



## PERFIL TRANSCRIPCIONAL Y COMPORTAMIENTO METABÓLICO DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris* MODIFICADA PARA EMPLEAR LACTOSA COMO FUENTE DE CARBONO

Mariana Sánchez-Villarreal, Mauricio Castillo-Galván, 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.guerrero@uanl.edu.mx

*Palabras clave:* *Pichia pastoris*, RNA-seq, análisis transcripcional,  $\beta$ -galactosidasa

**Introducción.** *Pichia pastoris* ha sido tradicionalmente empleada para la producción de proteínas heterólogas, sin embargo recientemente es considerada en el campo de la ingeniería metabólica para su empleo en la producción de metabolitos o biocatálisis. La lactosa es un subproducto de la industria lechera que representa un problema para su eliminación o su empleo alternativo. Con el fin de utilizar lactosa como fuente de carbono, el grupo de trabajo construyó cepas de *P. pastoris* con las secuencias *lac4* y *lac12* ( $\beta$ -galactosidasa y lactosa permeasa de *Kluyveromyces lactis*), reguladas por el promotor constitutivo GAP (cepa KM71LAC412).

En el presente trabajo, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes de KM71LAC412 frente a una cepa control (KM71pPIC9, sin las secuencias *lac4* y *lac12*) y de KM71LAC412 cultivada en dos fuentes de carbono, mediante secuenciación masiva de mRNA (RNA-seq).

**Metodología.** Se determinó la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y el rendimiento respecto al sustrato  $Y_{x/s}$  de las cepas KM71LAC412 y KM71pPIC9 cultivadas en medio mínimo con glucosa (BMGlu), lactosa (BMLac) o glicerol (BMGli) a una concentración de 30 mM. Para el análisis de la expresión diferencial, ambas cepas fueron cultivadas en BMGlu a 30°C y 250 rpm por 30 h, y KM71LAC412 fue cultivada en BMLac a las mismas condiciones. A partir de paquetes celulares de 2 mL se obtuvieron preparaciones de RNA con RIN comprendidos entre 7.9 y 9.8. Las librerías de DNAC se generaron y secuenciaron en LANGE BIO CINVESTAV, empleando la plataforma MiSeq de Illumina. Se realizó un recorte de las secuencias con FASTQ Quality Trimmer para obtener lecturas confiables. El mapeo se realizó en base a un genoma de referencia con la herramienta Tophat2 v0.6 (1) y el análisis de expresión diferencial con Cuffdiff v0.7 (1), ambos en la plataforma Galaxy. Se consideraron como expresados diferencialmente los genes con  $q$ -value < 0.05 y  $\log_2(\text{fold\_change}) > 1$  ó < -1. El análisis de enriquecimiento se realizó mediante ClueGO 2.1.6 (2), en Cytoscape 3.2.0 (3).

**Resultados.** El crecimiento de ambas cepas no presentó diferencias significativas en glucosa y glicerol, la cepa control no presentó crecimiento en lactosa. El crecimiento de KM71LAC412 no presentó diferencia significativa en los tres sustratos, con  $\mu$  respectivas de  $0.21 \pm 0.01$ ,  $0.22 \pm 0.01$  y  $0.23 \pm 0.01$  h<sup>-1</sup> en lactosa, glucosa y glicerol. Sin embargo, el  $Y_{x/s}$  para KM71LAC412 fue más alto en

glicerol (4.2 veces) y en glucosa (2.6) que en lactosa con un valor de  $0.13 \pm 0.01$  g/g en peso seco. Los valores de  $Y_{x/s}$  de KM71LAC412 en glucosa y glicerol fueron similares a los de KM71pPIC9. En los análisis de expresión diferencial se detectó la expresión de 5,434 genes. En KM71LAC412 en BMGlu se encontraron 324 genes sobre- y 299 sub-expresados diferencialmente respecto a KM71pPIC9 en BMGlu. En KM71LAC412 en BMLac se encontraron 747 genes sobre- y 544 sub-expresados diferencialmente respecto a la misma cepa en BMGlu. En la comparación entre las dos cepas en BMGlu, se observó una sobrerrepresentación significativa entre los genes sobre-expresados de los términos de ontología de genes (GO) de transporte transmembrana, de aniones y unión a coenzimas; en los sub-expresados, de peroxisoma y procesos biosintéticos de compuestos que contienen flavinas. En la comparación de BMGlu y BMLac, se sobrerrepresentaron en los genes sobre-expresados los términos traducción, componentes de ribosoma y procesos biosintéticos de sustancias orgánicas y de aminoácidos celulares; en los sub-expresados, transporte transmembrana, peroxisoma, respuesta a estímulos extracelulares y macroautofagia. Se analizaron 13 genes de transportadores de carbohidratos encontrándose respectivamente 3 y 7 genes sub-expresados en la comparación de las dos cepas y en la comparación de BMGlu y BMLac, y un gen sobre-expresado en ambas. Se encontraron diferencias en la comparación de los dos sustratos en las rutas de metabolismo de carbohidratos, con 14 genes sobre- y 6 sub-expresados de glucólisis/gluconeogénesis, 4 genes sobre- y 4 sub-expresados del ciclo de Krebs, y 7 genes sobre-expresados de la vía de pentosas fosfato.

**Conclusiones.** KM71LAC412 presenta un crecimiento sin diferencias en los tres sustratos y respecto a la cepa control. De acuerdo a los resultados de la expresión diferencial, el metabolismo central y la síntesis de proteínas presentan una mayor actividad en KM71LAC412 crecida en lactosa y un trasporte de carbohidratos posiblemente deprimido.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo del CONACYT (CB-2012-183840) y las becas otorgadas.

### Bibliografía.

1. Trapnell C, Roberts A, Goff L *et al.* (2012). *Nat. Protoc.* 7(3): 562–578.
2. Bindea G, Galon J, Mlecnik B. (2009). *Bioinformatics.* 25(8):1091–1093.
3. Cline M, Smoot M, Cerami E, *et al.* (2007). *Nat. Protoc.* 2: 2366–2382