



EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE BETA-DEFENSINAS HUMANAS EN DIFERENTES CONDICIONES DE OXÍGENO

Ana Juárez, Ligia Corrares-García, Herlinda Clement, Iván Arenas, Leobardo Serrano, Gerardo Corzo. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM) Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Cuernavaca, Morelos, México. C.P 62210, corzo@ibt.unam.mx

Palabras clave: Oxígeno, Beta-Defensinas, Biorreactor.

Introducción. La resistencia que han desarrollado las bacterias debido al mal uso de los antibióticos convencionales, ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para combatir las infecciones. Una clase relativamente nueva de antibióticos son los péptidos antimicrobianos denominados β -defensinas. Las de tipo humano son parte de nuestro sistema inmune adquirido las cuales actúan en nuestro cuerpo como una defensa natural [1]. Existen trabajos que han mostrado que las β -defensinas tienen actividad antimicrobiana, y además incrementan la respuesta de nuestro sistema inmune. Un método de producción de las β -defensinas a nivel laboratorio ha sido mediante su expresión en sistemas heterólogos [2]. Debido a la importancia que tiene como antimicrobianos, es necesario optimizar el proceso de producción, que permita obtener un mejor rendimiento, para que estas moléculas puedan ser empleadas como antibióticos alternativos o bien poder realizar un estudio más detallado de sus mecanismos de acción [3]. Para ello es importante conocer las variables fisicoquímicas que podrían influir en su expresión. Existen pocos trabajos de la producción de estos péptidos y no se han realizado estudios para determinar la importancia del oxígeno en la producción de los mismo, en este sentido nosotros estamos interesados en probar diferentes condiciones de oxígeno.

Objetivo: Expresar una beta defensina en un reactor controlado en condiciones de baja y alta aireación.

Metodología. Se transformaron bacterias quimio competentes de la cepa *E. coli* M15 con el vector de expresión pQE30-HBD3-M. Se realizaron cultivos a 1 vvm y 0.25 vvm con un porcentaje de oxígeno disuelto a 0% y 15% controlado por agitación a un pH y temperatura constante. Los cultivos fueron inducidos a una OD_{600nm} de 1.3 con 1 mM de IPTG. Se determinó la biomasa por peso húmedo. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad a Ni-NTA y por columnas de fase reversa utilizando un sistema HPLC. La beta defensina obtenida se identificó en geles SDS-PAGE, por inmunoblot y posterior a su purificación de cuantificó por medio de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm.

Resultados. Los resultados de expresión obtenidos a 1 vvm fueron similares en las condiciones de oxígeno disuelto de 0% y 15%, viéndose solo afectado el crecimiento celular al inicio de la fermentación a 0% de

oxígeno disuelto, obteniendo una OD_{600nm} de 3.5 U de absorbancia y una concentración de proteína 4.1 mg/L. En el caso de la fermentación al 15% de oxígeno disuelto se obtuvo una OD_{600nm} de 4U de absorbancia y una concentración de proteína de 4.5 mg/mL. En el caso donde se usó un flujo de oxígeno a 0.25 vvm, se observó una disminución significativa en el crecimiento llegando a una OD_{600nm} de 3U de absorbancia a 0% de oxígeno disuelto. En el segundo caso que se mantuvo con una saturación de oxígeno disuelto al 15%, en esta condición el crecimiento no se vio afectado, sin embargo, la producción de proteína se vio disminuida obteniendo 3.1 y 3.4 mg /L respectivamente. Esto puede deberse a la menos disponibilidad de oxígeno.

Tabla 1. Cuantificación de biomasa y proteína finales en las diferentes condiciones de oxígeno que se probaron a 0.25 vvm y 1 vvm.

Flujo de oxígeno (vvm)	Oxígeno Disuelto (%)	Peso húmedo (g/L)	HBD3-M (mg/L)
1	0	3.7	4.1
	15	4.7	4.5
0.25	0	3.1	3.1
	15	4.5	3.6

Conclusiones. La producción de péptidos antimicrobianos tipo beta-defensina por medio de la expresión heteróloga en *E. coli* M15 es una alternativa para incrementar su producción y así realizar estudios clínicos más detallados. En este trabajo el incremento en vvm aumento el rendimiento de las beta-defensinas.

Agradecimiento. Al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT-SEP No. 240616 y DGAPA IN204415.

Bibliografía.

- Xu Z., Peng L., Zhong Z., Fang X., Cen P. (2006). *Biotechnol. Prog.* vol. (22): 382-386.
- Corrales L., Ortiz E., Castañeda J., Rivas S., Corzo G. (2013). *Protein Expression and Purification.* vol. (89): 33-43.
- Chen H., Xu Z., Peng L., Fang X., Yin X., Xu N., Cen P. (2006). *Peptides.* vol. (27):931-940