

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PE-PGRS26 DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN CULTIVOS SUMERGIDOS DE *ESCHERICHIA COLI*

¹Navarro García Pedro E., ²Flores Villalva Susana, ¹Gamboa Suasnavart Ramsés A., ¹Espitia Clara, ¹Trujillo-Roldán Mauricio A.

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, ²Laboratorio de Investigación en Tuberculosis y Brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510. E-mail: pedroemmanuel@gmail.com, maurotru@gmail.com

Palabras clave: PE-PGRS26, tuberculosis, *Escherichia coli*.

Introducción. La familia proteica PE/PE-PGRS constituye cerca del 5% del genoma de *M. tuberculosis* y se haya altamente conservada en micobacterias patógenas (1). Estas proteínas juegan papeles en la patogénesis de la bacteria, aún no muy bien determinados (3). Estas proteínas tienen una región amino-terminal de 110 aminoácidos conservada (PE) y un carboxilo-terminal rico en Glicina y Cisteína de 175 a 550 aminoácidos (2). En este trabajo se caracterizó la producción de la proteína recombinante PE-PGRS26 de *M. tuberculosis* en *E. coli* en cultivos en matraces y en biorreactor en lote y alimentados, con la finalidad de determinar si esta puede ser usada para desarrollar nuevas vacunas o sistemas diagnósticos contra la tuberculosis.

Metodología. Se generó un banco maestro y uno de trabajo de *E. coli* Rosetta (DE3) pET22-PE-PGRS26. Se evaluó la edad y concentración de inducción con IPTG. Se uso medio LB en todos los cultivos. Estos se llevaron a cabo en un reactor de 1.0 L (Applikon, USA), a 37 °C, pH 7.2 ± 0.2 y oxígeno disuelto mayor a 30%. La proteína rPE-PGRS26 fue obtenida a partir de cuerpos de inclusión (CI), los que fueron recuperados por ruptura con lisozima y sonicación y lavados con buffer de fosfatos. La concentración de biomasa se midió por espectrofotometría, la concentración e identidad de la proteína por densitometría en geles de acrilamida, Bradford y Western-blot (WB). La purificación se efectuó mediante cromatografía de afinidad en una columna His-trap™ HP (GE healthcare) y se siguió por Dot-blot.

Resultados y discusión. El proceso de producción de rPE-PGRS26 de cultivos en matraces y en biorreactor en lote no presentó diferencias en el rendimiento proteína/biomasa (fig. 1). Sin embargo, en aquellos cultivos alimentados con glucosa (10%), la concentración de rPE-PGRS26 fue casi del doble que en cultivos en lote. Se obtuvo una densidad celular de 2.9 u.a. a 600 nm en matraces, 3.9 u.a. en cultivos en lote y 9.6 u.a. en cultivos alimentados con glucosa al 10%. La proporción de rPE-PGRS26 en los C.I. obtenidos alcanzó al menos 60% en todas las estrategias de cultivo (fig. 1). La identidad de la proteína se verificó por WB con un anticuerpo anti-histidina (fig 2). El proceso de purificación de la proteína recombinante alcanzó puridades superiores a 80% (fig. 1). Las fracciones ricas en proteína (fig. 3) fueron dializadas para poder ser utilizadas en estudios

comparativos de respuesta inmune de la familia de PE/PE-PGRS con otras proteínas antigénicas de *M. tuberculosis*.

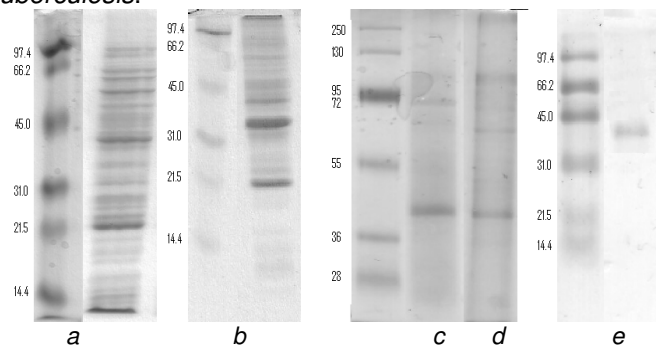


Fig. 1. Producción de rPE-PGRS26 en cultivos en (a) matraz, (b) Lote y (c) Lote alimentado. Además, de la recuperación de rPE-PGRS26 en (d) cuerpos de inclusión y (e) purificada.



Fig 2. Western blot de un cultivo en lote a diferentes tiempos de post-inducción (0, 1, 2, 3, 4 y 5.5 de inducción).

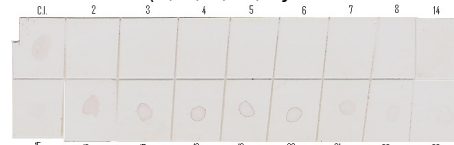


Fig. 3. Dot-blot de fracciones purificadas por cromatografía de afinidad.

Conclusiones. Se logró establecer el proceso de producción de rPE-PGRS26 de cultivos en matraces y en biorreactor sin decremento en la productividad de rPE-PGRS26, manteniendo constantes las condiciones de cultivo. Adicionalmente, se logró obtener proteína de alta pureza y que se está evaluando en un sistema experimental de diagnóstico.

Agradecimiento. Proyectos PAPIIT No. IN228509 y CONACyT No. 103393 y 82533.

Bibliografía

- Flores J Espitia C (2003) Differential expression of PE and PE_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains *Gene.*, 318, 75-81.
- Brennan MJ, Delogu G (2002) The PE multigene family: a molecular mantra for mycobacteria. *Trends Microbiol.* 10, 246-249
- Singh PP, Parra M, Cadieux N, Brennan MJ. (2002) A comparative study of host response to three Mycobacterium tuberculosis PE-PGRS proteins. *Microbiol.* 154, 3969-79