

## LA TEMPERATURA PRE Y POST-INDUCCIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. coli* TERMOINDUCIBLE

Mauricio A. Trujillo-Roldán<sup>1</sup>, Sara Restrepo-Pineda<sup>1,2</sup>, Néstor O. Pérez<sup>3</sup>, Norma A. Valdez-Cruz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, CP 04510. <sup>2</sup> Noxgen Biotech SAPI de CV. Paseo de las Palmas 1 Fracc. Lomas de Cocoyoc, Atlalahuacan, Morelos, México C.P. 628470. <sup>3</sup> Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed SA de CV, Tenancingo, Estado de México 52400.

E-mail: maurotru@iibiomedicas.unam.mx

*Palabras clave: proteínas recombinantes, termoinducción, E. coli*

**Introducción.** La termoinducción en *E. coli* se emplea comúnmente a nivel industrial para producir altas concentraciones de proteínas recombinantes (PRs), evitando la adición de inductores químicos, minimizando así los riesgos de contaminación (1,2). El sistema de termoinducción está integrado por los promotores pL/pR y el represor termolábil cI857 (derivados del bacteriófago  $\lambda$ ) (1,2). La termoinducción *per se* favorece la formación de Cuerpos de Inclusión (CI) a través de la sobreproducción de PR. En este trabajo describimos como la temperatura (pre- y post-inducción) afectan el metabolismo y la fisiología de *E. coli*, la sobreproducción de la PR y la arquitectura de los cuerpos de inclusión (CI).

**Metodología** Se realizaron cultivos de la cepa *E. coli* W3110 productora del rhuGM-CSF en biorreactores de 1.2 L con 0.8 L de medio mínimo (17.5 g/L de glucosa) a dos temperaturas de pre-inducción (30°C vs 34°C) (2) y dos de post-inducción (39 °C y 42°C) (3). Se cuantificó el consumo de glucosa en un YSI 2900 y la acumulación de ácidos orgánicos por HPLC (2,3). Se separaron y purificaron los CI para determinar cambios en los niveles de expresión del rHuGM-CSF y las chaperonas DnaK/J, GroEL/ES por SDS-PAGE y Western blot. Para la caracterización estructural de los CI, se utilizó espectroscopía infrarroja FTIR-ATR, unión a tioflavina-T, digestión con proteínaasa K y solubilización con cloruro de guanidinio (GndCl) (2,3).

**Resultados.** Los cultivos de *E. coli* recombinantes que crecieron a 34 °C mostraron un aumento de ~ 69 % en la velocidad específica de crecimiento en comparación con cultivos crecidos a 30 °C. La cantidad de PR en los IB fue significativamente mayor en los cultivos a 34 °C. Las chaperonas (DnaK y GroEL) se asociaron con CIs y sus co-chaperones (DnaJ y GroES) normalmente con la proteína soluble. Finalmente, los IB de cultivos que crecieron a 34 °C tenían un menor contenido de estructura tipo amiloide y eran más sensibles a

degradación proteolítica que los IB obtenidos de cultivos a 30 °C.

Por otra parte cambios tan pequeños como 3 °C en post-inducción (39°C vs 42°C) favorecen la síntesis de biomasa a 39°C, pero limitan la producción de la PR comparándolo con 42°C. A su vez, los CI formados a 42°C eran menos propensos a la degradación y presentaban menos estructuras de tipo amiloide, relacionado esto con una rápida formación de CI. En comparación, los CI formados lentamente a 39 °C presentaron una mayor proporción de estructuras de tipo amiloide, siendo más susceptibles a la degradación. En ambos escenarios de termoinducción, los CI fueron más resistentes a medida que aumentaba el tiempo de inducción.

**Conclusiones.** La temperatura de pre y post-inducción no solo afecta el metabolismo y la fisiología de *E. coli* y la producción de proteínas recombinantes, sino también las velocidades de síntesis y la arquitectura de los CI. Esto puede ser útil para desarrollar un bioproceso mejorado para producir PR terapéuticas en sistemas termoinducibles y para diseñar estrategias racionales de recuperación y purificación de proteínas, ya que la arquitectura de los IB es un factor determinante para iniciar el bioproceso posterior.

**Agradecimiento.** Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM IN211422, IN210822, IV201220.

### Bibliografía.

- Restrepo-Pineda S, Pérez NO, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA (2021) *FEMS Microbiol Rev*, 45(6):fuab023.
- Restrepo-Pineda S, Sánchez-Puig N, Pérez NO, García-Hernández E, Valdez-Cruz NA, Trujillo-Roldán MA (2022) *Appl Microbiol Biotechnol*, 106(8):2883-2902.
- Restrepo-Pineda S, Rosiles-Becerril D, Vargas-Castillo AB, Ávila-Barrientos LP, Luviano A, Sánchez-Puig N, García-Hernández E, Pérez NO, Trujillo-Roldán MA, Valdez-Cruz NA (2022). *Elec J of Biotechnol* 59:94-106.