



EFFECTO DE LA INHIBICIÓN QUÍMICA DE LA FOSFOMANOSILTRANSFERASA-1 (PMT1) EN CULTIVO DE *P. pastoris* RECOMBINANTE

Daniel Juárez-López¹, Angélica B. Vargas-Castillo¹, Diego Rosiles-Becerril¹, Daniel Chávez-Velasco², C. Giroschi Bando-Campos¹, Mauricio A. Trujillo-Roldán¹, Norma A. Valdez-Cruz^{1*}. ¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, CDMX. ²Centro de Graduados e Investigación en Química, Instituto Tecnológico de Tijuana, B.C. México. *adrivaldez1@gmail.com
Palabras clave: Glicoproteína recombinante, O-manosilación, *P. pastoris*.

Introducción. La O-manosilación de proteínas recombinantes (PR) es una modificación postraduccional (MPT) que impacta en la estructuración y función de las mismas (1). Cambios o mutaciones en la maquinaria que realiza la O-manosilación puede afectar el crecimiento, resistencia, virulencia y termotolerancia en levaduras. En procesos biotecnológicos, se ha observado que el uso de inhibidores de la familia de fosfomanosiltransferasas (PMT's) que adicionan la primer manosa a proteínas, modifica la O-manosilación e incrementa la producción de PR (2). El compuesto PMT1i, derivado del Rhodanine-3-ácido acético inhibe la fosfomanosiltransferasa-1 (PMT1), en levaduras (3). *P. pastoris* es un hospedero promisorio para la producción de antígenos O-manosilados de *M. tuberculosis* debido a la semejanza en las MPT's que realizan ambos sistemas. Esto demostrado durante la producción y caracterización de la glicoproteína PstS-1 recombinante producida en *P. pastoris* que fue reconocida por anticuerpos de sueros de pacientes con tuberculosis activa, al menos 2 veces mejor comparado con lo observado con la producida en *E. coli* sin MPT (4). En este proyecto, se pretende evaluar el efecto del inhibidor PMT1i sobre la enzima PMT1. De forma indirecta de la inhibición, se determinarán variaciones en la O-manosilación de la PR producida, por cambios en el peso molecular, con la intención de producir glicoantígenos con MPT particulares.

Metodología. Se utilizó la cepa productora *P. pastoris*-PstS-11 (4). El efecto del inhibidor se evaluó en matraces bafleados (n=3) con medio de crecimiento BMGY y como medio de inducción BMMY (con metanol). La inducción se realizó cada 8 h durante 70 h adicionando metanol al 1% y 2 μ M del inhibidor PMT1i (3). La variación en las MPT's se analizó indirectamente mediante el análisis de las proteínas contenidas en los sobrenadantes por SDS-PAGE. Las proteínas fueron obtenidas por precipitación con TCA y la PR fue identificada por WB utilizando un anticuerpo policlonal (4).

Resultados. El crecimiento de la cepa con inhibidor mostró diferencias en la X_{max} alcanzada. Sin inhibidor se logró una DO_(600 nm) de 32 \pm 4 U.A., mientras que con inhibidor se obtuvo el doble (62 \pm 7 U.A.). Las muestras analizadas en gel SDS-PAGE mostraron al menos 4 diferentes bandas (Fig. 1). De forma interesante al analizar

en los gels de SDS-PAGE como por WB la banda correspondiente al antígeno recombinante, se observó una variación de R_f de 3 kDa. De forma indirecta se podría inferir que el uso del inhibidor de la PMT1 provoca la disminución del peso molecular debido a que disminuye el número de sitios manosilados en la PR desde las 24 h (Fig. 1A,1B). También se analizó el efecto a las 60 h de cultivo post inducción observándose variaciones similares.

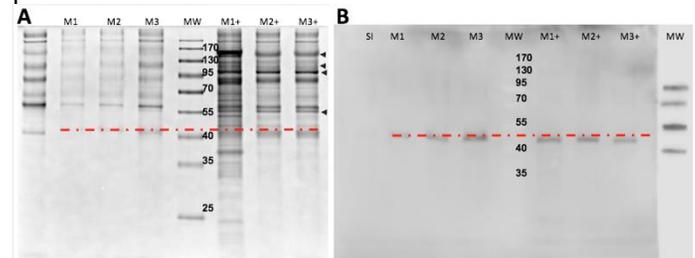


Fig. 1. A) Análisis de la producción de proteínas del sobrenadante de *P. pastoris* recombinante después de 24 h de la inducción inicial (n=3). B) Inmunodetección con anticuerpo policlonal anti-PstS-1. La línea roja marca la diferencia en R_f de la PR. SI, Sin inducir; M1, M2, M3 (matraces n=3), + adición del inhibidor. MW, marcador de peso molecular. Las marcas de flechas negras indican proteínas diferenciales cuando se adiciona el inhibidor.

Conclusiones. El uso del inhibidor de la fosfomanosiltransferasa-1 a 2 μ M con pulsos en conjunto con la alimentación de metanol 1% c/8h provocó un aumento de 2 veces la biomasa máxima alcanzada a las 60 h de cultivo de *P. pastoris*-PstS-1 en matraces bafleados comparado con los cultivos sin inhibidor. A partir de que la PR aquí estudiada presenta al menos 4 sitios de O-manosilación, el análisis de proteína por SDS-PAGE y WB mostraron la disminución del R_f de alrededor de 3 kDa cuando se adicionó el inhibidor de la PMT1. Esto podría indicar la disminución en la O-manosilación de la PR.

Agradecimientos. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IT-200719, IN-208414) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, (CONACYT 247473, 220795). Beca DJL CONACYT 288329.

Bibliografía.

1. Sun Lee H, Qi Y, Im W. (2015). *Sci Rep*. 5: 8926
2. Argyros R et al. (2013). *PloS One*. 8(5):e62229
3. Orchard MG et al. (2004). *Bioorg Med Chem Lett*. 14(15):3975-8
4. Bando-Campos G et al. (2019). *Microb Cell Fact*. 18(1):11

