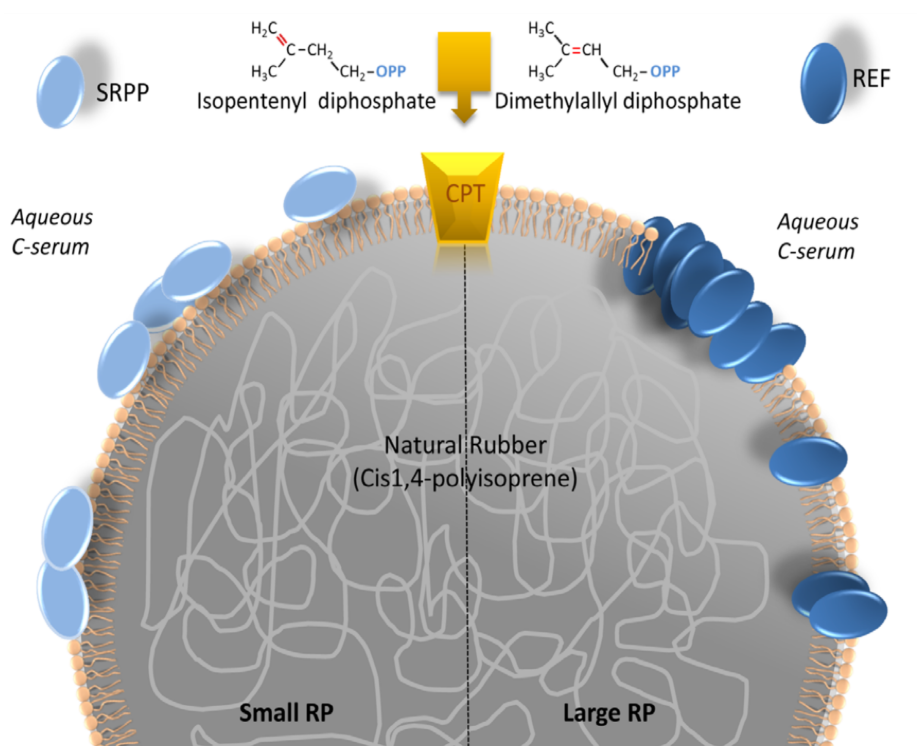


Figura 7. Modelo de interacción de REF y SRPP con la monocapa de las partículas de caucho. (Berthelot et al., 2013)

JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas la demanda del hule natural a nivel internacional se ha incrementado exponencialmente, mientras que las plantaciones de *Hevea brasiliensis* requieren de un largo periodo de crecimiento para que el árbol sea productor de este material. Esto ha inducido a investigar los mecanismos moleculares de la biosíntesis del hule para desarrollar una alternativa en su producción *in vitro*. Por lo tanto, el estudio de las proteínas involucradas en la producción de hule natural en *Hevea brasiliensis* aportará información relevante.

HIPÓTESIS

Es posible clonar y sobre expresar a la proteína Hev b 3 en forma soluble aún cuando forma parte de la membrana de las partículas pequeñas de hule.

OBJETIVO

Clonar, sobreexpresar y purificar Hevb 3.

Objetivos específicos

Caracterización de la proteína recombinante utilizando técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

METODOLOGÍA

Clonación y expresión de Hev b 3

La amplificación del gen Hev b 3 se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando 5 µl del cDNA y los oligonucleótidos específicos que se diseñaron de acuerdo con la secuencia reportada para Hev b 3 por Yeang *et al.*, en 1996. La siguiente tabla indica los oligos utilizados para las dos construcciones genéticas utilizadas en este trabajo (pET32 y pET26).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para cada construcción.

Oligonucleótidos (5'-3')	Construcción
Forward CTGAATTCGACGACGACGACAAGATGGCTGAAGAGGTGGAGGAAGAGAGGCTAAAGTATTTGGAT	pET-32a Hevb 3
Reverse TCAAGCTTTTATGATGCCTCATCTCCAACACCTT	
Forward CACATATGATGATGGCTGAAGAGGTGGAGG	pET-26b Hevb3
Reverse ATCTCGAGTTATGATGCCTCATCTCCAACA	

La reacción de PCR se llevó a cabo en 50 µl de la mezcla Accuprime pfx supermix (Invitrogen) con 30 ciclos de amplificación (95 °C durante 15 s, 60 °C por 30 s y 68 °C por 60 s) usando el termociclador TC-512 (Techne). Los productos de PCR se ligaron al vector pET32a y pET 26b (Novagen, CA, USA), respectivamente, usando T4 DNA ligasa y posteriormente fueron introducidos en células de *E.coli* DH5α. Las clonas positivas se seleccionaron por restricción a antibióticos para obtener los plásmidos pET26b-MetMet-Hev b3 y pET32a-Hevb3. Estas construcciones fueron purificadas utilizando el kit Miniprep (250) de Quiagen y ambos plásmidos se enviaron a un servicio de secuenciación (Largen Inc) para su verificación.

Después de purificar el material genético de Hev b 3, el siguiente paso fue la transformación con éste de las bacterias termocompetentes, se aplica un cambio térmico a las siguientes cepas de *E. coli*: Rosseta y BL21 (DE3) PLysS.

Transformación de células competentes

Protocolo para la transformación de células competentes

- En un tubo con 50 µl de células competentes de la cepa Rosetta (Novagen) o BL21 se agrega 1 µl del plásmido. Colocar a 0 °C durante 20 min.
- Choque térmico: 45 s a 42 °C y después 2 min a 0 °C. Se colocan 200 µl de medio de cultivo Luria Bertani (LB) y se incuban con agitación a 37 °C por 30 min.

- Las bacterias transformadas se sembraron en cajas Petri con medio LB sólido, tomando en cuenta la resistencia a antibióticos para la cepa y el plásmido. Rosetta y BL21 (DE3) PLysS tienen resistencia a cloranfenicol, los plásmidos pET-32a y pET-26 confieren resistencia a ampicilina y kanamicina, respectivamente.
- Se incuban a 37 °C por 12 h. Posteriormente, se trasladó una de las colonias crecidas a medio de cultivo líquido.

Expresión

Las condiciones optimizadas para expresar a la proteína de fusión en medio de cultivo LB suplementado con los antibióticos apropiados son:

- Crecer una colonia transformada en 20 ml de LB durante 14 horas.
- Inocular 1 L de LB con los 20 ml de células.
- Permitir la proliferación de células bacterianas en fase logarítmica a 37 °C, hasta tener una densidad óptica de 0.7 a 600 nm (OD₆₀₀).
- La inducción del material genético se llevó a cabo con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5 mM a una temperatura de 30 °C.
- La expresión de la proteína de fusión debe monitorearse mediante geles de SDS-PAGE para determinar el tiempo de máxima expresión a 30 °C.
- Transcurrido este tiempo, las células se separan del medio de cultivo por centrifugación a 6000 rpm por 10 min, a 4 °C. El medio de cultivo se decanta para obtener el paquete celular que se almacena a -20 °C.

Después de la biosíntesis, la célula productora debe ser lisada para extraer a la proteína del microorganismo y posteriormente purificar a Hev b 3.

Lisis

Protocolo optimizado para el rompimiento de células mediante choques sónicos.

- Se resuspendió el paquete celular en un amortiguador preparado con los reactivos indicados en la Tabla 4, dependiendo de la construcción.

Tabla 4. Composición de amortiguadores de lisis.

Construcción	Amortiguador de Lisis (ALI)
pET 32a/Hev b 3	50mM de Tris-HCl pH 8.0, 50 mM de NaCl y 1 mM de fenilmetilsulfonilo (PMSF)
pET26b/MM-Hev b 3	100mM de Bis-Tris pH 6.4, 200 mM de NaCl, 1 mM de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1.0% Tween 20 y 10mM de DTT

- La sonicación se realizó por 40 min con intervalos de 5 s ON y 30 s OFF en un sonicador Misonix 3000 con potencia de 45 watts. Es importante mantener la muestra a 4 °C.

-
- El extracto celular obtenido de la lisis se fraccionó en una parte soluble y otra insoluble por centrifugación a 14,000 rpm a 4 °C durante 25 min. La fracción soluble se puede purificar con las técnicas y estrategias que se describen a continuación.

Purificación de la proteína en la construcción genética pET32a-Hev b3

La purificación de la proteína recombinante Hev b 3 se diseñó en tres pasos de acuerdo a las características de la proteína de fusión a Tiorredoxina (Trx)-Hev b 3: aislamiento de la proteína de fusión del extracto celular, corte de la proteína de fusión con Enterokinase[®] y purificación de Hev b 3 por cromatografía de intercambio aniónico.

Aislamiento del extracto celular

La mezcla de proteínas en el extracto celular se fraccionó usando una columna de afinidad metal quelato. En este tipo de columnas, las proteínas que poseen aminoácidos cuyas cadenas laterales son capaces de coordinar iones metálicos son retenidas por los iones fijos en la fase estacionaria de la columna. La proteína de fusión posee una etiqueta de seis histidinas (His₆) que posee afinidad por el ión Ni²⁺ que es de utilidad para aislarla del extracto celular por esta técnica.

Protocolo optimizado para realizar la cromatografía de afinidad.

- El sobrenadante se filtró por una membrana con diámetro de poro de 0.22 µm (Millipore).
- La muestra se cargó a una columna de afinidad a Ni²⁺ His Trap (Invitrogen) de 5 ml a un flujo de 0.5 ml/min.
- La elución de la muestra se realizó mediante un gradiente por pasos de imidazol utilizando concentraciones de 50, 80, 120, 200 y 300 mM, en amortiguador Tris 20 mM pH 8, a un flujo de 1 ml/min.

Con la finalidad de seguir a la proteína de interés, en cada paso de purificación se utilizó electroforesis en placa en la modalidad SDS-PAGE al 14%.

Después de aplicar la muestra a la columna de afinidad, las fracciones deseadas se colectaron y se dializaron contra Tris 20 mM pH 8 utilizando una columna PD-10. Las fracciones conteniendo a la proteína se inyectaron a una columna de intercambio aniónico Mono Q 5/50 (GE) montada en un sistema AKTA FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography).

Determinación de la concentración de proteína por espectroscopía UV

Los cálculos de concentración de proteína se realizaron considerando el coeficiente de extinción molar teórico de la proteína de fusión Trx- Hev b 3. La mayoría de las proteínas presenta un máximo de absorción a una λ de 280 nm, esta característica es atribuida principalmente al grupo fenólico de la tirosina y al grupo indólico del triptófano. El coeficiente de extinción (ϵ), también llamado coeficiente másico de absorción y el coeficiente molar de extinción son parámetros que definen la capacidad de una sustancia para absorber la luz a una longitud de onda dada, por unidad de masa o por concentración molar, respectivamente. Este valor es único para cada proteína y depende de la composición de aminoácidos de la proteína en estudio. El coeficiente de extinción se calculó usando el servidor <http://expasy.org/tools/protparam.html>. Los valores del coeficiente de extinción a 280 nm para la el producto de la construcción pET32a/Hev b 3 es de $1.1 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Tomando en cuenta los parámetros anteriores, se calculó la concentración de proteína en mg/ml tomando el coeficiente de extinción teórico y la medida de su absorbancia a 280 nm.

Cromatografía de intercambio iónico

Después de pasar por cromatografía de afinidad, las fracciones conteniendo a la proteína de interés se concentraron a no más de 2 mg/ml y se eliminó el exceso de imidazol utilizando una columna PD-10. Las fracciones se filtraron por membrana con poro de $0.22 \mu\text{m}$. Posteriormente se inyectaron a una columna de intercambio aniónico Mono Q 5/50 (GE) acoplada a un sistema de purificación de proteínas tipo AKTA FPLC, la composición para los amortiguadores se detalla en la Tabla 5. La columna se equilibró con el amortiguador de unión y la elución se realizó mediante un gradiente lineal de 0 a 100% del amortiguador de elución.

Tabla 5. Composición de amortiguadores utilizados en cromatografía de intercambio aniónico para la construcción genética pET32a /Hev b 3

Amortiguador	Composición
Unión	Tris 20mM pH 8.0
Elución	Tris 20mM pH 8.0+ 1 M de NaCl

Corte con Enterokinase®

Una vez aislada del extracto celular y purificada por cromatografía de intercambio aniónico, la proteína de fusión se sometió a corte proteolítico con la enzima Enterokinase® para obtener Hev b 3. Previamente, la proteína debe ser dializada contra el amortiguador de corte, para eliminar el NaCl, ya que es un obstáculo para la reacción enzimática.

La estrategia es utilizar el sitio de corte para la proteasa enteroquinasa, con el cual fue diseñada la proteína de fusión. Esta enzima reconoce la secuencia de aminoácidos DDDDK. El sitio de corte fue colocado en el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la proteína Hev b 3 para que al momento de cortar ésta fuese liberada. El corte con la enzima se realizó de acuerdo a las indicaciones del proveedor Enterokinase® (Ek) de Invitrogen utilizando 0.1 unidades de la enzima por cada 20 µg de proteína de fusión. Hev b 3 se separó del fragmento de tiorredoxina por cromatografía de afinidad metal quelato (columna de Ni) y después por cromatografía de intercambio aniónico en las mismas condiciones que el paso anterior.

En este último paso no se obtuvieron los resultados esperados, así que se diseñó otra construcción de expresión proteica y por tanto se desarrolló una nueva metodología de purificación.

Purificación de la proteína en la construcción genética pET26-Hev b 3

Para la segunda construcción usando pET-26, la purificación de la proteína recombinante Hev b 3 se diseñó en los siguientes pasos de acuerdo a sus características de afinidad a Ni²⁺ y punto isoeléctrico teórico: aislamiento de la proteína del extracto celular, semi-purificación por intercambio aniónico de baja resolución y finalmente intercambio aniónico de alta resolución.

Purificación por afinidad a Ni

El extracto celular obtenido después del rompimiento celular se aplicó a una columna de Ni y se eluyó con 20 mM de imidazol. La fracción deseada se inyectó a una columna de intercambio aniónico Q Sepharosa marca Biotech, con un volumen total de 7 ml.

Cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución

Protocolo optimizado

- Se utilizó una resina Q Sepharosa empacada en una columna con volumen de 7 ml, según las especificaciones del proveedor.
- Los amortiguadores utilizados se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición de amortiguadores utilizados en cromatografía de intercambio aniónico de baja resolución para la construcción genética pET26b /MM-Hev b 3

Amortiguador	Composición
Unión	Bis-Tris Propano 20mM pH 5.7+ 3mM DTT+0.05% Tween 20
Elución	Bis-Tris Propano 20mM pH 5.7+ 3mM DTT+0.05% Tween 20 + 1 M de NaCl

- La columna se equilibró con una mezcla de amortiguadores en composición 98% de unión y 2% de elución.
- La muestra eluída de cromatografía de afinidad a Ni se filtró por una membrana con tamaño de poro de 0.22 micras y se aplicó a la columna de intercambio aniónico a un flujo de 0.5 ml/min.
- Se pasaron 5 volúmenes de columna de amortiguador de unión para eliminar el máximo de proteínas adsorbidas inespecíficamente a la resina.
- Para eluir a las proteínas unidas a la columna se realizó un gradiente de 0 a 100% del amortiguador de elución de la Tabla 6.

Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución

Las fracciones deseadas se desalaron por diálisis contra el amortiguador de unión (Tabla 6) y se inyectaron a una columna Mono Q 5/50 de mayor resolución acoplada a un sistema AKTA FPLC utilizando las condiciones de la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones utilizadas para la cromatografía aniónica en una columna

Condiciones de columna	
Columna Mono Q 5/50 GL Tricorn Matriz Poliestireno/divinil benceno Tamaño de partícula 10 µm Dimensiones 5x50 mm	Gradiente 0-100% de amortiguador de unión en 80 volúmenes de columna Flujo 1ml/min Muestra 2 ml en concentración de 2mg/ml
Amortiguador de unión	Bis Tris propano 20mM pH 5.7+3mM DTT
Amortiguador de elución	Bis Tris propano 20 mM pH 5.7+NaCl 1M+3mM DTT

Las fracciones de interés que eluyeron de la columna anterior se desalaron e inyectaron de nuevo a la columna Mono Q 5/50, en las mismas condiciones indicadas en el paso anterior.

Con el objetivo de seguir a la proteína recombinante en cada paso de purificación se realizó un gel de electroforesis SDS-PAGE al 14%, detectando aquellas fracciones con la proteína de interés. La muestra siempre se almacenó y transportó a 4°C.

Caracterización

Determinación del peso molecular

La masa molecular de las proteínas de interés se determinaron utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption/ Ionization-time of flight). Esta técnica puede proporcionar información acerca de la masa molecular exacta y de la secuencia primaria, combinadas con bases de datos, entre otras aplicaciones. Esta técnica está basada en la formación de una red de cristales producidos por matrices sólidas que favorecen la desadsorción e ionización del análisis a través de fotones aplicados mediante láser. En los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF), los iones (producidos en un paso previo de ionización) son desviados por un campo magnético y se determina su relación masa/carga (m/z) por el tiempo que toman en impactar con el detector. Este tipo de técnicas se emplea principalmente en el análisis de biomoléculas, desde azúcares de menos de 10000 Da, hasta proteínas de 300 kDa.

La muestra de Hev b 3 se preparó a una concentración de 1mg/ml, utilizando como matriz ácido sinápinico en 30% acetonitrilo/ 70% agua/ 0.1% ácido trifluoro acético (TFA). Los controles utilizados para calibrar el equipo son proteínas estándar que poseen una masa por arriba y otra por debajo de la esperada. La relación (m/z) para el ión molecular se obtuvo utilizando un espectrometro MALDI-TOF Microflex Bruker Daltonics.

Determinación del contenido de estructura secundaria

El contenido de estructura secundaria se determinó por Dicroísmo Circular (D.C). La muestra se preparó dializando la proteína contra amortiguador BisTris 20 mM pH 6.4 y ajustando su concentración a 0.12 mg/ml. El espectro se obtuvo en un espectropolarímetro Jasco J-710 en el UV lejano (190-260nm), a temperatura constante de 20°C, utilizando una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales realizadas cada 1 nm a una velocidad de barrido de 20 nm/min. El resultado se expresa en valores de elipticidad (Θ)

molar, considerando una masa molecular promedio por residuo de 109.7 g/mol utilizando la ecuación:

$$\theta = \frac{CD * Mmrw}{10 * C * L}$$

Donde θ molar es elipticidad molar, CD es el valor de la elipticidad en mdeg (miligrados), $Mmrw$ es el peso molecular promedio de los aminoácidos, [C] es la concentración de proteína en mg /ml y L es el paso óptico en cm. El procesamiento de los datos se realizó con el software Dicroweb que utiliza un método de deconvolución de datos basado en redes neurales que aplican el algoritmo de propagación inversa (Dalmas *et al.*, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión de proteínas recombinantes se ha convertido en una herramienta útil para el estudio de su función y estructura. En algunas ocasiones las proteínas de interés se encuentran en la fuente natural en cantidades insuficientes para realizar un estudio sobre ellas, lo que implica una complicada metodología de separación que se puede convertir en imposible. En estos casos se recurre a técnicas de Biología Molecular para clonaras, sobreexpresarlas y así obtener cantidades suficientes para caracterizarlas.

Obtención del plásmido pET 32a / Hev b 3

La biosíntesis de la proteína de fusión se llevó a cabo según el procedimiento señalado en la parte experimental. La secuencia de Hev b 3 se insertó en el plásmido pET32a, que es un sistema de expresión que incorpora una región promotora T7, la cual es reconocida por la T7 RNA polimerasa que es producida por la cepa a partir de la previa inserción en su genoma mediante un virus, la expresión de la T7 RNA polimerasa está regulada por el operón lac. La secuencia genética se ligó entre los sitios HindIII y EcoRI. Adicionalmente, Hev b 3 se obtuvo como una proteína fusionada a tiorredoxina con una etiqueta de His₆ y un sitio de corte para Ek, la masa molecular de esta proteína de fusión es de 40 kDa. En la Figura 8 se muestra esquemáticamente el diseño de la construcción de la proteína de fusión (PF).



Figura 8. Representación de la proteína de fusión. En la figura se muestran las regiones que constituyen dicha proteína. Donde TRX representa a la proteína tiorredoxina; su función es ayudar a plegar correctamente la proteína de interés, His-Tag es una región de seis histidinas que facilita la purificación de la proteína de fusión mediante su afinidad a níquel, EK es el sitio de reconocimiento de la enzima enteroquinasa y finalmente la secuencia de Hevb 3.

Expresión de la proteína de fusión

Una vez que la secuencia del vector pET-32a-Hev b 3 fue confirmada, la expresión de la proteína recombinante fue evaluada en cuatro cepas distintas de *E. coli*: BL21DE3, Rosseta, CD41 y BL21pLySDE3. Después de realizar la evaluación inicial de las cepas, se encontró que en BL21DE3 la PF producida tiene un peso molecular menor al esperado, por lo que inmediatamente se descartó su utilización. Por lo tanto, el estudio cinético de expresión en función de la temperatura y la concentración de IPTG se realizó para Rosseta, CD41 y BL21pLySDE3. En la siguiente etapa de verificación, la cepa

CD41 requirió 16 h en producir suficiente cantidad de proteína de fusión, así que también se descartó. En la Tabla 8 se resumen las condiciones de monitoreo para las dos cepas restantes. En ambas se encontró que las condiciones óptimas para la expresión se tienen con una concentración 0.5 mM de IPTG a 30 °C . La mayor parte de la proteína producida por BL21pLySDE3 se obtuvo en la porción insoluble, lo cual no es deseable en muchas ocasiones. Entonces se eligió a Rosseta como cepa productora de Hev b 3 en el vector pET-32a, con base a la cantidad de proteína soluble biosintetizada. Esta estimación se hizo tomando como criterio de normalización a la banda más intensa observada en el gel de electroforesis.

Tabla 8. Condiciones de inducción utilizadas para expresar a Hev b 3 en diferentes cepas.

E.coli	IPTG mM	Temperatura °C	tiempo óptimo, h
Rosseta	0.5, 1.0	30, 37	7-8
BL21pLySDE3	0.5, 1.0	30, 37	16

En la Figura 9 se muestra el gel de electroforesis al 14% de acrilamida correspondiente al estudio cinético de expresión para la proteína de fusión en la cepa *E. coli* Rosseta. No hay variaciones apreciables en cuanto a la cantidad de proteína que se biosintetiza con 1 mM comparada con 0.5 mM de IPTG a 37 °C. La proteína de fusión migra entre las bandas de los marcadores de 31 y 45 kDa.

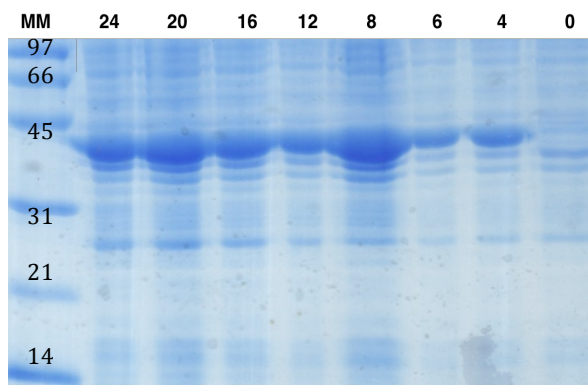


Figura 9. Cinética de expresión. Gel SDS-PAGE al 14%, en donde se muestra la sobreexpresión de *E. coli* Rosseta de la proteína de fusión y del tiempo de inducción en horas.

Por cada litro de cultivo obtenido en las condiciones de inducción ya mencionadas se obtuvieron 3 gramos de pellet que se resuspendieron en 75 mL de ALI y se sometieron a lisis celular según las indicaciones de la metodología.

Purificación de la proteína de fusión

La proteína de fusión sobreexpresada es soluble, por lo que puede ser recuperada en el sobrenadante del lisado celular. Esta proteína es fuertemente retenida por la columna de afinidad a Ni, por lo que su purificación se ve favorecida al realizar lavados de la columna utilizando una disolución amortiguadora con una concentración baja de imidazol (20 mM) hasta detectar a 280 nm una absorbancia igual a la del amortiguador de elución. En la Figura 9 se muestra la purificación de la proteína de fusión que eluye con 100 mM de imidazol. El rendimiento de la proteína de fusión en esta etapa se estimó en 10 mg por litro de cultivo, Berthelot *et al.*, en 2013 reportaron obtener 3 mg de Hev b 3 por litro de cultivo. Hasta esta etapa se consideró tener un alta producción de Hev b 3 como proteína de fusión a Trx.

Corte enzimático de la proteína de fusión

La hidrólisis enzimática realizada con Ek permite liberar a Hev b 3 de la proteína de fusión. La enzima reconoce a la secuencia DDDDK y escinde entre la lisina y la metionina inicial de la proteína Hev b 3, de tal manera que ésta queda libre de aminoácidos adicionales en el extremo amino.

El corte enzimático fue evaluado variando la cantidad de enzima según las indicaciones del proveedor. Previamente, la proteína de fusión fue dializada contra el buffer de corte que contiene 50 mM de Tris pH 8.0 más 1% de Tween 20. La reacción enzimática se realizó a 37 y 4 °C durante 16 h, no se observó una diferencia en ambas condiciones de temperatura. La Figura 10 muestra la fracción de la PF no retenida por la columna de Ni¹⁺ después de ser cortada con 0.0001, 0.001 y 0.01 unidades de Ek utilizadas para digerir 20 µg de proteína, con éstas cantidades no se obtiene una sola especie de péptido. La cantidad óptima de Ek para cortar 20 µg de PF se realizó con 0.1 unidades; con esta cantidad solo se obtiene un producto de la reacción de corte, como se muestra en el carril 0.1 de la Figura 10.

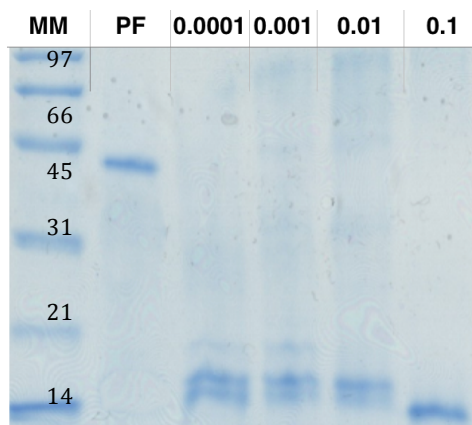


Figura 10. Gel SDS-PAGE al 14%, en donde se muestra el resultado de la reacción de corte con la enzima EK utilizando diferentes unidades, en todos los casos se colocó la misma cantidad de proteína de fusión, las cantidades marcadas para cada carril son equivalentes a microlitros de enzima adicionada. 20

La proteína obtenida con 0.1 unidades de Ek se dializó contra Tris 20mM y se realizó su caracterización utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF. En este punto se esperaba que la banda observada en el ultimo carril del gel de la Figura 9 tuviese una masa igual de 22,4 kDa que corresponde al peso teórico de Hev b 3; sin embargo, no fue así, se obtuvo una banda con una masa aparente cercana a 14 kDa. Se sabe que existen algunas proteínas que no migran en geles de electroforesis conforme a su masa real, debido a que poseen un plegamiento erróneo o son altamente hidrófobas. Cuando la proteína tiene muchos residuos no polares estos podrían interactuar con un mayor número de moléculas de SDS, este ultimo compuesto confiere la carga negativa a la proteína para poder migrar hacia al ánodo, entonces como la proteína estaría más cargada negativamente y se desplazaría más hacia el frente del gel.

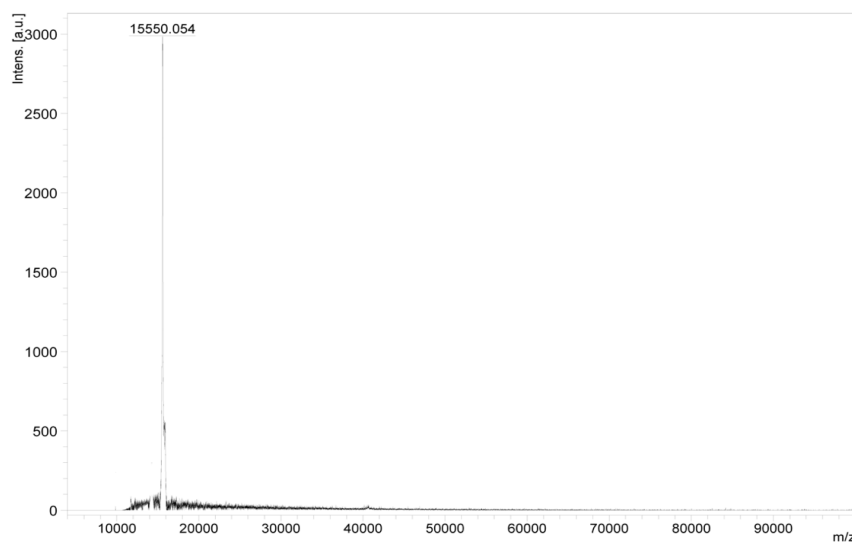


Figura 11. Espectrómetro de masas para el producto de corte con Ek .

Para confirmar la masa de la proteína después de la escisión con la enzima Ek se obtuvo un espectro de masas MALDI-TOF. El espectro se muestra en la Figura 11 y éste demuestra que no se obtiene de forma completa a Hev b 3, aparentemente la Ek corta en un lugar inespecífico dentro de la secuencia de la proteína objetivo. Es interesante notar que en el 2013 K. Berthelot *et al.*, reportaron que esta proteína se hidroliza fácilmente hasta tener una masa similar a la de la proteína Hev b 1 (Rubber elongation factor) que es de 14,845 kDa. Estos autores también demostraron que Hev b 1 no se degrada con la misma facilidad que Hev b 3. El péptido que se obtuvo en este estudio mediante la construcción descrita tiene una masa molecular que es de 700 Da mayor que Hev b 1. Por lo tanto, sugerimos que esta proteína incompleta podría ser reconocida por inmunoglobulinas tipo E de sueros de pacientes alérgicos al látex, puesto que Hev b 1 es uno de los principales alérgenos del látex. Por otra parte, sería deseable secuenciar a esta proteína trunca para confirmar su identidad; esto es, saber si su secuencia corresponde con la de Hev b 1.

La construcción de Hev b 3 como proteína de fusión a Trx se llevó a cabo con la finalidad de obtener a la proteína plegada adecuadamente y, por consecuencia con mayor estabilidad, lo cual no se logró. Aparentemente, al liberarla utilizando una enzima con sitio de corte conocido, ésta también hidrolizó algún enlace en la secuencia de Hev b 3 dando como resultado un péptido de 15,550 kDa. En forma paralela a nuestro trabajo Berthelot *et al.*, en 2013 publicaron la obtención de Hev b 3 con una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino, por lo que intentamos imitar dicha construcción para obtener la secuencia completa la secuencia de Hev b 3. Los detalles de la clonación, expresión y purificación se detallan a partir de la sección de Biosíntesis de MM-Hev b 3.

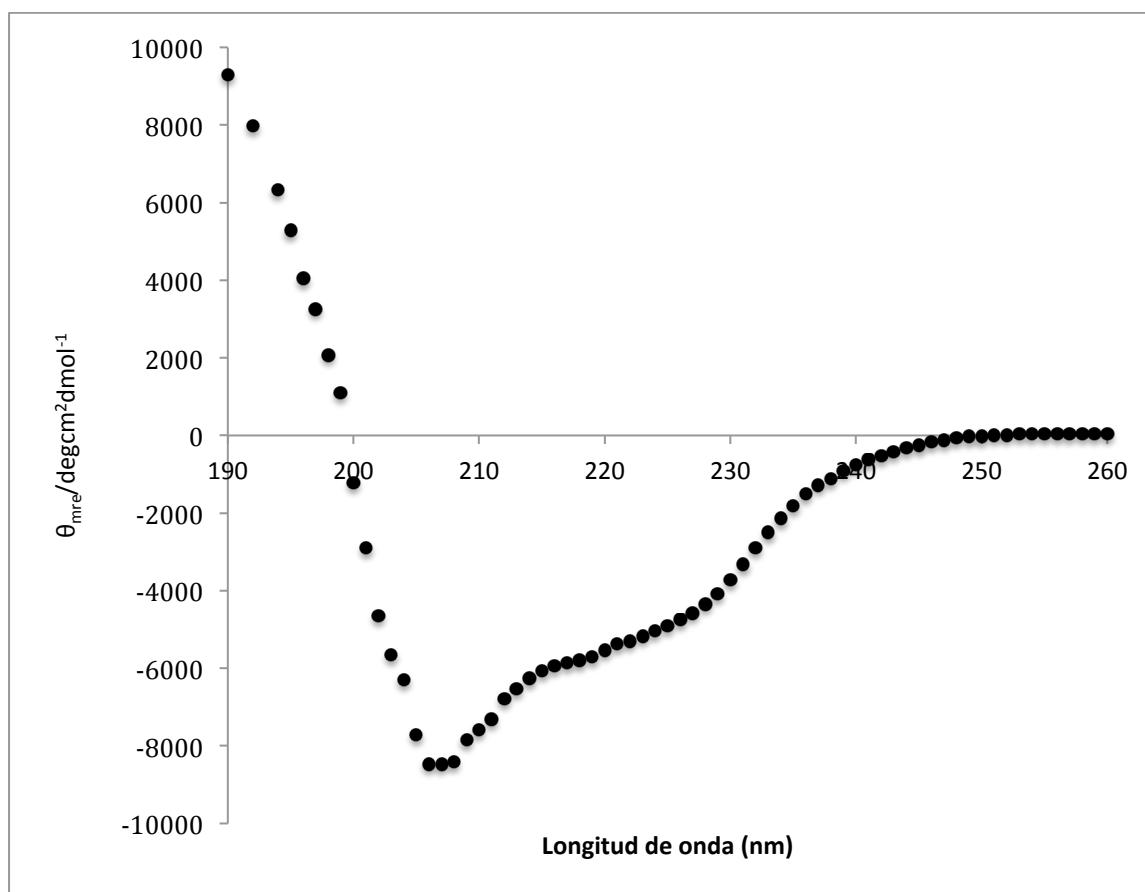


Figura 12. Espectro de dicroísmo circular para el resultado de corte de la proteína de fusión

En la Figura 12 se muestra el espectro de dicroísmo circular obtenido para el péptido de 15,550 kDa: la muestra se dializó a contra Tris 20 mM pH 8.0 a una concentración de 0.2 mg/ml. Para el cálculo de estructura secundaria sólo se consideró la región entre 200 y 260 nm. El espectro muestra un alto contenido de hélices y hebras según el programa CDSSTR a través de la página <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>

Biosíntesis de MM-Hev b 3

Intentamos usar otra construcción para tratar de obtener a Hev b 3 completa. La proteína MM-Hev b 3 se insertó en el plásmido pET26-b, bajo las condiciones de clonación seleccionadas, la expresión de proteína quedó regulada por el promotor T7 para ser inducida con IPTG. La secuencia genética se ligó entre los sitios XhoI y NcoI del vector, elegimos este sistema ya que en 2013 Berthelot *et al.*, reportaron la clonación a Hev b 3 en el vector pET-24a, el cual es un sistema de expresión muy similar al utilizado en este trabajo. Sin embargo, un error en el diseño de los oligonucleótidos dio lugar a un codón de paro entre el sitio de la metionina de la proteína de interés y la etiqueta His₆, dando como resultado dos metioninas extras en el extremo amino de Hev b 3, la Figura 13 esquematiza dicha construcción que posee 206 aminoácidos y una masa molecular de 22,606.9 Da.



Figura 13. Construcción de la proteína recombinante MM-Hevb3, donde la etiqueta MM corresponde a dos metioninas.

Transformación de células competentes

Para realizar la transformación, se introdujo la construcción génica pET26-Hevb 3 dentro de la célula termo-competente BL21(DE3)pLysS. Nos aseguramos que la construcción estuviera presente en la célula mediante resistencia a cloranfenicol (34 µg/ml) y kanamicina (150 µg/ml).

Expresión

El plásmido pET-26 está diseñado para generar un producto proteico el cual contiene al gen de la proteína de interés dentro del operón *lac* que se activa mediante la adición de IPTG, este último permitió el control adecuado de la transcripción y traducción de la proteína de Hev b 3 la cual se biosintetizó de forma soluble en citoplasma.

Para determinar el tiempo óptimo de producción de proteína recombinante, se monitoreó en los tiempos señalados en la Figura 13 después de iniciada la sobre-expresión con 1mM de IPTG, se observa que el máximo de producción se obtiene a las 24 horas a 30 °C. Al analizar los resultados mostrados en la Figura 14, se decidió retirar el cultivo bacteriano a las 12 h, en este tiempo se obtiene suficiente cantidad de proteína para llevar a cabo su caracterización y además la metodología de purificación se simplificó, puesto que se obtiene menor cantidad de desechos celulares, ya que al cultivar a *E. coli*

por muchas horas ésta comienza a producir una gran cantidad de metabolitos que pueden interferir con la purificación. Por cada litro de cultivo se obtuvieron 2.5 g de células.

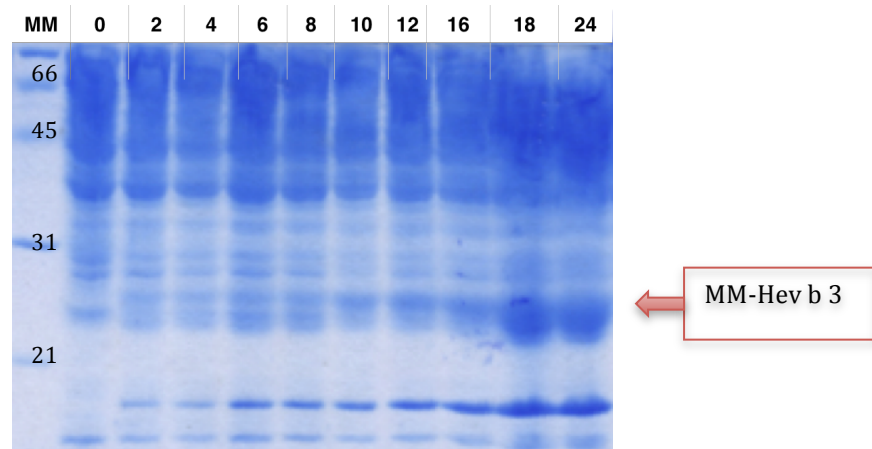


Figura 14. Cinética de expresión de la construcción genética pET26-MMHevb3 en la cepa BL21pLySDE3 de *E. coli*. Cada carril corresponde al tiempo en horas a partir del la inducción con IPTG.

Purificación de la proteína en la construcción genética pET26-Hev b 3

La purificación de la proteína recombinante de Hev b 3 se realizó en función de la afinidad de la proteína al ión Ni y su punto isoeléctrico, que tiene un valor de 4.8, por lo tanto la metodología desarrollada en la parte experimental es la que mejores resultados arrojó.

En la Figura 15 se puede observar el contenido proteico de cada una de las fracciones colectadas para el gradiente realizado en la columna Q Sepharosa según las especificaciones indicadas en la metodología. Se aprecia que la proteína esperada eluye a partir de 120 mM hasta 250 mM de NaCl en amortiguador de unión según la Tabla 6. Estas fracciones se desalaron y concentraron.

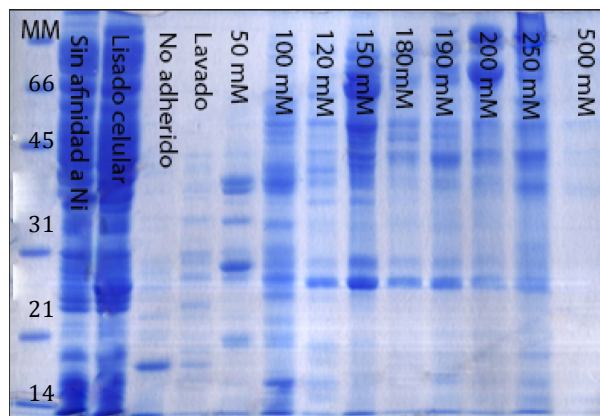


Figura 15. Purificación de la proteína MM-Hevb 3 utilizando la columna Q Sepharosa. Las cantidades con unidades mM corresponden a la concentración de NaCl utilizado para eluir dicha fracción.

El cromatograma de la Figura 16 muestra la purificación de la proteína MM-Hev b 3 por intercambio aniónico, se puede observar que Hev b 3 eluye en 14,6 minutos y en el minuto 20 se obtienen algunas impurezas. El método utilizado para la purificación fue optimizado hasta lograr la separación adecuada, las fracciones colectadas de la purificación por intercambio aniónico de alta resolución contenían algunas proteínas no deseadas. Entonces se recirculó dicha fracción hasta obtener a Hev b 3 sin contaminantes, este procedimiento redujo el rendimiento de la proteína a 500 µg por litro de cultivo. Las condiciones de columna utilizadas para obtener el cromatograma de la Figura 16 se muestran en la Tabla 7.

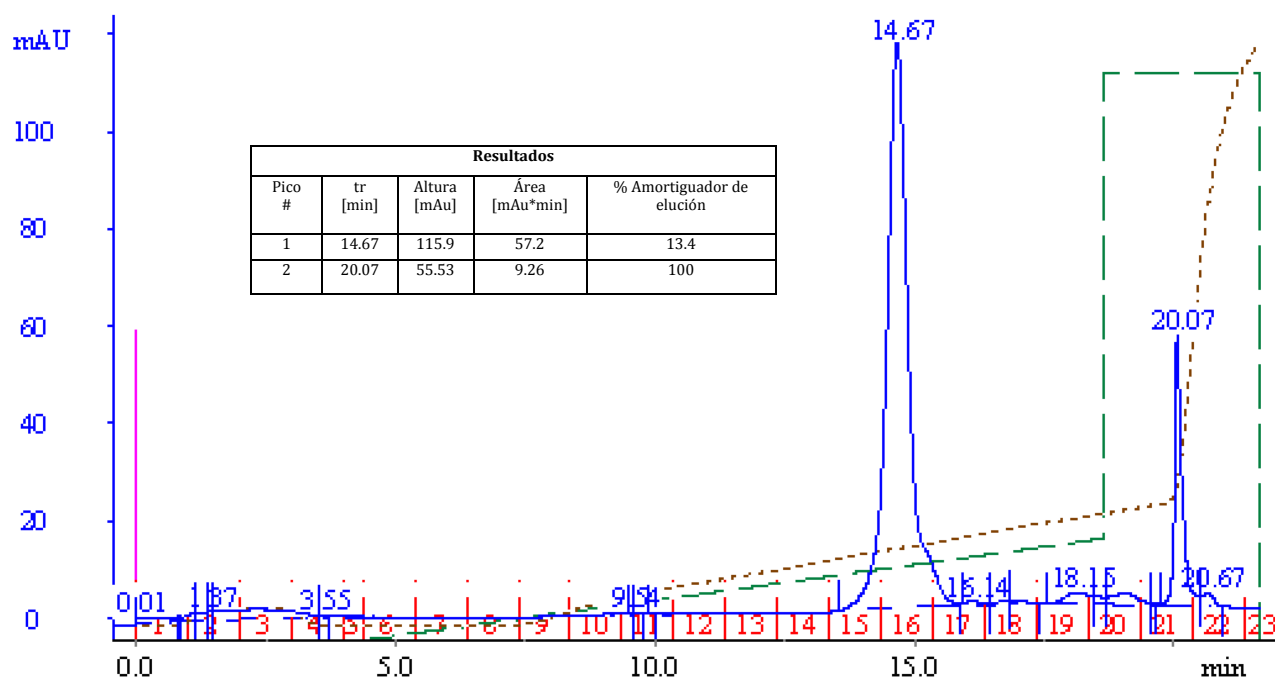


Figura 16. Cromatograma de la purificación de MM-Hevb3 utilizando una columna de intercambio aniónico. En la Tabla 7 ubicada en la sección de metodología pueden observarse los condiciones de columna empleados en la separación. La línea entrecortada color verde corresponde al gradiente de amortiguador de unión y la línea punteada color café corresponde a la conductancia detectada por el cromatógrafo.

Por otra parte, al purificar Hev b 3 utilizando la misma columna de intercambio aniónico con Tris 20 mM a pH 8 se observó una gran tendencia a formar multímeros y al mismo tiempo hidrolizarse como se muestra en la Figura 17. El carril 1 corresponde a una fracción eluida de una columna mono Q con una concentración de 1.2 mg/ml y almacenada por 12 h a 4 °C. Lo cual sugiere su alta inestabilidad en amortiguador Tris con pH 8. El espectro de masas de ésta fracción realizado por MALDI-TOF se muestra

en la Figura 18, se pueden observar diversos picos desde 11 kDa hasta 55 kDa, se utilizó ácido sinapínico como matriz.

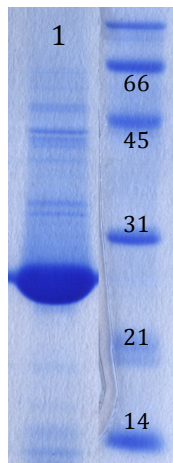


Figura 17. Separación electroforética en gel desnaturalizante . El carril 1 muestra la fracción a MM-Hev b 3 purificada a pH 8 utilizando 20 mM de Tris un una columna de intercambio aniónico Mono Q 5/50.

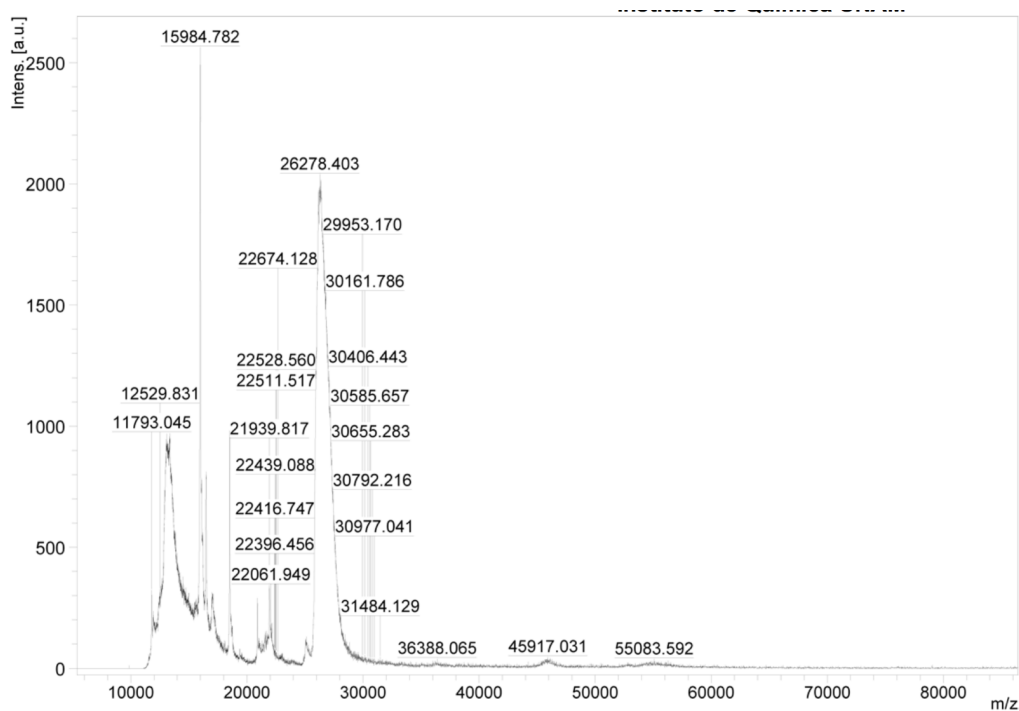


Figura 18. Espectro de masas MALDI-TOF, correspondiente a MM-Hev b 3 purificada en Tris pH 8 y almacenada 12 h a 4 °C.

Hev b 3 es una proteína que está unida a la capa de lípidos de las partículas de hule y por tanto es altamente hidrófoba. Al llevar a cabo su purificación se tuvieron dificultades experimentales en cuanto a determinar las condiciones necesarias para mantener estable a la proteína y por tanto obtenerla sin contaminantes, como se demuestra en la Figura 19. A pesar de que el rendimiento obtenido por cada litro de cultivo es bajo, el poder establecer las etapas de purificación permitirá obtener cantidades suficientes de proteína a partir de un escalamiento del cultivo de células biosintetizadoras de Hev b 3. La obtención cuantitativa de una proteína es uno de los puntos críticos para lograr cristalizarla y determinar su estructura utilizando técnicas de difracción de rayos x.

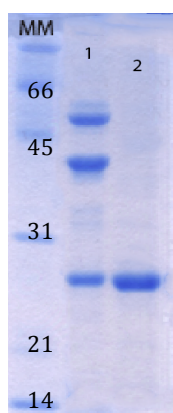


Figura 19. Separación electroforética en gel desnaturizante. El carril 1 muestra la fracción que tuvo que ser sometida a recirculación en la columna de intercambio aniónico. El carril 2 muestra a MM-Hevb3 pura, correspondiente al cromatograma de la Figura 16.

Determinación del contenido de estructura secundaria

La muestra se preparó a una concentración de 0.1 mg/ml y se utilizó como control amortiguador BisTris 20 mM. El espectro de dicroísmo circular fue obtenido por el promedio de tres repeticiones en un equipo Jasco J-710 a una temperatura de 20 °C. El cálculo de contenido de estructura secundaria se realizó con el programa CDSSTR a través de la página <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk>.

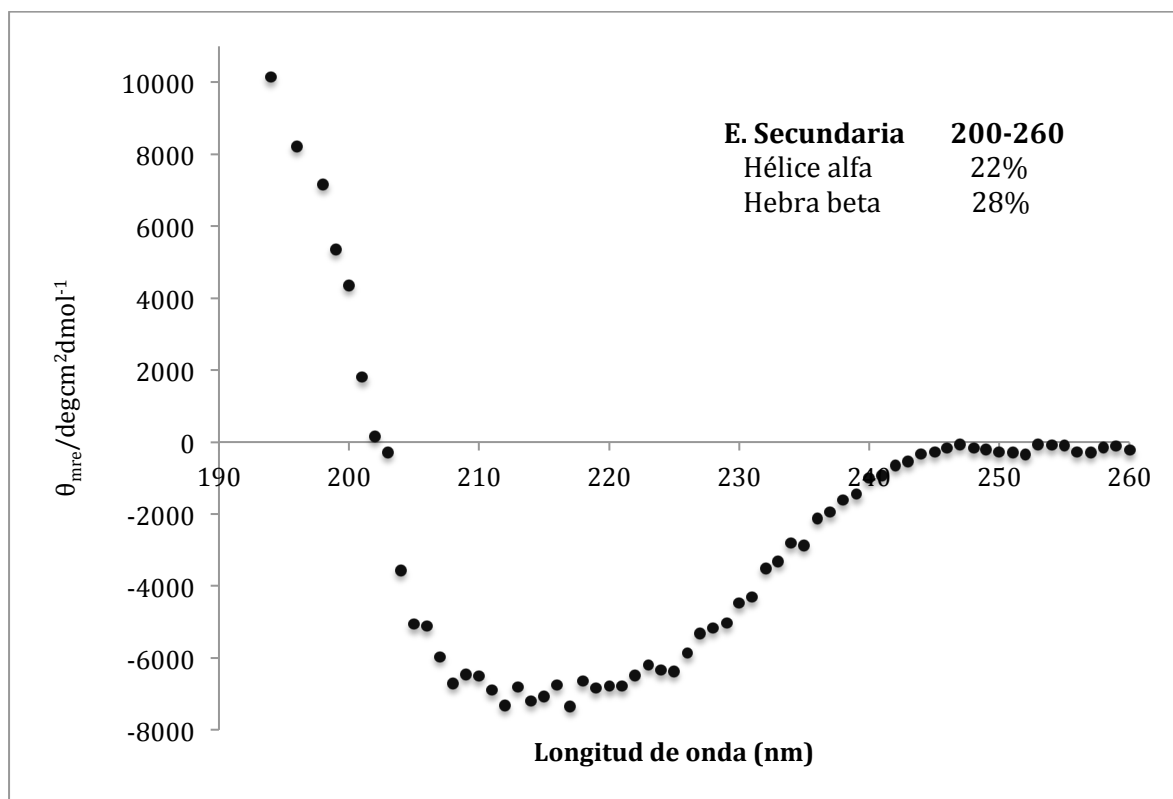


Figura 20. Espectro de D.C de MM-Hev b 3. Temperatura 20 °C, amortiguador BisTris 10 mM pH 6.4, celda con un paso óptico de 0.1 cm. Velocidad 20 nm/min. Intervalos de una unidad de 190 a 260 nm.

En el espectro de la Figura 20 se puede observar un máximo positivo entre 190 y 200 nm, la señal corresponde a la suma de una hélice alfa más una hebra beta y es consecuencia de una transición $\pi > \pi^*$. Entre 210 y 220 se puede observar un mínimo demasiado ancho en este intervalo debido a las contribuciones superpuestas de hélice α y hebra β según la clasificación de la base de datos SCOP. Cuando una proteína tiene una fuerte tendencia a oligomerizar se observa un espectro de dicroísmo muy parecido al obtenido para Hev b 3 en disolución acuosa.

Comparando el espectro que obtuvimos para Hev b 3 (Figura 20) con el obtenido para Hev b 1 (Figura 21) que también se purificó en el grupo de trabajo, se observa una gran similitud; ambas son espectros típicos de proteínas con una estructura alfa + beta.

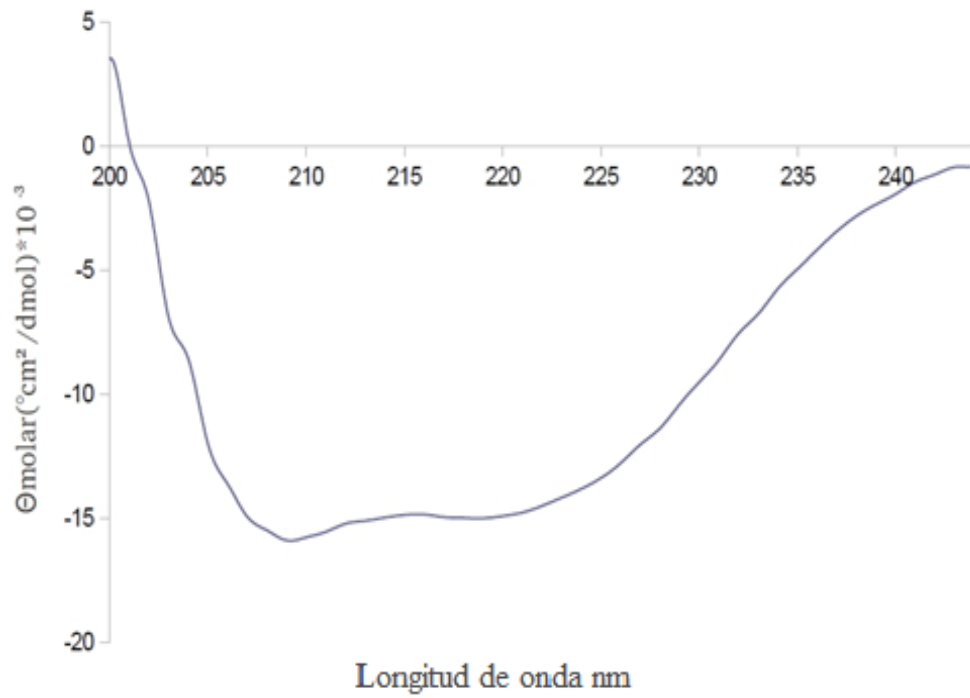


Figura 21. Espectro de dicroísmo circular de Hev b 1. La muestra analizada en UV lejano presentó una concentración de 0.26 mg/mL en agua:acetonitrilo al 10%. Obtenido de: Vázquez G. Clonación y expresión del alérgeno Hev b 1 de *Hevea brasiliensis*. caracterización bioquímica. Tesis de maestría no publicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

Determinación de la masa molecular

MM-Hev b 3 tiene una masa molecular teórica de 22606.7 Da, mediante la técnica MALDI-TOF se obtuvo una masa de 22668.7 Da correspondiente a la señal MH^+ y la especie molecular MH^{2+} de 45338.1 Da que corresponde a la especie dimérica. La ventana de detección se abrió de 10000 a 100000 Da y no se detectó otra señal en el intervalo monitoreado, corroborando la pureza de MM-Hevb 3. La obtención de la masa molecular para cualquier péptido mediante MALDI-TOF depende en gran medida de tres factores; calibración del equipo, concentración de proteína y naturaleza de la matriz utilizada. El espectro de la Figura 22 se obtuvo con 100 pM de MM-Hev b 3.

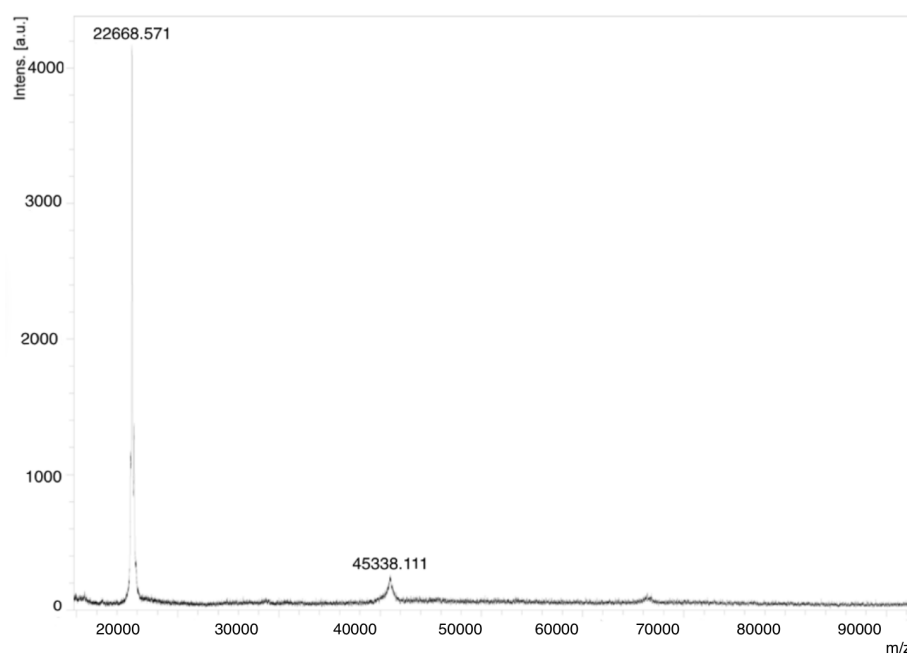


Figura 22. Espectro de masas MALDI-TOF, el pico más abundante corresponde a la masa de MM- Hev b 3.

Predicción del modelo tridimensional de Hev b 3

Para obtener un modelo tridimensional se usaron varios servidores que utilizan estructuras tridimensionales experimentales que son similares en secuencia primaria, pero la mayoría no logró predecir una estructura con alta confiabilidad, ya que a la fecha prácticamente no existen estructuras tridimensionales de proteínas que presenten una alta identidad con Hev b 3 en el Banco de Datos de Proteínas (PDB). Utilizando el servidor I-Tasser, se logró obtener un modelo tridimensional de la estructura de Hev b 3. Este servidor utiliza modelos homólogos y se basa en un alineamiento previo de la estructura secundaria, así como en la identificación de residuos que están expuestos al disolvente.

La puntuación del modelo (C-score) fue de -2.4, lo que indica que el modelo puede ser variable, en una escala de -5 a 2, donde 2 sería un modelo idéntico y -5 un modelo con muy baja similitud, por lo que el modelo podría tener variaciones respecto a una estructura cristalográfica. La Figura 23 muestra en su mayoría hélices, no predice hebras dentro de la estructura tal y como se predice mediante el espectro de dicroísmo circular mostrado en la Figura 20.

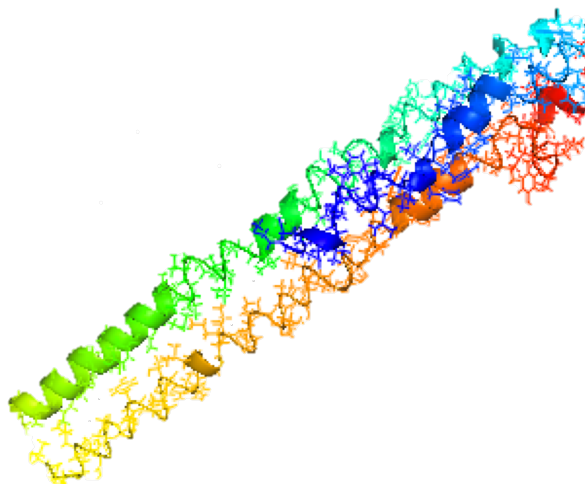


Figura 23. Predicción de estructura tridimensional de Hev b 3 mediante el servidor I-Tasser.

CONCLUSIÓN

Se logró clonar y sobre-expresar a Hev b 3 en células de *E.coli*. Al igual que se determinó la metodología para obtener pura a la proteína recombinante y de forma soluble, a pesar de ser una proteína altamente hidrófoba.

Contar con la proteína completa recombinante (Hev b 3 o SRPP) nos permitirá realizar estudios de interacción con otras proteínas involucradas en la producción del poli-cis-isopreno en *Hevea brasiliensis*, tales como la prenil transferasa y Hev b 1 (rubber elongation factor) y conocer así su función en la planta. También, se podrán realizar estudios comparativos de la interacción de Hev b 1 y Hev b 3 con inmunoglobulinas de tipo E para determinar su alergenicidad en pacientes mexicanos.

BIBLIOGRAFÍA

1. d'Auzac, J.L., Jacob, H., Chrestin, H., The composition of latex from *Hevea brasiliensis* laticiferous cytoplasm, in: J. d'Auzac, J.L. Jacob (Eds.), *Physiology of the Rubber Tree Latex*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989.
2. Sansatsadeekul, J., Sakdapipanich, P., Rojruthai, Characterization of associated proteins and phospholipids in natural rubber latex, *J. Biosci. Bioeng.* 111 (2011) 628–634.
3. K. Nawamawat, J.T. Sakdapipanich, C.C. Ho, Y. Ma, J. Song, J.G. Vancso, Surface nanostructure of *Hevea brasiliensis* natural rubber latex particles, *Colloid Surface A* 390 (2011) 157-166.
4. H. Hasma, A. Subramaniam, Composition of lipids in latex of *Hevea brasiliensis* clone RRIM 501, *J. Nat. Rubber Res.* 1 (1986) 30-40.
5. C.C. Ho, A. Subramaniam, W.M. Yong, Lipids associated with the particles in *Hevea* latex, *Proc. Int. Rubb. Conf. Kuala Lumpur*, 2, 1976, pp. 441-445.
6. L. Dai, G. Kang, Y. Li, Z. Nie, C. Duan, R. Zeng, In-depth proteome analysis of the rubber particle of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree), *Plant Mol. Biol.* 82 (2013) 155-168.
7. D. Wahler, T. Colby, N.A. Kowalski, A. Harzen, S.Y. Wotzka, A. Hillebrand, R. Fischer, J. Helsper, J. Schmidt, C. Schulze Gronover, D. Prüfer, Proteomic analysis of latex from the rubber producing plant *Taraxacum brevicorniculatum*, *Proteomics* 12 (2012) 901-905.
8. B. Wagner, M. Krebitz, D. Buck, B. Niggemann, H.Y. Yeang, K.H. Han, O. Scheiner, H. Breiteneder, Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida, *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (1999) 1084-1092.
9. H.Y. Yeang, K.F. Cheong, E. Sunderasan, S. Hamzah, N.P. Chew, S. Hamid, R.G. Hamilton, M.J. Cardoso, The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy, *J. Allergy Clin. Immunol.* 98 (1996) 628–639.
10. U. Sookmark, V. Pujade-Renaud, H. Chrestin, R. Lacote, C. Naiyanetr, M. Seguin, P. Romruensukharom, J. Narangajavana, Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome, *Plant Cell Physiol.* 43 (2002) 1323-1333.

-
- 11 K. Berthelot, S. Lecomte, Y. Estevez, V. Zhendre, S. Henry, J. Thévenot, E.J. Dufourc, I.D. Alves, F. Peruch, Rubber particle proteins, HbREF and HbSRPP, show different interactions with model membranes, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr* (2013)
- 12 M.S. Dennis, D.R. Light, Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*. Identification, characterization, and role in rubber biosynthesis, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 18608-18617.
- 13 S.K. Oh, H. Kang, D.H. Shin, J. Yang, K.S. Chow, H.Y. Yeang, B. Wagner, H. Breiteneder, K.H. Han, Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17132-17138.
- 14 R. Wititsuwannakul, K. Rukseree, K. Kanokwiroon, D. Wititsuwannakul, A rubber particle protein specific for *Hevea* latex lectin binding involved in latex coagulation, *Phytochemistry* 69 (2008) 1111–1118.
- 15 WHO-IUIS, http://www.allergen.org/search.php?allergen_source=hevea&search_source=Search, in, Allergen Nomenclature Sub-Committee, 2013.
- 16 Cornish, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochem* (2001). 57, 1123-1134
- 17 Yeang HY, Cheong KF, Sunderasan E, Hamzah S, Chew NP, et al. The 14.6 kd rubber elongation factor (Hev b 1) and 24 kd (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from patients with spina bifida and latex allergy. *J Allergy Clin Immunol* (1996): 628–639.
- 18 J.M. Hagel, E.C. Yeung, P.J. Facchini, Got milk? The secret life of laticifers, *Trends Plant Sci.* 13 (2008) 631-639.
- 19 Evert, R.F. (2006) Internal secretory structures. In *Esau's Plant Anatomy* (3rd edn) (Evert, R.F., ed.), pp. 473-501, John Wiley & Sons, Inc
- 20 Polhamus, L.G. (1962) *Rubber, Botany, production, and utilization*. Leonard Hill Limited
- 21 N. Ohya, Y. Tanaka, R. Wititsuwannakul, T. Koyama, Activity of rubber transferase and rubber particle size in *Hevea* latex, *J. Rubber Res.* 3 (2000) 214-221.
- 22 A.P. Singh, S.G. Wi, G.C. Chung, Y.S. Kim, H. Kang, The micromorphology and protein characterization of rubber particles in *Ficus carica*, *Ficus benghalensis* and *Hevea brasiliensis*, *J. Exp. Bot.* 54 (2003) 985–992.

-
23. Berthelot K, Estevez Y, Deffieux A, Peruch F (2012) Isopentenyl diphosphate isomerase: a checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Biochimie online*, doi: 10.1016/j.biochi.2012.03.021.
- 24 Chow KS, Mat-Isa MN, Bahari A, Ghazali AK, Alias H, et al. (2012) Metabolic routes affecting rubber biosynthesis in *Hevea brasiliensis* latex. *J. Exp. Bot.* 63: 1863-1871.
- 25 K. Berthelot, S. Lecomte, Y. Estevez, B. Couлары-Salin, F. Peruch, Homologous *Hevea brasiliensis* REF (Hevb1) and SRPP (Hevb3) present different auto- assembling, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Proteins Proteomics* 1844 (2014) 473-485.
- 26 J.B. van Beilen, Y. Poirier, Establishment of new crops for the production of natural rubber, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 522-529.