

EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE CON ACTIVIDAD DE MANOSILTRANSFERASA

Serrano Esteban Francisco (1); Núñez Beltrán Arianna (2); Reyes Martínez Juana Elizabeth (3)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas, campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [kuuby_esteban@hotmail.es]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [arianna0862@gmail.com]

3 [Departamento de biología, División de Ciencias Naturales y exactas, campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [juana.reyes@ugto.mx]

Resumen

Se conoce que la bacteria *Escherichia coli*, un microorganismo comensal, tiene variantes fenotípicas, de las cuales algunas de ellas son patógenas de humanos. La cepa Enteropatógena (EPEC) es una bacteria causante de diarrea en diferentes grados afectando principalmente a niños y adultos mayores. Esta bacteria tiene una gran variedad de factores de virulencia, algunos de ellos presentes en su pared celular. La infección causada por este patógeno provoca el desgarre de las microvellosidades del enterocito, al desagarrarse, se pierden iones y electrolitos esenciales para el organismo, lo cual produce deshidratación, pudiendo llegar a ser mortal. El objetivo principal de este trabajo fue realizar la expresión de la proteína Manosiltransferasa 1 de *Saccharomyces cerevisiae*, en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, para realizar la síntesis “in vitro” de los antígenos O encontrados en la pared celular de la cepa EPEC de *E. coli*.

Abstract

It is known the bacterium *Escherichia coli*, a commensal microorganism, has phenotypic variants, some of which are pathogenic for humans. The Enteropathogenic strain (EPEC) causes diarrhea in different degrees affecting mainly children and elderly people. This bacterium possesses a great variety of virulence factors, some of them located in its cell wall. The infection with this pathogen, provokes the tearing of the microvilli of the enterocyte, when it is discharged, essential ions and electrolytes are lost causing dehydration, which can be fatal. The main objective of this work was to express the protein Manosyltransferase 1 from *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris* expression system, to perform “in vitro” the synthesis of O antigens found in the cell wall of *E. coli* EPEC strain.

PALABRAS CLAVE

Enteropatógena; Virulencia; Diarrea; Manosiltransferasa 1; Antígeno O.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa, GRAM negativa, la cual tiene una relación comensalista con el hombre, sin embargo, existen ciertos tipos de variantes fenotípicas (cepas) que superan el límite de una interacción comensalista y se convierten en microorganismos causantes de enfermedad. La cepa Enteropatógena de *E. coli* (EPEC) es una de las cepas de mayor relevancia, la cual es causante de diarrea en diferentes grados en el hombre, en niños menores de 5 años puede acarrear graves consecuencias incluso llegando a ser mortal.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés) se ha estimado que aproximadamente dos millones de niños mueren cada año de enfermedades diarreicas en países con un bajo índice de desarrollo y generando la muerte de un menor cada 15 segundos [1].

La cepa infecciosa de *E. coli*, posee una gran variedad de factores de virulencia y una alta susceptibilidad a desarrollar resistencia a antibióticos [2]. Algunos factores de virulencia son encontrados en los componentes de su pared celular, como es el caso de los lipopolisacáridos (LPS) [3].

En el análisis diagnóstico de EPEC se utilizan diversas metodologías, entre las cuales se incluyen la serotipificación [4], la cual consta en la clasificación de organismos infecciosos según los antígenos que presentan en su superficie celular, de los cuales algunos de ellos son los antígenos O, componentes del LPS de la pared celular. Algunos de los antígenos identificados en las cepas EPEC están constituidos de monómeros de D-manosa y son sintetizados por 2 enzimas denominadas manosiltransferasas 1 y 2.

Por otro lado, la producción de proteínas recombinantes ha sido ampliamente estudiada, y se ha desarrollado un modelo estandarizado en *Pichia pastoris*. Ésta es una levadura ampliamente estudiada y presenta ventajas como la presencia de promotores fuertemente regulados y una

tendencia al crecimiento bajo un metabolismo respiratorio, teniendo como capacidad el uso del metanol como fuente de carbono, mismo que es opuesto al crecimiento fermentativo [5]. Se ha logrado obtener niveles excepcionalmente altos de proteínas heterólogas colocando la secuencia del gen, bajo un promotor inducible de AOX1 de *P. pastoris* [6].

En el presente trabajo se planteó expresar la proteína Mnn1 de *Saccharomyces cerevisiae* en forma recombinante para realizar la síntesis “in vitro” de los antígenos O de las cepas EPEC de *E. coli*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Medios de cultivo, así como peptona, extracto de levadura, agarosa se adquirieron de Gibco. SDS, EtOH, EDTA, antibiótico de Sigma Aldrich. Enzimas de restricción de Promega, ligasa T4, dNTP's, y marcador de peso molecular 1Kb de Thermo Scientific. Los oligonucleótidos se adquirieron de la empresa T4 Oligo.

Clonación del gen *Mnn-1* de *S. cerevisiae*

Posterior al análisis de la secuencia que codifica para el gen Mnn1 previamente identificado en el genoma de la levadura *S. cerevisiae*, se confirmó que éste no contenía intrones. Posteriormente se amplificó dicho gen mediante la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los siguientes oligonucleótidos iniciadores:

Mnn-1 Fw: 5'CCGCGGCAACTAGTTACCCACC3'

Mnn-1 Rv: 5'GCGGCCGCGCCTTTGTTTCGTGT3'

Dejando sitios de reconocimiento para las endonucleasas Sac II y Not I respectivamente (subrayado).

Tabla 1: Condiciones de reacción para la amplificación del gen Mnn-1

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Primer ciclo	95°C	3min
29 ciclos	95°C	30seg
	67°C	30seg
	72°C	1min
Ronda Final	72°C	5min
Termino	12°C	Indefinido

La reacción de PCR se efectuó bajo las condiciones descritas en la tabla 1. Utilizando un termociclador modelo T100 (BioRad).

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó el análisis de las reacciones de PCR y digestión de plásmidos con endonucleasas mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Las fotografías se adquirieron en un fotodocumentador modelo Gel Doc XR+ de BioRad.

Purificación de DNA desde geles de agarosa

Se realizó usando columnas de vidrio siguiendo el protocolo descrito en el manual de Molecular cloning: a laboratory manual (Sambrook, J., & Russell, D. W.) [7]

Cuantificación de ácidos nucleicos

Se calculó la concentración de los fragmentos de PCR, así como los plásmidos mediante espectrofotometría utilizando Nanodrop (2000, Thermo Scientific). Tomando lectura a una absorbancia de 260nm (a la cual absorben los ácidos nucleicos gracias a los anillos de purina encontrados en sus bases nitrogenadas). Se tomó en consideración la relación 260/280, para determinar la cantidad la pureza de la muestra de DNA.

Ligación del gen Mnn-1 al vector pJET1.2

Una vez realizada la clonación y posterior a la purificación del gen Mnn-1 se llevó a cabo una reacción de ligación con el vector pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific). Posterior a la adición de los reactivos descritos en la tabla 2 se incubó la reacción a 16°C durante 16h, al finalizar la reacción se incubó a 4°C.

Transformación de *E. coli* DH5 α

Se utilizó la mezcla de la reacción de ligación para realizar una transformación bacteriana con la cepa de *E. coli* (DH5 α) la cual se encontraba en estado de competencia, al finalizar se colocó a 37°C durante 18h con Ampicilina (Amp) a una concentración final de 10 μ g/mL. Al visualizar las colonias transformantes se realizó una expansión en medio líquido adicionado con Amp a la concentración mencionada y se incubó a 37°C durante 18h para posteriormente realizar la extracción de DNA plasmídico.

Tabla 2: Reactivos utilizados para la reacción de ligación del gen Mnn-1 y el vector pJET1.2

Componente	Volumen
Agua	4 μ L
Buffer para la Ligación	10 μ L
Mnn-1 Gen	5 μ L
pJET1.2 vector	0.5 μ L
T4 DNA ligasa	0.5 μ L
Vf	20 μ L

Extracción de DNA plasmídico

Se realizó una extracción de ácidos nucleicos con un enriquecimiento especial para DNA plasmídico, usando el método de Lisis alcalina en donde posterior a la centrifugación del cultivo líquido, las células se resuspendieron en buffer 1 (Glucosa 50mM, EDTA 10mM, Tris 25mM), se añadieron 100 μ L de buffer 2 (NaOH 0.2N, SDS1%), se mezcló la solución por inversión. Posteriormente

se añadieron 150µL del buffer 3 (KOAc 3M pH6) mezclando nuevamente por inversión. Se centrifugaron los tubos por 10 min y se recolecto el sobrenadante. Se añadieron 3 volúmenes de EtOH absoluto frio y se incubó en hielo durante 20 min. Se centrifugaron nuevamente los tubos y se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado con EtOH al 70%, se secó la pastilla y se resuspendió en 40 µL de H₂O.

Análisis de DNA plasmídico mediante digestión con endonucleasas

Se realizó la linealización del vector mediante el uso de la endonucleasa *Eco* RI la cual se dejó incubar con el DNA plasmídico a 37°C durante 1h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clonación del gen Mnn-1 de S. cerevisiae

Al realizar el análisis de la reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa, se logró visualizar una banda levemente superior a los 2kpb, el cual se muestra en la fig. 1, teniendo como consideración que el peso del gen Mnn-1 en pb es de 2187 pb, se puede decir que se realizó una correcta amplificación del gen.

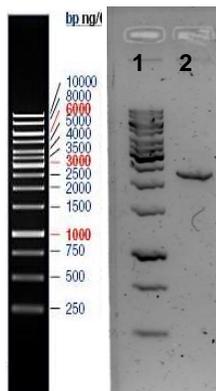


FIGURA 1: Clonación del Gen Mnn-1. El marcador de peso molecular se cargó en el carril 1, el producto de la amplificación por PCR se cargó en el carril 2 (2187pb).

Tras la purificación del gen Mnn-1 desde el gel de agarosa, se realizó una electroforesis para visualizarlo (fig.2) y mediante el análisis con un equipo de Nanodrop se obtuvo una concentración de 8.4ng/µl en un volumen total de 60 µL.

Aislamiento de DNA plasmídico

Tras realizar la ligación del vector pJET1.2 con el gen Mnn-1, se transformaron células competentes (DH5α) de las cuales se obtuvieron 5 colonias transformantes teniendo una eficiencia de transformación de 7142.85 ufc/µg.

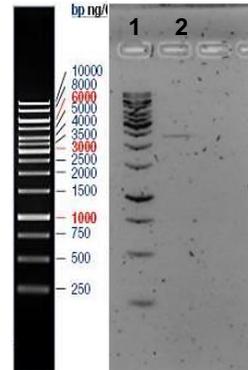


FIGURA 2: Purificación del Gen Mnn-1. El marcador de peso molecular se cargó en el carril 1, el producto de la purificación por columna se cargó en el carril 2 (2187pb).

De estas colonias se obtuvo DNA plasmídico de 4 colonias, las bandas que corresponden al DNA plasmídico se pueden observar en la figura 3.

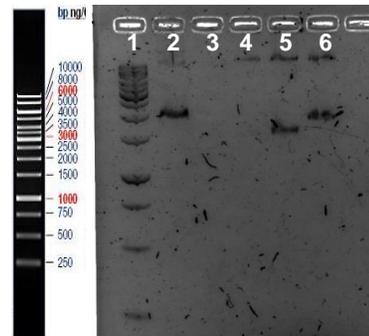


FIGURA 3: Extracción de DNA plasmídico de las Colonias transformantes. El pDNA aislado de las colonias se cargó en forma ascendente de izquierda a derecha.

Análisis de DNA plasmídico mediante digestión con endonucleasa Eco RI

A partir del DNA obtenido de las colonias que crecieron en medio selectivo, las cuales contenían el posible constructo pJET1.2 + Mnn-1 se realizó una digestión utilizando la enzima de restricción *Eco* RI para linealizar el plásmido y comprobar su tamaño, sin embargo, al analizar los productos de

reacción, no se logró observar que ninguna de ellas alcanzara el peso molecular esperado (~5100pb) resultante de la ligación del vector con el fragmento Mnn-1 (fig. 4).

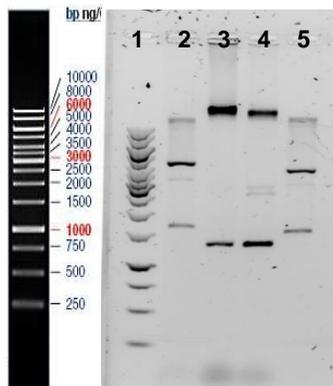


FIGURA 4: Digestión de DNA plasmídico con la enzima de restricción Eco RI. El marcador de peso molecular se cargó en el carril No. 1, Las muestras se cargaron de la siguiente manera: Colonia 1 en el carril 2, Colonia 3 en el carril 3, Colonia 4 en el carril 4 y colonia 5 en el carril 5. .

Debido a que el gen Mnn-1 posee un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Eco RI y el vector Pjet1.2 no contiene ningún sitio de reconocimiento se decidió usar esta enzima para realizar la linealización. En los pozos 1 y 5 se observó que la banda corresponde al peso molecular del vector sin el gen de interés por lo que concluimos que el vector se está ligando sin el gen Mnn1.

Debido a que el tiempo del proyecto de investigación concluyó no se logró terminar la parte experimental del proyecto, esto deja ciertos avances para la continuación del proyecto.

CONCLUSIONES

Gracias a la realización del presente proyecto aprendí que la glicobiología es una ciencia bastante amplia y requiere un gran estudio, ya que los carbohidratos son una de las biomoléculas más importantes y cumplen un sinnúmero de funciones en los seres vivos. Falta desarrollar estrategias para la síntesis de glicoconjugados lo que permitirá realizar estudios moleculares de la interacción de los antígenos O de EPEC y la posterior generación

de tratamientos alternativos para la prevención de diarrea.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad de Guanajuato por el apoyo institucional para fortalecer el conocimiento científico y el desarrollo personal de los estudiantes y por el apoyo para fortalecer la excelencia académica convenio 89/2016". De igual manera se agradece a los asesores del proyecto JERM Y ANB, al técnico M. en C. Lérica Liss Flores Villavicencio, al Dr. Héctor M. Mora Montes por las facilidades que nos brindó por el uso del equipo, así como a mis compañeros de verano de investigación por su motivación y consejos.

REFERENCIAS

- [1] Alper, J. (2003). Data gaps need bridging to assess infectious gastrointestinal diseases. *ASM News-American Society for Microbiology*, 69(2), 65-68.
- [2] Ochoa, T. J., Ruiz, J., Molina, M., Del Valle, L. J., Vargas, M., Gil, A. I., ... & Lanata, C. F. (2009). High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(2), 296-301.
- [3] Vidal-Graniel, J. E. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en Tabasco*, 9(1), 188-193.
- [4] Lluque, A., Mercado, E., Riveros, M., Alvarado, L., Carlos, E., Colichón, A., ... & Ochoa, T. (2010). Comparación entre el diagnóstico serológico y el diagnóstico por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). *Revista de Gastroenterología del Perú*, 30(2), 121-125.
- [5] Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., & Chappell, T. (2009). Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in enzymology*, 463, 169-189.
- [6] Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(12), 5301-5317.
- [7] Sambrook, J., & Russell, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 3. 2001. *Chapter*, 15, 15-1.