



EFFECTO DE LA OPTIMIZACION DEL USO DE CODONES SOBRE EL NIVEL DE EXPRESION Y CONDICIONES DE CULTIVO EN *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE.

Néstor O. Pérez. Probiomed SA de CV, Departamento de Investigación y Desarrollo, Tenancingo Edo. De México, C.P. 52400. Correo Electrónico: nestor.perez@probiomed.com.mx.

Palabras clave: uso de codones, expresión de proteínas, fermentación

Escherichia coli es la primera opción para expresar una proteína heteróloga, debido a la facilidad de su manipulación y la cantidad de proteína que puede obtenerse. Esta bacteria esta caracterizada genetica y fisiológicamente, y por lo general la propiedades de expresión observadas en matraz son comparables a las observadas en fermentadores.

Aunque *E. coli* ha demostrado su capacidad de expresar una gran cantidad de proteínas heterólogas, no todas las proteínas se expresan fácilmente. Varios aspectos de cómo están codificados los genes heterólogos pueden llevar a bajos niveles de expresión. Una de las principales causas de esto es el uso preferencial de codones. *E. coli* y de hecho todas las células usan solo un subset de los 61 codones disponibles para la producción de los mRNA. Esto significa que determinados organismos usan codones preferenciales en las proteínas que expresan en gran cantidad, mientras que utilizan codones de uso menor en las proteínas que casi no expresan. El uso de codones del humano y de *E. coli* resultan ser diferentes y eso ha causado que muchas proteínas de humano no puedan ser expresadas directamente (mediante clonación del cDNA) en *E. coli*. La traducción de codones de uso poco frecuente a altos niveles, produce un efecto estrés similar al de limitación de nutrientes, debido a que la fosa metabólica de tRNA es muy pobre, impidiendo la expresión de la proteína heteróloga.

Además del uso de codones, es necesario tomar en cuenta una gran variedad de elementos genéticos necesarios para que se lleve a cabo el inicio y final de la transcripción. Estos elementos incluyen, un promotor de la transcripción, un sitio de unión a ribosoma, codones de inicio y paro, y una secuencia terminadora de la transcripción. Además de la secuencia codificante del gen de interés.

En este trabajo evaluamos el efecto de la optimización de codones sobre el nivel de expresión de la proteína recombinante y como se pueden modificar las condiciones de cultivo para obtener el mayor rendimiento posible.

Para la optimización del uso de codones se evitó el uso de los codones ATA (Isoleucina), CTA (Leucina), CCC (Prolina), CGA, CGG, AGA, AGG (Arginina) y GGA (Glicina). La secuencia resultante fue optimizada para evitar la formación de estructuras secundaria que pudiera afectar los niveles de transcripción. Donde se encontraron lazos con ΔG negativa, se deshicieron modificando el uso de codones, pero sin introducir ninguno de los mencionados arriba. El diseño del gen incluyó los sitios de corte para su clonación, se adicionó un RBS y la SD del fago T7, dos codones de paro para la traducción y una secuencia terminadora de la transcripción para hacer más eficiente y estable al RNAm.

La clona sin uso optimizado de codones muestra niveles de expresión muy bajos. La clona solo puede producir niveles detectables de la proteína recombinante cuando se cultiva a baja densidad celular en un fermentador (15 OD₆₅₀). La nueva clona puede soportar la producción de la proteína recombinante en condiciones de alta densidad celular (50 OD₆₅₀). El uso preferencial de codones permite la expresión de proteínas heterólogas eficientemente, permitiendo el diseño de estrategias de cultivo que busquen la expresión de la proteína recombinante en los máximos niveles de expresión.

Durante la presentación se discutirá como el éxito para la obtención de un producto recombinante depende de un diseño integral. La biología molecular es el soporte que sostiene todos los bioprocesos. El diseño de una clona altamente productora, permitirá diseñar estrategias de cultivo y purificación que busquen maximizar el rendimiento global del proceso.