

CONSTRUCCIÓN DE CEPAS RECOMBINANTES PARA LA EVALUACIÓN DE UN PROMOTOR REGULADO POR FUENTES DE CARBONO ALTERNAS AL METANOL EN *Pichia pastoris*

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, elementos reguladores, promotores

Introducción. La búsqueda de nuevos promotores funcionales en *Pichia pastoris* ha despertado el interés en la comunidad científica (1). Los promotores regulables por fuentes de carbono alternas al metanol (2) han sido poco estudiados. Debido a que recientemente se ha reportado que *P. pastoris* reduce su energía de mantenimiento a velocidades específicas de crecimiento extremadamente bajas (3), se piensa que los genes con altos niveles de expresión bajo estas condiciones poseen promotores factibles de ser empleados en la producción de proteínas recombinantes bajo un control del proceso de producción mediada por la concentración de la fuente de carbono. Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se identificaron ocho genes cuya expresión fue dependiente de la fase de crecimiento y la fuente de carbono en cepas recombinantes de *P. pastoris*, entre ellos el gen hipotético que denominamos P2 que se expresa principalmente en condiciones limitantes de la fuente de carbono.

En este trabajo se obtuvieron cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras de una región promotora, estudiada por primera vez, que regula la expresión de un gen heterólogo modelo con fuentes de carbono alternas al metanol.

Metodología. Se diseñó y sintetizó una secuencia que contuvo la región río arriba del ATG del gen en estudio P2, la cual incluyó una posible región promotora de la transcripción, y la secuencia que codifica para la región pre-pro del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*. El plásmido PUC57-KanP2PT conteniendo la secuencia sintética se propagó en *Escherichia coli* TOP10. Posteriormente se realizó una digestión preparativa con las enzimas de restricción *AatII* y *XhoI* para liberar la secuencia de las regiones promotoras en los plásmidos PUC57-KanP2PT y pGAHFTEII, y se construyó el vector pP2FTEII. El plásmido se caracterizó por PCR empleando oligonucleótidos específicos dirigidos al promotor y a una región endógena del gen reportero FTEII y con éste se transformaron células de *P. pastoris* KM71 por electroporación, previamente linearizado con *Sall*. Las colonias transformadas se seleccionaron por prototofía a histidina. Las cepas se caracterizaron por PCR para verificar la integración del casete de expresión en el genoma de la levadura. Se verificó la funcionalidad del promotor mediante RT-PCR empleando oligonucleótidos específicos dirigidos al gen reportero (FTEII) y al gen de la

β -actina. Se realizaron cultivos en BMG-CaCl₂ para seleccionar clonas unicopia y multicopia mediante la determinación de la concentración extracelular de proteínas totales y actividad volumétrica extracelular de fitasa. Se determinó la densidad celular, el rendimiento proteína/biomasa y el rendimiento producto biomasa ($Y_{p/x}$) de todos los cultivos evaluados para seleccionar las clonas uni y multicopia.

Resultados. La identidad del vector construido, pP2FTEII, fue corroborada por la banda única de 1436 pb obtenida por PCR con los oligonucleótidos dirigidos hacia la región promotora y una región del gen reportero. Se obtuvieron 58 clonas His⁺ de *P. pastoris* KM71 transformadas. Los resultados del RT-PCR demostraron la funcionalidad del promotor. Se seleccionaron una cepa unicopia y multicopia del casete de expresión en base a los rendimientos proteína/biomasa y $Y_{p/x}$. Se comprobó la integración del casete de expresión por PCR en la clona uni y multicopia. Se obtuvieron 12 aislados de la cepa pP2FTEII con los rendimientos proteína/biomasa más altos a las 48 h del cultivo, con valores entre 3.4 y 4.6 mg/g, una densidad celular entre 6.5 y 9.2 g/L, y valores de $Y_{p/x}$ entre 3.9 y 28.1 U/g.

Conclusiones. En este trabajo se obtuvieron por primera vez clonas de una cepa recombinante de *P. pastoris* portadora de un promotor de la transcripción nunca antes explorado, que no requiere de metanol para controlar la expresión del gen reportero y que podría permitir un control robusto del proceso de producción. Se comprobó que el promotor regula la transcripción del gen reportero y permite la obtención del producto recombinante. Se seleccionaron clonas unicopia y multicopia de la cepa construida.

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

Bibliografía

1. Ahmad M et al. (2014) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(12):5301-5317.
2. Delic M et al. (2013) *Microb. Cell Fact.* 12(1):6.
3. Rebnegger C et al. (2016) *Appl. Environ. Microbiol.* 82(15):4570-4583.

