

ESTUDIO PROTEÓMICO Y ESTRUCTURAL DE LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN DE LA PROTEÍNA rHuGM-CSF OBTENIDOS USANDO UN SISTEMA TERMOINDUCIBLE EN *E. coli*

Sara Restrepo-Pineda¹, Norma A. Valdez-Cruz¹, Néstor O. Pérez², Mauricio A. Trujillo-Roldán¹

¹ Unidad de Bioprocesos, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510, Ciudad de México. ² Unidad de Investigación y Desarrollo, Probiomed S.A. de C.V., Tenancingo, Edo. De México 52400. E-mail: maurotru@biomedicas.unam.mx

Palabras clave: Sistema de expresión termoinducible, Proteína recombinante, Respuesta de choque térmico.

Introducción. El sistema de expresión termoinducible λ pL/pR-cl857, tiene gran interés para la producción de proteínas recombinantes (PR) en *E. coli* (1), ya que se evitan los inductores químicos y se minimizan riesgos de contaminación (2). Sin embargo, aumentos por encima de los 34°C provocan la activación de la respuesta de choque térmico, desencadenando la síntesis de chaperonas involucradas en el correcto plegamiento de las PR (3). Se ha reportado que según la estrategia de termoinducción cambia los niveles de mRNA de genes asociados a la respuesta de choque térmico y de la proteína heteróloga (4,5), pero pocos trabajos hacen referencia a cambios a nivel proteómico. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la temperatura de crecimiento (30°C y 34°C) sobre la respuesta de choque térmico, evaluando los cambios en el proteoma y en la estructura de los cuerpos de inclusión (CI) que contienen el Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (rHuGM-CSF).

Metodología. Se realizaron cultivos de la cepa de *E. coli* W3110 productora de rHuGM-CSF en biorreactores con 0.8 L de medio mínimo a dos temperaturas de crecimiento (30°C vs 34°C) con inducción a 42°C. Se cuantificó el consumo de glucosa en el YSI 2900 y la acumulación de acetato por HPLC. Se separaron y purificaron los CI para determinar cambios en los niveles de expresión de rHuGM-CSF y las chaperonas DnaK/J, GroEL/ES por SDS-PAGE, Western blot y espectrometría de masas. La caracterización estructural de los CI se realizará por microscopía electrónica, FTIR-ATR, desnaturización con agentes caotrópicos y solubilización con proteínasa K.

Resultados. Se alcanzaron biomazas máximas similares bajo ambas temperaturas de crecimiento, pero a 34°C hubo un aumento del ~40% en la velocidad específica de crecimiento ($0.90 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$) comparada con 30°C ($0.53 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$). En ambos casos, la glucosa se consumió completamente y se observó producción de ~6.0 g/L de acetato (Fig. 1). La proteína de interés rHuGM-CSF (~14 kDa) se expresó exclusivamente en los CI, observando más proteínas endógenas a 34°C que a 30°C. No hay expresión en la cepa sin inducir (s/i) y en la silvestre (wt), ni en la fracción soluble (Fig. 2).

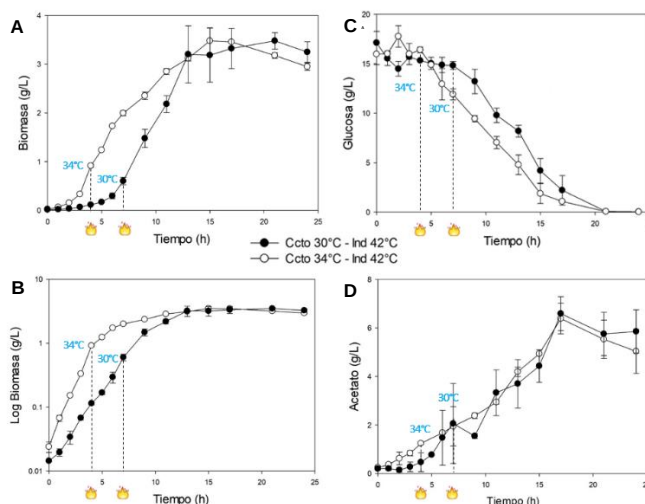


Fig. 1. Cinéticas a 30°C y 34°C con inducción a 42°C de *E. coli* W3110 productora de rHuGM-CSF en biorreactores. Biomasa (A), escala logarítmica (B), consumo de glucosa (C) y producción de acetato (D). Las líneas punteadas indican la inducción (7 h a 30°C y 4 h a 34°C).

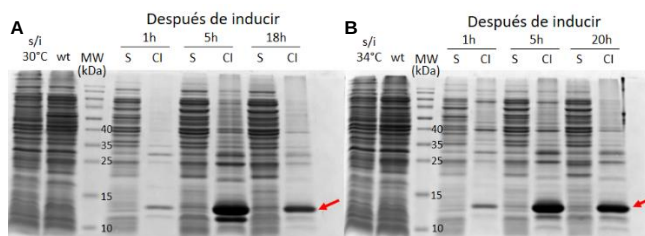


Fig. 2. Expresión de rHuGM-CSF en cultivos de *E. coli* W3110 a 30°C → 42°C (A) o 34°C → 42°C (B). Se separaron la fracción soluble (S) y los cuerpos de inclusión (CI) en un gel de poliacrilamida al 15%.

Conclusiones. Cultivos a 34°C aceleran el crecimiento, reflejado en una mayor μ antes de inducir en comparación a 30°C. rHuGM-CSF forma CI en cultivos de *E. coli* termoinducidos a 42°C.

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 589949.

Bibliografía.

- (1) Villaverde A et al. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* 59(10): 3485-3487.
- (2) Valdez-Cruz NA et al. (2010) *Microb. Cell Fact.* 9:18.
- (3) Guisbert E et al. (2004) *Genes Dev.* 18(22): 2812-2821.
- (4) Valdez-Cruz NA, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA (2011) *Bioeng. Bugs.* 2: 2.
- (5) Caspeta L et al. (2013) *J. Biotechnol.* 167: 47-55.