

## EVALUACIÓN DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE 8 GENES NATIVOS DE *Pichia pastoris* PARA DETERMINAR LA FACTIBILIDAD DE EMPLEAR SUS PROMOTORES EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Karla Fernández-Cano, José María Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán  
Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología  
San Nicolás de los Garza, N.L., México C.P. 66455. martha.guerrero01@uanl.edu.mx

*Palabras clave: Pichia pastoris, promotores, proteínas rescombinantes*

**Introducción.** El sistema clásico de elección para la expresión de proteínas recombinantes a escalas industriales en *Pichia pastoris*, implica el uso del promotor fuerte  $P_{AOX1}$  inducible con metanol, el cual impacta directamente en el costo y control del bioproceso (1). El interés por comprender la regulación transcripcional mediada por nuevos promotores y la disponibilidad de nuevas tecnologías de secuenciación, como RNA-seq, permitieron en nuestro grupo de trabajo identificar ocho genes con promotores fuertes en condiciones limitantes de la fuente de carbono en cepas recombinantes de *P. pastoris*.

En este trabajo, se analizaron los niveles de expresión de estos ocho genes y su regulación bajo condiciones de cultivo que incluyeron como variables la fuente de carbono, temperatura y fase de crecimiento.

**Metodología.** Se realizaron cultivos con la cepa KM71pGAPFTEII a 24 y 30°C y a 30 mM de la fuente de carbono (0.5% de glucosa y 0.27% de glicerol) para evaluar la regulación de la transcripción de los ocho genes (P1-P8) y la de los genes *GAP* nativo y reportero (*FTEII* regulado por  $P_{GAP}$ ) por RT-qPCR mediante el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Las muestras de los cultivos se tomaron durante la fase de crecimiento a las 6 y 12 h, y durante la fase estacionaria a las 24 y 48 h. Se realizó un ANOVA de dos vías con prueba de Tukey para el análisis estadístico de los datos obtenidos.

**Resultados.** Los resultados mostraron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión de los 8 genes evaluados y fue dependiente de la fase de crecimiento. El 63% de los genes (P1, P2, P3, P4, P5) presentaron niveles de expresión cercanos a cero durante la fase exponencial y fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) con altos niveles de expresión durante la fase estacionaria, cuando la concentración de la fuente de carbono fue mínima o nula en el medio de cultivo. Además, los niveles de expresión del 60% de los genes de este grupo (P2, P3, P4) fue significativamente diferente con la temperatura a las 24 y 48 h cuando se empleó glicerol como fuente de carbono ( $p < 0.05$ ). Los resultados sugieren que estos 5 genes podrían presentar represión por catabolito. Este evento de represión ocurre por la presencia de glucosa en el medio

de cultivo y es mediada por represores que pertenecen a la familia Mig (2). Por otro lado, el 38% de los 8 genes evaluados (P6, P7, P8) mostraron una expresión máxima durante la fase exponencial con un comportamiento similar a los genes *GAP* nativo y *FTEII* regulado por  $P_{GAP}$ . Debido a las características del primer grupo de genes y a que el gen P2 no ha sido estudiado anteriormente, resulta de especial interés evaluar sus elementos reguladores en la producción de proteínas recombinantes. Los niveles de expresión de P2 fueron dependientes de la temperatura y fuente de carbono. En los cultivos crecidos en glicerol a 24°C, la expresión del gen P2 durante la fase estacionaria a las 48 h, fue 4.4 y 2.8 veces mayor que en los cultivos crecidos en glicerol a 30°C a las 24 y 48 h, respectivamente. Además, en los cultivos crecidos en glicerol a 24°C mostraron niveles de expresión a las 48 h 2.8 veces mayor, que en los cultivos crecidos en glucosa a 24°C a las 24 h ( $p < 0.05$ ).

**Conclusiones.** La regulación de la expresión de los diferentes genes estudiados fue dependiente de la fase de crecimiento y mostró una probable dependencia de la concentración de la fuente de carbono en el medio de cultivo. Los promotores de los genes P1, P2, P3, P4 y P5 podrían considerarse como promotores fuertes inducibles en condiciones limitantes de la fuente de carbono y sujetos a represión cuando hay un exceso de ésta. Los promotores de los genes P6, P7 y P8 mostraron características similares al promotor del gen *GAP* nativo y del  $P_{GAP}$  regulador del gen reportero *FTEII*. Debido a las características de expresión del gen P2, sus elementos reguladores podrían ser empleados en sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo al proyecto CONACYT-SEP CB-2016-01-286093. KFC agradece el apoyo del CONACYT por la beca otorgada.

### Bibliografía

1. Ahmad M *et al.* (2014) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(12):5301-5317.
2. Weinhandl K *et al.* (2014) *Microb. Cell Fact.* 13(1):5.

