



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

FORO DE INVESTIGACIÓN Y CUERPOS ACADÉMICOS



ALTERACIÓN DE LA PROPORCIÓN LISINA Y ARGININA COMO ESTRATEGIA PARA MODIFICAR LA SOLUBILIDAD DE PROTEÍNAS

Carballo-Amador M.A.*^{1,2}, Dickson A. J.² and Warwicker J.²

¹Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, México

²School of Chemistry, Manchester Institute of Biotechnology, University of Manchester, Manchester, Reino Unido

Resumen

Las proteínas tienen una amplia gama de propiedades como resultado de la evolución natural de células simples a organismos complejos. Estas propiedades están enciñadas en la información de su propia secuencia primaria. Una vez que el polipéptido se traduce, el siguiente paso es lograr su forma de estructura nativa durante el proceso de plegamiento. Es aquí donde uno de los principales desafíos para la producción de proteínas recombinantes a cualquier escala hace su aparición, la agregación de proteínas. Este fenómeno se ha descrito como la consecuencia de interacciones proteicas parciales o desplegadas¹. En *Escherichia coli*, la acumulación de proteínas en el citoplasma puede resultar en la agregación de proteínas para formar lo que se conoce como cuerpos de inclusión². Este proceso ocurre a menudo durante la sobreexpresión de proteínas de origen eucariota, proteínas que deberían llevar modificaciones postraduccionales que no ocurren en el citosol de *E. coli*. Algunas de estas proteínas son bioterapéuticas líderes en el mercado, por lo tanto, una comprensión molecular básica es esencial para lograr la producción de bioterapéuticos rentables.

Diversos enfoques experimentales se han llevado a cabo para prevenir la agregación de proteínas en *E. coli*. Estos incluyen la reducción de la temperatura de cultivo y la concentración de inductores, la co-expresión de chaperones moleculares, el uso de etiquetas solubles, y modificación del uso de codones. Además, durante las dos últimas décadas se han desarrollado algoritmos computacionales para ayudar a la predicción de la inclinación a la agregación basándose en el análisis de secuencia de aminoácidos. Una ventaja para cada uno de estos paquetes de predicción es que la entrada se basa en secuencias, las cuales están disponibles fácilmente. Existe un extenso estudio experimental de solubilidad de proteínas de *E. coli* mediante la expresión libre de células (eSOL)³, la cual ha abierto el campo para el trabajo adicional sobre problemas de solubilidad de proteínas^{4,5}. Nuestro grupo ha utilizado los datos de eSOL para discernir las características basadas en la estructura y en la secuencia que mejor separan los subgrupos de proteínas más y menos soluble^{4,5}. La característica discriminatoria destacada fue el tamaño del parche cargado positivamente en



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

FORO DE INVESTIGACIÓN Y CUERPOS ACADÉMICOS



la superficie de la proteína⁵, que se ha explorado experimentalmente^{6,7}. Cuando se observó la composición de las cargas positivas en proteínas (en gran parte las cargas de la cadena lateral de lisina y arginina a pH fisiológico), se encontró que la propiedad basada en secuencias de proporción lisina (K) *versus* arginina (R) también era discriminatorio entre las proteínas menos y más solubles⁴. Un mayor contenido de lisina:arginina se asoció con el subconjunto más soluble. Además, se encontró que las proteínas que se encuentran en altas concentraciones en la naturaleza (*versus* las de concentraciones más bajas) también tenían una preferencia relativa por la lisina⁴, lo que conduce a la sugerencia de que este equilibrio de lisina y arginina podría ser un efecto general, no sólo específico de los sistemas de expresión.

La presente investigación se centra en la exploración del proteoma de *E. coli* K-12, probando el papel de la relación K a R en la expresión de proteínas. Para seleccionar proteínas, se clasificaron 2,931 proteínas de *E. coli* basado en el cálculo de la proporción más alta de K a R y se hicieron referencias cruzadas con proteínas altamente solubles observadas experimentalmente en la expresión libre de células³. Se seleccionaron tres proteínas, la tiorredoxina-1 (TRX), la proteína de choque frío cspB (cspB) y la proteína fosfotransportadora (HPr). TRX es una proteína redox pequeña (108 aminoácidos) implicada en funciones celulares variadas, incluyendo reducción de ribonucleótidos y plegamiento de proteínas⁸. HPr es un componente peptídico pequeño (85 aminoácidos) del sistema de fosfoenolpiruvato (PEP): carbohidrato fosfotransferasa (PTS)⁹. CspB (71 residuos) es una de las principales proteínas de choque en frío que se desencadena por un cambio descendiente de temperatura¹⁰.

Con el fin de investigar las consecuencias de los cambios en la relación de K a R para la solubilidad de estas tres proteínas, hemos diseñado una variante intermedia (C2) y construcciones de sustitución parcial o completa (C3) (es decir, bajo o nulo contenido de lisina). Hemos observado una caída significativa en la solubilidad para cspB y HPr en comparación con las versiones de tipo salvaje (WT), siendo más prominente en las variantes C3. Sin embargo, para la expresión de variantes de TRX, la solubilidad sólo cae en condiciones de baja inducción (baja temperatura e inductor de IPTG) en comparación con WT. Este enfoque computacional y experimental contribuirá a la racionalización para mejorar los rendimientos en tecnologías de proteínas recombinantes, especialmente en relación con el diseño de bioterapéuticos de formato novedoso.

Agradecimientos

Al Dr. E. McKenzie por el suministro del vector y cepa de expresión, al Dr. R. Curtis por sus discusiones, y también al CONACyT por aportar fondos de doctorado.

Referencias

1. A. L. Fink. *Fold Des*, **3**, R9-23 (1998).
2. J. F. Kane, D. L. Hartley. *Trends Biotechnol*, **6**, 95-101 (1988).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

FORO DE INVESTIGACIÓN Y CUERPOS ACADÉMICOS



3. T. Niwa, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 4201-6 (2009).
4. J. Warwicker, S. Charonis, R. Curtis. *Mol Pharm*, **11**, 294-303 (2014).
5. P. Chan, R. Curtis, J. Warwicker. *Sci Rep*, **3**, 3333 (2013).
6. M. A. Carballo-Amador *et al.*, *FEBS – Under review* (2017a).
7. M. A. Carballo-Amador *et al.*, *in preparation* (2017b).
8. T. Yasukawa, *et al.*, *J Biol Chem*, **270**, 25328-31 (1995).
9. N. D. Meadow *et al.*, *Annu Rev Biochem*, **59**, 497-542 (1990).
10. J. P. Etchegaray, M. Inouye. *J of Bact*, **181**, 1827-1830 (1999).

*Autor correspondiente: alejandro.carballo@uabc.edu.mx