



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA 1 HUMANA [Cu, Zn].

Sponton, Belén A.

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

Director: Figueroa, Carlos M.

Codirector: Asencion Diez, Matías D.

Área: Ciencias biológicas

Palabras claves: cosmética, enzimas recombinantes, SOD

INTRODUCCION

La superóxido dismutasa (SOD) pertenece a una familia de metaloenzimas que cumplen un rol protagónico en la eliminación del radical superóxido (O_2^-) (**Mathews C. y Col.**, 2002). La SOD se encuentra frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes y algunos anaerobios obligados (**García B. y Col.**, 1995). Existen múltiples familias de SODs, las que se clasifican según el metal que utilizan como cofactor (**Mathews C. y Col.**, 2002). En este trabajo nos enfocamos en la SOD humana (hSOD), que utiliza como cofactores los metales Zn^{2+} y Cu^{2+} .

Además del papel que cumple como mecanismo de defensa celular endógeno, la hSOD puede ser utilizada en el tratamiento de diversas enfermedades y para mejorar la calidad de los alimentos. Por ello, la hSOD cobra gran importancia en la industria médica, cosmética, alimentaria, agrícola y química (**Rauf M. y Col.**, 2021). Teniendo en cuenta estos antecedentes, planteamos la posibilidad de obtener de forma recombinante la hSOD para su posterior uso como suplemento en la producción de formulados de uso dérmico.

OBJETIVOS

- Expresar la hSOD de forma recombinante, soluble y activa.
- Purificar la proteína recombinante mediante cromatografía de pseudoafinidad por metal inmovilizado (IMAC).
- Medir la actividad de la hSOD recombinante.

Título del proyecto: Diseño y desarrollo de procedimientos para la producción de biomoléculas con aplicación en cosmética

Instrumento: Servicio a terceros

Año Convocatoria: 2023-2025

Organismo financiador: Skin Actives (USA)

Director: Iglesias, Alberto A.



METODOLOGIA

El gen que codifica para la hSOD fue sintetizado *de novo* con codones optimizados para su expresión en *Escherichia coli* por la empresa BioBasic (Canadá) a partir de la secuencia proteica de la hSOD (UniProt ID P00441) y clonado en el vector pET24b entre los sitios de restricción *NdeI* y *SacI*. Para realizar la purificación de la proteína recombinante mediante IMAC, fue necesario adicionar una etiqueta de His₆ a la secuencia que codifica para la hSOD. Para ello se subclonó el gen de interés en el vector pET28c, entre los sitios *NdeI* y *SacI*, el cual adiciona una etiqueta de His₆ en el extremo N-terminal de la proteína recombinante.

La construcción [pET24b/hSOD] se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *SacI*, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) y el inserto se purificó a partir del gel utilizando el equipo comercial *Quick Gel Extraction Kit* (Trans Gen Biotech, China). El fragmento de ADN resultante se ligó con el vector pET28c, previamente digerido con las mismas enzimas, utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Productos Bio-Lógicos, Argentina).

El vector resultante se utilizó para transformar células de *E. coli* TOP10. Para seleccionar los clones que contenían la construcción [pET28c/hSOD] se realizó una PCR de colonias. Los clones positivos fueron utilizados para obtener el plásmido correspondiente, utilizando el equipo comercial *EasyPure Plasmid MiniPrep Kit* (Trans Gen Biotech). Con este vector, se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3).

Para expresar la proteína recombinante se crecieron las células transformadas en medio LB suplementado con kanamicina 50 µg/ml. Los cultivos fueron inducidos con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM al alcanzar una densidad óptica de 0,6. Los cultivos se mantuvieron a 25°C toda la noche con agitación a 200 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 x *g* y 4°C por 10 min.

El paquete celular se resuspendió con *Buffer H* [Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM y glicerol 5% (v/v)], las células se rompieron con ultrasonido y la suspensión resultante se centrifugó a 20.000 x *g* y 4°C por 10 min. La fracción soluble se sembró en una columna His-Trap (GE Healthcare) de 5 ml conectada a un ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare) y previamente equilibrada con *Buffer H*. La elusión de la proteína recombinante se realizó mediante un gradiente de imidazol (10-300 mM) en *Buffer H*. Las fracciones recolectadas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las fracciones que contenían la proteína de interés fueron reunidas y la muestra resultante se utilizó para evaluar la actividad de la hSOD.

La medida de actividad de la hSOD se llevó a cabo mediante un método indirecto, el cual consiste en inhibir la reducción de *nitro blue tetrazolium* (NBT) mediante el anión superóxido generado por la glucosa oxidasa a partir de glucosa.

RESULTADOS

Para obtener la proteína recombinante fusionada a una etiqueta de His₆ por el extremo N-terminal fue necesario subclonar el gen de interés en el vector pET28c. El producto de ligación se utilizó para transformar *E. coli* TOP10 y los clones obtenidos se analizaron mediante PCR de colonia. De las 20 colonias analizadas, 7 dieron un producto de amplificación del tamaño esperado (Figura 1).



Figura 1. Análisis de clones conteniendo la construcción [pET28c/hSOD] por PCR de colonia.

Calle M, marcador de ADN; calles 1 a 20, clones 1 a 20 de *E. coli* TOP10 transformadas con el producto de ligación [pET28c/hSOD]. Los clones 11 y 15-20 mostraron una banda del tamaño esperado (750 pb).

Para verificar que los clones seleccionados contenían el inserto de interés, se realizó una minipreparación de ADN plasmídico y luego una digestión con las enzimas de restricción *Sa*II y *Bg*III. Los clones que liberaron una banda del tamaño esperado se utilizaron para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para proceder a la expresión de la proteína recombinante. Primero se efectuó un ensayo de expresión a baja escala de las colonias transformadas. Las células inducidas se rompieron por sonicación y se analizaron las fracciones solubles e insolubles mediante SDS-PAGE. Como se muestra en la Figura 2, las células transformadas muestran una banda de aproximadamente 18 kDa, que no se observa en el control negativo (células sin transformar).

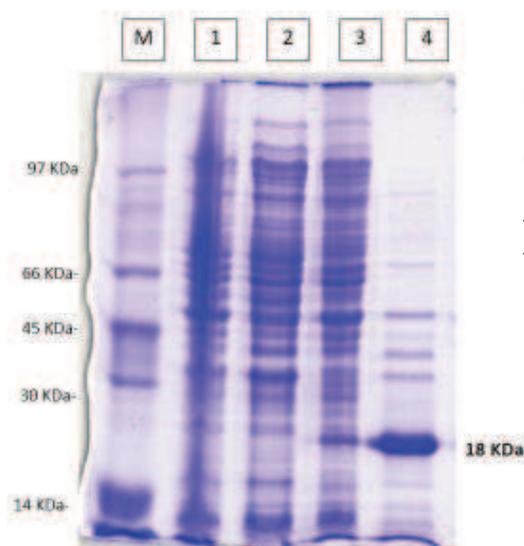


Figura 2. Análisis de la expresión de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE.

Calle M, marcador de masa molecular; calle 1, fracción soluble *E. coli* BL21 (DE3); calle 2, fracción insoluble *E. coli* BL21 (DE3); calle 3, fracción soluble *E. coli* BL21 (DE3) [pET28c/hSOD]; calle 4, fracción insoluble *E. coli* BL21 (DE3) [pET28c/hSOD].

A continuación, se escaló el cultivo para aumentar la producción de proteína recombinante. Se realizó un cultivo de 4 litros con medio LB suplementado con CuCl_2 y ZnCl_2 0,1 mM. El cultivo se indujo con IPTG 1mM a 25°C durante toda la noche y luego se cosecharon las células por centrifugación. Las células obtenidas se utilizaron para purificar la hSOD mediante IMAC y las muestras obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE (Figura 3), donde se detectó la presencia de la proteína de interés en 2 de las muestras, las que contenían una banda de 18 kDa aprox. Estas muestras se reunieron y se cuantificó la concentración de proteínas mediante la técnica de Bradford, la que arrojó un resultado de 0,24 mg/ml. La medida de actividad de la hSOD arrojó un resultado de 33.000 U/mg.

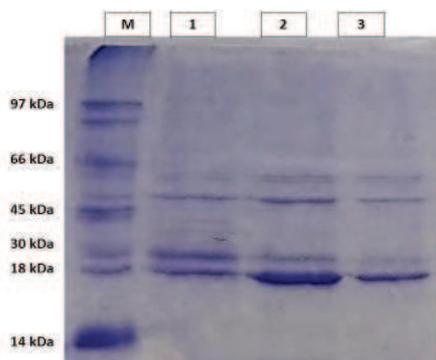


Figura 3. Análisis de la purificación de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE.

Calle M, marcador de masa molecular; calles 1 a 3, diferentes fracciones recolectadas de la purificación de la hSOD recombinante, donde las calles 2 y 3 mostraron una marcada banda a 18 kDa.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que fue posible obtener la hSOD de forma soluble y activa, con un alto grado de pureza. La proteína así obtenida podría utilizarse como compuesto activo en artículos de cosmética. Sin embargo, la producción a gran escala de la proteína podría encontrarse limitada debido al bajo rendimiento obtenido. Esto podría deberse a la adición de la etiqueta de His₆ en el extremo N-terminal de la proteína recombinante. Cuando la proteína fue expresada de forma recombinante utilizando el vector pET22b y sin el agregado de etiqueta alguna (Zangh K. y Col., 2017), el rendimiento de la hSOD fue mayor al alcanzado en este trabajo. Por lo tanto, en el futuro se explorará la factibilidad de utilizar otros vectores para la expresión de la proteína de interés.

Es importante resaltar que, en base a resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, se observó que la hSOD posee una actividad mayor que la SOD de *E. coli* [Mn], para la cual hemos obtenido tradicionalmente un valor de 3000 U/mg.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y con el objetivo de lograr un mayor rendimiento en la producción de la hSOD, trabajaremos en la optimización de los protocolos presentados en este trabajo, ya que esta enzima resulta un excelente principio activo para diferentes áreas, como en cosmética y en medicina, para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades humanas (Rauf M. y Col., 2021).

BIBLIOGRAFIA

- García B. y Col.**, 1995. Dra. Bárbara García Triana, Lic. Onel García Morales, Ing. Sonia Clapes Hernández, Dr. Lorenzo Rodes Fernández y Dr. José Carlos García Piñeiro. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. Rev. Cubana Invest Bioméd, Ciudad de la Habana, Cuba. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03001995000100001
- Mathews C. y Col.**, 2002. Christopher k. Mathews, Kensal E. Van Holde, Kevin G. Ahern. Bioquímica. 3^{era} ed. Madrid: Pearson Educación; 2002. p. 1368.
- Rauf M. y Col.**, 2021. Mohammad Nazmul Islam Abdur Rauf, Fowzul Islam Fahad, Talha Bin Emran, saikat mitra, Ahmed Olatunde, Mohammad Alí Shariati, maksim rebezov, Kannan RR Rengasamy, Mohammad S. Mubarak. Superoxide dismutase: an updated review on its health benefits and industrial applications. Crit Rev Food Sci Nutr. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33905274/>
- Uniprot**, 2023. Uniprot. P00441SODC_HUMANO [Internet]. [consultado el 27 de Julio de 2023]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P00441/entry>.
- Zangh K. y Col.**, 2017. Kun Zhang, Yuejuan Zhang, Jing Zi, Xiaochang Xue y Yi Wan. Production of Human Cu,Zn SOD with Higher Activity and Lower Toxicity in *E. coli* via Mutation of Free Cysteine Residues. Biomed Research international, China. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/4817376/>