

EFFECTO DEL pH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE rHuGM-CSF EN UN SISTEMA RECOMBINANTE TERMOINDUCIDO DE *Escherichia coli*

Jesús Antonio Rauda Ceja^{1,2}, Nestor O. Perez³, Norma A. Valdez-Cruz², Mauricio A. Trujillo-Roldán²

¹Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Morelia. Morelia, Mich. C.P. 58120. ² Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Ciudad de México, CdMx. C.P. 04510. ³. Probiomed S.A. de C.V. Planta Tenancingo, Tenancingo, Edo. Mex. C.P. 52400.

E-mail: maurotru@gmail.com

Palabras clave: pH, cuerpo de inclusión, respuesta de choque térmico.

Introducción. En la producción de proteínas recombinantes (PR) en *E. coli*, la formación de cuerpos de inclusión (CI) es un fenómeno común en la producción de biofármacos. Los CI son más densos que otros componentes celulares y poseen una alta proporción de PR, siendo posible su separación mediante centrifugación (1). Sin embargo, la proteína agregada, asociado a la formación de fibras amiloides en la estructura secundaria, comúnmente pierde su actividad biológica y debe ser desnaturizada por completo para posteriormente ser replegada (1). Se ha reportado que el pH alcalino en sistemas inducidos por IPTG forma CI más susceptibles a la degradación por proteinasa K y solubilizables a menores concentraciones de GndCl (2,3). El sistema termoinducido se fundamenta en la inhibición de la transcripción por el represor termolábil CI857 unido a los promotores pR o pL en temperaturas inferiores a 37°C (4). El incremento de la temperatura (hasta 42°C) inicia la transcripción de la PR y desencadena la expresión de chaperonas moleculares como parte de la respuesta de choque térmico (4). rHuGM-CSF (14.47 kDa) es un biofármaco empleado en el tratamiento de neutropenia y promueve la proliferación de granulocitos y macrófagos (5). Este trabajo evaluó el efecto sobre el crecimiento bacteriano y la formación de CI en dos condiciones de pH postinducción (7.4 y 8.5), en cultivos de *E. coli* K-12 productora rHuGM-CSF inducidos a 42°C.

Metodología. Se realizaron cultivos en lote en biorreactores Applikon de 1.2 L. Después de 8 h de crecimiento a 30°C y pH 7.4, los cultivos fueron inducidos a 42°C con dos condiciones de pH, manteniendo a 7.4 o incrementando a 8.5. Se monitoreó el consumo de sustrato mediante un analizador bioquímico YSI 2900. La producción de proteína recombinante se observó por SDS-PAGE (15%). Se empleó FTIR en CI liofilizados, por la segunda derivada (1500-1700 cm⁻¹) (6).

Resultados. El incremento en el pH postinducción derivó en la disminución a un tercio de la biomasa final en comparación a los cultivos a pH de 7.4; la producción de PR igualmente disminuyó. Sin embargo, los espectros de infrarrojo muestran un incremento en el pico de α-hélice (≈1650 cm⁻¹), en los CI cosechados 3h después de inducir, posiblemente indicando una estructura menos rígida.

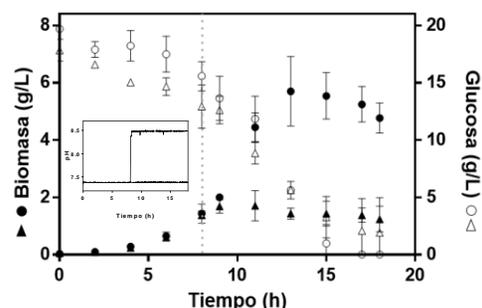


Fig. 1. Cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa a pH 7.4 (círculos) y pH 8.5 postinducción (triángulos). La inducción se señala en la gráfica como una línea punteada.

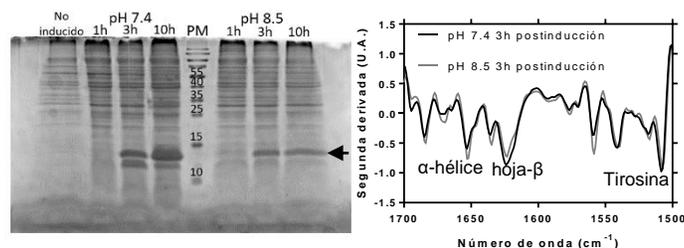


Fig. 2. SDS-PAGE de proteína total cargando 25 µg de proteína.

Fig. 3. Segunda derivada de espectros IR de cuerpos de inclusión secos, 3h después de inducir.

Conclusiones. La carga metabólica asociada al estrés térmico y estrés alcalino, podría ser la responsable de la disminución en el crecimiento y en la acumulación de PR. No obstante, por lo visto en los espectros IR de los CI cosechados a pH 8.5, 3h después de la inducción; parecen tener una estructura menos rígida.

Agradecimientos. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM IT-200719, IN-208414) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT 247473, 220795). Beca AMC XXVIII Verano de la Investigación Científica.

Bibliografía.

- de Marco A et al. (2019) *FEMS Microbiol Rev.*; 43(1):53-72.
- Castellanos-Méndez A et al. (2014) *Microb Cell Fact.*; 13(137).
- Calines-Cruz C et al. (2018) *Int J Biol Macromol.*; 108:826-836.
- Valdez-Cruz et al. (2010) *Microb. Cell Fact.*; 9(18).
- Francisco-Cruz et al. (2014) *Med Oncol*; 31(774).
- Ami D et al. (2005) *FEBS Lett.*; 579(16):3433-3436.