

## ARTICULOS ORIGINALES CORTOS

### PRODUCCION, AISLAMIENTO Y SEMIPURIFICACION DE LA PROTEINA TRANSMEMBRANICA gp-41 SINTETIZADA EN *Escherichia coli*

Emilio Narciandi, José García, José Motolongo, Jorge A. Machado, Jesús Benítez,  
Lidia I. Novoa, Luis Herrera

*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba.*

Recibido en noviembre de 1991. Aprobado en julio de 1992.

Key words: HIV transmembrane protein, gp-41, recombinant, inclusion bodies.

#### SUMMARY

A representative region of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) transmembrane gp-41 protein was expressed in *Escherichia coli* under the control of the tryptophan promoter. A high dependence of the expression level on the host strain was observed.

The recombinant protein was obtained intracellularly up to a level of 28% of the total cellular protein, evidenced by electron microscopy as inclusion bodies. The intact granules were semipurified by a simple washed pellet cell procedure, obtaining a material with a purity level higher than 70%. Finally the protein was further purified by a simple gel filtration chromatography procedure up to a purity level higher than 95%.

#### RESUMEN

La región representativa de la proteína transmembránica gp-41 del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) fue producida en *Escherichia coli* bajo el control del promotor triptófano, observándose una gran dependencia del nivel de expresión en cuanto a la cepa utilizada como hospedero.

La proteína recombinante fue obtenida intracelularmente a un nivel del 28% de la proteína celular total formando agregados insolubles, lo cual fue evidenciado mediante microscopía electrónica.

Los gránulos intactos fueron semipurificados por un simple procedimiento de lavado del precipitado celular, obteniéndose un material con más del 70% de pureza. Finalmente la proteína fue purificada mediante un solo paso de cromatografía de filtración en gel, alcanzándose más de 95% de pureza.

#### INTRODUCCION

La *E. coli* ha sido ampliamente utilizada para el clonaje y expresión de genes de organismos procarióticos y eucarióticos. Los altos niveles de expresión logrados mediante la utilización de estos sistemas conducen, por lo general, a la formación de agregados de proteínas insolubles (Marston, 1986), conocidos como "cuerpos de inclusión", los cuales

presentan ventajas en la producción, fundamentalmente por el bajo costo de procesamiento, ya que la etapa de aislamiento inicial es relativamente simple y brinda un producto con más del 50% de pureza, simplificándose considerablemente el proceso de purificación posterior. Esta ventaja inicial puede no resultar positiva si no se logra resolver una eficiente solubilización y renaturalización de producto obtenido en forma de agregados en *E. coli*.

En los sistemas de diagnóstico que utilizan antígenos procedentes de virus se presentan dificultades para obtener una representatividad de cada proteína que lo compone, lo cual disminuye la sensibilidad y especificidad del análisis. El desarrollo de sistemas de diagnóstico que utilizan proteínas recombinantes permite la manipulación de productos no infectivos, por lo tanto no son necesarias etapas de inactivación que pueden afectar la reactividad del producto y la representatividad de los antígenos deseados, además, por esta vía se pueden obtener, con mayor facilidad, los antígenos con un alto nivel de pureza. El presente reporte describe la cinética de obtención de la proteína transmembránica gp-41 del VIH en *E. coli*, la influencia de la cepa hospedera, la localización del producto y el aislamiento y semipurificación de los cuerpos de inclusión insolubles formados por la proteína en el citoplasma celular.

#### MATERIALES Y METODOS

##### Cepas de bacterias y plasmidios

Las cepas de *E. coli* utilizadas como hospederas fueron: MC-1061 ; JM-101 ; C-600 ; HB-101 (Sambrook *et al.*, 1989).

El plasmidio pVIHTA-1 contiene las regiones que codifican para un péptido estabilizador y para un fragmento de la proteína antigénica gp-41 bajo el control del promotor triptófano. Los detalles de la construcción genética fueron reportados anteriormente (Novoa *et al.*, 1991).

### Condiciones de crecimiento

Las células de *E. coli* fueron cultivadas durante 12 horas a 37°C en 5 ml de medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con ampicilina 50 µg/ml y triptófano 100 µg/ml. Las células fueron colectadas durante el principio de la fase estacionaria de crecimiento y transferidas a 100 ml de medio M 9 (Miller, 1972), suplementado con 2% de hidrolizado ácido de caseína, 1% de glucosa, 50 µg/ml de ampicilina y 100 µg/ml de triptófano. El cultivo fue mantenido durante 8 horas a 37°C y 250 rpm e inoculado a un fermentador de 5 l conteniendo el medio anteriormente descrito con ausencia de triptófano. Las condiciones de crecimiento fueron: 37°C, 1 vvm y 350 rpm. Después de 1 hora de cultivo, se añadió 20 µg/ml de ácido 3-indolacrílico y las células fueron mantenidas en estas condiciones durante 20 horas.

### Aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión

Las células obtenidas fueron lavadas en solución tampón PBS (NaCl 8 g/l, NaHPO<sub>4</sub> 1 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.26 g/l, KCl 0.2 g/l) y centrifugadas a 12000 x g durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente fueron lisadas utilizando un sonificador Braun durante 5 minutos a 4°C, centrifugadas nuevamente y las fracciones insolubles fueron separadas y lavadas con PBS suplementado con detergente (NP-40 al 0.5%). Finalmente el material insoluble fue lavado 2 veces utilizando PBS.

La solubilización de los agregados fue realizada utilizando PBS suplementado con 0.5% de NP-40 y 8 M de urea.

#### Métodos analíticos

La electroforesis en gel de poliacrilamida fue realizada mediante el método descrito por Laemmli (1970). El porcentaje de la proteína recombinante gp-41 presente en el extracto de células completas y en el preparado final fue estimado por densitometría (Hoefer Instrument, Scientific Instruments, San Francisco, Calif., USA). La masa celular seca fue determinada centrifugando volúmenes fijos de cultivo en un tubo previamente tarado, seguido por secado a 80°C hasta obtener peso constante. Los valores reportados corresponden a las medias de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

Tabla 1

Influencia de la cepa hospedera en la obtención de la proteína transmembránica gp-41

Cepas transformadas	Masa celular (g/l)	Expresión (%)
MC-1061	2.2	5
JM-101	2.1	12
C-600	1.9	7

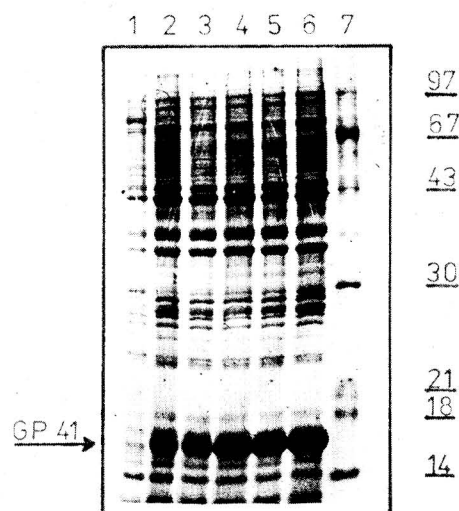


Fig. 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la cinética de expresión de la proteína gp-41. El cultivo de *E. coli* HB-101 (pVIHTA-1) fue inducido por la adición de 20 µg/ml de ácido 3-indolacrílico y cultivado a nivel de 5 l durante 20 horas. Las muestras corresponden a las diferentes horas de inducción: 1: 0 h; 2: 4 h; 3: 8 h; 4: 12 h; 5: 16 h; 6: 20 h; 7: Patrones de pesos moleculares (kDa).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Influencia de la cepa hospedera en la obtención de la proteína gp-41

Las cepas MC-1061, JM-101, C-600 y HB-101 transformadas con el plasmidio pVIHTA-1 fueron inducidas, para expresar la proteína recombinante gp-41, con ácido 3-indolacrílico tal y como describimos en materiales y métodos. Después de 20 horas de inducción las células fueron colectadas y las proteínas celulares fueron extraídas y analizadas mediante electroforesis. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 1, observándose que el nivel de expresión de la proteína de interés fue estrictamente dependiente de la cepa hospedera utilizada para su expresión,

Tabla 2

Cinética de obtención de la proteína transmembránica gp-41 a nivel de 5 l de cultivo

Tiempo de inducción (horas)	Masa celular (g/l)	Expresión (%)
4	1.32	14
8	2.18	18
12	2.80	26
16	3.00	28

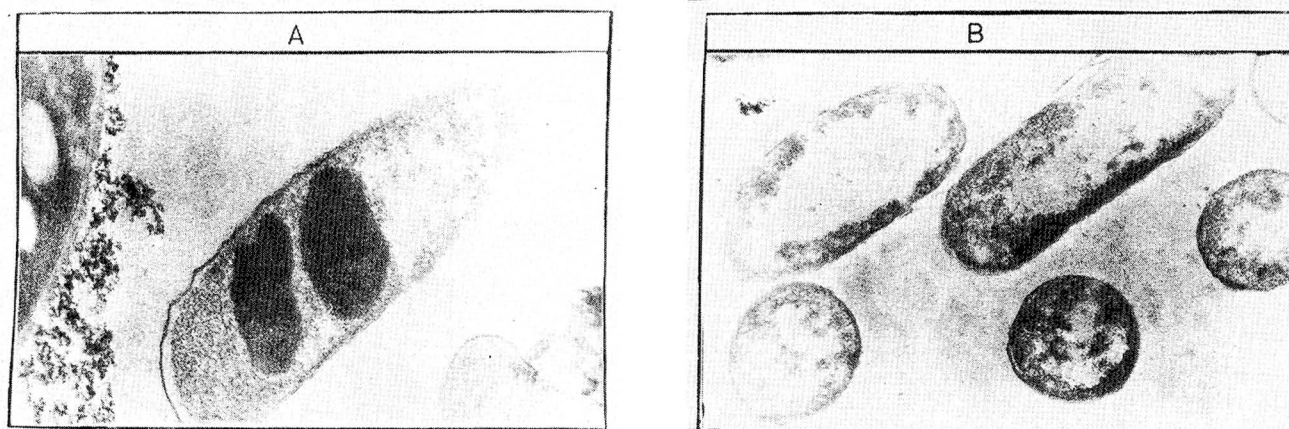


Fig. 2. Microscopía electrónica de las células de *E. coli* K-12 HB-101 (pVIHTA-1) durante la producción de la proteína gp-41.

corroborándose lo descrito anteriormente por Kawaguchi *et al.*, (1987), mientras que el crecimiento celular no varía significativamente en las diferentes cepas utilizadas.

Los mejores resultados fueron obtenidos al utilizar la cepa HB-101, expresándose la proteína de interés a un nivel del 23% de la proteína celular total.

#### Producción de la proteína transmembránica gp-41

Muestras del cultivo de las células (HB-101pVIHTA-1) fueron tomadas a diferentes tiempos de inducción (4, 8, 12, 16, 20 horas) y analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Como se muestra en la figura 1, el nivel de expresión de la proteína gp-41 se incrementa en función del tiempo de inducción hasta las 12 horas, a partir de este tiempo la expresión no sufre un aumento significativo, manteniéndose en aproximadamente un 28%, mientras que la masa celular aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor de 3.4 g/l a las 20 horas (tabla 2). Diferentes autores (Schoemaker *et al.*, 1985 ; Rhee *et al.*, 1990) han reportado niveles de expresión similares.

#### Microscopía de Transmisión Electrónica

Para determinar donde se encuentra localizada la proteína de interés, las células de *E. coli* (HB-101 pVIHTA-1) fueron examinadas por microscopía electrónica.

En la figura 2A se muestran las preparaciones correspondientes a las células obtenidas después de 20 horas de realizarse la inducción, observándose la presencia de cuerpos de inclusión citoplasmáticos,

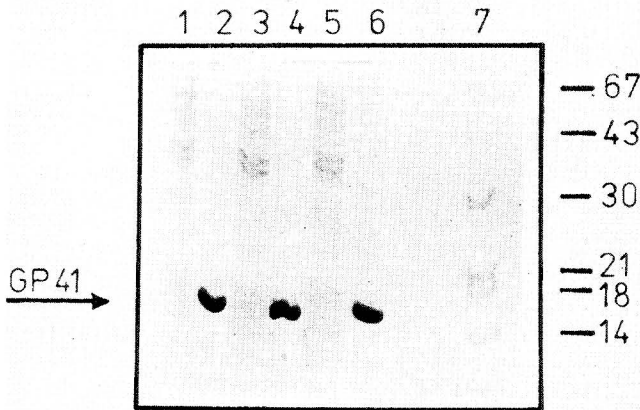
que aparecen como áreas oscuras no delimitadas por membranas y se encuentran ocupando más del 40% del citoplasma celular. En contraste, tales agregados no son observados mientras el cultivo se encuentra en condiciones de represión del sistema de expresión triptófano (figura 2B), lo que indica fuertemente que las inclusiones son formadas por la proteína expresada bajo el control del sistema triptófano.

Las causas que provocan la expresión de las proteínas heterólogas en forma insoluble en *E. coli* no son completamente conocidas (Kane y Hartley, 1988), aunque se ha demostrado que este proceso es afectado por la unión de diferentes parámetros relacionados con la célula hospedera, las condiciones de crecimiento y las propiedades particulares de las proteínas clonadas.

#### Aislamiento de la proteína gp-41 expresada de forma insoluble en *E. coli*

Los gránulos formados por la proteína fueron semipurificados mediante un procedimiento de lavado del precipitado celular, constituido por lavados sucesivos utilizando como buffer base PBS y como detergente NP-40 (0.5%).

Las muestras del cultivo (HB-101 pVIHTA-1), tomadas a diferentes horas después de efectuada la inducción (4, 12, 20 horas), fueron centrifugadas; y las células aisladas fueron lavadas previamente con PBS, y a continuación rotas mediante tratamiento con ultrasonido. Las fracciones solubles e insolubles fueron separadas por centrifugación (12000 g x 10 minutos) y analizadas mediante electroforesis.



**Fig. 3.** Localización de la proteína gp-41. Las muestras corresponden a la ruptura por ultrasonido de varias fracciones de *E. coli* HB-101 (pVIHTA-1) tomadas a diferentes horas de inducción y aplicadas por proteína total.

En la figura 3 se muestra que la proteína gp-41 expresada en *E. coli* al formar agregados siempre fue colectada en la fracción insoluble independientemente del tiempo de inducción en el cual fueron analizadas las muestras.

Al realizar el proceso de lavado del precipitado celular se obtiene un preparado final enriquecido en la proteína de interés con más del 70% de pureza y un 80 % de recobrado total de la proteína gP-41 (figura 4).

Diferentes variantes de estos procedimientos han sido utilizadas en el caso de proteínas expresadas de forma insoluble en *E. coli* (Marston *et al.*, 1984 ; Schonr *et al.*, 1985).

Este material fue purificado posteriormente hasta un nivel del 95% utilizando un solo paso de cromatografía de filtración en gel (HPLC), por lo que se concluye que la utilización del procedimiento del lavado del precipitado celular hace posible una notable disminución en el costo de procesamiento.

**Solubilización de los cuerpos de inclusión insolubles**

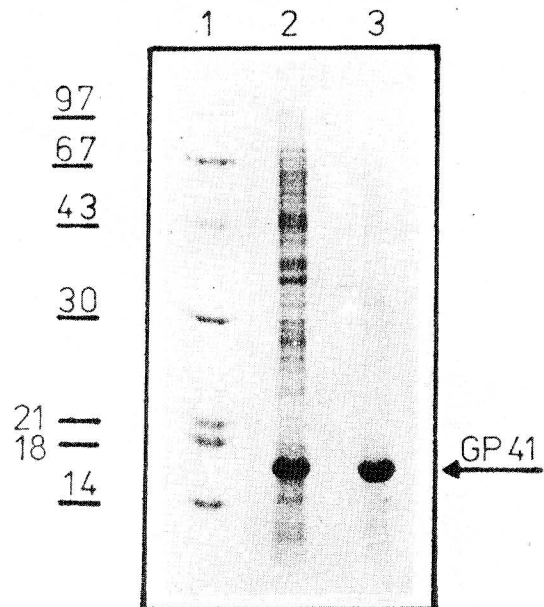
Con vistas a caracterizar la solubilización de la proteína recombinante, alícuotas de las preparaciones que contenían los gránulos insolubles obtenidos después de la ruptura celular de las muestras correspondientes a las 20 horas de inducción, fueron lavadas con concentraciones incrementadas de urea (2, 4, 6 y 8 M), centrifugadas y finalmente analizadas mediante electroforesis.

**Tabla 3**  
Influencia de la concentración de urea en la solubilidad de la proteína recombinante gp-41

Concentración de urea (Molar)	Concentración relativa gp-41	
	Fracción soluble (%)	Fracción insoluble (%)
2	-	100
4	5	95
6	55	45
8	95	5

En la tabla 3 se observa que para solubilizar más del 90% de la proteína recombinante ( Morales *et al.*, 1989; Shibui *et al.*, 1989), son necesarias altas concentraciones del agente desnaturante utilizado, mientras concentraciones por debajo de 4 M pueden ser utilizadas como agente solubilizante de proteínas contaminantes.

Las muestras de la proteína, obtenidas a diferentes tiempos de inducción fueron solubilizadas utilizando 6 M de urea (datos no mostrados). Se observó que a medida que aumenta el tiempo de inducción se obtienen menores rendimientos en cuanto al nivel de



**Fig. 4.** Electroforesis en gel de poliacrilamida del total de proteínas celulares y los cuerpos de inclusión aislados de la proteína gp-41.

extracción, ello demuestra que la solubilidad relativa de los gránulos formados por la proteína gp-41 depende del tiempo de inducción en el que el cultivo es recolectado, lo cual debe estar relacionado con el incremento en la compactación de los cuerpos de inclusión con el tiempo.

## REFERENCIAS

- KANE, J.F. y D.L. HARTLEY (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Tibtech* 6: 95-101.
- KAWAGUCHI, Y. ; S. KOSUGI ; K. SASAKI ; T. VOZUMI y T. BEPPU (1987). Production of chymosin in *Escherichia coli* cells and its enzymatic properties. *Agric. Biol. Chem.* 51: 1871-1877.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680-685.
- SAMROOK, J ; E. F. FRITSCH y T. MANIATIS (1989). *Molecular Cloning*. A Laboratory Manual. Sec. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- MARSTON, F.A.O. ; P.A. LOWE ; M.T. DOEL ; J.M. SCHOEMAKER; S. WHITE y S. ANGAL (1984). Purification of calf prochymosin (prorennin) synthesized in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 2: 800- 804.
- MARSTON, F.A.O. (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 240: 1-12.
- MILLER, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 431-432.
- MILLONING, G. (1961). Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. *J. Appl. Phys.* 32: 1637-1639.
- MORALES, J. ; V. MUZIO ; I. C. TORRENS, V. JIMENEZ ; A. SILVA ; A. SANTOS ; Y. QUIÑONES; R. E. NARCIANDI y L. S. HERRERA (1989). Expresión del gen de la quimosina en *E. coli*. *Interferón y Biotecnología* 6: 242-250.
- NOVOA, L.I. ; J.A. MACHADO ; J.R. FERNANDEZ; J.V. BENITEZ ; R.E. NARCIANDI ; J.L. RODRIGUEZ ; M.P. ESTRADA ; J. GARCIA y L.S. HERRERA (1991). Method for the expression of heterologous proteins produced in fused form in *E. coli*, use there of, expression vectors and recombinant strains. European Patent Solicitud 416673 *AI Bulletin* 91/11.
- RHEE, H. J. ; I. LEE y K. H. YANG (1990). High-Level expression of Human Insulin-like growth factor II in *Escherichia coli*. *J. Biotechnology* 13: 293-304.
- SCHOEMAKER, J. M. ; A. H. BRASNETT y F.A.O. MARSTON (1985). Examination of calf prochymosin accumulation in *Escherichia coli*: disulphide linkages are a structural component of prochymosin containing inclusion bodies. *EMBO J.* 4: 775-780.
- SCHONER, R. G. ; L. F. ELLIS y B. E. SCHONER (1985). Isolation and purification of protein granules from *Escherichia coli* cells overproducing bovine growth hormone. *Biotechnology* 3: 151-154.
- SHIBUI, T. ; R. MATSUI ; M. UCHIDA-KAMIZONO ; H. OKAZAKI ; J. KONDO ; K. NAGAHARI; S. NAKANISHI y Y. TERANISHI (1989). Periplasmic production of Human Pancreatic prokallikrein in *E. coli*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 31: 253-258.
- SPURR, A.R. (1969). A low viscosity epoxyresin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Research* 26: 31-36.