

## EFFECTO DE LA TENSIÓN DE OXÍGENO DISUELTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DEL rHuGM-CSF EN UN SISTEMA TERMOINDUCIDO DE *Escherichia coli*.

Ximena Gómez-Gil<sup>1</sup>, Norma A. Valdez-Cruz<sup>1</sup>, Néstor O. Pérez<sup>2</sup>, Mauricio A. Trujillo-Roldán<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Bioprocesos, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, CP. 04510, maurotru@biomedicas.unam.mx

<sup>2</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed, S.A. de C.V, Cruce de carreteras Acatzingo-Zumpahuacán S/N, Tenancingo, Estado de México, México, C.P. 52400

*Palabras clave:* Oxígeno disuelto, termoinducción, cuerpos de inclusión.

**Introducción.** Los sistemas de termoinducción han sido usados exitosamente para la producción de proteínas recombinantes (PR) de grado farmacéutico (1). La sobreexpresión de PR bajo condiciones de estrés puede causar la formación de cuerpos de inclusión (CI), con altos porcentajes de la PR parcialmente plegada, con estructura secundaria similar a la nativa. Normalmente las PR pueden ser sometidas a un proceso de replegamiento *in vitro* (2). Por lo anterior, existe una gran importancia en evaluar la respuesta ante condiciones de estrés que puedan alterar la cantidad o calidad de la proteína producida, así como las características de los CI. Es por eso, que este proyecto tiene como objetivo la evaluación del efecto de la TOD, sobre la producción de rHuGM-CSF, una citosina de gran interés clínico, acumulado como CI, en un sistema de expresión termoinducido en *E. coli*.

**Metodología.** Se llevaron por triplicado cinéticas en un biorreactor de 1 L, a un pH de  $7.2 \pm 0.2$ ,  $30^\circ\text{C}$  en la pre-inducción y la inducción a  $42^\circ\text{C}$  ( $0.4 \pm 0.05^\circ\text{C}/\text{min}$ ). La TOD se controló a 70%, 30%, 10% y 5% durante todo el cultivo. Se siguió el crecimiento a 600 nm y análisis de consumo de sustrato en un analizador bioquímico (YSI 2900). La cuantificación, la detección y análisis de proteína se realizó por Bradford, SDS-PAGE y western Blot. Además, el análisis de la arquitectura de los CI se realizó por ATR-FTIR y ensayos de estabilidad frente a diferentes concentraciones de GuCl (3).

**Resultados.** El control de la TOD a 5% post-inducción da como resultado una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) menor con respecto a las otras condiciones, sin efecto sobre la biomasa máxima (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización cinética a diferente % TOD.

Parámetro /TOD	30 %	70%	10%	5%
$\mu$ preinducción ( $\text{h}^{-1}$ )	0.58 +/- 0.04			
$\mu$ postInducción ( $\text{h}^{-1}$ )	0.32±0.04	0.29±0.001	0.25±0.04	0.15±0.03
biomasa máx (g/L)	5.40±0.6	5.08±0.06	5.76±0.7	5.18±0.5
$Y_{x/s}$ (g <sub>cél</sub> /g <sub>glucosa</sub> )	0.30±0.008	0.29±0.03	0.31±0.04	0.30±0.01
$q_s$ (g <sub>glucosa</sub> /g <sub>cél</sub> *h)	1.34±0.2	1.21±0.2	0.90±0.07	0.75±0.07
$Y_{p/x}$ (mg <sub>GM-CSF</sub> /g <sub>cél</sub> )	11.74	14.08	13.37	18.14

Al realizar el análisis de CI purificados por SDS-PAGE se observó una mayor proporción de la banda correspondiente a rHuGM-CSF a 5% post-inducción (Fig.

1). Al analizar los espectros por ATR-FTIR, de los CI purificados (Fig. 2), se observa que no hay cambios en la banda  $\sim 1653 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a  $\alpha$ -hélice, no obstante, se observan cambios entre  $1610\text{-}1630 \text{ cm}^{-1}$ , región reportada para agregados y fibrillas amiloides (4,5).

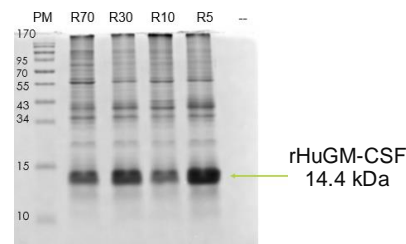


Fig. 1. SDS-PAGE al 15%. CI purificados (carga volumétrica) PM: Marcador de peso molecular, R70: 70% TOD, R30: 30% TOD, R10: 10% TOD, R5: 5% TOD

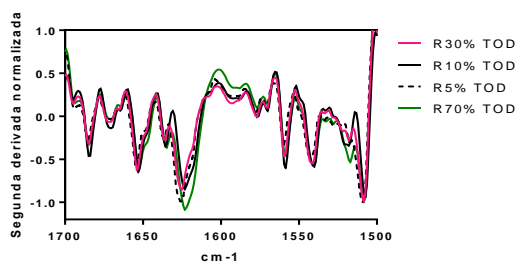


Fig. 2. Espectro infrarrojo de CI de 15 h post-inducción purificados

**Conclusiones.** El cultivo a 5% de TOD post-inducción favorece la producción de rHuGM-CSF. No hay cambios en la arquitectura de los CI en el contenido de estructuras  $\alpha$  hélice, sin embargo, hay un aparente cambio en la región entre  $1610\text{-}1630 \text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a las interacciones intermoleculares  $\beta$  (fibrillas amiloides).

**Agradecimientos.** Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT-200719, IN-208414) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT 247473, 220795). Beca CONACYT 894768.

### Referencias

- Valdez-Cruz, N.A. *et al.* (2010). *Microb Cell Fact.* 9 (18).
- de Marco, A *et al.* (2019). *FEMS Microbiol Rev.* 43 (1):53-72.
- Calcines-Cruz, C *et al.* (2018). *Int J Biol Macromol.* 108:826-836.
- Zandomenighi, G. *et al.* (2004). *Protein Sci.* 13(12):3314-21.
- Valdez-Cruz, N.A. *et al.* (2017). *Microb Cell Fact.* 16(1):129.

