

Las bacterias como sistema de expresión de proteínas heterólogas terapéuticas: una revisión bibliográfica

Bacteria as a therapeutic heterologous protein expression system: a review

Yurley Vanesa Álvarez G.*‡, Alexander Arias N.†

RESUMEN

En la actualidad la producción de proteínas terapéuticas se ha convertido en uno de los campos de mayor impacto a nivel científico y biotecnológico. La expresión de proteínas recombinantes en sistemas procariontes, particularmente en *E. coli* han permitido el desarrollo de una gran variedad de proteínas terapéuticas. Sin embargo, para poder producir proteínas funcionales ha sido necesario buscar intensamente un equilibrio entre la calidad y la producción; por lo que es necesario innovar nuevas estrategias que permitan superar las dificultades inherentes a los sistemas de expresión procarionte, por esto es esencial delimitar los alcances que pueden tener las bacterias más empleadas y aquellas que podrían representar alternativas prometedoras para la producción de proteínas de interés. La presente revisión bibliográfica está dirigida a realizar un estudio del estado del arte y de la técnica de los sistemas de expresión de proteínas heterólogas que existen en torno al empleo de bacterias, con impacto en la industria farmacéutica y biotecnológica.

PALABRAS CLAVES

Bacterias, expresión, proteínas heterólogas, proteínas terapéuticas.

ABSTRACT

At present, the production of therapeutic proteins has become one of the greatest impact areas at scientific and biotechnological level. The expression of recombinant proteins in prokaryotic systems, particularly in *E. coli*, has allowed the development of a variety of therapeutic proteins. However, in order to produce functional proteins, a search for balance between quality and production has been necessary. Innovation in strategies to overcome the inherent difficulties to prokaryotic expression systems is essential; thus, it is also crucial delimiting the scope that can have the bacteria most frequently used and those that may represent promising alternatives for the production of proteins of interest. This review aims at conducting a study of state of the art on and the techniques around the use of heterologous protein expression

systems on bacteria, with impact on the pharmaceutical and biotechnological industry.

KEY WORDS

Bacteria, expression, heterologous proteins, therapeutic proteins.

INTRODUCCIÓN

El uso de proteínas terapéuticas en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas o deficiencias hereditarias, se ha venido implementando cada vez más en los últimos 30 años.¹ Las proteínas terapéuticas son producidas en sistemas heterólogos mediante tecnología de ADN recombinante.

Actualmente, se desarrollan nuevos y mejores sistemas de expresión, implementando nuevos plásmidos,

*Estudiante de Microbiología Industrial y Ambiental. †Asesor-Docente de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. ‡Contacto: Yurago90@gmail.com
Recepción: 05-14-2014. Aceptación: 08-21-2014.

adición de elementos genéticos del gen adicional y optimización de codones.² También se desarrollan cepas mutantes que asimilan nutrientes de forma eficiente, aumentando la producción de proteínas recombinantes terapéuticas y/o reducen la producción de compuestos tóxicos que afectan su producción, y se desarrollan procesos de cultivo cada vez más eficiente para producir las proteínas terapéuticas.¹

Actualmente, estas proteínas se han convertido rápidamente en productos clave para las industrias farmacéuticas, pues las ventas globales en el 2007 fueron cercanas a los 79 mil millones de dólares americanos, lo que representa entre el 10% al 15% del mercado de los fármacos; para el 2020 se prevén ventas de hasta 200 mil millones de dólares americanos.³ En nuestros días, más de 150 proteínas terapéuticas se encuentran en el mercado y más de 400 se encuentran en pruebas clínicas, además de muchos otros en desarrollo. Entre las más vendidas se encuentran las proteínas hematopoyéticas (23%) y los anticuerpos monoclonales (20%). Otras proteínas que tienen también altos porcentajes de venta son las citocinas (19%), antitrombina (11%), vacunas (11%), proteínas plasmáticas (6%) e insulina (5%). Una de cada cuatro drogas introducidas en el mercado es una proteína heteróloga terapéutica, y ese número tiende a crecer exponencialmente.⁴

La elección del microorganismo para expresar la proteína de interés depende en gran medida de las características fisicoquímicas de la proteína a producir, estas células son ampliamente usadas debido a su rápido crecimiento, baja labilidad al estrés mecánico, altas productividades y escalamiento sencillo.⁵

Los sistemas procariontes expresan proteínas solubles o en forma de agregados intracelulares o cuerpos de inclusión, sin plegamiento, lo que implica su estructuración *in vitro*. *Escherichia coli* es uno de los modelos más simples para la producción de proteínas recombinantes. En el mercado, cerca del 30% de las proteínas terapéuticas «sencillas» son producidas en *E. coli*.¹ Por otro lado, hay otros sistemas bacterianos diferentes de *E. coli* que están siendo empleados como alternativas sustentables que se mencionaran en el desarrollo del texto. En esta revisión se presenta un panorama general del uso de bacterias como sistemas de expresión de proteínas heterólogas terapéuticas, el mecanismo de regulación genética más empleado y/o técnica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñó una revisión sistemática de la evidencia científica disponible, desde 2000 hasta 2014, relacionada con el estudio del arte y de la técnica de los sistemas de expresión de proteínas heterólogas que existen en torno al empleo de bacterias, y su impacto en la industria farmacéutica y biotecnológica.

BASES DE DATOS Y BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Para realizar esta revisión se consultó la literatura científica disponible en las bases de datos PubMed (Medline), ScienceDirect, SpringerLink. También se utilizaron los motores de búsqueda como Scholar Google, con opciones avanzadas; las palabras claves utilizadas en la búsqueda fueron: heterologous protein therapeutic, bacteria, expression. Usando el operador booleano: AND.

Los artículos de interés inicialmente fueron seleccionados por título y contenido del resumen, teniendo en cuenta los criterios de inclusión establecidos: artículos originales; en idioma inglés; investigaciones realizadas con bacterias para la producción de proteínas heterólogas terapéuticas entre 2000 y 2014. Posteriormente, cada artículo fue revisado completamente y solo se escogieron aquellos que contenían información en la que se describirá las bacterias usadas, la técnica usada y las proteínas heterólogas terapéuticas expresadas (Figura 1).

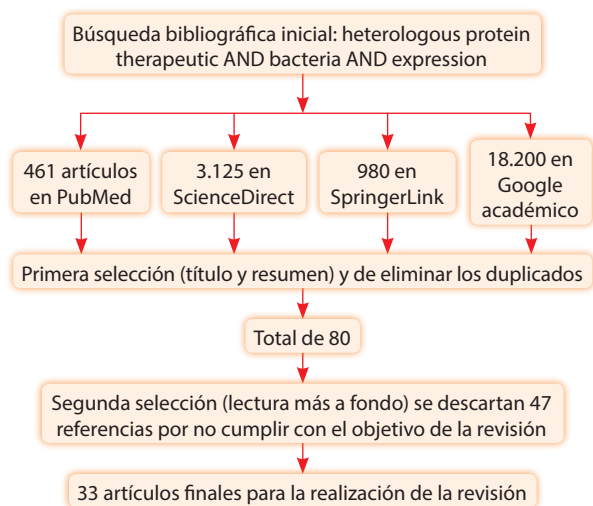


Figura 1. Resultados esquematizados de la búsqueda de bibliografías para la realización del trabajo.

Las publicaciones seleccionadas se recopilaron impresas en carpetas, así como en archivos magnéticos formato PDF (Adobe Reader 7.0). Se construyó una base de datos (Excel) en la cual se clasificaron los artículos de acuerdo con el año, país, autor, bacteria usada, proteína heteróloga terapéutica expresada, técnica usada.

RESULTADOS

1. LAS BACTERIAS COMO SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Las células procariontes como *E. coli* son escogidas como sistemas huéspedes para la expresión de proteínas recombinantes porque ofrecen una plataforma que requiere fuentes de carbono más económicas y de fácil acceso; rápida acumulación de biomasa; facilidad para la fermentación de alta densidad; el escalamiento del sistema es relativamente sencillo.⁶

Sistema *Escherichia coli*. *Escherichia coli* es ampliamente usada tanto en la investigación como en la industria, como un organismo huésped para la expresión de proteínas heterólogas; esto se debe a que es un sistema más económico y escalable, está genéticamente caracterizado y tiene altos niveles de producción.⁷

Generalmente las proteínas recombinantes se acumulan en el citoplasma o bien, en el periplasma. Frecuentemente, el citoplasma es la primera elección como resultado de la alta acumulación de proteínas recombinantes.⁸ La expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se efectúa principalmente en las cepas BL21 y K12, así como en cepas derivadas (Tabla 1).

Por otro lado, hay ciertos inconvenientes inherentes al uso de *E. coli*, como la expresión heteróloga ineficiente y la pobre solubilidad de las proteínas expresadas; debido a la carencia de una maquinaria molecular que pueda realizar las modificaciones post-traduccionales necesarias.⁶ Otro problema muy común,

Tabla 1. Cepas de *E. coli* frecuentemente usadas para expresar proteínas recombinantes.

| Cepa de <i>E. coli</i> | Derivación | Características |
|------------------------|------------|--|
| AD494 | K-12 | Mutante de <i>trxB</i> , facilita la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma. |
| BL21 | B834 | Deficiente de proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> . |
| BL21 <i>trxB</i> | BL21 | Mutante de <i>trxB</i> , facilita la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma, deficiente de proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> . |
| BL21 CodonPlus-RIL | BL21 | Favorece la expresión de proteínas eucarióticas que contienen codones raros usados en <i>E. coli</i> : AGG, AGA, AUA, CUA; deficiente de proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> . |
| BL21 CodónPlus-RP | BL21 | Favorece la expresión de proteínas eucarióticas que contienen codones raros usados en <i>E. coli</i> : AGG, AGA, CCC; deficiente de proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> . |
| BLR | BL21 | Mutante de <i>RecA</i> , estabiliza repeticiones en tandem; deficiente de proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> . |
| B834 | Cepa B | Auxotrofo de Met |
| C41 | BL21 | Mutante diseñado para la expresión de proteínas de membrana |
| C43 | BL21 | Doble mutante diseñado para la expresión de proteínas de membrana |
| HMS174 | K-12 | Mutante de <i>RecA</i> ; Resistencia Rif |
| JM 83 | k-12 | Secreción de proteínas al periplasma |
| Origami | k-12 | Mutante <i>trxB/gor</i> ; facilita la formación de enlaces disulfuro citoplasmáticos |
| Origami B | BL21 | Mutante <i>trxB/gor</i> ; facilita la formación de enlaces disulfuro citoplasmáticos; deficiente de proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> . |
| Rosetta | BL21 | Favorece la expresión de proteínas eucarióticas que contienen codones raros usados en <i>E. coli</i> : AUA, AGG, AGA, CCC, CGG, CUA, y GGA; deficiente de proteasas <i>lon</i> y <i>ompT</i> . |

Tomada y modificada de: (Terpe, 2006).⁷

está relacionado con el uso preferencial de codones de la bacteria, con respecto a las secuencias de los genes heterólogos; lo que puede incluso anular la expresión de las proteínas heterólogas.⁹

A pesar de estos inconvenientes, se ha reportado que *E. coli* puede acumular hasta un 80% de peso seco de proteína recombinante.¹⁰ Sin embargo, la incapacidad de este sistema para secretar proteínas al medio de crecimiento, ha sido la principal dificultad en este sistema.¹¹ Por otro lado, se han desarrollado diversas estrategias para contrarrestar dicha desventaja, como la bioingeniería de los sistemas de secreción que existen naturalmente en *E. coli*; el uso de proteínas transportadoras; el empleo de mutantes de la membrana celular y la co-expresión de proteínas promotoras de lisis.¹²

Otro de los problemas que se presenta en los sistemas bacterianos, es la acumulación de lipopolisacáridos (LPS) referidos comúnmente como endotoxinas, las cuales son pirogénicas en humanos y mamíferos.¹³ Por otra parte, la modificación de la temperatura de crecimiento, la posición de etiquetas proteínicas, la optimización de codones y de promotores; pueden incrementar el rendimiento de producción de proteínas heterólogas.¹⁴

En este entendido, Pacheco y colaboradores (2012), han demostrado que la inclusión de etiquetas N-terminales grandes, puede mejorar y promover la solubilidad de las proteínas heterólogas hasta en un 77%; lo que revierte la formación de cuerpos de inclusión cuando se inducen altos niveles de expresión de proteína heteróloga en *E. coli*.¹⁵

En este orden de ideas, es posible incrementar la producción si las proteínas recombinantes se dirigen hacia el periplasma, ya que es más fácil recuperar proteínas en este espacio que a partir de lisados celulares; más importante aún, en el ambiente oxidante del periplasma se promueve la formación de puentes disulfuro.¹⁶

Por lo tanto, las proteínas que poseen enlaces disulfuro como los fragmentos de anticuerpo y diversas hormonas peptídicas, son producidas en el periplasma para facilitar el plegamiento de las mismas en sus conformaciones nativas¹⁷ (de Marco, 2012).

Para dirigir las proteínas hacia el periplasma, es necesario equiparlas con una señal N-terminal, para que puedan atravesar la membrana citoplasmática a través del conductor de proteínas sec-translocón.

Sin embargo, la producción de proteínas heterólogas secretorias puede resultar tóxica afectando la producción en la bacteria.¹⁸

Recientemente Schlegel y colaboradores (2013), observaron que la producción de proteína recombinante en altos niveles satura la capacidad del conductor sec-translocón, debido a que se obstruye la translocación de las proteínas endógenas de secreción, lo que genera problemas de plegamiento y agregación en el citoplasma (formación de cuerpos de inclusión). Por otro lado, la regulación de la expresión génica a niveles óptimos, puede reducir la saturación de la función basal del conductor sec-translocón.¹⁹

Optimizando la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. La producción de proteínas recombinantes tanto en bacterias como en eucariotas requiere de la optimización de la secuencia del gen heterólogo. El reemplazo de codones dentro del gen heterólogo con sinónimos usados preferencialmente en el organismo huésped (optimización de codones), y la manipulación de la secuencia de nucleótidos de la región correspondiente al inicio de la traducción; pueden tener un efecto directo sobre la producción de proteínas recombinantes.²⁰

Por otra parte, estructuras secundarias de mRNA, sitios de corte de RNasas, así como sitios de unión a ribosoma, han sido introducidos en los vectores de expresión con el objetivo de incrementar la estabilidad del mRNA, mejorando la terminación de la transcripción y la eficiencia traduccional.²¹

Con base en lo anterior, la selección adecuada del vector de expresión y la optimización del uso de codones, son dos aspectos esenciales para asegurar la acumulación de la proteína de interés a niveles apreciables.²² Sin embargo, por sí sola esta estrategia de optimización no aborda los problemas inherentes al plegamiento y la solubilidad de las proteínas recombinantes producidas en bacterias; por lo que ha sido necesario implementar nuevas estrategias que solucionen las limitantes del sistema de expresión.

Se ha reportado que al fusionar la proteína de interés junto con otra proteína auxiliar, como la proteína de unión a maltosa (MBP) o la proteína glutatión S transferasa (GST), puede repercutir en el plegamiento adecuado de la proteína al actuar como chaperonas.^{23,24}

Ingeniería del mRNA para mejorar la estabilidad y la eficiencia traduccional. La vida media del mRNA en las bacterias es más corta que en eucariotas, lo que hace que sea un factor limitante para la translocación y por consiguiente, para la síntesis de proteínas, esto se debe principalmente a la actividad de la enzima RNasa E que cataliza la escisión de los transcritos de mRNA. Interesantemente, se ha reportado que mutaciones en el gen que codifica para esta proteína (alelo *rne13f*) puede disminuir su actividad, confiriendo mayor estabilidad al mRNA y por consiguiente, aumentar los niveles de expresión de proteína.²⁵

Expresión de proteínas con puentes disulfuro. El citoplasma de *E. coli* es generalmente un ambiente reducido, que excluye la formación de enlaces disulfuro mediante la acción del sistema enzimático tioredoxina-glutation.²⁶ En adición, las proteínas con enlaces disulfuro normalmente necesitan ser exportadas al periplasma. Una vez en el periplasma, la formación de enlaces disulfuro y la isomerización es catalizada por el sistema enzimático Dsb. Por otro lado, se ha demostrado que la coexpresión de las enzimas cisteína oxidasa DsbA, disulfuro isomerasa DsbC, o la combinación de enzimas Dsb; puede mejorar la expresión de proteínas recombinantes.²⁷

Producción de glicoproteínas en *E. coli*. Hasta hace poco se pensaba que la modificación post-traduccional de glicosilación de proteínas podía ser efectuada por eucariotas. Sin embargo, en 2002 fue descubierta la bacteria enteropatógena *Campylobacter jejuni*, que tiene la capacidad de efectuar la N-glicosilación. Por otra parte, se ha observado que la transferencia del gen *pgl* permite desarrollar cepas de *E. coli* capaces de realizar N-glicosilación de las proteínas de *C. jejuni* AcrA y PEB3.²⁸

Acetilación de proteínas. En eucariotas, la mayoría de las proteínas son acetiladas en el grupo alfa-amino del aminoácido N-terminal o en el grupo épsilon-amino de las lisinas internas. De manera general, la acetilación N-terminal es efectuada por la enzima N- α -acetiltransferasa (Nat) de manera cotranslacional en el ribosoma.²⁹ Por otro lado, esta modificación post-traduccional raramente se encuentra en bacterias. Sin embargo, Fang y colaboradores (2009), demostraron

que la sobre expresión del gen *RimJ* que codifica para la N- α -acetiltransferasa, es suficiente para producir timosina alfa 1 completamente acetilada en *E. coli*.³⁰

Ingeniería genómica. Una de las consecuencias fenotípicas más usuales ocasionadas por la expresión de proteínas recombinantes, es el retardo en el crecimiento o el arresto completo del mismo en el organismo huésped luego de efectuar la inducción o la sobreexpresión del gen heterólogo.³¹

A partir de lo anterior, se han propuesto estrategias de ingeniería genómica, las cuales pueden tener un impacto global en vías celulares y fisiológicas. En este tenor de ideas, es posible ajustar la maquinaria transcripcional para reprogramar el proceso de transcripción mediante mutagénesis aleatoria de componentes seleccionados de la maquinaria transcripcional como el factor sigma (σ^{70}), la subunidad alfa de la RNA polimerasa de *E. coli*, o el factor de transcripción de unión a TATA (tbp) Spt15p.³²

De igual forma, Park y colaboradores, reportaron que los dedos de Zinc, los cuales son proteínas de unión a DNA altamente específicos, pueden ensamblarse de manera modular a otras subunidades proteínicas como activadores o represores. Dichas fusiones pueden generar diversos fenotipos, como tolerancia a bajas y altas temperaturas, resistencia a fármacos, tolerancia osmótica entre otros. Por lo anterior, los dedos de zinc son una buena estrategia para mejorar la producción de proteínas recombinantes.³³

Regulación de la transcripción y uso de promotores. Las condiciones más favorables para la producción de proteínas recombinantes varían con el producto génico. Es decir, un sistema que es óptimo para producir una proteína, puede ser no funcional para la producción de otra. A parte de las condiciones de temperatura e inducción, la elección del promotor adecuado, la cepa bacteriana y la solubilidad de la proteína de interés, pueden afectar en gran medida la producción final y la solubilidad de la proteína recombinante.³⁴

Los promotores usados comúnmente en *E. coli* incluyen al promotor T7, que proviene originalmente del bacteriófago T7. De igual forma, el promotor Lac de *E. coli*, así como también el promotor sintético *trc*, derivado de los promotores de *E. coli* *trp* y *LacUV5*.³⁵ La fuerza de los diferentes promotores,

es determinada por la frecuencia relativa de la iniciación de la transcripción. Esta es principalmente afectada por la afinidad entre la secuencia del promotor y la RNA polimerasa.³⁶

Particularmente, la T7 RNA polimerasa es muy selectiva y eficiente, lo que permite alcanzar altos niveles de transcripción y elongación.

A continuación, se muestra en la **Tabla 2** los principales promotores empleados en la producción de proteínas heterólogas en bacterias.

2. SISTEMAS BACTERIANOS MÁS EMPLEADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A pesar de que *E. coli* es el sistema más empleado para la producción de proteínas recombinantes, en términos genéticos no es un sistema completamente óptimo. Esto se debe a varios factores como el mantenimiento de las cepas basado en antibióticos, inductores químicos no deseables para la expresión genética, ausencia de modificaciones post-traduccionales (incluyendo la incapacidad de formar puentes disulfuro); bajos niveles de secreción, agregación de proteínas, digestión proteolítica y contaminación con endotoxinas.⁴⁴

Por otro lado, hay otros sistemas bacterianos diferentes de *E. coli* que están siendo empleados como alternativas sustentables, muchas de ellas provenientes de las industrias de alimentos (lactobacilos), que además son considerados como microorganismos seguros (GRAS).⁴⁵

En este entendido, ha sido posible mejorar la solubilidad en bacterias halófilas, la secreción en bacterias ácido lácticas y de manera general en bacterias Gram positivas libres de endotoxinas.⁴⁴ Los sistemas bacterianos más empleados como alternativas diferentes, se mencionan a continuación:

Caulobacter crescentus. Simón y colaboradores (2001), reportaron una vacuna subunitaria contra el virus IHNV (Virus Infeccioso de Necrosis Hematopoyética) producidas en *C. crescentus*. La vacuna subunitaria fue obtenida con base a diferentes arreglos basados en la fusión de 184 aminoácidos del segmento de la glicoproteína del virus IHNV con la proteína de membrana S de *C. crescentus*. El grupo de investigación aprovechó la facilidad de purificación de la proteína en el sistema utilizado, y logró determinar que el arreglo más efectivo para inmunizar a los animales de prueba, fue a través de la fusión de los 184 aminoácidos C-terminal del segmento de la glicoproteína con un segmento de la proteína S de *C. crescentus*; logrando niveles de supervivencia del 26% al 34%.⁴⁶

Por otro lado, se ha demostrado que el sistema de secreción S (*RsaA*) de *C. crescentus* ofrece un modelo atractivo para la producción de biocatalizadores. Esto fue gracias a un estudio en el que se fusionó la proteína beta 1,4-glicanasa (Cex) de la bacteria celulolítica *Cellulomonas fimi* con la región C-terminal de RsaA; resultando en la producción de

Tabla 2. Promotores usados en la producción de proteínas recombinantes.

| Sistema de expresión | Inducción (intervalo) | Nivel de expresión | Características | Referencia |
|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|---|------------|
| Promotor lac | Adición de IPTG 0,2 mM | Bajo | Expresión baja, regulación de genes a bajos niveles intracelulares | 37 |
| Promotor trc y tac | Adición de IPTG 0,2 mM | Moderadamente alto | Mayor nivel de expresión, menor que T7 | 38 |
| RNA pol T7 | Adición de IPTG 0,2 mM | Muy alto | Utiliza la T7 RNA pol, altos niveles de sobre expresión | 39 |
| Promotor del fago pL | Cambio de temperatura 40°C - 42°C | Nivel medio-alto | Regulación estrecha, independiente de la cepa, inductor barato | 40 |
| Promotor araBAD (P _{BAD}) | L-ramnosa 0,2% | De bajo a alto nivel | Estrecha regulación, baja actividad basal, inductor costoso | 41 |
| Promotor/operador tetA | Anhidrotetraciclina 200 µg/L | Nivel medio-alto | Regulación estrecha, independiente del estado metabólico, bajo nivel basal. | 42 |
| Promotor rhaP _{BAD} | L-ramnosa 0,2% | De bajo a alto nivel | Estrecha regulación, baja actividad basal, inductor costoso | 43 |

altos niveles de proteína recombinante Cex/RsaA (76 mg/L de peso seco).⁴⁷

Rodhobacter sphaeroides. Esta bacteria fototrófica ha sido empleada para obtener altos niveles de producción de proteínas membranales, con el fin de obtener cantidades de proteína suficientes para realizar estudios de rayos X y cristalografía de proteínas.⁴⁸

Pseudoalteromonas haloplanktis. Un nuevo sistema de expresión regulado ha sido desarrollado para la producción de proteínas terapéuticas inducido por l-malato en medio de cultivo. En condiciones de inducción, pueden obtenerse altos niveles de proteína recombinante soluble a escala pequeña; sin embargo, el rendimiento no es óptimo al momento de escalarse. Por otro lado, la utilización de aminoácidos ramificados (L, I, V) en el medio de cultivo han aumentado la producción hasta siete veces más que en condiciones normales. Dichas observaciones fueron obtenidas al incrementar la producción heteróloga de fragmentos de anticuerpo 3H6 Fab (0,9 mg de peso seco).⁴⁹

Por su parte, Vigentini y colaboradores (2006), demostraron que las bajas temperaturas pueden facilitar el plegamiento adecuado de proteínas heterólogas que se acumulan en forma insoluble como cuerpos de inclusión cuando se producen en *E. coli*. En este orden de ideas, expresaron de manera heteróloga el gen que codifica la forma madura de la proteína de crecimiento de nervio humano (hNGF) en la bacteria antártica *P. haloplanktis* TAC125 a 4°C (7,5 mg de peso seco). Los experimentos de *western blot*, demostraron que la proteína fue producida en forma soluble y fue translocada hacia el espacio periplasmático.⁵⁰

Pseudomonas fluorescens. Este sistema fue empleado en la pasada década para producir la proteína humana factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) como proteína recombinante soluble. Dicha proteína fue optimizada y clonada en varios vectores de expresión dirigidos al periplasma. De las 96 cepas generadas, una cuyo marcador de selección (resistencia a antibiótico) fue insertado en la posición del gen *pfal*, generó un rendimiento de 99% de Met-GCSF recombinante. Con base en los resultados, se generó una cepa genéticamente con una deleción completa del mismo gen *pfal*; a partir de la cual se obtuvo un rendimiento de 350 mg/L a una escala de fermentación de 1 L.⁵¹

Pseudomona putida. La cepa KT2440 de *P. putida* ha resultado ser una cepa versátil y eficiente para la expresión de proteínas heterólogas, particularmente de fragmentos de anticuerpo recombinante. Recientemente, se ha empleado dicha cepa para expresar exitosamente fragmentos de la proteína scFvs fusionada con la proteína C-reactiva humana (mucina 1). La proteína recombinante fue dirigida al periplasma y recolectada en el orden de 3,5 mg/L de proteína bioactiva soluble. En adición, la optimización de codones mejora la producción y la bioactividad de la proteína.⁵²

Por otra parte, Krzeslak y colaboradores, lograron producir de manera heteróloga la enzima bacteriana penicilina G acilasa (PGA) de *E. coli* en *Pseudomonas aeruginosa*. Esta enzima de interés industrial sobre producida en *E. coli* conlleva a la acumulación en el citoplasma, provocando toxicidad celular. Para solucionar dicho problema, fusionaron la proteína PGA con péptidos señales Sec o Tat de *Pseudomonas*, logrando que la proteína quimérica TatProPGA se acumulara en el periplasma.⁵³

Streptomyces lividans. Uno de los aspectos críticos en la producción de proteínas recombinantes es la identificación y la purificación. Ayala y colaboradores (2013), emplearon una etiqueta de estreptavidina (strep-tag II) para poder purificar antígenos recombinantes bioactivos de *Mycobacterium tuberculosis* en *Streptomyces lividans*. Esto debido a que la etiqueta 6His-tag es incompatible con el sistema secretorio de *Streptomyces*. De esta manera, se expresaron los genes *ag85A* (codifica la micoliltransferasa Ag85A) y *Rv2626c* (codifica la proteína de respuesta a hipoxia 1) equipándolos con la etiqueta Strep-tag II amino terminal. Ambas proteínas fueron reportadas como bioactivas y capaces de desencadenar una respuesta inmune en pacientes con tuberculosis.⁵⁴

Mycobacterium smegmatis. La generación de nuevas vacunas recombinantes es uno de los principales objetivos de la producción de proteínas recombinantes. Recientemente, se ha realizado un trabajo en el que se logró producir una proteína quimérica fusionando la secuencia que codifica la proteína de choque térmico 65 (Hsp65) con interleucina 2 (IL-2). Para dicho fin, se transformó a *M. smegmatis* mediante electroporación, verificando la presencia del transgen por

PCR y analizando la bioactividad de la proteína mediante ELISA. Al inocular a ratones experimentales, fue posible determinar que la proteína recombinante incrementaba notablemente la presencia de linfocitos esplénicos y además, era capaz de inducir un aumento de los niveles de IFN- γ e IL-2.⁵⁵

Bacillus subtilis. Esta bacteria es un modelo muy atractivo para la expresión de genes heterólogos. Esto se debe a que *B. subtilis* posee promotores fuertes que impactan directamente en la expresión génica. Yang y colaboradores (2013), aislaron mediante una trampa de promotor al promotor fuerte pShuttle-09, el cual reportaron podía inducir hasta 8 veces más la expresión de β -galactosidasa que el promotor P43 de esa misma. De esta manera, es posible construir nuevos vectores que permitan incrementar los niveles de producción de proteína heteróloga, adaptándolos con las etiquetas adecuadas para dirigir las proteínas al periplasma y facilitar su recuperación.⁵⁶

Lactobacillus casei. El Virus de Necrosis Pancreático (IPNV) es uno de los principales agentes virales que infectan a truchas juveniles, salmones salvajes y de cultivo, ocasionando altas tasas de mortalidad. En atención a dicha problemática, Zhao y colaboradores (2012), diseñaron un gen quimérico VP2-VP3 que insertaron mediante los vectores pPG1 y pPG2 en *L. casei*. Las proteínas quiméricas producidas VP2-VP3 pueden inducir suero IgM específico para IPNV, con lo cual fue posible demostrar la bioactividad de la proteína recombinante, que además indujo actividad neutralizante en las truchas inoculadas. A partir de lo anterior, fue posible generar una vacuna funcional contra el virus IPNV.⁵⁷

Lactobacillus reuteri. Eom y colaboradores (2010), utilizaron a *L. reuteri* para producir una bacteriocina heteróloga. Para dicho fin, sobre expresaron el gen PA1 fusionado con el promotor de un gen de alfa amilasa de una cepa de bifidobacteria. A partir de la transformación de *L. reuteri* (con el plásmido pLR5cat_PSAB), fue posible inducir la expresión de la proteína, la cual resultó tener actividad antibacteriana sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*.⁵⁸

Lactobacillus gasseri. Damelin y colaboradores (2010), demostraron el potencial de *L. gasseri* como una nue-

va herramienta para la prevención del VIH a través de membranas mucosas. Las microfloras vaginales se componen típicamente de especies de *Lactobacillus* bacilos Gram positivos. En este entendido, se planteó una nueva estrategia basada en equipar a *Lactobacillus* con correceptores heterólogos antagonistas de VIH, quimosinas CCL5 y CCL3; con lo que se evitaría la infección por parte del virus en la mucosa vaginal.⁵⁹

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Aunque muchos organismos y sistemas de expresión están siendo empleados para la producción de proteínas recombinantes, el sistema de expresión en bacterias, particularmente en *E. coli* sigue siendo punta de lanza.

El crecimiento rápido y los niveles de producción de proteína, combinados con el amplio conocimiento acerca del sistema y las herramientas genéticas existentes, hacen de la plataforma de *E. coli* y otros modelos bacterianos el sistema más versátil. En adición, la disponibilidad de nuevos promotores ha expandido el repertorio de genes heterólogos; además, se siguen desarrollando nuevas estrategias que han abierto nuevas posibilidades.

Sin embargo, como se ha expuesto anteriormente, el uso de bacterias para la producción de proteínas recombinantes implica también diferentes problemas inherentes al sistema de expresión. El primero de ellos está relacionado con la obtención de niveles óptimos de proteínas correctamente plegadas por la manipulación molecular de la maquinaria de proteínas chaperonas.

Esto puede ser solucionado con la co-expresión de múltiples genes que codifiquen para proteínas chaperonas, o bien, por métodos que activen moléculas que funcionen como chaperonas en la célula. El segundo inconveniente, es la secreción de la proteína al medio de crecimiento de tal forma que pueda ser un sistema de secreción robusto.

Actualmente, hay varios sistemas que facilitan la secreción de proteínas recombinantes, muchos de ellos están basados en la utilización de péptidos señales, fusión de proteínas coadyuvantes y uso de agentes permeabilizantes. En este orden de ideas, sería bastante interesante investigar nuevos métodos para mejorar el plegamiento y la secreción de proteínas

heterólogas, que permitan disminuir la degradación de las proteínas al ser secretadas al periplasma, y con esto, incrementar los niveles de producción de proteínas heterólogas bioactivas y funcionales.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses para la publicación de este manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Graumann K, Premstaller A.** Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J.* 2006; 1(2):164-86.
2. **Pavlou AK, Reichert JM.** Recombinant protein therapeutics success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol* 2004; 22:1513-9.
3. **Datamonitor.** Recombinant therapeutic proteins: 2010; Delivering a \$200 billion mature market by 2020.
4. **Smales CM.** Therapeutic proteins: methods and protocols. Humana Press. 2008.
5. **Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT.** Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol.* 2004; 267:15-52.
6. **Sahdev S, Khattar SK, Saini KS.** Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2008; 307:249-64.
7. **Terpe K.** Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2006; 72:211-22.
8. **Georgiou G, Segatori L.** Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Curr Opin Biotechnol.* 2005; 16:538-45.
9. **Sorensen HP, Mortensen KK.** Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology.* 2005; 115: 113-28.
10. **Demain AL, Vaishnav P.** Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances.* 2009; 27:297-306.
11. **Chen R.** Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology Advances.* 2012; 30:1102-7.
12. **Ni Y, Chen R.** Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 2009; 31:1661-70.
13. **Petsch D, Anspach FB.** Endotoxin removal from protein solutions. *J. Biotechnol.* 2000; 76:97-119.
14. **Bakke I, Berg L, Aune TE, Brautaset T, Sletta H, Tondervik A, et al.** Random mutagenesis of the PM promoter as a powerful strategy for improvement of recombinant-gene expression. *Appl Environ Microbiol.* 2009; Apr; 75(7):2002-11.
15. **Pacheco B, Crombet L, Loppnau P, Cossar D.** A screening strategy for heterologous protein expression in *Escherichia coli* with the highest return of investment. *Protein Expression and Purification*, 2012; Vol. 81, p.33-41.
16. **Denoncin K, Collet JF.** Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid Redox Signal.* 2013 Jul 1;19(1):63-71. doi: 10.1089/ars.2012.4864. Epub 2012; Oct 2. Review.
17. **de Marco A.** Recent contributions in the field of the recombinant expression of disulfide bonded proteins in bacteria. *Microbial Cell Fact.* 2012; 11:129.
18. **du Plessis DJ, Nouwen N, Driessen AJ.** The Sec translocase. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808(3): 851-65.
19. **Schlegel S, Rujas E, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Lui-rink J, de Gier JW.** Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microbial Cell Factories.* 2013; 12:24.
20. **Burgess-Brown NA, Sharma S, Sobott F, Loenarz C, Oppermann U, Gileadi O.** Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expr Purif.* 2008; 59(1):94-102.
21. **Pfleger BF, Pitera DJ, Smolke CD, Keasling JD.** Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes. *Nat Biotechnol.* 2006; 24(8):1027-32.
22. **Kudla G, Murray AW, Tollervey D, Plotkin J.** Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science.* 2009; 324(5924):255-8.
23. **de Marco A.** Protocol for preparing proteins with improved solubility by co-expressing with molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Nat Protoc.* 2007; 2(10):2632-9.
24. **Cho HJ, Lee Y, Chang RS, Hahm MS, Kim MK, Kim YB, et al.** Maltose binding protein facilitates high-level expression and functional purification of the chemokines RANTES and SDF-1 alpha from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2008; 60(1):37-45.
25. **López PJ, Marchand I, Joyce SA, Dreyfus M.** The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing *in vivo*. *Mol Microbiol.* 2000; 33(1):188-99.

26. **Kadokura H, Katzen F, Beckwith J.** Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72:111-35.
27. **de Marco A.** Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact.* 2009; 8:26.
28. **Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, et al.** N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science.* 2002; 298(5599):1790-3.
29. **Gautschi M, Just S, Mun A, Ross S, Rucknagel P, Dubaquié Y, et al.** The yeast N(alpha)-acetyltransferase NatA is quantitatively anchored to the ribosome and interacts with nascent polypeptides. *Mol Cell Biol.* 2012; 23(20):7403-14.
30. **Fang H, Zhang X, Shen L, Si X, Ren Y, Dai H, et al.** RimJ is responsible for N(alpha)-acetylation of thymosin alpha1 in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009; 84(1):99-104.
31. **Tomohiro M, Georgios S, George G.** Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories.* 2011; 10:32.
32. **Klein-Marcuschamer D, Santos CN, Yu H, Stephanopoulos G.** Mutagenesis of the bacterial RNA polymerase alpha subunit for improvement of complex phenotypes. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(9):2705-11.
33. **Park KS, Jang YS, Lee H, Kim JS.** Phenotypic alteration and target gene identification using combinatorial libraries of zinc finger proteins in prokaryotic cells. *J Bacteriol.* 2005; 187(15):5496-9.
34. **Tegel H, Ottosson J, Hober S.** Enhancing the protein production levels in *Escherichia coli* with a strong promoter. *FEBS Journal* 2011; 278: 729-39.
35. **Tegel H, Tourle S, Ottosson J, Persson A.** Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). *Protein Expr Purif.* 2010; 69,159-67.
36. **Welch M, Govindarajan S, Ness JE, Villalobos A, Gurney A, Minshull J, et al.** Design parameters to control synthetic gene expression in *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 4, e7002. 2009.
37. **Becker NA, Peters JP, Maher LJ 3rd, Lionberger TA.** Mechanism of promoter repression by Lac repressor-DNA loops. *Nucleic Acids Res.* 2013; Jan 7; 41(1):156-66.
38. **Yu H, Ma Q, Lin J, Sun YF, Zheng F.** Expression and purification of GST-FHL2 fusion protein. *Genet Mol Res.* 2013; 12(4):6372-8.
39. **Kimberly J, Durniak, Scott Bailey, Thomas A, Steitz.** The Structure of a Transcribing T7 RNA Polymerase in Transition from Initiation to Elongation. *Science.* 2008; Vol. 322 no. 5901 pp. 553-7.
40. **Equbal MJ, Srivastava P, Agarwal GP, Deb JK.** Novel expression system for *Corynebacterium acetoacidophilum* and *Escherichia coli* based on the T7 RNA polymerase-dependent promoter. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(17): 7755-66.
41. **Kogenaru M, Tans S.** An improved *Escherichia coli* strain to host gene regulatory networks involving both the AraC and LacI inducible transcription factors. *Journal of Biological Engineering.* 2014; 8:2
42. **Xin-tian Li, Lynn C, Thomason, James A.** Sawitzke, Nina Costantino, and Donald L. Court (2013). Positive and negative selection using the *tetA-sacB* cassette: recombineering and P1 transduction in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 2013, Vol. 41, No. 22.
43. **Wegerer A, Sun T, Altenbuchner J.** Optimization of an *E. coli* L-rhamnose- inducible expression vector: test of various genetic module combinations. *BMC Biotechnology.* 2008; 8:2.
44. **Ferrer-Miralles N, Villaverde A.** Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microbial Cell Factories.* 2013; 12:113.
45. **Arendt EK, Moroni A, Zannini E.** Medical nutrition therapy: use of sourdough lactic acid bacteria as a cell factory for delivering functional biomolecules and food ingredients in gluten free bread. *Microb Cell Fact.* 2011; 10(1):S15.
46. **Simon B, Nomellini J, Chiou P, Bingle W, Thornton J, Smit J, et al.** Recombinant vaccines against infectious hematopoietic necrosis virus: production by the *Caulobacter crescentus* S-layer protein secretion system and evaluation in laboratory trials. *Dis Aquat Organ.* 2001; 44:17-27.
47. **Duncan G, Tarling CA, Bingle WH, Nomellini JF, Yamage M, Dorocicz IR, et al.** Evaluation of a new system for developing particulate enzymes based on the surface (S)-layer protein (RsaA) of *Caulobacter crescentus*: fusion with the beta-1,4-glycanase (Cex) from the cellulolytic bacterium *Cellulomonas fimi* yields a robust, catalytically active product. *Appl Biochem Biotechnol.* 2005; 127:95-110.
48. **Laible PD, Scott HN, Henry L, Hanson DK.** Towards higher-throughput membrane protein production for structural genomics initiatives. *J Struct Funct Genomics.* 2004; 5:167-72.
49. **Giuliani M, Parrilli E, Ferrer P, Baumann K, Marino C, Tutino ML.** Process optimization for recombinant protein production in the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Process Biochem.* 2011; 46:953-9.
50. **Vigentini I, Merico A, Tutino ML, Compagno C, Marino G.** Optimization of recombinant human nerve growth factor production in the psychrophilic *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *J Biotechnol.* 2006; 127:141-50.

51. Jin H, Cantin GT, Maki S, Chew LC, Resnick SM, Ngai J, et al. Soluble periplasmic production of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expr Purif*. 2011; 78:69-77.
52. Dammeyer T, Steinwand M, Kruger SC, Dubel S, Hust M, Timmis KN. Efficient production of soluble recombinant single chain Fv fragments by a *Pseudomonas putida* strain KT2440 cell factory. *Microb Cell Fact*. 2011; 10:11.
53. Krzeslak J, Braun P, Voulhoux R, Cool RH, Quax WJ. Heterologous production of *Escherichia coli* penicillin G acylase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biotechnol*. 2009; 142:250-8.
54. Ayala JC, Pimienta E, Rodríguez C, Anné J, Vallín C, Milanés MT, et al. Use of Strep-tag II for rapid detection and purification of *Mycobacterium tuberculosis* recombinant antigens secreted by *Streptomyces lividans*. *J Microbiol Methods*. 2013; 94:192-8.
55. Guo XQ, Wei YM, Yu B. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing Hsp65-hIL-2 fusion protein and its influence on lymphocyte function in mice. *Asian Pac J Trop Med*. 2012; 5:347-51.
56. Yang M, Zhang W, Ji S, Cao P, Chen Y, Zhao X. Generation of an artificial double promoter for protein expression in *Bacillus subtilis* through a promoter trap system. *PLoS One*. 8:e56321. 2013.
57. Zhao LL, Liu M, Ge JW, Qiao XY, Li YJ, Liu DQ. Expression of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) VP2-VP3 fusion protein in *Lactobacillus casei* and immunogenicity in rainbow trouts. *Vaccine*. 2012; 30:1823-9.
58. Eom JE, Moon SK, Moon GS. Heterologous production of pediocin PA-1 in *Lactobacillus reuteri*. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20:1215-8.
59. Damelin LH, Mavri-Damelin D, Klaenhammer TR, Tiemessen CT. Plasmid transduction using bacteriophage Phi(adh) for expression of CC chemokines by *Lactobacillus gasseri* ADH. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76:3878-85.