

## IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DEL PROMOTOR *AOX1* DE *Pichia pastoris* Y DETERMINACIÓN DE SU EXPRESIÓN BAJO CONDICIONES DE REPRESIÓN E INDUCCIÓN DEL GEN *AOX1*

Alber Uriel Sánchez-Moreno, José María Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán  
Universidad Autónoma de Nuevo León, 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*, promotores, factores de transcripción.

**Introducción.** El promotor *AOX1* ( $P_{AOX1}$ ) es uno de los elementos reguladores del metabolismo de metanol en *Pichia pastoris*. Debido a su regulación estricta y a los altos niveles de expresión del gen *AOX1* en presencia de metanol,  $P_{AOX1}$  es el promotor más utilizado en la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. Sin embargo, el mecanismo de regulación de la expresión génica de *AOX1* aún no se conoce con exactitud (1). Los factores de transcripción son proteínas que regulan la expresión génica mediante la unión a una secuencia específica de DNA (TFBS), permitiendo la interacción con otras proteínas a las regiones promotoras, inhibiendo o favoreciendo la expresión de un gen en específico (2). La identificación de los TFBS de un promotor es de suma importancia ya que permite la optimización de la secuencia reguladora.

En este trabajo se identificaron posibles factores de transcripción del  $P_{AOX1}$  y se determinó la expresión de los genes de dos de los factores de transcripción identificados en células de *P. pastoris* bajo condiciones de represión e inducción del gen *AOX1*.

**Metodología.** Se buscaron posibles TFBS en la secuencia del  $P_{AOX1}$  con la herramienta en línea TRAP (transcription factor affinity prediction) empleando la matriz fungi y el modelo para promotores de levaduras. Se localizaron las secuencias de los factores de transcripción de *Saccharomyces cerevisiae* en la base de datos de Uniprot que se unen a los TFBS identificados, y se buscaron las proteínas homólogas y sus genes en *P. pastoris* utilizando el método "Best Reciprocal BLAST Hit". Con los datos de tres transcriptomas de RNA-seq de trabajos previos (3): cultivo C0 (etapa de desrepresión de  $P_{AOX1}$ ), CP47 y CM47 (condiciones de inducción de  $P_{AOX1}$  con metanol), se realizó un análisis de expresión diferencial de los genes de los factores de transcripción identificados utilizando las herramientas Tophat2, Cufflinks y Cuffdiff de la plataforma Galaxy. Con esta información, se seleccionaron los genes *YML081W* y *ADR1* para un análisis de sus niveles de expresión relativa por RT-qPCR mediante el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (4), y empleando los genes *G6PD* y *YPT1* como genes normalizadores. Las muestras analizadas provinieron de las tres etapas (lote y lote alimentado en glicerol, y lote alimentado con metanol) de

un cultivo en un biorreactor de 7 L de la cepa *P. pastoris* KM71FTEII. La muestra al inicio de la etapa de inducción se empleó como muestra calibradora.

**Resultados.** Se identificaron 11 factores de transcripción que interactúan con la secuencia de  $P_{AOX1}$  y que tienen proteínas homólogas en *P. pastoris*. De los 11 genes que codifican para los factores de transcripción, 9 se expresaron diferencialmente en los transcriptomas analizados, y únicamente los genes *GAL4*, *MIG2*, *YML081W* y *ADR1* presentaron expresión diferencial significativa bajo las diferentes condiciones de cultivo (CM47/C0 y CM47/CP47;  $\log_2$  fold change > 1 ó < -1). Los niveles relativos de expresión por RT-qPCR del gen *YML081W* fue diferente en las diferentes etapas del cultivo, mostrando valores bajos (0.64-1.00) en las etapas del cultivo en glicerol respecto a la expresión en la etapa de alimentación con metanol (3.61-4.28). Mientras que el gen *ADR1* presentó niveles de expresión altos en las etapas de lote en glicerol y en lote alimentado en glicerol (1.00-2.20) y disminuyendo su expresión en la etapa de lote alimentado con metanol (0.67- 8.00).

**Conclusiones.** Se identificaron posibles factores de transcripción y sus sitios de unión en el  $P_{AOX1}$ . Debido al comportamiento de los genes *YML081W* y *ADR1* a lo largo del cultivo evaluado, estos podrían estar relacionados con la regulación de  $P_{AOX1}$  en *P. pastoris*.

**Agradecimientos.** Los autores agradecen el apoyo del CONACYT, proyecto CB-2016-01-286093.

### Bibliografía

1. Vogl T & Glieder A (2013) *N. Biotechnol* 30(4):385-404.
2. Hahn S & Young E (2011) *Genetics* 189(3):705-736.
3. Fernandez K *et al.* La transcriptómica como herramienta para la identificación de nuevos promotores en *Pichia pastoris*. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Puerto Vallarta Jal., México, 25-30 de junio de 2017.
4. Livak K & Schmittgen (2001) *Methods* 25(4):402-408.

