



## RESPUESTAS TRANSCRIPCIONALES DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE TERMO-INDUCIDA EN UN SISTEMA DE ESCALAMIENTO DESCENDENTE

Luis Caspeta, Noemí Flores, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar y Octavio Tonatiuh Ramírez.  
Av. Universidad #2001, Col. Chamilpa C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos. tonatiuh@ibt.unam.mx

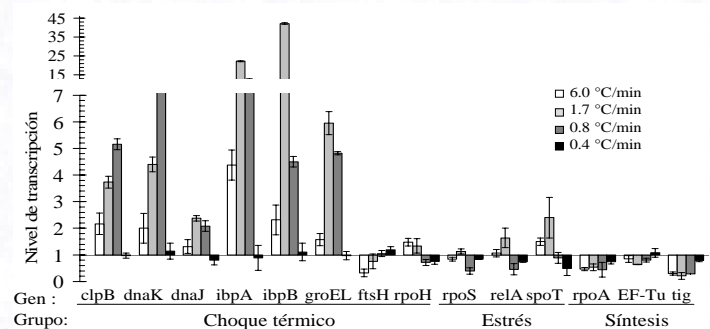
*Palabras clave: Respuesta transcripcional, proteína recombinante, termo-inducción*

**Introducción.** El aumento de temperatura es una estrategia muy útil para inducir la expresión de proteína recombinante en cultivos de alta densidad de *E. coli*. Sin embargo, el aumento de la temperatura favorece la respuesta de choque térmico, caracterizada por la sobre expresión de proteínas que pueden contaminar o degradar el producto de interés. La sobre síntesis de proteínas causa una carga metabólica que puede inducir la respuesta estricta, caracterizada por la disminución en la capacidad transcripcional y traduccional de las bacterias y es modulada por las concentraciones de ppGpp sintetizado por RelA y SpoT. Mediante el análisis de régimen, que consistió en comparar las velocidades de transferencia de calor de biorreactores de varios volúmenes y las de expresión de genes propios de estas respuestas, representados por sus tiempos característicos, encontramos que bajo las tasas de aumento de temperatura de biorreactores mayores a 0.1 m<sup>3</sup> es posible que las respuestas de choque térmico y estricta se induzcan antes de alcanzar la temperatura óptima de inducción. En este trabajo se realizó un estudio de escalamiento descendente en donde se evaluó el efecto de la tasa de aumento de temperatura de biorreactores de varias escalas sobre la expresión de genes característicos de las respuestas de choque térmico y estricta.

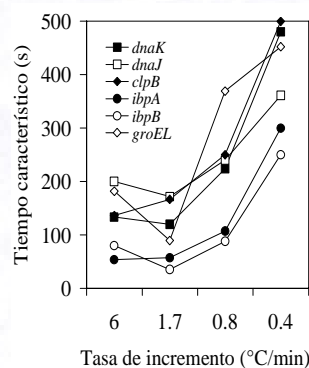
**Materiales y Métodos.** Se realizaron cultivos a alta concentración celular (55 g/L), controlados inicialmente a 30 °C. Después de alcanzar la concentración celular indicada, la temperatura se incrementó hasta 42 °C a tasas de 6, 1.7, 0.8, 0.4 °C/min, simulando escenarios de calentamiento para biorreactores de (0.01, 5, 20 y 100 m<sup>3</sup>). Durante el calentamiento se tomaron muestras exactamente a los 38 y 42 °C para determinar los niveles de mRNA de 15 genes.

**Resultados y discusión.** A tasas de 6, 1.7 y 0.8 °C/min, cuando se alcanzaron los 42 °C, los niveles de transcripción relativos a 30 °C de los genes de choque térmico y de la maquinaria biosintética (transcripcional y traduccional) aumentaron y disminuyeron, respectivamente (**Figura 1**). Sin embargo, la magnitud de estos cambios no depende del tiempo de permanencia de las células a temperaturas que propician la inducción de las respuestas (33 °C en adelante). En otras palabras, se esperaban respuestas mas extensas entre menor fuera la velocidad de aumento de la temperatura (según datos del análisis de régimen reportados en otro trabajo). Además, inesperadamente no se observaron cambios cuando se aumentó la temperatura a 0.4 °C/min. En conjunto, los datos sugieren que las bacterias expuestas a un calentamiento rápido tienen menos posibilidades de contender con cambios rápidos en la temperatura, especialmente en el intervalo de temperaturas entre 38 – 42 °C. Las velocidades de acumulación de transcritos de los genes de choque térmico (**Figura 2**) y las de desaparición

de transcritos de los genes de síntesis, muestran una dependencia directa con la velocidad de aumento de temperatura. Esto explica las diferencias en los niveles de transcripción observados a los 42 °C. Respecto a los genes de regulación, no se observó incremento en la transcripción de *rpoH* (s32, regulador de la respuesta de choque térmico) aún cuando los niveles de los genes del regulón aumentaron dramáticamente. La caída de los niveles de transcripción de los genes de síntesis sugiere que RelA y SpoT (reguladores de la respuesta estricta) intervienen en las respuestas celulares a todas las condiciones, aún cuando sólo se incrementaron sus niveles a 6 y 1.7 °C/min.



**Figura 1** Nivel de transcripción de genes selectos de *E. coli*. Las barras corresponden al cociente entre el nivel de mRNA obtenido a 42°C y a 30°C (punto de comparación); la línea horizontal que cruza el eje-Y en uno corresponde al valor de expresión a 30 °C.



**Figura 2** Tiempos característicos de transcripción de genes de choque térmico calculados como el inverso de la velocidad de transcripción (entre 38 y 42 °C) durante el incremento de la temperatura a diferentes tasas (eje -X).

**Conclusiones.** Los resultados indican que el calentamiento lento, como ocurriría en un biorreactor de 100 m<sup>3</sup>, es más favorable para inducir la síntesis de proteína recombinante.

Los estudios microbiológicos reportados en la literatura no predicen el comportamiento dinámico encontrado en este estudio, por lo que estos resultados son útiles para el establecimiento de estrategias más racionales de escalamiento ascendente y en el diseño de protocolos novedosos de inducción por temperatura.

**Agradecimientos.** Proyecto financiado por CONACyT Proyecto 46408-Z.