

Efecto de la expresión en *Pichia pastoris* de una serinproteasa sobre enzimas peroxisomales

Martha Guerrero Olazarán*, Luis Lauro Escamilla Treviño, Alain Van Wormhoudt, Julio Sepúlveda Saavedra, José María Viader Salvadó

La tripsina es una serin-proteasa que juega un papel importante en la activación de endopeptidasas digestivas en animales y lleva a cabo la catálisis de reacciones de hidrólisis de enlaces peptídicos que contienen residuos de aminoácidos básicos, tales como lisina y arginina. La tripsina bovina y porcina se encuentran disponibles comercialmente y son producidas principalmente por aislamiento y purificación a partir de tejido animal, sin embargo, frecuentemente esta enzima se contamina con otras proteasas digestivas, como la quimi tripsina. En la literatura existen escasos reportes sobre la producción de tripsina o tripsinógeno recombinante por el poco éxito obtenido en su producción, ya que generalmente la biosíntesis de esta proteasa provoca efectos nocivos para el hospedero o bien se obtienen rendimientos muy bajos debido a su inestabilidad (1, 2).

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica que tiene la capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono, el cual es metabolizado por una ruta metabólica que involucra a las enzimas alcohol oxidasa (AOX), catalasa y formaldehído deshidrogenasa, entre otras. En esta levadura, la síntesis de la enzima AOX se induce cuando se emplea metanol como única fuente de carbono, debido a la activación del promotor del gen *AOX1* bajo estas condiciones de cultivo (3, 4).

El sistema de expresión de *P. pastoris* consiste de vectores de integración que portan el gen heterólogo de interés bajo el control del promotor del gen *AOX1*, siendo posible inducir la expresión del gen heterólogo al emplear metanol como única fuente de carbono (3, 4).

En 1992 (5) se aisló y caracterizó de las glándulas digestivas del camarón *Penaeus (Litopenaeus)*

vannamei tres isoformas de la principal serin-proteasa de crustáceos (tripsina). Además, el mismo grupo de investigadores clonaron una secuencia de DNAc que codifica para un zimógeno de tripsina (tripsinógeno) de 255 aminoácidos (6). Posteriormente, nuestro grupo de trabajo clonó este DNAc y la porción del mismo que codifica para tripsina, ambos fusionados a la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, en un vector de expresión y se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras de los DNAc de tripsina y tripsinógeno de *Litopenaeus vannamei* (7, 8). A pesar que la integración de los genes heterólogos fue verificada por PCR, los productos proteicos de los genes heterólogos clonados no se detectaron mediante el análisis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y ensayos de western blot (7, 8). Un análisis por microscopía electrónica reveló que las células de las cepas recombinantes portadoras del DNAc de tripsina cultivadas bajo condiciones de inducción mostraban una ausencia de proliferación peroxisomal (7, 8), por lo que se pensó que la función de las enzimas peroxisomales, entre ellas la AOX y la catalasa, se encontraba alterada.

Con estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó la integridad funcional de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa de cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras del DNAc de tripsina o tripsinógeno de *Litopenaeus vannamei*, cuando son cultivadas bajo condiciones de inducción de los genes heterólogos clonados. Además, se evaluó el cre-

* Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UANL. E-mail: mguerrer@ccr.dsi.uanl.mx

cimiento de estas cepas bajo las mismas condiciones de inducción, con el fin de determinar si éste se ve afectado por una probable alteración del metabolismo del metanol, producido por la disfunción de estas enzimas peroxisomales.

Estrategia experimental

Para determinar la integridad funcional de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa se determinó la actividad específica de estas enzimas en la fracción soluble intracelular de las cepas portadoras del DNac de tripsina o tripsinógeno, cultivadas bajo condiciones de inducción de los genes heterólogos empleando un medio mínimo amortiguado con metanol como única fuente de carbono (BMM). Para determinar si se ve afectado el crecimiento celular cuando las cepas recombinantes son cultivadas bajo condiciones de inducción, se realizaron cinéticas de crecimiento en BMM y bajo condiciones de represión de los genes heterólogos empleando un medio mínimo amortiguado con glicerol como única fuente de carbono y agente represor (BMG) y se compararon con las cinéticas de crecimiento de cepas control. Además, se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas recombinantes cultivadas en BMM suplementado con sorbitol, con el fin de evaluar el efecto del sorbitol como fuente alternativa de carbono y energía en presencia de metanol. Por último, se realizó un análisis por SDS-PAGE de la fracción soluble intracelular de las cepas cultivadas en BMM y BMM suplementado con sorbitol, con el fin de detectar la presencia de AOX y catalasa.

Actividad específica de AOX y catalasa

La funcionalidad de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa de las cepas recombinantes cultivadas en BMM (fosfato potásico 100 mM, pH 6.0, base nitrogenada para levaduras [YNB] 1.34% [p/v], biotina 0.4 mg/L y metanol 0.75% [v/v]), se evaluó determinando la actividad específica de estas enzimas a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas de inducción en la fracción intracelular empleando un método descrito previamente (9). Se emplearon las cepas GS115-C2B4 (cepa GS115 de *P. pastoris* [tripsina+, Mut+], contiene el DNac de tripsina de *Litopenaeus vannamei*), GS115-Tg2 (cepa GS115 de *P. pastoris* [tripsinógeno+, Mut+], contiene el DNac de tripsinógeno de *Litopenaeus vannamei*), GS115-GP

(cepa GS115 de *P. pastoris* [Mut+], contiene el vector de expresión sin la secuencia de algún gen funcional) y GS115-22K (cepa GS115 de *P. pastoris* [Mut+], contiene el DNac que codifica para una proteína de 22 kDa), estas dos últimas empleadas como cepas control.

En la cepa GS115-C2B4 no se detectó la actividad específica de la enzima AOX a los tiempos estudiados, mientras que en la cepa GS115-Tg2 aumentó durante las primeras 6 horas y después disminuyó rápidamente hasta niveles próximos a cero en las siguientes 6 horas (figura 1). Sin embargo, para el caso de la cepa control GS115-22K, la actividad específica de AOX tendió a aumentar a lo largo del tiempo y para la cepa GS115-GP aumentó durante las primeras 4 horas para posteriormente disminuir y permanecer constante (figura 1).

Por otro lado, la actividad específica de la catalasa de la cepa GS115-C2B4 fue tres veces más baja que la observada para la cepa GS115-Tg2 y las cepas control a partir de las 6 horas de inducción (figura 1).

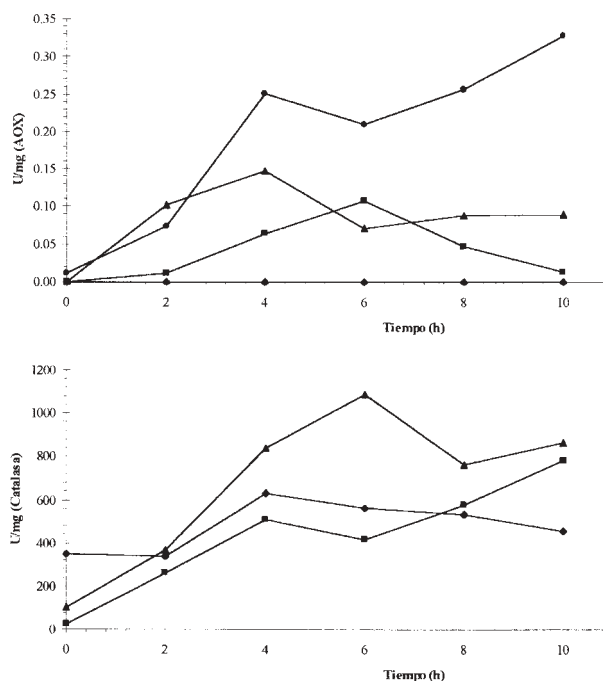


Fig. 1. Actividad específica de la enzima AOX (gráfica superior) y catalasa (gráfica inferior) de la fracción intracelular de las cepas cultivadas en BMM a diferentes tiempos de inducción: GS115-C2B4 (◆), GS115-Tg2 (◻), GS115-GP (◻) y GS115-22K (●). Los valores reportados son las medias de tres determinaciones (C.V. < 20%).

Estos resultados indican que, a diferencia de las cepas empleadas como control, el cultivo de las cepas GSS115-C2B4 y GS115-Tg2 bajo condiciones de inducción de la expresión de los genes heterólogos afecta la funcionalidad de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa.

Cinéticas de crecimiento bajo condiciones de represión del gen heterólogo

Se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas GS115-C2B4, GS115-Tg2 y GS115-GP cultivadas en BMG (fosfato potásico 100 mM, pH 6.0, YNB 1.34% [p/v], biotina 0.4 mg/L y glicerol 1% [v/v]) determinando la densidad óptica a 600 nm ($D.O._{600}$) y las unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL). Se determinaron las velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación. Para comparar los resultados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), comparaciones múltiples de Tukey y una prueba de t de Student empleando el paquete estadístico SPSS 8.0.

En la tabla 1 se muestran los tiempos de duplicación y las velocidades específicas de crecimiento de las cepas recombinantes cultivadas en BMG. La cepa GS115-C2B4, mostró el menor crecimiento en BMG de todas las cepas estudiadas. Además las cepas GS115-C2B4 y GS115-Tg2 mostraron valores de tiempos de duplicación 1.43 y 1.05 veces mayores que el de la cepa control, respectivamente, ($p < 0.01$ y $p < 0.05$) y diferentes entre sí ($p < 0.01$).

Los resultados indican que existen diferencias fisiológicas entre las cepas recombinantes y éstas respecto a la cepa control que influyen en el crecimiento aún en ausencia de la expresión de los genes heterólogos.

Cinéticas de crecimiento bajo condiciones de inducción del gen heterólogo

Se realizaron cinéticas de crecimiento de las cepas GS115-C2B4, GS115-Tg2, GS115-GP y GS115-22K, las dos últimas empleadas como cepas control, las cuales se cultivaron en los medios BMM y BMM suplementado con sorbitol (figura 2).

En la tabla 2 se muestran los tiempos de duplicación y las velocidades específicas de crecimiento de las cepas recombinantes cultivadas en BMM es-

timados por $D.O._{600}$ y por UFC/mL. La cepa GS115-C2B4 presentó un tiempo de duplicación menor que el de las dos cepas control, por lo tanto una mayor velocidad específica de crecimiento. Un punto importante a enfatizar es el comportamiento observado en la cepa GS115-Tg2, para la cual se detectó crecimiento cuando éste se evaluó a través de la medición de la $D.O._{600}$, sin embargo cuando el cre-

Tabla 1. Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMG

Cepas	Tiempo de duplicación (h)	
	D.O.	UFC/mL
GS115-C2B4	3.48 ± 0.02 ^a	2.99 ± 0.45 ^a
GS115-Tg2	2.54 ± 0.02 ^b	1.54 ± 0.40 ^b
GS115-GP	2.43 ± 0.07 ^c	ND

Cepas	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	
	GS115-C2B4	0.199 ± 0.001 ^a
GS115-Tg2	0.273 ± 0.002 ^b	0.48 ± 0.14 ^b
GS115-GP	0.286 ± 0.008 ^c	ND

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=3). ND: No determinado. Literales diferentes indican diferencias significativas con $p < 0.01$ en las comparaciones con GS115-C2B4 de los valores obtenidos por D.O. y $p < 0.05$ para las demás.

cimiento se evaluó a través de las UFC/mL se observó claramente la muerte del cultivo (figura 2, gráfica inferior).

En la gráfica superior de la figura 2 se observa que en medio BMM la cepa GS115-C2B4 y la cepa GS115-Tg2 iniciaron una fase estacionaria a tiempos muy cortos de 3 y 6 horas, respectivamente, mientras que las cepas control estuvieron en una evidente fase exponencial hasta las 16 horas registradas. Por otro lado, en las cinéticas de GS115-C2B4 y GS115-Tg2 en el medio BMM suplementado con sorbitol se observó una evidente fase exponencial (velocidades específicas de 0.284 ± 0.003 y 0.147 ± 0.001 h⁻¹ con tiempos de duplicación de 2.44 ± 0.59 y 4.72 ± 0.39 horas [n=3], respectivamente) hasta las 20 horas de cultivo (figura 2, gráfica superior). En las cinéticas determinadas por UFC/mL en BMM, la cepa GS115-C2B4 (figura 2, gráfica inferior) alcanzó la fase estacionaria a las 3-4 horas, mientras que para la cepa GS115-Tg2 se registró claramente una cinética de

Tabla II. Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMM		
Cepas	Tiempo de duplicación (h)	
	D.O.	UFC/mL
GS115-C2B4*	4.12 ± 1.78 ^a	4.89 ± 0.62 ^a
GS115-Tg2	6.69 ± 1.21 ^{a,b}	ND
GS115-GP	8.19 ± 0.49 ^b	6.19 ± 1.10 ^{a,b}
GS115-22K	7.10 ± 0.21 ^b	7.43 ± 0.99 ^b
Cepas	Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹)	
	D.O.	UFC/mL
GS115-C2B4*	0.19 ± 0.06 ^a	0.14 ± 0.01 ^a
GS115-Tg2	0.11 ± 0.02 ^{a,b}	ND
GS115-GP	0.08 ± 0.01 ^b	0.11 ± 0.02 ^b
GS115-22K	0.098 ± 0.003 ^b	0.09 ± 0.01 ^b

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n=3), *(n=5). ND: No determinado. Literales diferentes indican diferencias significativas con p < 0.05.

muerte del cultivo y las cepas control presentaron un evidente crecimiento exponencial.

En el medio BMM suplementado con sorbitol, las cinéticas de crecimiento determinadas evaluando las UFC para las cepas GS115-C2B4 y GS115-Tg2, mostraron que hasta las 20 horas de cultivo se encontraron en una evidente fase exponencial (velocidades específicas de crecimiento de 0.280 ± 0.005 y 0.146 ± 0.006 h⁻¹ con tiempos de duplicación de 2.47 ± 0.23 y 4.74 ± 0.31 [n=3] horas, respectivamente).

Análisis de proteínas intracelulares por SDS-PAGE

Con el fin de detectar la presencia de las enzimas AOX y catalasa en la fracción soluble intracelular, se realizó un análisis por SDS-PAGE de esta fracción de las cepas GS115-C2B4, GS115-Tg2 y GS115-22K cultivadas durante 24 horas bajo condiciones de inducción en los medios BMM, BMM suplementado con sorbitol y en el medio complejo BMMY (BMM más peptona 2% [p/v] y extracto de levadura 1% [p/v]). La inducción de la expresión de los genes heterólogos se inició en cultivos con altas densidades celulares obtenidas en cultivos previos en BMG. Este análisis reveló la ausencia de las bandas correspondientes a las enzimas AOX (~75 kDa) y catalasa (~60 kDa) en la fracción soluble intracelular de los cultivos de la cepa GS115-C2B4 en todos los medios evaluados (carriles 4, 5 y 6,

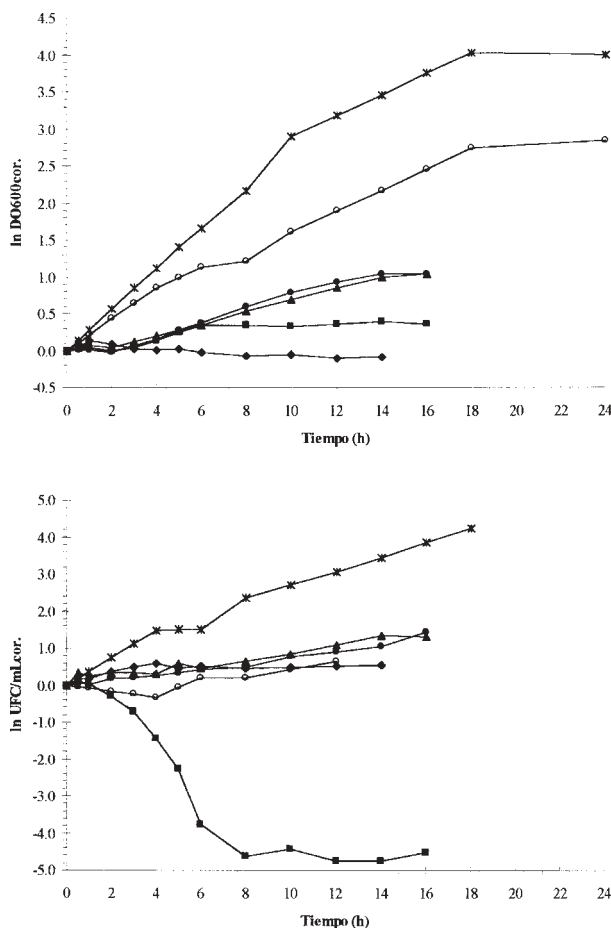


Fig. 2. Cinéticas de crecimiento de cepas recombinantes de *P. pastoris* bajo condiciones de inducción determinadas por D.O. a 600 nm (superior) o bien a través de las UFC/mL (inferior). (♦) Cepa GS115-C2B4 en BMM, (○) cepa GS115-Tg2 en BMM, (△) y (●) cepas control GS115-GP y GS115-22K en BMM, respectivamente, (*) cepa GS115-C2B en BMM suplementado con sorbitol y (○) cepa GS115-Tg2 en BMM suplementado con sorbitol.

figura 3), mientras que estas bandas estuvieron presentes en el mismo análisis realizado para las cepas GS115-Tg2 y control (carriles 1, 2, 3, 7, 8 y 9, figura 3).

Estos resultados indican que se llevó a cabo la expresión de los genes que codifican para AOX y catalasa y la biosíntesis de sus productos, tanto en la cepa portadora del DNac de tripsinógeno como en la cepa control cuando éstas se cultivaron en BMM, BMM suplementado con sorbitol y BMMY, los cuales contienen metanol que induce la expresión tanto de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa como la de los DNac de tripsina y tripsinógeno clonados. La cepa control GS115-22K, cultivada

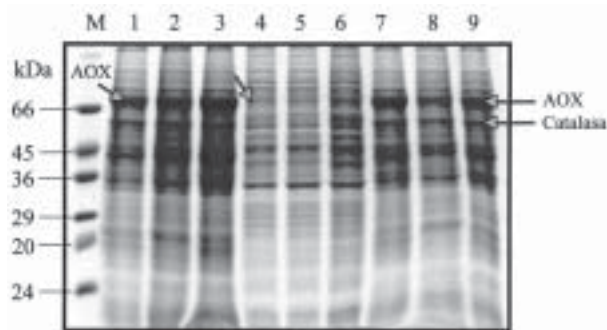


Fig. 3. SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de proteínas de la fracción soluble de lisados celulares de las cepas GS115-22K, GS115-C2B4 y GS115-Tg2. Carril M: Marcador de peso molecular. Carril 1: GS115-22K en el medio BMM. Carril 2: GS115-22K en el medio BMM suplementado con sorbitol. Carril 3: GS115-22K en el medio BMMY. Carril 4: GS115-C2B4 en el medio BMM. Carril 5: GS115-C2B4 en el medio BMM suplementado con sorbitol. Carril 6: GS115-C2B4 en el medio BMMY. Carril 7: GS115-Tg2 en el medio BMM. Carril 8: GS115-Tg2 en el medio BMM suplementado con sorbitol. Carril 9: GS115-Tg2 en el medio BMMY.

en BMM suplementado con sorbitol, produjo y secretó la proteína heteróloga de 22 kDa, evidencia experimental obtenida por SDS-PAGE (resultados no mostrados) lo cual demuestra la inducción del gen heterólogo en la presencia de sorbitol. Sin embargo, los resultados obtenidos de este análisis para la cepa GS115-C2B4 indican una disminución en la síntesis o un aumento en la degradación de las enzimas AOX y catalasa, lo que dio a lugar a que sus bandas no se pudieran detectar por SDS-PAGE a las mismas condiciones experimentales en las cuales sí se detectaron para la cepa GS115-Tg2 y la cepa control. Además, estos resultados están en concordancia con la ausencia de actividad de AOX observada cuando la cepa GS115-C2B4 es cultivada bajo estas condiciones.

Discusión y conclusiones

Bajo condiciones de represión del promotor *AOX1*, las cepas GS115-C2B4 y GS115-Tg2 crecieron de forma más lenta que la cepa control, pero se mantuvieron en una fase exponencial semejante.

El crecimiento de las cepas GS115-C2B4 y GS115-Tg2 se vio afectado cuando estas cepas se cultivaron bajo condiciones de activación del promotor de *AOX1* (inducción de la síntesis de las

enzimas AOX y catalasa, así como la síntesis de tripsina y tripsinógeno clonadas). Bajo estas condiciones, la cepa portadora del DNAC de tripsinógeno (GS115-Tg2) no se mantuvo viable y la detección de crecimiento determinado por $D.O_{600}$ a tiempos cortos pudo deberse a algún efecto óptico no determinado. Para el caso de la cepa portadora del DNAC de tripsina, a pesar de que se registró crecimiento a tiempos cortos, lo cual podría ser debido a la presencia de un remanente de glicerol en el inóculo empleado al inicio del cultivo, se inició una fase estacionaria temprana a partir de las 3 horas, a diferencia de las cepas control que se mantuvieron en una evidente fase exponencial hasta las 16 horas registradas. Por otro lado, el cultivo de las cepas GS115-C2B4 y GS115-Tg2 en el medio BMM suplementado con sorbitol permitió el crecimiento y viabilidad del cultivo para ambas cepas, a pesar de que el cultivo se mantuvo en presencia de metanol, es decir bajo condiciones de inducción de los genes heterólogos clonados.

Los resultados obtenidos indican que la biosíntesis o vida media de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa se encuentra limitada, cuando las cepas recombinante son cultivadas en un medio que contiene metanol y se induce la síntesis de tripsina y tripsinógeno. La disfunción o función limitada de estas enzimas puede ser una de las causas del crecimiento deficiente y viabilidad limitada de las cepas en estudio, debido a que se afecta el empleo de la fuente de carbono y obtención de energía, este efecto fue contrarrestado cuando se proporcionó sorbitol, sustrato que sin inhibir el promotor proporcionó una ruta alternativa para la obtención de energía, permitiendo así el crecimiento de las cepas recombinantes aún en presencia del inductor del promotor *AOX1*.

Los resultados obtenidos sugieren que los productos recombinantes inducidos, tripsina y tripsinógeno de *Litopenaeus vannamei*, afectan la biosíntesis o vida media de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa.

Por último, la alternativa del empleo de sorbitol como sustrato permitió el crecimiento y la viabilidad de las cepas recombinantes en estudio.

Agradecimientos

Agradecemos los apoyos económicos del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT, No. CN343-00), a los estudiantes

de Servicio Social por el apoyo técnico brindado y a la Jefatura del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina de la UANL y al Programa de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas ambos de la UANL por el apoyo en infraestructura. LLET agradece al Conacyt la beca otorgada.

Resumen

En este trabajo se evaluó la integridad funcional de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa de cepas recombinantes de *P. pastoris*, portadoras del DNAC de tripsina o tripsinógeno de *Litopenaeus vannamei* cuando son cultivadas bajo condiciones de inducción de los genes heterólogos clonados. Los resultados obtenidos indican que la biosíntesis o vida media de las enzimas peroxisomales AOX y catalasa se encuentra limitada cuando las cepas recombinantes son cultivadas en un medio que contiene metanol como única fuente de carbono y energía y se induce la expresión de los genes heterólogos. La disfunción o función limitada de estas enzimas afectó al crecimiento y viabilidad de las cepas recombinantes, debido a que se influye en el empleo de la fuente de carbono y obtención de energía. Este efecto fue contrarrestado cuando se proporcionó sorbitol al medio de cultivo, permitiendo el crecimiento y viabilidad de las cepas recombinantes estudiadas.

Palabras clave: Alcohol oxidasa, Levaduras metilotróficas, *Pichia pastoris*, Tripsina, Peroxisomas, Catalasa.

Abstract

In the present work the functional integrity of alcohol oxidase (AOX) and catalase both peroxisomal enzymes of *pichia pastoris* recombinant strains, harboring the trypsin or trypsinogen coding sequence of shrimp (*Litopenaeus vannamei*), grown under heterologous gene induction conditions was evaluated. Results indicate that biosynthesis or half life of the peroxisomal enzymes AOX and catalase were significantly altered when the recombinant strains were grown in an induction medium using methanol as single carbon and energy source, affecting the growth and viability of recombinant strains. This effect was counteracted when sorbitol was added to the induction medium allowing the growth and viability of the studies recombinant strains.

Keywords: Alcohol oxidase, Methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, Trypsin, Peroxisomes, Catalase.

Referencias

1. Yee L., H. W. Blanch. 1993. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 41:781-790.
2. Greaney M.G. 1993. Expression vectors for the bovine trypsin and trypsinogen and host cells transformed therewith. EP 0597681 A1.
3. Romanos M.A. 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression. *Curr. Opin. Biotech.* 6: 527-533.
4. Escamilla Treviño L.L., J.M. Viader Salvadó, M. Guerrero Olazarán. 1999. Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. *CIENCIA UANL* 2(2):27-33.
5. Sellos D., A. Van Wormhoudt. 1992. Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda). *FEBS Lett.* 309:219-224.
6. Klein B., G. Le Moullac, D. Sellos, A. Van Wormhoudt. 1996. Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression during the moult cycle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28(5):551-563.
7. Escamilla-Treviño L.L., J.M. Viader-Salvadó, A. Van-Wormhoudt, J. Sepúlveda-Saavedra, R.M. Leal-González, M. Guerrero-Olazarán. 1999. Expression studies of shrimp trypsin and trypsinogen in *Pichia pastoris*. *Current Topics in Gene Expression Systems – Meeting*. Invitrogen Corporation and Research Corporation Technologies, San Diego, California (U.S.A.).
8. Escamilla Treviño L.L. 2001. Producción de tripsina de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*. Tesis de doctorado en ciencias con especialidad en Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.
9. Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.