



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



TOXICIDAD DE TRIPSINÓGENOS RECOMBINANTES SOBRE CÉLULAS DE *PICHIA PASTORIS*

José A. Fuentes-Garibay, Melissa I. Leija-Salazar, Martha Guerrero-Olazarán, José M. Viader-Salvadó
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66450. jose.viadersl@uanl.edu.mx

Palabras clave: Tripsinógeno quimérico, *Pichia pastoris*, *Litopenaeus vannamei*

Introducción. La tripsina del camarón *Litopenaeus vannamei* tiene mayor actividad específica que la tripsina humana y bovina, lo que la hace una candidata potencial para su producción en forma recombinante. Una opción sería producir esta proteasa a través de su zimógeno inactivo (tripsinógeno). Además, el tripsinógeno de *L. vannamei* no ha podido ser aislado de su fuente natural, por lo que su producción en un sistema de expresión proporcionaría la posibilidad de hacer estudios funcionales dirigidos a entender su mecanismo de activación y regulación. Sin embargo, su síntesis en *Pichia pastoris* a través de su zimógeno causa toxicidad sobre su hospedero debido a una rápida autoactivación del tripsinógeno recombinante producido (1). Un tripsinógeno quimérico de lenta autoactivación facilitaría la síntesis de tripsina de camarón en *P. pastoris*.

En el presente trabajo se evaluó la toxicidad de un tripsinógeno quimérico (TgQ) sobre células de *P. pastoris* y se correlacionó con el mecanismo de autoactivación de los tripsinógenos.

Metodología. Se empleó una cepa de *P. pastoris* productora de un tripsinógeno quimérico (KM71TgQ) formado por la tripsina del camarón *L. vannamei* y el péptido de activación del tripsinógeno humano, construida previamente en nuestro laboratorio. Se realizaron cinéticas de crecimiento comparativas en condiciones de inducción por 12 h como método indirecto para evaluar la toxicidad de una proteína heteróloga sobre su hospedero. Se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) de la cepa KM71TgQ en los medios BMM y BMM suplementado con sorbitol o alanina (BMMS o BMMA), y se compararon con las correspondientes de dos cepas testigo productoras del tripsinógeno II de *L. vannamei* (KM71Tg4) y de una fitasa bacteriana (KM71PhyC). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey.

Resultados. Las cinéticas de crecimiento en el medio BMM de las cepas KM71TgQ y KM71Tg4 mostraron un comportamiento muy similar entre las dos cepas sin presentarse un incremento significativo en el número de células viables a través del tiempo ($\mu \sim 0 \text{ h}^{-1}$). Sin embargo, la cepa KM71PhyC presentó un incremento de células viables desde el inicio y hasta el final del cultivo ($\mu = 0.060 \text{ h}^{-1}$). En el medio BMMS la cepa KM71TgQ

mostró un crecimiento exponencial desde el inicio del cultivo hasta las 8 horas ($\mu = 0.074 \text{ h}^{-1}$), con una fase estacionaria posterior. Mientras que la cepa KM71Tg4 presentó la fase estacionaria a partir de las 4 horas y hasta el final del cultivo ($\mu = 0.052 \text{ h}^{-1}$), y la cepa KM71PhyC una fase de crecimiento exponencial desde el inicio hasta el final del cultivo ($\mu = 0.102 \text{ h}^{-1}$). En el medio BMMA las tres cepas evaluadas (KM71TgQ, KM71Tg4 y KM71PhyC) mostraron un crecimiento exponencial desde el inicio hasta el final del cultivo ($\mu = 0.111, 0.091$ y 0.074 h^{-1} , respectivamente).

Conclusiones. Los resultados de las cinéticas de crecimiento indicaron que en los medios de cultivo BMM y BMMS, TgQ y el tripsinógeno de camarón presentan toxicidad sobre las células hospederas de *P. pastoris*, pero en el medio BMMS, TgQ muestra menor toxicidad que el tripsinógeno de camarón sobre las células hospederas. La adición de alanina en el medio de cultivo genera una mayor disminución de la toxicidad de TgQ y el tripsinógeno de camarón sobre las células hospederas que la adición de sorbitol. Además, la alanina tiene un efecto adicional que estimula el crecimiento celular en las cepas KM71TgQ y KM71Tg4 que no tiene efecto en la cepa KM71PhyC, siendo este efecto mayor en la cepa KM71TgQ que en la cepa KM71Tg4. Estos resultados sugieren que la velocidad de autoactivación del TgQ es sólo un poco menor que la del tripsinógeno de camarón. Un análisis de la secuencia aminoacídica de TgQ sugiere que el residuo de tirosina de TgQ en la posición equivalente al Asp²¹⁸ de la tripsina humana podría disminuir la repulsión electrostática del péptido de activación de TgQ que generaría una autoactivación con una velocidad intermedia entre la correspondiente al tripsinógeno de camarón y la del tripsinógeno de vertebrados.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo económico del fondo CONACYT-SEP (CB-2005-01-25618). JAFG agradece la beca otorgada por el CONACYT.

Bibliografía.

1. Guerrero-Olazarán, M., Escamilla-Treviño, L.L., Castillo-Galván, M., Gallegos-López, J.A., y Viader-Salvadó, J.M. (2009). Recombinant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) trypsinogen production in *Pichia pastoris*. Biotechnol. Progr. 25: 1310-1316.