

2014 Noviembre, 2(2): 2-2

## **Producción de factor de crecimiento epidermal humano recombinante biológicamente activo**

Daniela Lufrano<sup>1</sup>, Javier García Pardo<sup>2</sup>, Julia Lorenzo<sup>2</sup>, David Obregón<sup>1</sup>, Sabina Mate<sup>3</sup> y Laura Bakas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Facultad de Ciencias Exactas,

<sup>2</sup>Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB). Universitat Autònoma de Barcelona, España.

<sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Bioquímicas, (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.

### **Introducción**

El factor de crecimiento epidermal humano (hEGF) es un polipéptido de 53 aminoácidos que forma parte del complejo sistema de modulación del crecimiento y desarrollo celular. Cuando el EGF se une a su receptor (EGFR) en la superficie de las células, se produce la dimerización del EGFR seguida de la auto-fosforilación de residuos Tyr en los dominios citoplasmáticos del receptor. Los residuos Tyr fosforilados inician la cascada de eventos que conduce a la síntesis de ADN, ARN y proteínas. A través de la interacción con el EGFR, el EGF cumple una variedad de roles fisiológicos vinculados con el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y supervivencia de diferentes tipos celulares. Así, por ejemplo, la acción mitogénica ejercida por el EGF mediante la activación del EGFR juega un papel principal en la regeneración tisular en las heridas, pero también se la ha vinculado a ciertos tipos de cánceres. Debido a este amplio abanico de efectos, el EGF es un blanco de interés permanente en variadas investigaciones tanto en el campo de la ciencia básica como también aplicada. Si bien se comercializa hEGF recombinante, su elevado costo limita la ejecución de ensayos que requieran cantidades importantes de proteína en un alto porcentaje de laboratorios de nuestro país

### **Objetivos**

Es por ello que en el presente trabajo reportamos la producción de hEGF recombinante en el sistema de levaduras *Pichia pastoris* (cepa X-33) con rendimientos del orden del µg/ml de medio de expresión. Las levaduras constituyen un huésped productor de proteínas recombinantes popular dado que poseen una maquinaria de síntesis similar a la de las células humanas, a la vez que son fáciles de crecer y procesar, rápidas y económicas. En particular, las especies *Sacharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* han contribuido ampliamente a la producción recombinante de proteínas humanas de interés farmacéutico.

### **Materiales y Métodos**

La expresión de proteínas heterólogas en levaduras es una buena alternativa para la producción debido a que estas son fácilmente manipulables a nivel genético y presentan un crecimiento análogo al de los organismos procariontes, pero al mismo tiempo poseen una maquinaria de procesamiento post-traducciona que permite la modificación de las proteínas de una manera similar a la que realizan los eucariotes superiores. La levadura metilotrófica ascomicética *P. pastoris* es altamente desarrollada para la expresión de proteínas foráneas ya que es capaz de realizar mejores modificaciones post-traduccionales que las producidas por *S. cerevisiae* a nivel del procesamiento proteolítico, la glicosilación y la formación de puentes disulfuro. Todo esto unido a altos rendimientos de la proteína obtenida y muy altos niveles de secreción de proteína de interés en relación a las proteínas nativas, que facilita el escalado, han convertido a los procedimientos de obtención de proteínas basados en *P. pastoris* en uno de los sistemas más fácilmente escalable, más baratos y más rápidos de los desarrollados hasta el momento.

### **Resultados**

La identidad del producto obtenido fue confirmada mediante huella peptídica generada por digestión con tripsina (PMF-MALDI TOF) y su actividad biológica evaluada por comparación de su capacidad de activar el EGFR en cultivos de la línea celular A-431, respecto al hEGF comercial. Las células fueron estimuladas con tres concentraciones del hEGF producido/comercial y la activación del receptor analizada a través de la determinación de los niveles de EGFR-fosforilado por Western blot empleando anticuerpos comerciales anti-Phospho-EGFR(Tyr1173) y anti-α-tubulina como control de cantidad de proteína total.

### **Conclusión**

En base a los resultados observados, el hEGF producido mostró ser igualmente activo que el hEGF comercial utilizado como patrón.

2014 Noviembre, 2(2): 2-2

*Fecha de Recibido: 04-10-14*

*Fecha de Publicación:1-11-14*