



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



BIOLOGÍA SINTÉTICA: MODELO DE ESTUDIO DE MECANISMOS DE RECOMBINACIÓN GENÉTICA CODIFICANTE PARA PROTEÍNAS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO PRODUCIDAS EN *ESCHERICHIA COLI*

Isui Aguilar Salvador^{1,A}, Isabel Angeles Santander^{1,B}, Alfonso Castillo Diaz¹, Gilberto Gomez Correa¹, Mauricio Trujillo Roldán², Norma Adriana Valdez Cruz^{1,C}.

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología,² Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Ciudad de México, C.P. 04510

^Aharekrishna35@gmail.com, ^Biangeles7@gmail.com, ^Cadriavaldez1@gmail.com

Conceptos clave: Biología sintética, recombinación somática, sistema Cre/lox

Introducción. La alta demanda de compuestos capaces de reconocer antígenos con alta afinidad, así como la complejidad en su obtención, ha promovido el desarrollo de moléculas alternativas a los anticuerpos monoclonales [1-3]. La variabilidad de los anticuerpos, radica principalmente en el proceso de recombinación somática [4], que es capaz de generar hasta 18 millones de anticuerpos diferentes. Desde el enfoque de la biología sintética, se propone diseñar e implementar un sistema capaz de producir proteínas análogas a los anticuerpos en bacterias (*E. coli*), mediante un proceso de recombinación somática sintética similar al que ya se conoce en los linfocitos B, basada en la estructura con motivos repetidos de las DARPinas [5] y en el sistema de recombinación Cre/lox [6]. El sistema propuesto se compone de un Módulo Recombinante (MR), portador de los segmentos que recombinarán para dar lugar a proteínas funcionales y un Módulo Inductor (MI), que regulará el momento en que se inicie la recombinación.

Metodología. El diseño y síntesis del MR se realizó a partir de secuencias *lox P* heterólogas, así como de motivos conservados y variables de 4 DARPinas diferentes, mediante la previa identificación y alineación. Entre cada sección se incluyó el gen codificante para la proteína roja fluorescente (RFP). Para formar el MR, se ensamblaron las regiones sintetizadas con las respectivas RFP's, mientras que para el MI se insertará el gen de la recombinasa Cre con un promotor regulado por arabinosa. Con ayuda del software I-TASSER [7], se verificará que las proteínas resultantes de la recombinación no modifiquen su estructura. Ambos módulos (MR y MI) serán insertados en el plásmido pSB2k3 y transformados en la cepa de *E. coli* D1210. La cepa transformada se cultivará en matraces agitados de 250 mL y se inducirá la recombinación durante la fase estacionaria del cultivo. En el diseño se contempló el proceso de selección para excluir clonas que expresen la RFP, ya que durante la recombinación, el fragmento de DNA que codifica para ésta será escindido, de caso contrario las colonias serán rojas. De igual forma se adicionó una cola de histidinas para la purificación de DARPinas mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Resultados. Se diseñó el MR mediante la obtención de las 4 DARPinas de trabajo y la identificación de las regiones variables que las componen, además se realizó

un análisis de compatibilidad de las regiones *lox* para hacer uso de las menos compatibles (*loxFAS* y *lox2272*) y evitar recombinaciones indeseadas. La estructura final del MR está formada por tres segmentos (C1, V1 y V2+C2) ilustrados en la Fig. 1, las flechas en colores muestran las distintas regiones variables de las DARPinas de trabajo. Se comprobó que la estructura terciaria de una de las proteínas resultantes no se alterara (Fig. 2). Actualmente, se está realizando el ensamblaje del MR con un avance del 60%. Por otra parte, el MI fue diseñado de manera que el gen de la recombinasa CRE estuviera bajo la regulación de un promotor inducible por arabinosa, este módulo está completamente terminado.

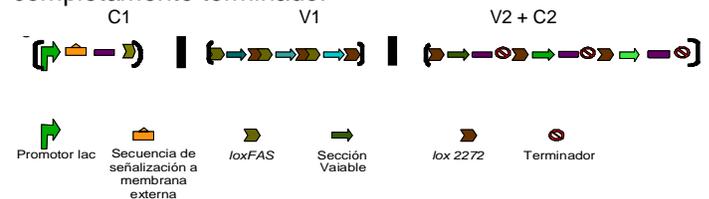
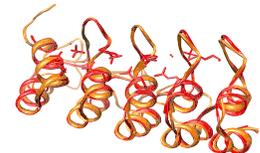


Figura 1. Esquema de los 3 segmentos del Módulo Recombinante.

Figura 2. Comparación de la estructura predicha con el software I-TASSER de uno de los posibles resultados de la recombinación (anaranjado) con la estructura de la DARPina consenso (rojo).



Conclusiones. El sistema de recombinación diseñado mediante biología sintética es capaz de producir hasta 18 proteínas diferentes estructuralmente estables. De ser funcional, podría aumentarse el número de regiones variables con el fin de generar una mayor diversidad de proteínas funcionalmente análogas a los anticuerpos.

Agradecimientos. Al proyecto 104951-Z SEP-CONACyT. Al Taller de Biología Sintética de la Facultad de Ciencias, UNAM.

- Bibliografía.**
1. Binz HK, Stumpp MT, Forrer P, Amstutz P, Plückthun A. (2003). *J. Mol. Biol.* 332: 489–503
 2. Skerra, A. (2007). *Curr. Opin. Biotechnol.* 18: 295–304
 3. Hosse RJ, Rothe A, Power BE. (2006). *Prot. Sci.* 15, 14–27
 4. Abul K, Abbas AH, Lichtman SP (2010) *Cell. Mol. Immun.* Saunders/Elsevier. USA. 566 p
 5. Stumpp MT, Binz HK, Amstutz P. (2008). *Drug Dis. Tod.* 13, 695-701
 6. Siegel RW, Jain R, Bradbury A. (2001). *FEBS Lett.* 505, 467-4
 7. Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010). *Nat. Prot.* 5, 725-738