EXPRESIÓN DEL ALERGENO RECOMBINANTE BIo t 5 COMO PROTEÍNA DE FUSIÓN UNIDA A LA GLUTATION-S-TRANSFERASA (GST)

CLAUDIA DEL SOCORRO MERCADO CUELLO

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2003

EXPRESIÓN DEL ALERGENO RECOMBINANTE Blo t 5 COMO PROTEÍNA DE FUSIÓN UNIDA A LA GLUTATION-S-TRANSFERASA (GST)

CLAUDIA DEL SOCORRO MERCADO CUELLO

Trabajo presentado como prerrequisito para optar el título de Biólogo con Énfasis en Biotecnología

Director:
PEDRO BLANCO TUIRÁN, M.D.

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2003

Nota de aceptación

_____

_____

_____

_____

Presidente del jurado

_____

Jurado

_____

Jurado

Sincelejo, Junio del 2003

DEDICATORIA

Por todos los esfuerzos y sacrificios descubrí lo bueno de alcanzar las metas.
Por cada momento de insatisfacción al llegar los problemas, descubrí la exaltación al pasar la prueba.
Por todas las personas que estuvieron en el transcurso de mi carrera y que de una u otra manera compartieron conmigo, descubrí lo importante de ser amigos.
Por cada palabra de amor y de esperanza de mis padres descubrí que siempre hay que salir adelante.
Por permitirme descubrir todas estas cosas y saber que la vida es siempre hermosa, te doy gracias Jesús por ser mi roca.

Claudia Mercado Cuello

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme en todos los momentos y brindarme lo mejor.

A mis padres por su amor, su gran apoyo y esfuerzo constante en cada momento. Gracias mamá y papá por brindarme la oportunidad de ser y alcanzar esta meta.

A la Universidad de Sucre por acogerme y formarme intelectual y personalmente.

Al Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena, a su director el Doctor Luis Caraballo Gracia por brindarme su apoyo y toda su colaboración.

A la Doctora Silvia Jiménez Hernández por su apoyo y amistad.

Al Doctor Pedro Blanco Tuirán por tenerme paciencia, brindarme sus conocimientos y ser el punto de apoyo en los momentos de incertidumbre.

A todos los docentes de la Universidad de Sucre que contribuyeron a mi formación y aportaron a mis conocimientos, especialmente al profesor Santiago Ruiz, Adolfo Consuegra, Juan Manuel Díaz, Rina Martínez, Javier Beltrán.

A los jurados de esta investigación, los Doctores Octavio Arzusa, Leonardo Puerta y Alfredo Lagares, por su cooperación y disposición.

A la Doctora Dary Luz Mendoza Jefe de Departamento de Biología y a su secretaria Mirna Luz.

A mis hermanos Lina, Cecilia, José Miguel y José Andrés, por su apoyo inigualable y comprensión.

A todos mis compañeros de la "U": Gladys, Tania, Katia, Shirley, Edilsa, Carmen, Eden, Rudy, Jorge, Blas, Luis Alberto, Maria Luisa, Humberto, Alberto, Liseth, Roger, Cesar, Edwuar, Pájaro, Gamer..... por entenderme, apoyarme y acompañarme siempre.

A todos mis amigos por darme fuerzas y consejos cuando los necesité.

TABLA DE CONTENIDO

		Pág.
RESUMEN		
INTRODUCCIÓN		9
1.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2.	JUSTIFICACIÓN	13
3.	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivo general	14
3.2	Objetivo especifico	14
4.	METODOLOGÍA	15
4.1	Expresión de la proteína de fusión Blo t 5-GST	15
4.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de Blo t 5-GST	16
4.3	Inmunoelectrotransferencia de Blo t 5-GST a una membrana de nitrocelulosa (Immunoblotting)	18
4.4	Purificación de la proteína de fusión Blo t 5-GST a través de una columna de Glutathione Agarosa	20
4.5	Diálisis de la proteína recombinante Blo t 5-GST	21
4.6	Liofilización de Blo t 5-GST	22
5.	RESULTADOS	23
6.	DISCUSIÓN	27
7.	CONCLUSIONES	29
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍCAS	30
ANEXOS		33

RESUMEN

La disponibilidad de alergenos recombinantes en cantidades apropiadas y en buen grado de purificación evita el uso constante de extractos naturales. *Blomia tropicalis* (Bt) es una de las especies de ácaros del polvo doméstico encontradas en la ciudad de Cartagena, de la cual se han caracterizado y clonado varias de sus proteínas alergénicas. El alergeno recombinante Blo t 5 ha sido clonado e identificado como un alergeno mayor de Bt por inducir 70% de reactividad a la IgE en pacientes asmáticos en áreas tropicales.

Este estudio tuvo como objetivo producir el alergeno recombinante Blo t 5 mediante su expresión como proteína de fusión unida a la Glutation-S-Transferasa (GST), para futuros estudios sobre su aplicación como reactivo de diagnóstico y tratamiento. La expresión de la proteína Blo t 5 unida a la GST se realizó, a partir de la inducción de un cultivo de *E. coli* (transformadas con pGEX-4T1) con Isopropyl β-D-Thiogalactoside (IPTG) y su posterior purificación a través de columnas de Glutathione agarosa. Se obtuvieron 26,0467 mg de la proteína de fusión Blo t 5-GST purificada, y cuantificada por electroforesis en SDS-PAGE 15% y una curva de calibración standard de un stock de BSA 2 mg/ml. Las alícuotas de alergeno se conservan congeladas y liofilizadas para su posterior uso.

INTRODUCCIÓN

El asma es una enfermedad alérgica que afecta principalmente el sistema respiratorio y que se caracteriza por la presencia de síntomas tales como hiperreactividad bronquial, obstrucción de las vías aéreas, sibilancia, disnea, y eosinofilia, entre otros. Esta enfermedad se presenta en personas que genéticamente son susceptibles y se encuentran expuestas a fuentes de alergenos.

Las fuentes de alergenos más comunes son los ácaros domésticos, pólenes, escamas de animales, alimentos, mohos e insectos. Existen varias especies de ácaros distribuidas en todo el mundo, especialmente en zonas tropicales y subtropicales, donde las condiciones de temperatura y humedad relativa favorecen su establecimiento y reproducción. En Colombia se han encontrado principalmente *Blomia tropicalis* (Bt) y *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) (1).

Bt es un ácaro de la familia Echymiopodidae (2) que se encuentra en el polvo doméstico de pisos y muebles, donde se reproduce abundantemente. Varias proteínas del cuerpo de este ácaro son alergénicas (3) y están directamente involucradas en la inducción de síntomas de asma y rinitis en personas genéticamente predispuestas.

Como consecuencia de la permanencia constante de alergenos de ácaros en el ambiente se están desarrollando cada vez más casos de asma (4, 5). Aunque actualmente no se dispone de vacunas profilácticas contra las alergias, se emplea la inmunoterapia como tratamiento exitoso en aquellos casos en que los síntomas ya han aparecido.

Para el estudio de los mecanismos moleculares de las alergias se necesita conocer más acerca de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los

alergenos, de manera que se pueda tratar de eliminar o inhibir su acción mediante modificaciones de algunas de sus propiedades. Entre los avances que se han realizado en este sentido se encuentra la obtención de varios alergenos mediante clonación y su expresión como proteínas recombinantes que conserven la estructura y función del alergeno nativo (6, 7).

Blo t 5 es un alergeno mayor de Bt que reacciona de manera específica con la IgE del 70% de los pacientes asmáticos probados, lo cual quiere decir que el alergeno nativo correspondiente es capaz de inducir una respuesta mediada por IgE en la mayoría de los casos de asma (8, 9); por lo tanto, el empleo de Blo t 5 podría ayudar a conocer mejor el papel de Bt como causa de asma en un medio tropical. También se ha aislado una clona parcial de Blo t 5, denominada Bt M, la cual presenta una relación directa con el alergeno nativo de Bt al compartir al menos uno de los epítopes inmunodominantes, encargado de inducir la unión a la IgE en ambos (10).

Se ha demostrado que existe una reactividad cruzada, entre varias de las especies de ácaros que hacen parte de la fauna de un mismo lugar, es decir cierto número de individuos expuestos a fuentes de alergenos distintas desarrollan una respuesta alérgica mediada por IgE contra varios de sus componentes, los cuales comparten cierta homología, es así como se ha encontrado una reactividad cruzada desde 43% y 40% entre alergenos del grupo 5 de Dp, B t M y Blo t 5 (11).

Para expresar una proteína recombinante es indispensable seleccionar un buen sistema de expresión que incluya las mejores cepas de bacterias y vector de expresión. Dentro de estos resultan importantes los elementos reguladores del plásmido de expresión y de la bacteria hospedadora, además de la maquinaria con que cuenta la bacteria para replicar el material genético incorporado y por ende el gen que codifica para la proteína de interés. La expresión de una proteína recombinante como proteína de fusión lleva la unión de la proteína de interés a un fragmento peptídico de otra proteína que hace parte del sistema (por ejemplo, la

GST: Glutation – S - Transferasa), lo que impide que la proteína foránea sea eliminada por proteasas y otras enzimas de la bacteria. De igual manera, facilita su ubicación e identificación dentro de la bacteria y posteriormente el proceso de purificación (12).

Durante la clonación se inserta el segmento del gen que codifica para la proteína (previamente insertada en un fago) dentro de un plásmido de expresión, entre los cuales están los de la serie pGEX, posteriormente se transforman las bacterias seleccionadas con el plásmido; estas bacterias brindan la maquinaria para la síntesis de la proteína codificada por el segmento foráneo. Este proceso es estimulado con la adición de Isopropyl β-D-Thiogalactoside (IPTG), el cual se une al centro del promotor incrementando la velocidad de síntesis de la proteína (13).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al incremento actual de la incidencia y mortalidad por asma, resulta imprescindible estudiar los factores de riesgo tanto ambientales como genéticos que pudieran estar influyendo en esta situación. Gracias a los nuevos avances que se tienen en alergología experimental y al uso de técnicas moleculares como la tecnología del ADN recombinante, se ha llegado al aislamiento de alergenos de su fuente natural y a la caracterización de gran número de ellos. Esto ha permitido conocer más de las características estructurales y alergenicidad de una molécula y obtener mayores cantidades de esta.

Cuanto mayor sea la producción de un alergeno, mejor será su utilización con fines terapéuticos y diagnósticos, por lo que su clonaje, expresión y purificación requieren metodologías estandarizadas que permitan su obtención en cantidades y calidades apropiadas. En el Instituto de Investigaciones Inmunológicas de la Universidad de Cartagena no se contaba con cantidades apropiadas del alergeno recombinante Blo t 5 para futuros trabajos de investigación, tanto clínicos como básicos; por otra parte hace falta formar mas recursos humanos con experiencia en los aspectos básicos de la biotecnología.

2. JUSTIFICACIÓN

Con el desarrollo de esta investigación se incrementara el número de profesionales capacitados en biotecnología en la región caribe de Colombia, aumentando así el recurso humano disponible para la investigación en el país. Se fortalecerán los estudios sobre diagnostico y tratamiento que se adelantan actualmente en Asma alérgica, al disponer de cantidades apropiadas de materia prima.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Producir el alergeno recombinante Blo t 5 mediante su expresión como proteína de fusión unida a la GST, para futuros estudios sobre su aplicación como reactivo de diagnóstico y tratamiento.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir 25 mg de Blo t 5-GST.

- Purificar Blo t 5-GST mediante columna de afinidad.

- Cuantificar la cantidad de recombinante obtenida.

- Adquirir experiencia en expresión de proteínas recombinantes y todas las metodologías relacionadas con Biotecnología en la producción de alergenos recombinantes.

4. METODOLOGÍA

4.1 EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Blo t 5 – GST

La proteína recombinante Blo t 5-GST fue expresada a partir de una siembra de la bacteria BL21 (DE3) transformada con el plásmido de expresión pGEX-4T1, que codifica para la proteína de fusión, en medio sólido LBA (Luria Bertani con Ampicilina). De esta siembra se realizaron cultivos sobre la noche (over night) agregando en un erlenmeyer de 2000 ml, 50 ml de LB/50 µl Ampicilina 100 mg/ml y una colonia fresca de la bacteria transformada, incubando en agitación a 250-300 rpm, 37°C.

Posteriormente el cultivo fue diluido 1:10 en medio LB/Ampicilina, siguiendo la incubación por 1 hora hasta alcanzar una densidad óptica (D.O) a 600 nm, de 0.5, lo cual se determinó empleando un espectrofotómetro (Spectramax 250) con el programa Soft Max Pro. De allí se tomaron 3 muestras de 1 ml de cultivo y se rotularon como "células no inducidas". Inmediatamente, el cultivo fue inducido agregando 500 µl de IPTG 100 mM, siguiendo la incubación por tres horas más.

Luego el cultivo fue repartido en frascos de cultivo de 250 ml, se centrifugó a 3000 rpm (centrifuga Beckman TJ-6) por 10 minutos. El botón ("pellet") resultante se lavó dos veces con MTPBS (PBS con alto contenido de sales), y se resuspendió en 2.5 ml de MTPBS para ser depositado en un tubo de 50 ml (Falcon) que contenía 2 ml de TritonX -100 al 10% y llevado a un agitador de tubos por 15 minutos para homogenizarlo.

Por último, las bacterias fueron lisadas por sonicación del "pellet" previamente resuspendido en frío (sonicador Virsonic 50), 5 veces cada 30 segundos, con intensidad de 14. Luego el tubo se centrifugó a 6000 rpm por 20 minutos a 4°C en centrífuga refrigerada (Beckman GS-6R); el sobrenadante fue depositado en un

tubo plástico de 15 ml (Falcon) debidamente marcado, mientras que el "pellet" se solubilizó agregando Sarkosyl 1.5%, Tris 1M pH 8.0, NaCl 6M y EDTA 0.5M y sonicación, finalmente fue centrifugado y almacenado a -20°C al igual que el sobrenadante.

4.2 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) DE Blo t 5-GST

Para monitorear la eficiencia en la expresión y determinar la concentración de proteína de fusión después de su purificación, se realizó una electroforesis en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE al 15% en un Mini PROTEAN®II (Bio-RAD) según el método de Laemmli (14).

En el primer paso se armó el equipo donde se montan los geles, con los vidrios, platos, espaciadores ("sandwich") sobre el nivelador y los cauchos; seguidamente se preparó el gel de corrida al 15% agregando 3.4 ml de Agua Destilada/Deionizada, 7.5 ml de Acrilamida-Bisacrilamida 29:1, 3.8 ml de Tris-HCl 0.5 M pH 8.8, 150 ul de SDS 10% en un kitasato. Se desgasificó por 10 minutos en una bomba de vacío para agregar por último 150 ul de Persulfato de Amonio 10% y 6.0 ul de Temed. Rápidamente se adicionó esta solución al "sándwich", hasta que alcanzara una altura que no sobrepasara 0.7 mm desde el borde superior con el fin de no cubrir el espacio para el segundo gel, por último se agregaron unas gotas de agua deshidratación del gel, el cual se dejó polimerizar por 20 minutos. Posteriormente se preparó el segundo gel agregando para 6.0 ml de agua, 1.4 ml de Acrilamida-Bisacrilamida 29:1, 2.5 ml de Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 100 ul de SDS al 10%, se desgasificó para adicionarle 50 ul de Persulfato de Amonio 10% y 10 ul de Temed, adicionándolo sobre el gel de corrida ya libre de agua, se colocaron los peines y se dejó polimerizar por 30 minutos.

Después se retiraron los peines y el "sándwich" con los geles, para colocarlos en el soporte y después dentro de la cámara electroforética con 300 ml de tampón

electrodo pH 8.3 (preparado a partir de un stock 5X con 9 gr de Tris-Base, 43.2 gr de Glicina, 30 ml de SDS 10% y 600 ml de Agua Destilada); se agregó también tampón electrodo dentro del soporte en el espacio formado entre los dos platos, cubriendo hasta la superficie.

Seguidamente se prepararon las muestras para correr, agregando en un tubo de reacción de 1.5 ml, 7.5 µl de sobrenadante o "pellet", más 7.5 µl de Agua estéril y 15 µl de tampón de muestra y carga reducido 2X (2.4 ml de Agua bidestilada, 2.0 ml de Tris 0.5 M pH 6.8, 1.6 ml de Glicerol, 3.2 ml SDS 10%, 0.8 ml de 2-β-Mercaptoetanol, 20 mg de Azul de bromofenol). Las muestras de células no inducidas que servían como control fueron preparadas con 7.5 µl de cultivo no inducido (previamente centrifugado y resuspendido en 100 µl de tampón de muestra y carga) más 7.5 µl de tampón de muestra y carga; cada muestra fue sometida a 95°C por 5 minutos para desnaturalizar la proteína y centrifugación a 13000 rpm (Beckman – Microfuge 11) por 2 minutos, para luego ser sembradas en el gel. De las muestras que habían sido purificadas y dializadas se tomaron 15 µl, mezclándose con 15 µl de tampón de muestra y carga; éstas muestras se corrieron para determinarles su concentración final y grado de pureza.

Las muestras fueron sembradas calibrando cada extremo del gel con 10 µl de tampón de muestra y carga reducido 2X, seguido de 10 µl del marcador standard de bajo peso molecular para SDS-PAGE y a continuación 20 µl de cada muestra de la proteína Blo t 5-GST. El equipo se arma con dos geles, cada gel con capacidad para 10 muestras.

Por último se cerró la cámara de acuerdo a la disposición de cada polo y se corrió la electroforesis empleando una fuente de poder (PAV-200) a 200 V, 19 mA, por 45 minutos hasta que todo el colorante saliera; posteriormente los geles fueron desmontados, coloreados con una solución de Azul brillante de Coomassie 0.2% (preparada a partir de Ácido acético al 10%, Metanol 40% y Azul brillante de Coomassie 0.1%) por 30 minutos, en agitación y decolorados con una solución

decolorante (Metanol 40% y Ácido acético 10%) por 1 hora haciendo recambio, luego los geles se depositaron en agua y se secaron en papel Celofán para ser analizados.

La cantidad de proteína Blo t 5-GST se calculó de acuerdo a una curva de calibración standard de BSA 2 mg/ml y su cuantificación total en el volumen obtenido se expreso en mg/ml.

4.3 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE Blo t 5-GST A UNA MEMBRANA DE NITROCELULOSA (IMMUNOBLOTTING)

La capacidad alergénica de la proteína Blo t 5-GST se analizó mediante Inmunoelectrotransferencia de las primeras muestras obtenidas, para esto se corrió un SDS-PAGE 15% (ver arriba) de muestras de cultivo de células no inducidas y sobrenadante inducido obtenidas del primer lote expresado. La transferencia a la membrana de nitrocelulosa se realizó en un MINI TRANS-BLOT®CELL como sigue.

Se armó primero el "sandwich" colocando dentro del "cassette" del equipo una esponja, 4 rectángulos de papel Whatman, una membrana de nitrocelulosa, el gel y 4 rectángulos más de papel, que previamente habían sido sumergidos junto con la membrana en tampón de transferencia (Tris-base 25 Mm, Glicina 192 mM , Metanol 20%) frío a 4°. Para colocar cada capa se mantenía el cuidado de no formar burbujas entre cada una de ellas, ya que esto podía interferir con la transferencia; finalmente se sello el "cassete" y el "sandwich" se sumergió en la cámara con tampón de transferencia frío; la transferencia se realizó a 4°C, con agitación, a 80 V, 150-180 mA durante 1 hora y 45 minutos.

Posteriormente se desmontó el "sandwich" retirando el gel con la membrana adherida, la cual se dejo secar por unos minutos. El área de la membrana correspondiente al carril del marcador de peso molecular fue cortado y coloreado

con Azul brillante de Coomassie 0.2% por 5 minutos, para verificar la eficiencia de la transferencia; el resto de la membrana fue bloqueado con una solución de PBS/BSA 3% y lavado dos veces con PBS/Tween20 0.1% y dos veces con PBS por 10 minutos; cada lavado en agitación. Después del último lavado, y ya seca la membrana, se cortó en pequeñas tiras, de acuerdo al ancho de los pozos en el peine; cada tira se rotuló según el orden en que fueron sembradas las muestras para el SDS-PAGE.

Las tiras fueron incubadas con un mezcla de sueros de pacientes alérgicos a Bt M, un suero control negativo de un paciente no alérgico y PBS, toda la noche a 4°C en agitación, de la siguiente manera: el cultivo de células no inducidas fue incubado con el suero control positivo dilución 1:4 y las muestras del sobrenadante del lote #1 con PBS, suero control negativo dilución 1:4 y con el control positivo respectivamente. Posteriormente fueron lavadas con PBS/Tween20 0.1% y PBS por 10 minutos (dos lavados con cada solución) e incubadas con 5 ml de el conjugado AntiIgE-AP dilución 1:500 con tampón Fosfatasa alcalina (Tris-HCl pH 9.5 0.5 M, NaCl 0.5 M, $MgCl_2$ 25 mM) en agitación por 3 horas; luego de la incubación las tiras se lavaron 4 veces con TBS 1X (Tris-HCl pH 8.0 10 mM, NaCl 150 mM) en agitación cada 10 minutos y reveladas con la adición del sustrato NTB (0.5 gr + 10 ml de Dimetylformamide al 70%) más BCIP (0.5gr + 10 ml de Dimetylformamide al 100%) diluido en tampón Fosfatasa alcalina 1X pH 9.5; la reacción se realizó por 5 minutos en agitación y se detuvo con agua y una solución compuesta por Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 5 Mm.

4.4 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN Blo t 5-GST A TRAVÉS DE UNA COLUMNA DE GLUTATHIONE AGAROSA

Las muestras de sobrenadante y "pellet" de cada lote expresado, fueron purificadas por afinidad a través de columnas plásticas de 25 ml (Pharmacia) empaquetadas con "Glutathione" agarosa (Sigma G4510), previamente preparada siguiendo las instrucciones del protocolo de Sigma.

Para la preparación de la matriz se removieron los residuos de Etanol al 20%, que pudieran estar presente en la Glutathione agarosa preparado con PBS 1X, para esto se depositó todo el contenido de matriz preparada en frascos de 50 ml fondo redondo y centrifugación a 2600 rpm por 5 minutos a 4°C en centrifuga refrigerada (Beckman GS-6R), luego se eliminó la capa superior y la matriz se lavó dos veces con MTPBS, para posteriormente ser resuspendida en un volumen pequeño de PBS 1X y agregada en las columnas. Cada columna se destapó con el fin de drenar el PBS 1X de la matriz, observándose la altura formada por la matriz en las columnas, la cual debía estar entre 1-2 cm utilizando el volumen de Glutathione agarosa requerido para ello (aproximadamente 3 ml por columna).

Una vez armada cada columna (de 4 a 10), se procedió a la purificación de las muestra, sacando tanto el sobrenadante como el "pellet" Blo t 5–GST de cada lote de -20°C; estos se descongelaron y se centrifugaron a 3000 rpm (Centrifuga Beckman TJ-6) por 10 minutos, cada sobrenadante se pasó a través de una columna y se mezcló con el fin de remover la matriz; luego las columnas se llevaron a agitación por 10 minutos. Seguidamente se eluyó cada sobrenadante y se recolectó nuevamente en los tubos de 15 ml correspondiente al lote respectivo. Una vez eluído todo el volumen de sobrenadante de la columna, se procedió a pasar el "pellet" solubilizado de igual forma; tanto el sobrenadante como el "pellet" de cada lote fueron almacenados nuevamente a -20° C para su purificación posterior.

Las columnas fueron sometidas seguidamente a 30 lavados con MTPBS, con el fin de eliminar uniones no especificas; la proteína de fusión fue eluída de la matriz después del último lavado, mediante la adición del tampón Glutathione reducido 20 mM pH 7.5. Las fracciones fueron recolectadas en tubos de 1,5 ml, en volúmenes de 1000 µl para las 3 primeras fracciones y de 500 µl para las cuatro últimas fracciones; determinando su D.O en el Spectra-MAX a 280 nm, utilizando placas de UV y empleando un volumen de 300 µl de cada fracción por pozo; con el fin de tener un indicativo de su concentración.

Por último se realizaron varias mezclas con las muestras acuerdo a las D.O de cada fracción, los cuales fueron recolectados en tubos de polipropileno de 5 ml; cada muestra fue rotulada como Blo t 5-GST purificado y almacenada a -20°C para ser dializada.

La matriz de cada columna se utilizo hasta tres veces, después de ser previamente lavadas con un volumen de NaCl 5 M, 30 veces con MTPBS y conservadas a 4°C con 1 ml de MTPBS.

4.5 DIALISIS DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Blo t 5-GST

Blo t 5-GST purificado fue dializado a través de una membrana semipermeable para diálisis (SPECTRA/POR 23mm cutoff 6.00-8.00) contra 2 L PBS 1X a 4°C y agitación toda la noche, con el fin de eliminar las proteínas de bajo peso molecular o contaminantes aun presentes en las muestras purificadas.

Las membranas se cortaron de acuerdo al número y volumen de las muestras Blo t 5–GST purificadas, estas se sumergieron en agua destilada mientras que se descongelaba cada muestra; y luego se les realizó varios lavados con Agua bidestilada estéril para eliminar el lubricante en que vienen.

La proteína se agregó suavemente en cada membrana con pipeta de 5 ml, sujetando cada membrana con un gancho para diálisis y eliminando las burbujas.

Seguidamente se desmontó la diálisis retirando cada membrana y depositando las muestras en sus tubos respectivos; de cada muestra se tomó un volumen de 15 µl para correr en SDS-PAGE.

Las muestras de Blo t 5-GST purificado y dializado, fueron almacenadas a –20°C.

4.6 LIOFILIZACIÓN DEL Blo t 5-GST

Todas las muestras de la proteína Blo t 5-GST purificadas y dializadas, fueron liofilizadas, con el fin de conservar la proteína más estable y no diluida, para esto cada muestra fue depositada en pequeños frascos de vidrios en un volumen de 3 ml por frasco, marcando el volumen y código de cada muestra. Los frascos se guardaron a –70 °C para su congelación por 3 horas, posteriormente se sellaron con "parafilm" y se llevaron a un liofilizador por 24 horas, al cabo de este tiempo cada muestra se rotuló con su respectiva cantidad de proteína y fueron almacenadas a 4°C.

5. RESULTADOS

La expresión de Blo t 5-GST fue más eficiente cuando la inducción del cultivo con IPTG se realizaba por tres horas, ya que al comparar en los primeros tres lotes con tiempos de inducción de 1hora/30 minutos y 2 horas, la cantidad de proteína obtenida fue baja tanto en el "pellet" como sobrenadante (Figura 1).

En total se expresaron 12 lotes de la proteína de fusión, correspondiente cada uno a un litro de cultivo, a excepción de los tres primeros lotes que fueron de 500 ml; para todos los casos la mayor cantidad de proteína siempre se encontró en el "pellet" solubilizado, aunque también esta presente en el sobrenadante se encuentra en menor cantidad. De cada lote de cultivo se obtuvo un volumen de 15 ml de sobrenadante y 8 ml de "pellet" solubilizado de color pardo, la cantidad de proteína en el sobrenadante de acuerdo al SDS-PAGE vario entre 10 – 30 µg/15 µl, y de 20 - 40 µg /15 µl en el "pellet" solubilizado.

La proteína de fusión se demostró estuvo presente tanto en el sobrenadante como en el "pellet" y la electroforesis mostró una banda de peso molecular de aproximadamente 43 Kd de acuerdo al marcador de peso molecular para proteínas SDS-PAGE "Standars Broad Range" de Bio-Rad, la cual se observa como una banda muy tenue en las muestras de cultivo no inducido.

Blo t 5-GST purificado y dializado presento la banda de 43 Kd característica de la proteína de fusión, en estas muestras se logran eliminar gran cantidad de contaminantes presentes tanto en el sobrenadante como en el "pellet"; quedando solo la presencia de algunas otras bandas que persisten, como por ejemplo una banda de aproximadamente 29 Kd y que corresponde al peso molecular de la GST, lo cual se confirmó al compararla con una muestra de la proteína Blo t 5-GST cortada (III) donde se observa la GST a la misma altura y también Blo t 5 sola en un peso molecular de 14 Kd (Figura 2).

Las condiciones en que se llevó a cabo el SDS-PAGE no se modificaron, pues se obtenían buenos resultados siempre y cuando se mantuvieran las condiciones precisas en la preparación y concentración de los reactivos, pH, voltaje, preparación de los geles y muestra, tiempo de polimerización y corrida.

La proteína Blo t 5-GST obtenida de la clona entregada resulto ser alergenica de acuerdo a la Inmunoelectrotransferencia, ya que la proteína expresada en el sobrenadante inducido fue reconocida por la IgE de los sueros positivos de pacientes alérgicos a Bt M un fragmento truncado de Blo t 5, dando una banda púrpura intensa en el peso de 43 Kd luego de reaccionar el conjugado AntiIgE-Ap (Fosfatasa alcalina) con el sustrato; no hubo reacción cuando las muestras de sobrenadante fueron incubadas con el suero control negativo y PBS. En el cultivo de células no inducidas reaccionó una pequeña banda que aparece a la misma altura de la banda de Blo t 5-GST presente en el sobrenadante, dando una coloración intensa cuando se incubó con el suero control positivo (Figura. 3); estos resultados fueron comparados con un cultivo de células no inducidas que fue incubado con suero control negativo, junto con muestras de Blo t 5-GST de sobrenadante inducido, Blo t 5-GST purificado y Blo t 5 cortado incubados con ambos sueros con el fin de verificar que se trataba de la proteína de fusión Blo t 5-GST y no de otra proteína presente en la bacteria o contaminante (Figura 4) tal como se demostró.

Todos los lotes expresados fueron purificados y dializados, la cantidad final de proteína de cada dializado aparece en la Tabla 1.

De los 12 lotes totales expresados, se obtuvieron 49 dializados con diferentes cantidades de proteína recombinante; la máxima cantidad obtenida fue de 3,06 mg/ml y una mínima de 0,1 mg/ml . El sobrenadante de cada lote fue purificado a través de la columna de Glutathione agarosa hasta 3 veces obteniéndose buenos resultados en la cantidad de proteína por cada fracción eluida, mientras que el "pellet" solubilizado se purificó hasta 5 veces; lo anterior se realizo debido a que

en un sólo paso de purificación no se alcanza a unir toda la proteína de fusión a la matriz. De acuerdo a los resultados obtenidos, la cantidad de proteína de fusión Blo t 5-GST después de ser purificada, fue estimada en 12.5 mg/L.

6. DISCUSIÓN

La expresión de alergenos recombinantes de Bt, nos permite estudiar la respuesta inmune a la fuente del alergeno y los niveles de riesgo de exposición; por lo tanto, el empleo y disponibilidad de Blo t 5 podría ayudar a conocer mejor el papel de Bt como causa de asma en un medio tropical; ya que es una proteína recombinante con una fuerte unión a la IgE de pacientes alérgicos.

El uso de recombinantes del grupo 5 tiene además aplicaciones en el estudio celular del asma, los cuales incluyen estudios de acumulación de alergenos en las vías aéreas después del reto bronquial, análisis de liberación de mediadores y el estudio de epítopes involucrados (15); esto es logrado expresando el alergeno recombinante en grandes cantidades para disponer de el constantemente y en forma pura, eliminando así los inconvenientes que se pueden tener con la presencia de alergenos de otras fuentes en los extractos, que pueden inducir sensibilización simultánea y que pueden ser inmunodominantes. *E. coli* resulta un sistema de expresión eficiente para la proteína Blo t 5-GST recombinante, por su fácil manejo, rápido crecimiento y producción de la proteína en cantidades apreciables.

La producción de proteína de fusión es altamente variable y está afectada por la naturaleza de esa proteína, la célula hospedadora, el vector de expresión y las condiciones del cultivo. Un alto nivel de expresión de proteínas en *E.coli*, generalmente resulta en la compartamentalización de estos productos en cuerpos de inclusión, estas partículas pueden ser aisladas y así provocar una purificación considerable del producto; sin embargo, la proteína obtenida es generalmente inactiva y podría ser extraída con detergentes y otros agentes solubilizantes (16).
La cromatografía de afinidad es un método de separación altamente específico basado en interacciones reversibles entre moléculas, por medio de su paso a través de una matriz; la escogencia de la matriz se hace de acuerdo a su hidrofilidad, poros, rigidez, y naturaleza inerte; la separación se realiza

manteniendo condiciones de pH, fuerza iónica, temperatura y de flujo, con el fin de eliminar al máximo el número de uniones no específicas sin alterar las propiedades de la proteína ni de la matriz. La elusión de la proteína se da como resultado de una acción competitiva del eluente por el ligando, desplazando la proteína de interés (17); este método ha sido ampliamente utilizado en la purificación de alergenos recombinantes que son expresados como proteínas de fusión, mediante el enlace de la GST a su ligando.

La mayoría de los estudios de alergia a ácaros han usado extractos totales de ácaros, sin embargo debido a la necesidad de distinguir entre la respuesta a alergenos y otras proteínas, se emplean alergenos recombinantes que contribuyen al diagnóstico de la respuesta alérgica aun en ausencia de IgE. Así, permitir evaluar aun aquellos alergenos presente en cantidades muy pequeñas dentro del extracto, que podrían estar presentes en el ambiente pero ser pobremente representados debido a su pobre extracción, labilidad e hidrofobicidad; estos podrían mostrar una alta reactividad en pruebas cutáneas o de unión a la IgE *in Vitro* como consecuencia a una alta concentración de alergenos mayores con especificidades dominantes (15); por lo tanto la aplicación de alergenos recombinantes es una gran alternativa en el uso de pruebas diagnósticas e inmunoterapia en pacientes con asma y otras enfermedades alérgicas.

7. CONCLUSIONES

- Blo t 5, alergeno de *Blomia tropicalis*, se logró expresar como proteína de fusión unida a la GST en *E. coli*, tanto el "pellet" solubilizado como en el sobrenadante.

- La purificación de la proteína recombinante por medio de cromatografía de afinidad, permitió eliminar gran cantidad de contaminantes presentes en las muestras, sin embargo para la optimización de los resultados, se recomienda dializar las muestras antes o después del paso por la columna.

- La bacteria *E. coli* resulta un buen sistema de expresión del alergeno recombinante Blo t 5-GST, por su fácil manejo, rápido crecimiento y productividad; además se confirmó que la proteína expresada a través de este sistema, conservó la capacidad de unión a la IgE.

- Se logró proveer de esta proteína a los laboratorios del Instituto de Investigaciones Inmunológicas, que cuentan hoy con 26,04 mg puros de Blo t 5-GST liofilizados. Esta cantidad servirá como herramienta para estudios posteriores sobre diagnóstico, sensibilización y tratamiento del Asma y otras enfermedades alérgicas.

- La expresión, purificación y cuantificación de Blo t 5-GST alergeno recombinante, le permitió al investigador de la presente propuesta, adquirir experiencia en las metodologías relacionadas con el área de biotecnología en la producción de alergenos recombinantes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1) FERNÁNDEZ-CALDAS, E; PUERTA, L; MERCADO, D; LOCKEY, R; CARABALLO, L (1993). Mite Fauna, Der p I, Der f I and *Blomia tropicalis* allergens levels in a tropical environment. Clin Exp Allergy; **23:** 292-297.

2) OCONNOR, B (1982). Astigmata. In: Parker S (ed): Synopsis and Classification of living Organisms. New York, McGraw-Hill; **2:** 146-169.

3) CARABALLO, L; PUERTA, L; MARTÍNEZ, B; MORENO, L (1994): Identification of allergens from the mite *Blomia tropicalis*. Clin Exp Allergy; **24:** 1056-1060.

4) PUERTA, L; FERNÁNDEZ-CALDAS, E; MERCADO, D; LOCKEY, R; CARABALLO, L (1996). Sequential determinations of *Blomia tropicalis* allergens in mattress and floor dust samples in a tropical city. J. Allergy Clin Immunol; **97:** 689-691.

5) FERNÁNDEZ-CALDAS, E; PUERTA, L; CARABALLO, L; MERCADO, D; LOCKEY, R (1996). Sequential determinations of Dermatophagoides spp. Allergens in a tropical city. J Invest Allergol Clin Immunol; **6:** 98-102.

6) CARABALLO, L (1999). Caracterización Inmunoquímica y Molecular de los Alergenos de *Blomia tropicalis*, un Acaro causante de Asma en el Trópico. Rev. Acad. Colomb. Cienc; **23:** 433-443.

7) CARABALLO, L (1995). La tecnología de DNA Recombinante en Alergología Experimental. Ediciones III. Universidad de Cartagena. ISBM 958-95538-2-6.

8) ARRUDA, K; FERNÁNDEZ-CALDAS, E; NASPITZ, C; MONTEALEGRE, F; VAILES, L; CHAPMAN, M (1995). Identification of *Blomia tropicalis* Allergen Blo t 5 by cDNA Cloning. Clin Exp Allergy; **107:** 456-457.

9) ARRUDA, K; VAILES, L; PLATTS–MILL, T; FERNANDEZ-CALDAS, E; MONTEALEGRE, F; LIN, K; CHUA, K; RIZZO, M; NASPITZ, C; CHAPMAN, M (1997). Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with Asthma and identification of Allergen Blo t 5. Am J Resp Crit Care Med; **155:** 343-350.

10) CARABALLO, L; AVJIOGLU, A; MARRUGO, J; PUERTA, L; MARRSH, D (1996). Cloning and Expression of Complementary DNA Coding For An Allergen With Common Antibody-Binding Specifities With Three Allergens Of The House Dust Mite *Blomia tropicalis*. J Allergy Clin Immunol; **98:** 573-579.

11) CARABALLO, L; MERCADO, D; JIMENEZ, S; MORENO, L; PUERTA, L; CHUA, Y (1998). Analysis of the Cross-Reactivity Between Bt M and Der p 5, Two Group 5 Recombinant Allergens From *Blomia tropicalis* and *Dermathophagoides pteronyssinus*. Int Arch Allergy Inmunol; **117:** 38-45.

12) GOEDDEL, D (1991). Gene Expression Techonology. Methods in Enzimology. California. Academic Press, INC; **185:** 129-143.

13) Pharmacia Biotech (1994), Inc. GST–Gene Fusion System. Second Edition; 2-36.

14) LAEMMIL, U (1970): Cleavege of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature ; **227:** 680-681.

15) THOMAS, W. R; SMITH, W; HALES, B. J; MILLS, K. L; OBRIEN, R. M (2002): Characterization and Immunobiology of House Dust Mite Allergens. Int Arch Allergy Immunol; **129:** 1-18.

16) BERGER, S. L; KIMMEL, A. R (1987). Guide To Molecular Cloning Techniques. Methods in ENZYMOLOGY. Academic press INC. Vol. **152:** 661-673.

17) MURRAY, P; DEUTSCHER (1990). Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology. Academic Press. Vol. **182**. San Diego California: 357-379.

Tabla 1: Cuantificación de Blo t 5-GST purificado y dializado

Código de la muestra	Volumen total eluido (ml)	Cantidad de proteína Blo t 5 GSTen gel (ug/15µl)	Cantidad de proteína Blo t 5-GST en volumen total eluido (ug/ml)	Cantidad de proteína Blo t 5-GST en volumen total (mg/ml)
Blo t 5-GST D1	3,0	7,5	1.500	1,5
Blo t 5-GST D2	2,5	2,5	416,6	0,416
Blo t 5-GST D3	3,5	12,5	2916,6	2,916
Blo t 5-GST D4	3,5	2,5	583,3	0,583
Blo t 5-GST D5	4,0	6,0	1.600	1,6
Blo t 5-GST D6	3,5	12,5	2916,6	2,916
Blo t 5-GST D7	6,0	45	18.000	18
Blo t 5-GST D8	6,5	8,0	3466,6	3,46
Blo t 5-GST D9	6,0	5,0	2.000	2,0
Blo t 5-GST D10	1,0	30	2.000	2,0
Blo t 5-GST D11	5,0	12	4.000	4,0
Blo t 5-GST D12	5,0	10	3333,3	3,333
Blo t 5-GST D13	8,0	5,0	2666,6	2,666
Blo t 5-GST D14	7,0	3,0	1.400	1,4
Blo t 5-GST D15	5,0	3,0	1.000	1,0
Blo t 5-GST D16	4,0	5,0	1333,3	1,33
Blo t 5-GST D17	4,0	3,5	933,3	0,93
Blo t 5-GST D18	4,0	10	2666,6	2,66
Blo t 5-GST D19	4,5	4,5	1.350	1,35
Blo t 5-GST D20	4,5	12	3.600	3,6
Blo t 5-GST D21	4,5	9,0	2.700	2,7
Blo t 5-GST D22	4,0	1,5	400	0,4
Blo t 5-GST D23	3,5	45	10.500	10,5
Blo t 5-GST D24	3,0	20	4.000	4,0
Blo t 5-GST D25	2,5	46	7666,6	7,66
Blo t 5-GST D26	2,0	2,5	333,3	0,33
Blo t 5-GST D27	3,5	12	2.800	2,8
Blo t 5-GST D28	3,0	12	2.400	2,4
Blo t 5-GST D29	3,0	15	3.000	3,0
Blo t 5-GST D30	2,5	11	1833,3	1,83
Blo t 5-GST D31	0,5*	30	1,0	0,001
Blo t 5-GST D32	5,0	5,5	1833,3	1,83
Blo t 5-GST D33	5,0	4,0	1333,3	1,33
Blo t 5-GST D34	4,0	4,0	1066,6	1,06
Blo t 5-GST D35	3,0	3,0	600	0,6
Blo t 5-GST D36	6,0	2,5	1.000	1,0
Blo t 5-GST D37	0,5*	20	0,666	0,00066
Blo t 5-GST D38	0,5*	15	0,5	0,0005
Blo t 5-GST D39	0,5*	15	0,5	0,0005
Blo t 5-GST D40	4,0*	5,0	1333,3	1,33
Blo t 5-GST D41	0,5*	15	0,5	0,0005
Blo t 5-GST D42	0,5*	15	0,5	0,0005
Blo t 5-GST D43	0,5*	10	0,333	0,0003
Blo t 5-GST D44	0,5*	10	0,333	0,0003

Código de la muestra	Volumen total eluido (ml)	Cantidad de proteína Blo t 5 GSTen gel (ug/15µl)	Cantidad de proteína Blo t 5-GST en volumen total eluido (ug/ml)	Cantidad de proteína Blo t 5-GST en volumen total (mg/ml)
Blo t 5-GST D45	**0,5***	**10**	**0,333**	**0,0003**
Blo t 5-GST D46	**0,5***	**15**	**0,5**	**0,0005**
Blo t 5-GST D47	**0,5***	**15**	**0,5**	**0,0005**
Blo t 5-GST D49	**2,5**	**15**	**2.500**	**2,5**
Blo t 5-GST D50	**6,0**	**3,0**	**1.200**	**1,2**
Cantidad total de proteína Blo t 5-GST purificada y dializada				104,1865
Cantidad de proteína Blo t 5 purificada y dializada correspondiente al 25% del total de Blo t5-GST				26,0467

*****Estas Muestras fueron liofilizadas y resuspendidas en Agua bidestilada estéril.

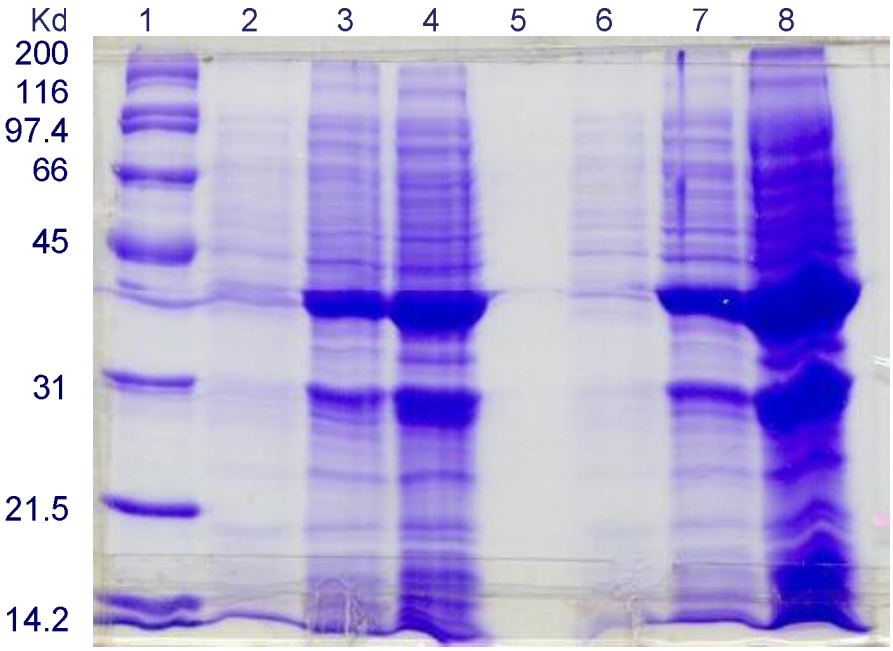

Figura 1. SDS-PAGE de Blo t 5-GST: Carril 1, marcador de pesos moleculares; Carril 2, células no inducidas (lote 1); Carril 3, sobrenadante Lote 1 inducido por 2 horas; Carril 4, pellet Lote 1 inducido por 2 horas; Carril 5, nada; Carril 6, células no inducidas Lote 2; Carril 7, sobrenadante Lote 2 inducido por 3 horas; Carril 8, pellet Lote 2 inducido por 3 horas.

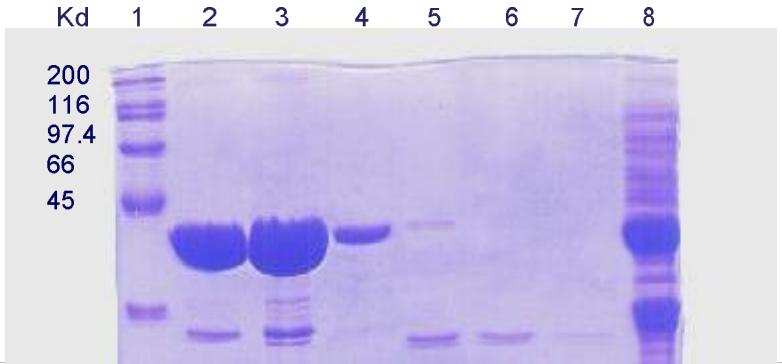

Figura 2. SDS-PAGE de Blo t 5-GST: Carril 1, marcador de pesos moleculares; Carril 2, Blo t 5-GST purificado y dializado Lote 1; Carril 3, Blo t 5- GST purificado y dializado Lote 2; Carril 4, Blo t 5-GST purificado Lote 3; Carril 5, Blo t 5 cortado, purificado y dializado Lote 3; Carril 6, Blo t 5 cortado, purificado y dializado Lote 3; Carril 7, Blo t 5 cortado, purificado y dializado Lote 3 pasado por columna; Carril 8, pellet Blo t 5-GST Lote 3 a través de columna.

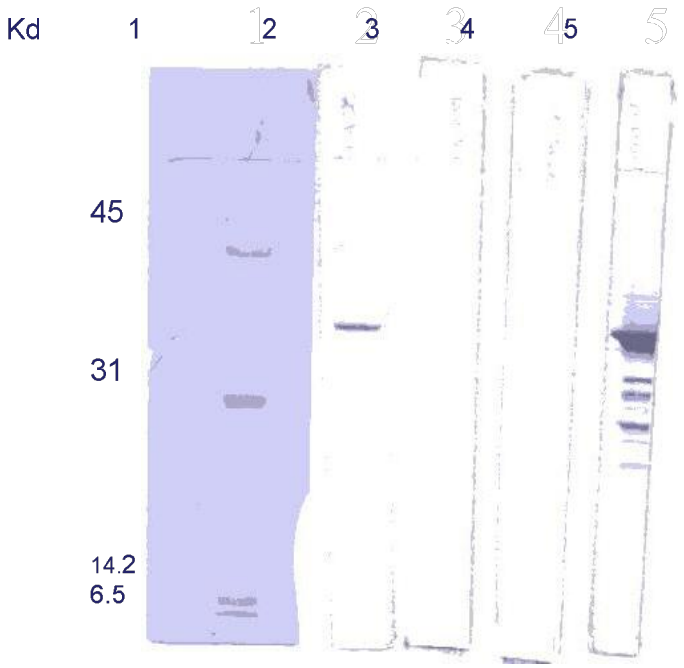

Figura 3. Immunobloting de Blo t 5–GST: Carril 1, marcador de pesos moleculares; Carril 2, Blo t 5 – GST células no inducidas incubadas con mezcla de sueros positivos; Carril 3, Blo t 5–GST sobrenadante incubado con PBS; Carril 4, Blo t 5–GST sobrenadante incubado con suero negativo; Carril 5, Blo t 5–GST sobrenadante incubados con mezcla de sueros positivos.

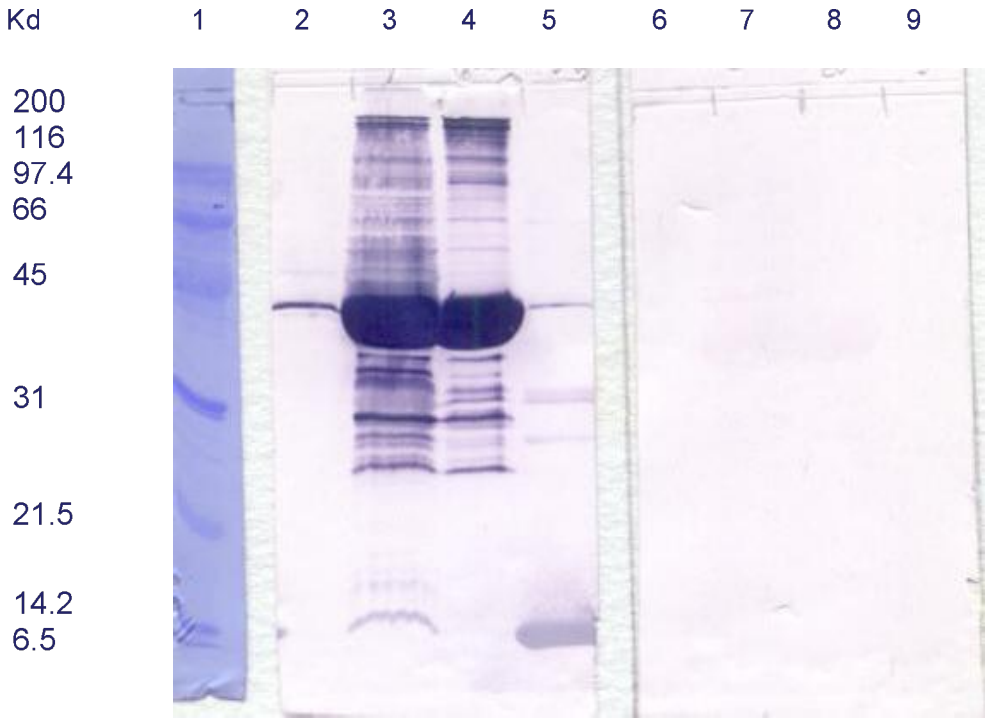

Figura 4. Immunoblotting de Blo t 5: Carril 1, marcador de pesos moleculares; Carril 2, células no inducidas incubadas con mezclas de sueros positivos; Carril 3, Blo t 5–GST sobrenadante incubado con mezclas de sueros positivos; Carril 4, Blo t 5–GST purificado incubado con mezclas de sueros positivos; Carril 5, Blo t 5 cortado incubado con mezclas de suero positivo; Carril 6, 7, 8 y 9; las mismas muestras incubadas suero control negativo.