

# EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE MANOSAMINA, CITIDINA Y N-ACETIL-MANOSAMINA EN LA GLICOSILACIÓN DE FOSFATASA ALCALINA HUMANA RECOMBINANTE PRODUCIDA EN CÉLULAS DE INSECTO.

L. Adrián Delgado Bustos, O. Tonatiuh Ramírez Reivich, Sandino Estrada Mondaca  
Instituto de Biotecnología U.N.A.M. Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa, C.P.62210, Cuernavaca, Morelos,  
E-mail:sandino@ibt.unam.mx

*Células de Insecto, Nucleótido-azúcares, Glicosilación*

**Introducción.** El procesamiento postraduccional de proteínas recombinantes de interés terapéutico producidas en cultivos celulares ha cobrado gran importancia debido a que es esencial para preservar su actividad. Una de las modificaciones postraduccionales que afectan las propiedades farmacocinéticas de estas proteínas es la glicosilación. Entre los factores que influyen en la glicosilación de glicoproteínas recombinantes, las condiciones de cultivo y la disponibilidad de nucleótido-azúcares han sido ampliamente estudiados en cultivos de células de mamíferos (1) pero no en células de insecto. En éste trabajo se analiza el efecto de la adición de manosamina (5, 10 y 20 mM), N-Acetil-Manosamina (5, 10 y 20 mM) y citidina (0.5, 1 y 1.5mM) tanto en el crecimiento de las células y la producción de proteína recombinante, como en la N-glicosilación compleja.

**Metodología.** La línea celular utilizada fue BTI-Tn5B1-4 (High Five®) derivada de *Trichoplusia ni* cultivada en suspensión en medio SF900II libre de suero. Los cultivos fueron infectados con un baculovirus recombinante que tiene el gen de la Fosfatasa alcalina humana secretada (SeAP). Los carbohidratos N-asociados a la proteína fueron liberados por digestión con PNGasaF, se utilizaron exo glicosidasas para definir el tipo de estructura de los mismos que fueron analizados en un aparato de electroforesis capilar.

**Resultados y discusión.** El crecimiento de los cultivos no se vió afectado por las concentraciones empleadas para cada tratamiento pero sí se encontraron diferencias entre un tratamiento y otro. Las mayores concentraciones celulares ( $5.3 \times 10^6$  células/mL) se lograron con el tratamiento con N-acetil-manosamina y las menores ( $3.3 \times 10^6$  células/mL) se obtuvieron en el tratamiento con citidina. No se encontraron diferencias en el consumo de nutrientes ni en la generación de metabolitos de desecho. La proteína recombinante obtenida fue de 140 µg/mL en promedio. El tratamiento con manosamina produjo un aumento en las glicofomas complejas así como una disminución en las glicofomas paucimanosa. La proteína obtenida en cultivos tratados con citidina no presentó carbohidratos complejos, y en el caso de N-acetil-manosamina sólo se identificaron estructuras complejas e híbridas a la concentración de 20 mM. En la tabla 1 se resumen los resultados de la abundancia de las glicofomas encontradas para cada tratamiento.

Tabla 1. Abundancias relativas de los N-carbohidratos asociados a SeAP.

	mM	% Paucimanosa	% Alta manosa	% Híbrida	% Compleja
Manosamina	0	57.4	42.54	0	0
	5	59	34.23	0	6.68
	10	53.6	36.5	0	9.92
	20	37.6	46.28	0	16.06
N-acetil-manosamina	0	56.4	43.59	0	0
	5	39.2	60.87	0	0
	10	54.16	47.87	0	0
	20	58.25	34	4.8	2.89
Citidina	0	53.4	46.57	0	0
	0.5	62.6	37.3	0	0
	1	60.5	39.53	0	0
	1.5	75.4	24.54	0	0

**Conclusiones.** La alta cantidad de glicofomas alta manosa y paucimanosa indican un procesamiento incompleto en Golgi y una alta actividad hexosaminidasa respectivamente. El aumento en las formas complejas logrado con el tratamiento con manosamina puede atribuirse a una inhibición de la hexosaminidasa (2) lo cual explica la disminución de formas paucimanosa. La aparición de formas complejas e híbridas a 20 mM de N-acetil-manosamina puede deberse a un aumento en la concentración de UDP-N-acetilhexosaminas, lo cual aumenta la disponibilidad de los sustratos para las transferasas encargadas de agregar N-acetilglucosaminas y galactosas a las cadenas de oligosacáridos que no han sido truncados previamente por la hexosaminidasa.

## Agradecimientos.

Se agradece el apoyo brindado por CONACyT proyecto 33348B, y a DGAPA proyecto IN216100.

## Bibliografía.

- 1.- Rijcken P.R., Overdijk B., Van Den Eijnden D., Ferwerda W., (1995) The effect of increasing nucleotide-sugar concentration on the incorporation of sugars into glucoconjugates in rat hepatocytes, *Journal of Biochemistry*, 305:865-870.
- 2.- Donaldson M., Wood H. A., Kulakosky P.C., Wood H.A., Shuler M.L., (1999), Use of mannosamine for inducing the addition of outer arm N-acetylglucosamine onto N-linked oligosaccharides of recombinant proteins in insect cells. *Biotechnology. Prog.*, 15: 168-173.