



## LA VARIACIÓN DEL pH INFLUYE EN LA FORMACIÓN Y COMPOSICIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN: *E. coli* PRODUCTORA DE ESFINGOMIELINASA-D

Andrea Castellanos-Mendoza<sup>1</sup>, Ricardo M Castro-Acosta<sup>2</sup>, Alejandro Olvera<sup>2</sup>,

Enrique García-Hernández<sup>3</sup>, Alejandro Alagón<sup>2</sup>, Mauricio A Trujillo-Roldán<sup>1</sup>, \*Norma A. Valdez-Cruz<sup>1</sup>

1 Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, 2 Instituto de Biotecnología, 3 Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México.

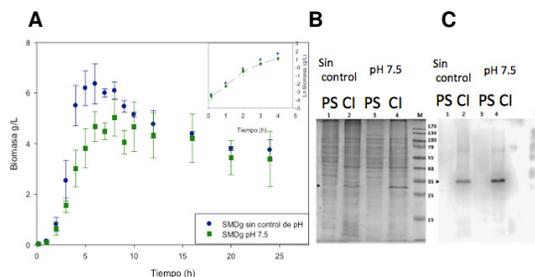
Email: adri@biomedicas.unam.mx

Palabras clave: proteína recombinante, agregación, cuerpos de inclusión, condiciones de cultivo

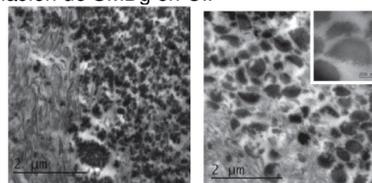
**Introducción.** Diferentes proteínas recombinantes (PR) han sido producidas en *E. coli*, pues llega a acumular hasta 30 g/L<sup>(1)</sup>. Sin embargo, la sobre-expresión de PR puede rebasar la capacidad biosintética bacteriana, causando deficiencias en el plegamiento de las PR, propiciando su agregación y dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión (CI)<sup>(2)</sup>. Anteriormente los CI se consideraban agregados amorfos sin uso. Sin embargo, se ha demostrado que algunos CI contienen proteínas ordenadas, estructuradas y activas. Por lo que los CI se han usado como catalizadores, materia prima para la purificación de PR, agentes de liberación e inmunogénos. No obstante, las características de los CI dependen del bioproceso y fondo genético de las cepas en los que se producen<sup>(3)</sup>. De ahí que evaluáramos el efecto de la variación de pH sobre algunas características fisicoquímicas de CI formados por esfingomielinasa D de garrapata (SMDg) producida en *E. coli*.

**Metodología.** Se evaluaron dos estrategias de cultivo: pH 7.5 y pH sin control, usando una clona de *E. coli* BL21-Gold (DE3) que produce SMDg. Los cultivos se realizaron en biorreactores de 1.0 L con 600 mL de medio Súper Broth (SB), turbinas tipo Rushton, a 37°C, con oxígeno disuelto >30%, controlado por cascada de agitación, y 1.0 vvm. El control de pH (7.5) se mantuvo por adición automática de NaOH y HCl 1 M. El contenido de PR en los CI fue comparado mediante SDS-PAGE. La SMDg recombinante fue identificada por Western-Blot. Los CI fueron purificados e identificados por microscopía de transmisión electrónica (TEM). Además se comparó su unión por colorantes de unión a estructuras amiloides, su degradación con proteinasa K y agentes caotrópicos. El tamaño de los CI fue determinado por TEM y por dispersión dinámica de luz.

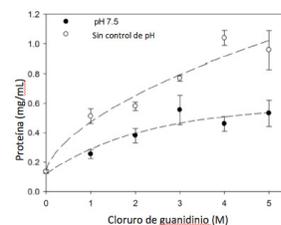
**Resultados.** En los cultivos sin control de pH se observó una mayor acumulación de biomasa (25%) comparada con los cultivos controlados (Fig.1A). En los cultivos sin control se observó una basificación después de la inducción, lo que favoreció la formación de CI (Fig.1B,2B). El control de pH favoreció la formación de SMDg soluble y CI enriquecidos en SMDg (Fig.1C). Los CI producidos sin control de pH fueron >500 nm y presentaron menor resistencia a la proteólisis y a agentes desnaturantes, sugiriendo una estructura relajada y menor compactación. Mientras que los CI formados en condiciones controladas de pH fueron compactos, con baja afinidad por colorantes de estructuras amiloides y difíciles de solubilizar.



**Fig.1.** Cinéticas de crecimiento de *E. coli* BL21-Gold (DE3) productora de SMDg en biorreactor con medio SB en condiciones controladas (pH 7.5) y sin control de pH (A). SDS-PAGE (B) y Western blot para identificar la SMDg (C). PS: proteína soluble, CI: cuerpo de inclusión. Se observa mayor acumulación de SMDg en CI.



**Fig. 2.** Comparación de CI purificados por TEM, colectados después de 20 h de inducción en pH 7.5 (izquierda) y sin control de pH (derecha).



**Fig. 3.** Perfiles de solubilización de CI obtenidos a pH 7.5 (círculos llenos) y sin control de pH (círculos vacíos), usando cloruro de guanidinio.

**Conclusiones:** El pH tiene impacto sobre la formación de CI, así como en sus características fisicoquímicas. Bajo condiciones sin control de pH fue favorecida la formación de CI con una estructuración relajada, obteniéndose CI conformados por la SMDg recombinante que se solubilizan más fácilmente con enzimas o agentes caotrópicos, en comparación con aquellos obtenidos en condiciones controladas.

**Agradecimientos.** CONACYT 178528, 214404 y 220795; PAPIIT-UNAM IN-210013 y IN-209113.

### Bibliografía.

- (1) Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). *Microbial Cell Factories*, 4(1), 1.
- (2) Valdez-Cruz N.A., Caspeta L., Pérez N.O., Ramírez O.T., Trujillo-Roldán M.A. (2010). *Microb Cell Fact*, 9:18.
- (3) Carrió, M. M. M., González-Montalbán, N. N., Vera, A., Villaverde, A., & Ventura, S. (2005). *Journal of Molecular Biology*, 347(5), 1025–1037.