

DISEÑO DE UNA ESTRATEGIA PARA LA PRODUCCIÓN DE UN PÉPTIDO INHIBIDOR DE PROTEASAS EN CULTIVOS BACTERIANOS

Violeta Guadarrama, César Aguilar, Hilda Ramos, Francisco Barona, Laura A. Palomares.
Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, Morelos, CP. 62210, México. violetag@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: sintasa de péptidos no-ribosomales, proteasas, livipeptina.

Introducción. La sobre expresión de proteínas recombinantes puede resultar en la activación de proteasas debido a la presencia de proteínas mal plegadas y/o a la limitación de aminoácidos disponibles, lo cual pone en riesgo su integridad (1). Una de las estrategias para evitar la proteólisis es la adición de inhibidores de proteasas durante el cultivo y el proceso de purificación, lo cual es caro y poco efectivo debido a su baja estabilidad (2).

El objetivo de este estudio es proponer una estrategia para la producción intracelular de un péptido inhibidor de proteasas en un sistema de expresión bacteriano.

Metodología. Los genes de la ruta biosintética (RBL) para la producción de un péptido aldehídico tipo leupeptina, llamado livipeptina, fueron clonados en plásmidos de transferencia y de expresión adecuada para *E. coli*, bajo un promotor inducible por tetraciclina (3). La RBL se expresó de forma transitoria usando la cepa de *E. coli* C41 (DE3)/pGroEL-GroES (3). Se evaluó el efecto de la expresión de la RBL en el crecimiento celular y la producción del péptido inhibidor de proteasas.

Resultados. El sistema para la producción de la livipeptina (RBL) está conformado por tres genes que codifican para una sintasa de péptidos no ribosomales, una transferasa de leucil/fenil t-RNAs, y una acetilasa que en conjunto producen la livipeptina (fig. 1).

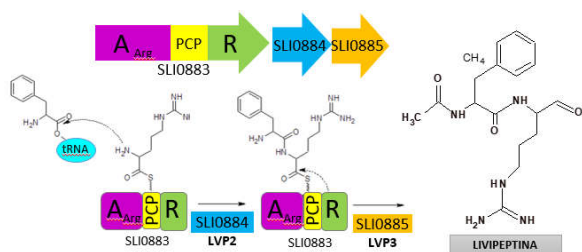


Fig. 1. Ruta biosintética que produce el péptido pequeño aldehídico livipeptina (3,4).

La expresión heteróloga de la RBL en *E. coli* (fig. 2A) no tiene efecto en su crecimiento (fig. 2B). Los sobrenadantes de estos cultivos fueron procesados para recuperar a la livipeptina y analizados por HPLC fase reversa (fig. 2C y 3A). La expresión de la RBL en la cepa de *E. coli* empleada, produce un compuesto (fracción 10.3) que es capaz de inhibir la actividad de la tripsina (fig. 3B) y que se ha identificado que tiene una masa de 365.08 Da (3).

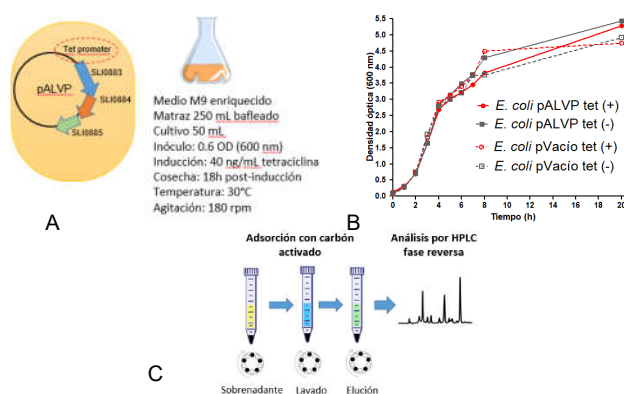


Fig. 2. A. Estrategia de cultivo para la producción de la livipeptina en cultivos de *E. coli*. B. Cinética de crecimiento de las bacterias que contienen el plásmido con la RBL (pALVP) o el plásmido vacío (pVacio), inducidas (tet (+)) y sin inducir (tet (-)). C. Tratamiento del sobrenadante del cultivo para la identificación de la livipeptina.

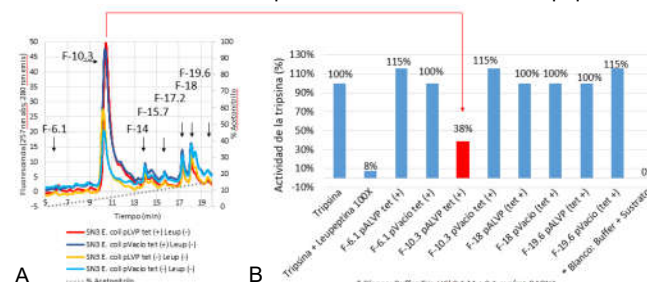


Fig. 3. A. Cromatogramas de sobrenadantes de cultivos procesados como se indica en fig. 1. Las fracciones señaladas en A se colectaron. B. Inhibición de la actividad de la tripsina al agregar cada una de las fracciones. En rojo se señala la fracción 10.3 con actividad anti tripsina.

Conclusiones. La expresión del conjunto de genes de la RBL en una cepa de *E. coli* produce una molécula capaz de inhibir a la serin proteasa, tripsina.

Agradecimientos. A Laboratorios Liomont por las facilidades prestadas para la realización de este proyecto. Al Ing. Alberto Porras, Dr. Norberto Cruz, M. en C. Martha A. Contreras y el Dr. Karim E. Jaen por la asesoría técnica. A CONACYT por la beca asignada 244042.

Bibliografía.

1. Rozkov A, Enfors SO (2004) *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 89:163-95.
2. Ryan BJ, Henenhan GT. (2013). *Curr Protoc Protein Sci.* 5:5–25.
3. Cruz-Morales P, Barona-Gómez F y Ramos-Aboitez H (2016) Genetic system for producing a proteases inhibitor of a small peptide aldehyde type. *US Patent App* 15/537,125.
4. Cruz-Morales P *et al.* (2013) *Genome Biol Evol.* 5(6):1165-75.