

CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN GEN DE LACASA DE *Trametes versicolor* EN DOS CEPAS DE *Pichia pastoris*

Marcos López¹, Juan A. Gallegos², José Ma. Viader², Martha Guerrero², Francisco J. Fernández¹, Octavio Loera¹ y Gustavo Viniegra¹. ¹UAM Iztapalapa, Depto de Biotecnología, 09340 México D.F.; ²UANL, Instituto de Biotecnología. Fax: 58 04 47 12

Palabras clave: Lacasa, Expresión heteróloga, Mut^s, Mut⁺,

Introducción. Las lacasas son enzimas usadas en bioprocesos y son producidas por una gran variedad de hongos, destacando las especies del género *Trametes* (1). Una alternativa para su aplicación es la sobreexpresión heteróloga en su forma activa. *Pichia pastoris* presenta varias ventajas para la expresión de proteínas heterólogas (2), la principal de ellas es que la expresión está regulado bajo el control del promotor AOX, inducible por metanol. El objetivo de este trabajo fue la clonación de un gen de lacasa de *T. versicolor* en dos cepas de *P. pastoris*, utilizando un método de clonación alternativo.

Metodología. Este trabajo se basó en una variante de la metodología habitual (usa las enzimas *Xho*I y *Avr*II) utilizada en el sistema de *P. pastoris* (3). El proceso tuvo que realizarse en dos fases para que no interfiriera un sitio *Xho*I incluido en la secuencia del gen de lacasa (*lcc1*) de *Trametes*. El gen *lcc1*, cuyo péptido señal fue previamente eliminado, se clonó en el vector pPIC9, justo entre la región promotora AOX1 y su correspondiente región terminadora. (Fig 1). Se obtuvieron mediante PCR dos amplicones con sitios de restricción diferentes en sus extremos a fin de permitir su colocación en fase sin interferencia del sitio *Xho*I interno. Una vez construido el plásmido pPIC9Lcc1, se transformaron las cepas de *P. pastoris* GS115 y KM71, a fin de obtener mutantes Mut^s y Mut⁺ y se comprobó la inserción del gen en el DNA genómico mediante PCR.

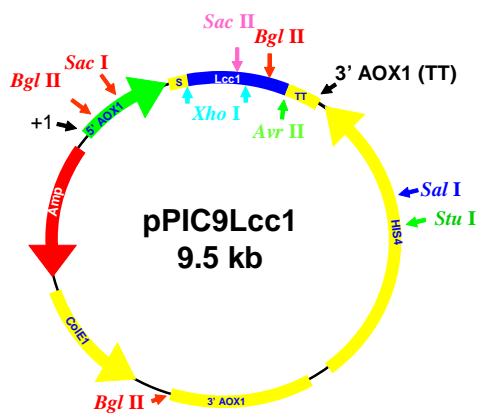


Fig. 1 Mapa de restricción del plásmido pPIC9Lcc1. Se visualiza en el fragmento *lcc1* dos sitios de restricción *Xho*I. Asimismo se localizan los sitios de restricción *Bgl*II necesarios para caracterizar el plásmido tras haber sido constituido

Resultados. El cultivo se mantuvo a 30°C desde la obtención del inóculo inicial hasta transcurridas las 48h de inducción (adición de metanol). La secuencia señal utilizada fue el factor α de *S. cerevisiae*, ya que ha resultado efectivo en multitud de trabajos de expresión heteróloga con *P. pastoris* (3).

Las diferencias encontradas entre las dos cepas de *P. pastoris* utilizadas pueden ser debidas a sus respectivos genotipos: las cepas GS115 (Mut⁺) poseen dos copias del gen AOX, una permanece activa durante el crecimiento y la otra es utilizada para la expresión en medios con metanol. Las cepas KM71 (Mut^s) a diferencia solo poseen una copia donde se sitúa el gen inducido.

CEPA	U/L	U/mg
GS115Lac	6.4±1.21	0.27 ±0.05
KM71Lac	4.0 ±0.6	0.17 ±0.02

Tabla 1: Datos comparativos de actividad sobre ambas cepas de *P.pastoris* transformadas. Se midió la actividad volumétrica (U/L) y actividad específica (U/mg).

Conclusiones. El método de clonación en 2 fases resolvió la dificultad debida a la presencia del sitio *Xho*I dentro del gene clonado. Las diferencias genéticas entre las cepas confieren capacidades distintas para la expresión del gen cuando crecen en medios con metanol.

Bibliografía

- Bergbauer M, Eggert C, Kraepelin G (1991) Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the whiterot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 35:105–109
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11:905–909
- Cereghino, G. P. L. & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24, 45-66.