

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

La manipulación del *DNA* ha aportado métodos eficaces para el aprovechamiento comercial de la información genética. Actualmente, en la biotecnología se emplean microorganismos reprogramados que portan nuevos genes para producir proteínas recombinantes de importancia biomédica e industrial. Existe una gran variedad de sistemas de expresión y hospederos para producir proteínas recombinantes, dentro de los cuales se encuentran bacterias, hongos y células de eucariotes en cultivo. La especie de bacteria más empleada para este fin ha sido *Escherichia coli*, la de hongos, *Saccharomyces cerevisiae* y la de células eucarióticas en cultivo, las células de ovario de hámster chino (células CHO para mamíferos) y para insectos las células de ovario de *Spodoptera frugiperda* (Sf21).

Actualmente se ofrecen en el mercado internacional una gran variedad de proteínas de origen recombinante, desde hormonas y factores de crecimiento, hasta nuevas vacunas. La lista se incrementa día a día, lo que ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado biofarmacéutico, a la vez que ha impulsado la investigación en este campo (Gilbert 1993 y Martínez 1994).

#### **1.1 Las Hormonas del Crecimiento.**

El estudio de las hormonas del crecimiento (*GHs*) empezó en 1886, con trabajos acerca de padecimientos adjudicables a sus deficiencias. Aunque la proteína se identificó en 1921, no fue sino hasta 1944 que se aisló la primera *GH*, la del bovino (Li y Evans, 1944; Díaz de la Serna, 1995).

La importancia económica que representan las *GHs* fue la motivación inicial para tratar de obtener las proteínas purificadas (Press, 1988). Debido a este motivo, los

primeros genes de *GHs* que se clonaron fueron precisamente de hormonas de interés económico, como la humana (1979) y la bovina (1980). Siendo la bovina, la primera *GH* obtenida en forma purificada a partir de extractos de hipófisis (Santomé, 1973).

Las *GHs* o somatotropinas (*STs*) representan una familia de proteínas producidas en los somatotropos de la hipófisis anterior de los vertebrados, e intervienen ya sea directa o indirectamente (vía las somatomedinas) como factores endocrinos importantes en el crecimiento somático postnatal de los vertebrados y en la lactación de los mamíferos (Brems *et al.*, 1988). Las *GHs* participan en el metabolismo del nitrógeno, minerales y carbohidratos, favorecen la lipólisis y tienen efectos hiperglucémicos y actúan en forma antagonista a la insulina; además, estimulan la síntesis de proteínas (Juskevich *et al.*, 1990). Las *GHs* pertenecen a la superfamilia de las *hematopoiétinas* y están relacionadas con las *prolactinas* (*PRL*), los *lactógenos placentarios* (*PL*) y con las *somatolactinas* (*SL*) (Ono *et al.*, 1990; Díaz de la Serna, 1995). Presentes en todos los vertebrados, las *GHs* constan de 190 residuos aminoácidos generalmente, aunque varían de especie a especie. En sus formas inmaduras o pre-*GHs* portan un péptido señal ó líder de alrededor de 26 aminoácidos, el cual dirige el transporte de la pre-hormona a través de la membrana del retículo endoplásmico hacia su cisterna, donde dicho péptido se remueve y la proteína madura funcional es finalmente secretada al torrente sanguíneo (Paladini *et al.*, 1982; Press, 1988). La hormona madura tiene un peso molecular aproximado de 21,000 daltons a pH neutro e inicia con un residuo de fenilalanina. En su secuencia, las *GHs* presentan residuos de cisteína que establecen puentes disulfuros estabilizando la estructura tridimensional de la forma biológicamente activa (Santomé *et al.*, 1973; Sato, *et al.*, 1988).

Se ha observado que aunque todas las *GHs* presentan los mismos efectos fisiológicos en los vertebrados, a veces no actúan únicamente en la especie que la produce. Así, una *GH* de algún vertebrado puede actuar en especies ubicadas más abajo en la escala evolutiva que la especie de donde se aisló, pero no en aquellas que están por encima de su origen.

## **1.2 La *BGHR*: su Función Biológica y su uso en la Ganadería.**

La administración de *BGHR* en bovinos incrementa la tasa de crecimiento, ganancia de peso y producción de carne y leche (Bauman, 1989). Dada la importancia de la hormona del crecimiento bovino en la industria lechera en particular y para la ganadería en general, se ha estudiado de forma extensa su función biológica. Los

efectos de administrar *BGHR* al ganado bovino destinado a la producción lechera son de gran importancia. El impacto en los animales tratados es el incremento de la producción de leche por bovino y el incremento en el aprovechamiento del alimento, lo que permite la reducción del número de animales requeridos para la producción de leche y el consecuente ahorro de dinero en el mantenimiento, alimento, agua, medicamentos, etc. También se reduce la producción de estiércol, del nitrógeno en la orina y del metano (Bauman, 1989). Sus principales acciones y efectos se describen en la TABLA 1.

**TABLA 1.**  
**EFFECTO DE LA *BGH* EN LA FISILOGIA Y TEJIDOS ESPECIFICOS DE BOVINOS LACTANDO.**

Glándula mamaria:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento de actividad y mantenimiento.</li> <li>• Incremento del flujo sanguíneo y absorción de nutrientes</li> <li>• Incremento de síntesis de leche</li> </ul>
Hígado:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en la producción de glucosa</li> <li>• Incremento en la respuesta a señales para la producción de glucosa (ej: insulina)</li> </ul>
Tejido Adiposo:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en la movilización de grasa almacenada para la producción de leche.</li> </ul>
Músculo:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento del uso de glucosa</li> </ul>
Riñón:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en la producción de 1,23 vitamina D3</li> </ul>
Páncreas:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No hay cambio en la secreción de insulina y glucagon en respuesta al cambio de niveles de glucosa</li> </ul>
Intestino:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento en la absorción de Ca, P y otros minerales requeridos para la leche.</li> <li>• Incremento del efecto estimulador de la vitamina 1,25 D3 sobre la proteína de unión a calcio.</li> </ul>
En general:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento de la producción de proteína de unión a calcio</li> <li>• Se reduce el uso de glucosa de algunos órganos</li> <li>• Se incrementa el uso de los almacenes de energía (grasa) si los nutrientes son inadecuados y no se incrementa si la alimentación es adecuada.</li> <li>• La glucosa puede usarse para formar grasa</li> <li>• No hay variación en niveles de insulina y Glucagon</li> <li>• No hay diferencia de gasto de energía para mantenimiento</li> <li>• El incremento de energía de gasto es proporcional al incremento de la producción de leche</li> <li>• Incremento en el rendimiento cardiaco consistente con el incremento de la producción de leche</li> <li>• Se incrementa la eficiencia productiva (leche por unidad de energía consumida).</li> </ul>

Fuente: Bauman (1989).

La *BGH* regula el uso de los nutrientes absorbidos. Cuando se incrementa la producción de leche, es necesario obtener nutrientes adicionales requeridos por las glándulas mamarias para proveer energía y materiales primarios para fabricar leche. La *BGH* coordina el metabolismo de varios tejidos y órganos del cuerpo con el fin de soportar el incremento en la demanda de nutrientes de las glándulas mamarias. Esta

coordinación de ajustes involucra el metabolismo de varios nutrientes (carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales) y son debidos a la acción de *BGH* en los tejidos (ejemplo hígado y tejido adiposo) para apoyar la lactación en los mamíferos (Bauman *et al.*, 1989).

La glucosa es un carbohidrato utilizado como fuente de energía por muchos tejidos y como materia primaria para la síntesis de leche (principalmente para la producción de lactosa). Con el suministro de *BGH* se incrementa el uso de glucosa para la síntesis de leche en la glándula mamaria en modo paralelo al incremento de la producción de leche. Este incremento en el uso de glucosa para sintetizar leche es ajustado en todo el cuerpo e incluye el incremento de la producción de glucosa por el hígado y la reducción del uso de glucosa en otros tejidos del cuerpo para obtener energía. Parte de estos ajustes suceden a causa de que *BGH* altera la respuesta de los tejidos a señales específicas (ej. insulina), manteniendo las funciones normales del cuerpo y destinando la glucosa para la síntesis de leche. Sin estos ajustes del metabolismo, el suministro inicial de *BGHr* puede causar que el uso de glucosa exceda la disponible, resultando esto en cetosis y posteriormente en la muerte. La cetosis no ha sido observada al suministrar *BGHr*, la cual se llegó a suponer ocurriría al suministrar *BGHr*. Estos estudios incluyen investigaciones de corto y largo plazo; ambos con estudios de toxicidad crónica y aguda. En éstos últimos se trataron vacas con 30 g de *BGHr* en un período de dos semanas, la cual es una cantidad de *BGHr* aproximada a la administrada en cuatro ciclos de lactación (IFST).

El metabolismo de lípidos proporciona otro ejemplo de la coordinación de cambios que suceden al suministro de *BGH*. Estos ajustes en el metabolismo del tejido adiposo dependen del estado nutricional de la vaca al momento de suministrar *BGH*. Normalmente, si la nutrición de la vaca excede sus requerimientos, el exceso es usado para formar tejido adiposo. Un ajuste metabólico diferente ocurre si la toma de nutrientes es igual o menor a sus requerimientos. En este caso, la *BGH* dirige la movilización de depósitos de grasa del tejido adiposo para que estas reservas de energía puedan ser usadas para sostener el incremento de la producción de leche. En ambos casos, estos ajustes involucran modificaciones en el tejido adiposo en respuesta a señales específicas (ej. insulina y otras hormonas que afectan el metabolismo de lípidos) con esto se permite que el uso de las reservas de grasa del cuerpo se coordine con cambios en las necesidades del animal y la disponibilidad de nutrientes. El tratamiento con *BGHr* gradualmente incrementa la toma de alimento para que los almacenes de grasa del cuerpo sean repuestos durante el ciclo de lactación. Esta regeneración de los

depósitos de grasa ocurre bajo cierto intervalo de condiciones en la dieta (Bauman *et al.*, 1989; Chalupa *et al.*, 1989; Chilliard, 1989). Si estos ajustes del metabolismo de lípidos no ocurren, las vacas enflacarían, disminuyendo la producción de leche. Estos efectos no solo no han sido observados, sino que incluso se ha demostrado que administrar *BGHR* incrementa la producción de leche y a su vez mejora el aprovechamiento del alimento (TABLA 2).

**TABLA 2.**  
**INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y AUMENTO EN LA EFICIENCIA**  
**ALIMENTICIA EN GANADO VACUNO LECHERO TRATADO CON *BGHR*.**

Localización	Incremento en la producción de leche (%)	Incremento en la eficiencia alimenticia (%)
Arizona	8.3	2.7
Cornell University	11.5	5.3
Missouri/Monsanto	21.8	8.2
Utah/Utah State U.	14.6	5.3
Francia	17.8	9.3
Alemania	16.6	4.9
Nueva Zelanda	18.5	7.1
Reino Unido	19.2	5.4

Fuente: Peel *et al* (1994).

El método de administración de *BGHR* es por vía subcutánea y la formulación que actualmente se utiliza de forma comercial es una suspensión de liberación prolongada que se aplica en un intervalo de tiempo determinado. El sabor de la carne y leche de bovinos tratados con *BGHR* no es alterado, pero el contenido de grasa en la carne es menor.

La leche, producto del tratamiento de vacas con *BGHR*, no difiere de la leche de vacas no tratadas con *BGHR*. Las características que han sido evaluadas al respecto incluyen el punto de congelamiento, pH, propiedades térmicas, susceptibilidad a oxidación, características sensoriales, incluido el sabor. Semejanzas y no diferencias son encontradas en las propiedades requeridas para producir queso, incluido el crecimiento inicial del cultivo, coagulación, acidificación, producción, composición y propiedades de varios quesos.

### 1.2.1 Controversias sobre el uso de *BGHR*:

Estudios realizados en la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EUA demostraron que la *BGHR* no tiene efecto en dosis diarias equivalentes a 2.3 millones de veces a la que sería expuesto un humano en cinco vasos de 8 onzas de leche al día, por lo que se concluyó que el uso de *BGHR* en ganado vacuno lechero no representa ningún riesgo para la salud de los consumidores (Juskevich *et al.*, 1990).

Posteriormente se desataron controversias con el uso de *BGHR* en EUA, donde la hormona producida en *E. coli* se utiliza desde 1994. Desde entonces, la controversia se ha difundido especialmente a Europa, e involucra aspectos del riesgo para la salud humana, para la salud animal y aspectos socioeconómicos. Esto ha sido amplificado por organizaciones y activistas opuestos a la biotecnología debido a ignorancia e intereses económicos.

La *BGHR* no tiene actividad biológica reconocible en humanos cuando son inyectados con ésta. La razón es la diferencia del 35% en la estructura tridimensional, pues para tener actividad biológica debe primero unirse a un receptor específico en la superficie celular. La *BGH* se une al receptor de la *HGH* en un orden de 10,000 a 100,000 veces menor que la *HGH* (Moore *et al.*, 1985; Hoquette *et al.*, 1989).

Además, la pasteurización destruye el 90% de la *BGH* en leche y por si esto fuera poco, la *BGH* ingerida no es absorbida como tal, pues primero es digerida por enzimas proteolíticas en el estómago e intestino y después absorbida como aminoácidos y oligopéptidos.

El factor de crecimiento parecido a insulina tipo 1 (*IGF-1*) se incrementa en la leche de bovinos tratados, pero tampoco representan riesgo alguno para los humanos. *IGF-1* es destruido al igual que *BGH* en el sistema digestivo humano. El *IGF-1* humano es idéntico al *IGF-1* bovino. Además, el *IGF-1* es un componente normal de la leche humana y está presente en altas concentraciones en el calostro humano. Los niveles de *IGF-1* bovino en leche de bovinos tratados con *BGHR* es menor al de *IGF-1* en el calostro humano (Costigan, 1988; Bauman, 1995).

Otra de las grandes controversias del uso de *BGHR* es su efecto sobre la mastitis en animales tratados (Burnevich *et al.*, 1988). Sin embargo, en un año de uso de *BGH* en New York, EUA, durante el cual se trataron 335,000 vacas (45% del total

del estado) el programa de control de mastitis reportó que no había indicio de que *BGH* tuviera un efecto de incremento en la incidencia de mastitis.

Luego de que la FDA (Food and Drug Administration) de EUA determinó que la leche y carne de bovinos tratados con *BGH* es segura para el consumo humano, la Comisión Europea aceptó que la leche producida de bovinos tratados con *BGHr* es segura.

Todos estos años de experiencia acumulada del uso de la *BGHr* y el cúmulo de evidencias de su seguridad, han conducido a que el tratamiento de bovinos con *BGHr* sea permitido en 17 países: Argelia, Brasil, Bulgaria, República Checa y Eslovaca, India, Jamaica, Corea, México, Namibia, Pakistán, Rumania, Rusia, Sur África, EUA, Venezuela, y Zimbabwe. (IFST, 1998).

### **1.2.2 Características Moleculares de la *BGH*:**

La *BGHr* posee cuatro cisteínas las cuales están involucradas en los dos enlaces disulfuro que participan en la estabilización de la estructura tridimensional (Cys 53-Cys 164 y Cys 181-Cys 189). Como pre-hormona, forma inmadura o pre-*BGH*, porta un péptido señal ó líder de 26 aminoácidos, el cual es utilizado para dirigir el transporte de la pre-hormona a través de la membrana del retículo endoplásmico hacia su cisterna, donde se remueve dicho péptido y la proteína madura funcional es finalmente secretada al torrente sanguíneo (Paladini *et al.*, 1981; Press, 1988). Se ha encontrado que el extremo *N-terminal* puede iniciar ya sea en el residuo de fenilalanina, como lo hacen el resto de las *GHs* en otras especies, o en un residuo aminoacídico anterior (-1) correspondiente a alanina (Kopchik, 1992).

También se ha descrito otro polimorfismo pero en este caso en el codón 126 del gen *bGH*, dando como resultado dos formas, las cuales son de importancia en la producción de leche, pues el genotipo homocigoto en dicho codón para ganado Holstein es leucina, mientras que para ganado Jersey es valina, con un diferencial de producción de leche en los dos casos del 2%. Como resultado de este descubrimiento se sugiere tomar en cuenta esta variación cuando se aplica al ganado lechero la *BGHr*, para administrar la variante adecuada al genotipo correspondiente del ganado (Collier, 1992).

Las estructuras tridimensionales obtenidas por cristalografía de difracción de rayos X de las *GHs* del cerdo (Abdel et al., 1987) y del humano unida con su receptor (DeVos et al., 1992), así como la predicha para la *BGH* (Carlacci et al., 1991), presentan una conformación similar. Las estructuras terciarias de las *GHs* de mamíferos se caracterizan por consistir de una sola cadena polipeptídica y por presentar 4 hélices alfa orientadas de forma antiparalela y que están conservadas en todas las especies de mamíferos, contenidas estas cuatro hélices en los residuos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183 (Bell et al., 1985).

La estructura tridimensional de *BGH* fue deducida por comparación con la estructura tridimensional de la *PGH* y con la isoforma de 22 kDa HGH, considerando los cambios aminoacídicos presentes en la *BGH* (Carlacci et al., 1991) (FIGURA 1). De la misma manera, las estructuras tridimensionales de otras *GHs* pueden ser deducidas tomando en cuenta las tendencias estructurales de los aminoácidos sustitutos de éstas con respecto a la *PGH* (Kopchick et al., 1992).



**FIGURA 1.** Representación gráfica del modelo tridimensional hipotético de la *BGH*. La estructura tridimensional de *BGH* fue deducida por comparación con la *PGH* y con la isoforma de 22 kDa HGH, considerando los cambios aminoacídicos presentes en la *BGH* (Carlacci et al., 1991).



### 1.2.3 Producción de *PGH*, *OGH* y *BGH* Recombinantes (r) en *E. coli*.

#### 1.2.3.1 Expresión en *E. coli*:

El desarrollo comercial basado en la tecnología del *DNA* recombinante para producir proteínas recombinantes, se centró por más de una década en *E. coli* como el microorganismo hospedero. Sin embargo, esta bacteria tiene algunas limitaciones como por ejemplo, contener varios factores pirogénicos tóxicos que deben eliminarse de cualquier polipéptido útil como producto farmacéutico. Naturalmente, la eficiencia con la cual pueda lograrse esta purificación varía según el polipéptido del que se trate. Además, las proteasas de *E. coli* pueden limitar seriamente los rendimientos de algunos productos recombinantes. Así mismo, algunos productos de genes heterólogos que se han expresado en *E. coli* se ha encontrado que se producen en forma insoluble, precipitando como cuerpos de inclusión. Estas y otras consideraciones han derivado en el interés hacia huéspedes alternativos; en particular, el uso de microorganismos eucarióticos que pudieran ofrecer mejores condiciones para la producción de proteínas recombinantes activas (Cregg, 1993).

De entre los factores que limitan una buena expresión de proteínas de eucariotes en bacterias, merecen especial mención los codones que son usados en el gen original y que probablemente no son los óptimos para el nuevo hospedero, o se requieran codones adicionales para que el gen funcione en el ambiente nuevo. Para que se sobreexpresen el gen, deben estar presentes las señales genéticas especiales que controlan el inicio de la transcripción y de la traducción del gen exógeno. El nuevo hospedero puede o no realizar las modificaciones pos-traduccionales requeridas por proteínas recombinantes complejas, con lo cual los plegamientos de la proteína pueden o no ser apropiados.

El empleo de *E. coli* para la expresión del *DNA* complementario (*DNAc*) al *RNAm* de la *BGH* no redituó resultados alentadores. La producción de la proteína resultó muy baja, cercana a los límites de sensibilidad de los métodos de detección ordinarios. Diversos estudios han encontrado que es necesario cambiar los codones sinónimos por aquellos preferidos por la bacteria, para obtener niveles de producción aceptables.

Se han encontrado problemas específicos de expresión en las *GHs* ovina (*oGH*) (Wallis *et al.*, 1989) y bovina (*bGH*) (George *et al.*, 1985; Hsiung *et al.*, 1987;

Schonner *et al.*, 1984; Wallis *et al.*, 1989). Dichos *DNAc* nativos poseen gran similitud en su secuencia y ambos presentan niveles de expresión bajos o no detectables. Al comparar los resultados obtenidos por diversos investigadores se ha determinado que al alterar la secuencia codificante en el extremo *N-terminal* de *BGH* (George *et al.*, 1985; Hsiung *et al.*, 1987; Wallis *et al.*, 1989), mediante la modificación, inserción o eliminación de nucleótidos después del codón de iniciación de la traducción o AUG (Schonner *et al.*, 1984; Wallis *et al.*, 1989), se puede incrementar la expresión hasta 50 veces.

En el *DNAc* de la *pGH* las alteraciones en las secuencias previas (5') al codón de iniciación, pueden incrementar la expresión (Vize *et al.*, 1987; Wallis *et al.*, 1989). Todos estos estudios indican que las secuencias al 5' y al 3' del AUG son determinantes en la eficiencia de expresión de las *GHs*. Una hipótesis basada en los resultados obtenidos por varios investigadores, postula que la expresión deficiente originada en estos sistemas es debida a estructuras secundarias en el *RNA<sub>m</sub>* del *DNAc* nativo de *GHs*, las cuales inhiben el inicio de la traducción. En la mayoría de los casos la naturaleza de las estructuras secundarias no es clara (Seeburg *et al.*, 1983; Tomich *et al.*, 1989; Sami *et al.*, 1990; Schonner *et al.*, 1984; George *et al.*, 1985).

Entre las estrategias de expresión desarrolladas para la producción de *BGHr* se encuentran las siguientes:

- 1) La fusión del *DNAc* de *bGH* con la región codificante del gen de la  $\beta$ -lactamasa, con lo que se obtuvo la proteína de fusión en el citoplasma de *E. coli* (Keshnet *et al.*, 1981).
- 2) La modificación de la región inicial de la proteína madura con la ayuda de *DNA* sintético, lo que incrementó su producción, hasta alcanzar el 15% de las proteínas totales (Seeburg *et al.*, 1983).
- 3) El reemplazo de la región 5' que codifica para la proteína madura, por codones ricos en A y T, con lo que se incrementó el nivel de expresión, destacándose la importancia del codón posterior al de iniciación (George *et al.*, 1985).
- 4) Construcción de un gen completamente sintético codificante para *BGHr*, con el fin de adecuar codones y así incrementar la producción de *BGHr* en *E. coli* (Cho *et al.*, 1994).

- 5) Fusión del *DNAc de bGH* con el *péptido señal* del gen *lamB* con el que *BGHr* fue secretada al periplasma, donde se encontró correctamente plegada. Los niveles de producción de *BGHr* fueron de 1 a 2 mg por ml de medio (Klein *et al.*, 1991).

Por otra parte, se ha comprobado que plásmidos basados en el origen de replicación de pBR322 son poco útiles para un nivel de expresión aceptable de *BGHr* y que ciertas mutaciones en las regiones que controlan la replicación de este plásmido, en conjunción con cambios en la secuencia nucleotídica del *DNAc de bGH*, pueden incrementar la tasa de expresión de la hormona recombinante (Watson *et al.*, 1990).

### 1.2.3.2 Producción de *BGHr* en *Saccharomyces cerevisiae* y *Streptomyces lividans*.

Para producir *BGHr* en *S. cerevisiae* se construyó un gen completamente sintético, con el fin de adecuar codones y así incrementar la producción de *BGHr* en levaduras (Cho *et al.*, 1994). Otra estrategia para producir *BGHr* en *S. cerevisiae* pero de forma intracelular fue la construcción de un sistema de expresión donde el vector portador del *DNAc de bGHr* tuviera un origen de replicación autónomo (Fraser *et al.*, 1984).

Para producir *BGHr* en *S. lividans* se empleó el promotor del gen *aph*, que codifica para la enzima *aminoglicósido 3' fosfotransferasa* para regular la transcripción del *DNAc de bGH*. La producción de *BGHr* alcanzó el 0.17% de la proteína total (Gray *et al.*, 1984).

## 1.3 *Pichia pastoris* como Hospedero Biotecnológico.

### 1.3.1 Ventajas de las Levaduras.

En general, las levaduras presentan alta eficiencia de traducción de los *RNAm* de origen eucariote. A su vez pueden glicosilar las proteínas recombinantes producidas, característica valiosa cuando se requiere para la actividad del producto polipeptídico. Pueden crecer a una densidad celular elevada y los procesos de fermentación son sencillos y de bajo costo, en comparación con *E. coli*. También son adaptables a procesos de fermentación continuos (Invitrogen, 1994).

Entre otras ventajas de las levaduras como hospederos está el hecho de que muchas funciones críticas del organismo, como la fosforilación oxidativa, están

colocadas dentro de organelos, y por lo tanto las funciones críticas no se exponen a posibles efectos perjudiciales ocasionados por la producción de polipéptidos extraños a la célula. Además la levadura tiene una preferencia de codones semejante a los organismos superiores, por lo que generalmente no se dificulta la traducción de productos expresados por los *DNAcs* obtenidos mediante transcripción reversa de los *RNAms* de mamíferos (Zaret *et al.*, 1984).

En particular, *Pichia pastoris* además de poseer las características ya mencionadas del grupo de las levaduras tiene las siguientes: es una levadura metilotrófica (puede crecer en presencia de metanol como única fuente de carbono), es de fácil manipulación y de rápido crecimiento, los niveles de producción de proteínas heterólogas son de 10 a 100 veces mayores a *S. cerevisiae* y alcanza una densidad celular muy elevada (hasta 100 g/l). También puede secretar la proteína al medio de cultivo, ofrece el ambiente apto para el plegamiento de proteínas eucariotes y lleva a cabo algunas modificaciones postraduccionales, características de células animales y vegetales (Invitrogen, 1994).

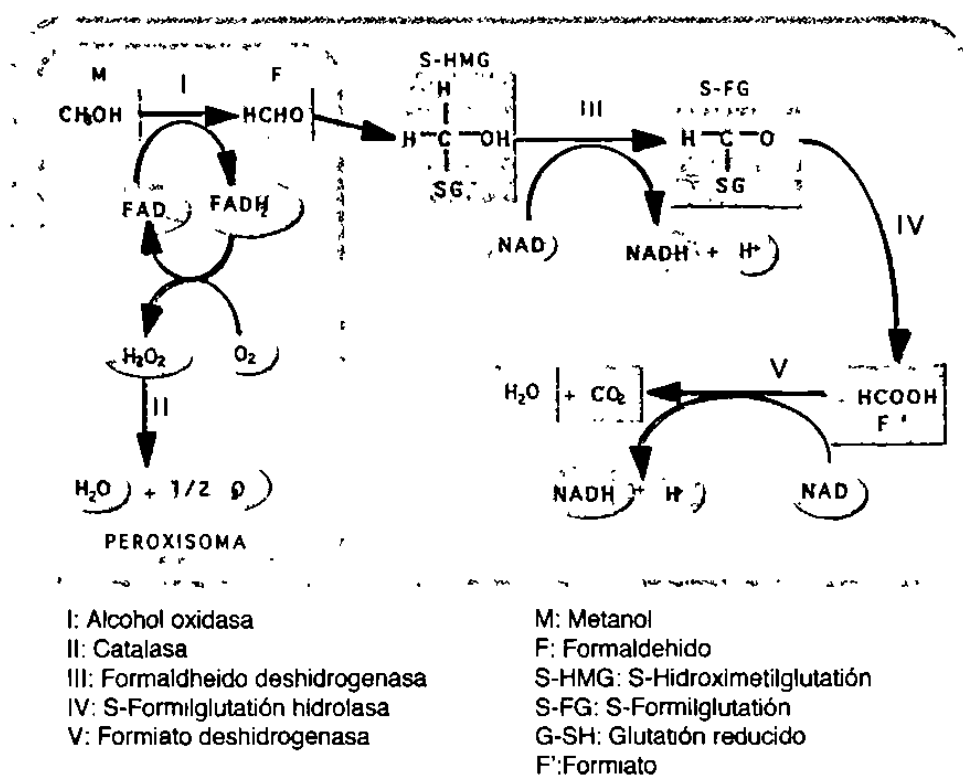
### 1.3.2 Levaduras Metilotróficas.

Los cuatro géneros de levaduras metilotróficas pueden subdividirse en dos grupos: las especies asporógenas *Candida* y *Turolopsis* y las levaduras ascomicetas *Hansenula* y *Pichia* (Faber, 1995).

La ruta metabólica para la conversión del metanol a dióxido de carbono y agua en éstos géneros, involucra a las enzimas *alcohol oxidasa*, *catalasa*, *formaldehído deshidrogenasa*, *S-formil-glutación hidrolasa* y *formiato deshidrogenasa* (Ellis *et al* 1985) (FIGURA 2). En la primera etapa del metabolismo del metanol, éste se oxida a formaldehído empleando la enzima alcohol oxidasa y oxígeno molecular como donador de electrones, generándose peróxido de hidrógeno (FIGURA 2).

Dos genes codifican para la *alcohol oxidasa* y son el *alcohol oxidasa primario* y el *alcohol oxidasa secundario* (AOX1 y AOX2). El gen AOX1 fue aislado de *P. pastoris* por tamizaje de una librería de *DNAc* obtenida de células crecidas en presencia de metanol (Ellis *et al.*, 1985). Las proteínas producto de ambos genes tienen una similitud del 97% y poseen aproximadamente la misma actividad específica. Sin embargo la gran mayoría de los transcritos provienen del gen AOX1, por lo que es responsable de casi toda la degradación del metanol. La enzima producto del gen AOX1

tiene mas baja afinidad por el  $O_2$ , lo que es compensado con la síntesis de grandes cantidades de la enzima, alcanzando hasta el 35% de la proteína celular total. La expresión del gen está regulada de modo que la enzima no es sintetizada en presencia de otra fuente de carbono, debido a que el metanol activa el promotor del gen, siendo este alcohol el elemento regulador empleado para dirigir la biosíntesis de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. En una fermentación en presencia de metanol como única fuente de carbono, los *RNAm* de *AOX1* representan aproximadamente el 5% del *RNA poliA* total, pero los *RNAm* de *AOX1* no son detectables cuando está presente otra fuente de carbono. (Creeg, 1989; Creeg, 1993; Koutz, 1989).



**FIGURA 2.** Vía metabólica para la oxidación del metanol en dióxido de carbono y agua en levaduras metilotróficas. Las enzimas involucradas se representan con números romanos y los compuestos presentes en las reacciones se representan con abreviaciones (Ellis *et al.*, 1985).

En base a las características de este proceso metabólico, se ha desarrollado un sistema de producción de proteínas recombinantes en el cual un vector portando el gen heterólogo bajo el control del promotor de la *alcohol oxidasa I* se introduce a las células, en donde por recombinación homóloga se integra al genoma de la levadura, siendo posible inducir la expresión del gen heterólogo al añadir el metanol como única fuente de carbono.

### 1.3.3 Producción de Proteínas Recombinantes en *Pichia pastoris*:

Las fermentaciones en *P. pastoris* recombinante se llevan a cabo en dos fases. En la primera fase, se busca el aumento de masa celular empleando un medio de cultivo mínimo, siendo la fuente de carbono glicerol o glucosa. En esta etapa se encuentra reprimida la producción de la proteína recombinante, debido a que el promotor del gen *AOX1* que dirige la síntesis se encuentra apagado.

En la segunda fase, este promotor se activa al agregar metanol al medio y convertirse en la única fuente de carbono disponible, siendo en esta etapa cuando se produce la proteína recombinante.

El sistema de expresión de *P. pastoris* ha sido exitosamente utilizado para producir numerosas proteínas heterólogas (TABLA 3). Una variedad de esquemas de lote alimentado y fermentación continua han sido descritos en la literatura (Creeg *et al* 1993, Invitrogen 1994).

El promotor *AOX1* puede ser activado de forma óptima solo en presencia de metanol como única fuente de carbono, en condiciones de crecimiento como matraz, tubos o placas a 30°C. El tiempo de duplicación en metanol es aproximadamente de 6 h en clonas con fenotipo *Mut*<sup>+</sup> (Metanol utilization), 18-24 h en clonas con fenotipo *Mut*<sup>S</sup> (Metanol utilization slow), y en medios con glucosa o glicerol es de 2 h (*Mut*<sup>+</sup> y *Mut*<sup>S</sup>). En algunos casos, el crecimiento se puede incrementar añadiendo 1% de sorbitol o 100 mM de alanina, ya que estos compuestos no interfieren con la inducción del promotor *AOX1* (Sreekrishna y Kropp, 1996).

En algunos casos, el producto expresado es tóxico. En éstos se sugiere un paso previo de inducción. Cuando el producto es tóxico para *P. pastoris* se puede comparar el crecimiento de transformantes en medios con sorbitol o alanina en las combinaciones sorbitol+metanol, alanina+metanol; si la proteína expresada es tóxica, el crecimiento en presencia de metanol es muy desigual (Sreekrishna y Kropp 1996).

Cuando la proteína es secretada, se recomienda ensayar con varios medios y distintos pHs (pH 2.5-8), con el fin de determinar el pH óptimo para una producción eficiente. Si la proteína es susceptible a proteólisis, se recomienda ensayar con un pH menor o igual a 6 (Sreekrishna, 1993).

La integración de múltiples copias del cassette de expresión en *Pichia pastoris* en algunos casos incrementa la expresión del gen recombinante de interés (Brierley *et al.*, 1994; Clare *et al.*, 1991a y b; Creeg, 1993; Romanos *et al.*, 1991a y b; Scorer *et al.*, 1993; Scorer *et al.*, 1994; Thill *et al.*, 1990; Vedvick 1991). En la TABLA 3 se presentan algunas proteínas expresadas y la producción de clonas multicopias correspondiente en la TABLA 4.

**TABLA 3.**  
**PROTEINAS DE ORIGEN RECOMBINANTE PRODUCIDAS EN *Pichia pastoris***

Proteína	Autor
Antígeno de superficie VHB	Cregg <i>et al.</i> , 1987
Invertasa	Tschopp <i>et al.</i> , 1987
Factor de necrosis tumoral	Shreekrishna <i>et al.</i> , 1988
Lisozima	Digan <i>et al.</i> , 1989
Fragmento C de la toxina tetánica	Clare <i>et al.</i> , 1991a
Proteína de envoltura del HIV-1	Scorer <i>et al.</i> , 1993
D-alanina carboxipeptidasa	Despereaux <i>et al.</i> , 1993
Péptido anticoagulante de garrapata	Laroche <i>et al.</i> , 1994
CD-38 humana	Fryxell <i>et al.</i> , 1995
$\alpha$ -Galactosidasa del grano de café	Zhu <i>et al.</i> , 1995
Anticuerpos monoclonales de conejo	Ridder <i>et al.</i> , 1995
Pectato liasa	Guo <i>et al.</i> , 1995
Factor de crecimiento endotelial vascular humano	Mohanraj <i>et al.</i> , 1995
Proteína anticoagulante antimetastásica	Brankamp <i>et al.</i> , 1995
Transferrina	Steinlein <i>et al.</i> , 1995
Fosfatasa ácida	Payne <i>et al.</i> , 1995
Enterocinasa bovina	Vozza <i>et al.</i> , 1996
Glicolato oxidasa y catalasa	Payne <i>et al.</i> , 1997
c-Kit receptor cinasa	Lam <i>et al.</i> , 1997
Proteína ORF3 del VHE	Lai <i>et al.</i> , 1997
Inhibidor porcino de la anhidrasa carbónica	Wuebbens <i>et al.</i> , 1997
Ligando trimérico CD40	McGrew <i>et al.</i> , 1997
Hexosa oxidasa del alga <i>Chondrus crispus</i>	Hansen <i>et al.</i> , 1997
Proteína HMG1	Mistry <i>et al.</i> , 1997

Fuente: Sreekrishna y Kropp (1996).

**TABLA 4.**  
**PRODUCCION PROTEICA DE CLONAS DE *Pichia pastoris* MULTICOPIA DEL CASSETTE DE EXPRESION.**

Proteína	Nivel de expresión	# de copias	Referencia
TNF humano	10 g/L	> 20	Sreekrishna <i>et al.</i> , 1988 a y b
Proteína de 51.4 KD de <i>B. sphaericus</i>	Rango de < 1 a > 20 de la proteína soluble	no determinado	Sreekrishna y Hopkins. (Datos no publicados)
Fragmento C de la toxina tetánica	12 g/L	14	Clare <i>et al.</i> (1991)
Hormona de crecimiento de salmón	0.3 g/L	18	Sreekrishna y Parker (Datos no publicados)
Pertactina P69 de <i>Bordetella pertussis</i>	> 3 g/L	>10	Romanos <i>et al.</i> , (1991a)
Aprotinina	0.9 g/L	5	Vedvick <i>et al</i> (1991)
mEGF	0.45 g/L	19	Clare <i>et al</i> (1991b)

Fuente: Sreekrishna (1993).

### 1.3.4 Introducción de Genes Extraños en *Pichia pastoris*:

Como *Pichia pastoris* no permite vectores episómicos estables, los genes extraños se introducen a *Pichia* empleando vectores de integración. Todos usan como marcador de selección el gen *HIS4* y tienen la misma organización. La cepa de *Pichia pastoris* mas utilizada es *GS115 (his4)*, pero también se emplean cepas deficientes de proteasas [por ejemplo *SMD1168 (his4, pep4)* ] con las cuales se ha encontrado que se reduce la degradación proteolítica de las proteínas recombinantes secretadas. Los vectores de expresión son dirigidos a integrarse en el genoma de *Pichia*, dependiendo del sitio de corte del *DNA* para la transformación. La digestión del fragmento de *DNA* que expone los extremos homólogos a *AOX1* dirige el reemplazamiento en *AOX1* y genera cepas recombinantes *Mut<sup>S</sup>*. La linearización del vector por corte en 5'*AOX1* o *HIS4*, resulta en la integración dirigida del plásmido en los sitios homólogos correspondientes del vector.

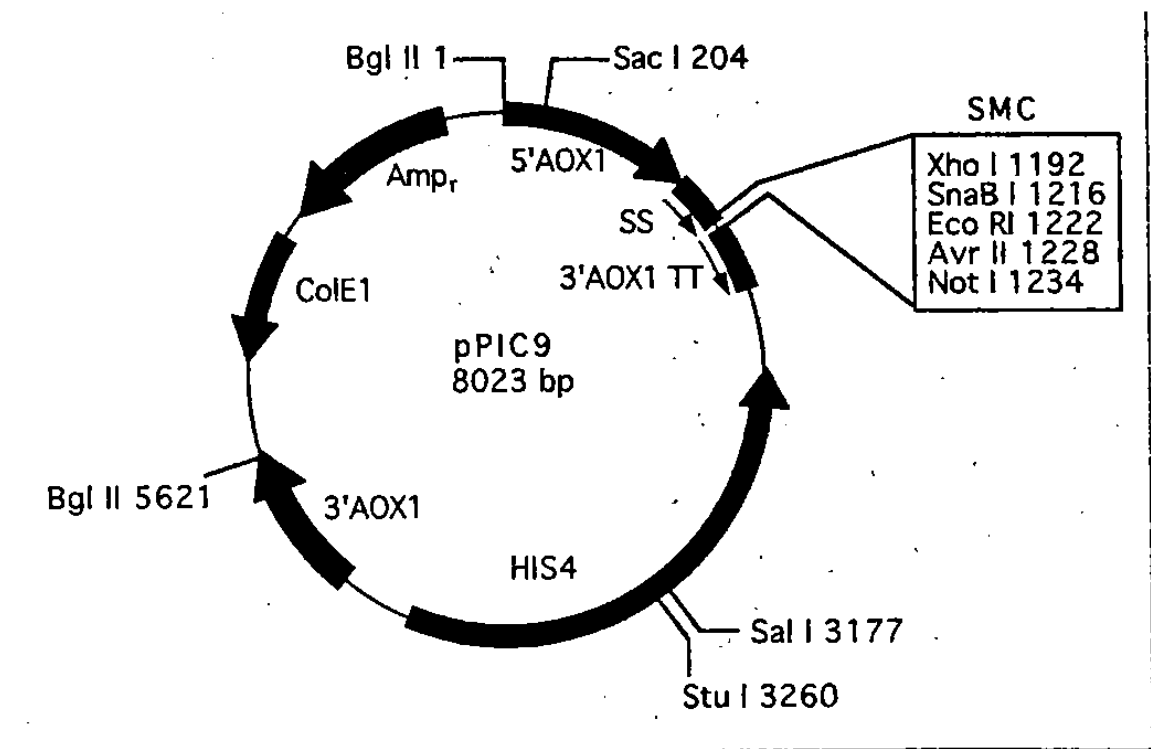
Los elementos de un vector de integración característico de *P. pastoris* son: 1) Promotor de la transcripción del gen *AOX1*; 2) terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* región 5'*AOX1* y 3'*AOX1 TT*; 3) sitio múltiple de clonación, seguido de 4) una región 3'*AOX1*, la cual sirve para estabilizar el *RNAM* expresado en *Pichia*; 5) el gen de la *histidinol deshidrogenasa (HIS4)* también de *P. pastoris* y que sirve como marcador de selección en cepas de *P. pastoris* mutadas en este gen (*his4*); y 6) Además, para la secreción de la proteína al medio de cultivo se utilizan vectores que poseen una secuencia señal, tal como la del factor alfa de *S. cerevisiae* o la de la fosfatasa ácida de *P. pastoris (PHO1)*. Finalmente los vectores también contienen



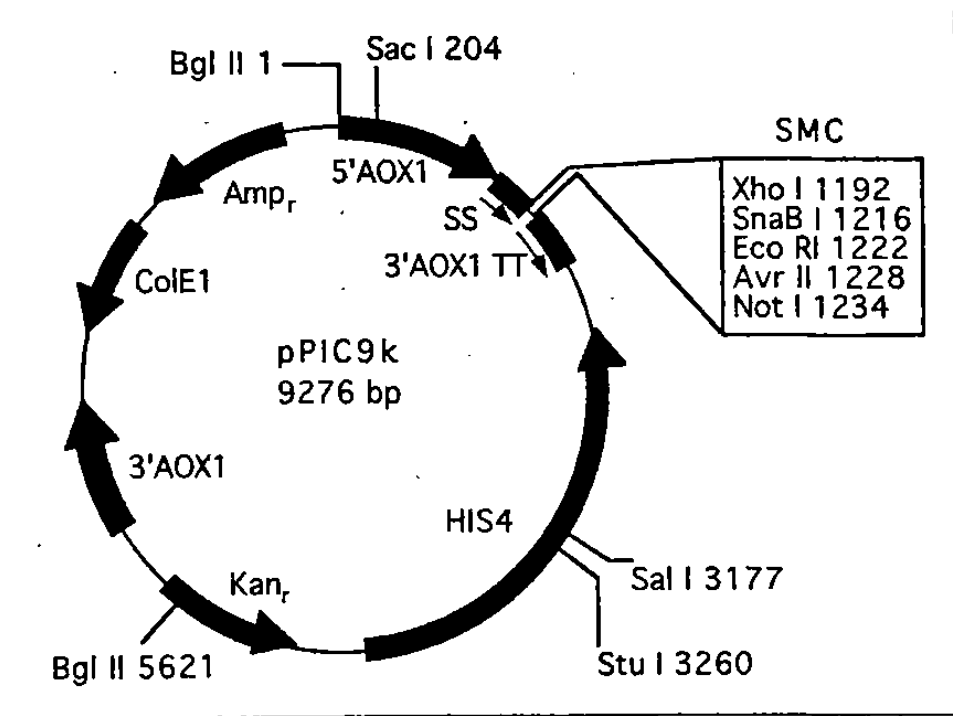
secuencias necesarias para su propagación en *Escherichia coli*, tales como el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación *ColE1* (Invitrogen, 1994) (FIGURAS 3 y 4 y TABLA 5).

### 1.3.5 Los Plásmidos pPIC9 y pPIC9K:

Los vectores de integración pPIC9 y pPIC9K son usados para la expresión de proteínas recombinantes y son muy similares (FIGURAS 3 y 4; TABLAS 5 y 6); ambos carecen de origen de replicación autónomo para funcionar como episomas en levaduras. La diferencia entre ellos es que pPIC9K porta el gen bacteriano *Kan<sup>r</sup>* (*kan* de *Tn903*), ausente en pPIC9. pPIC9K en bacterias confiere resistencia a kanamicina. Además, este gen también confiere resistencia a G418 (geneticina) en *Pichia*. El nivel de resistencia a geneticina depende básicamente del número de genes de *kan<sup>r</sup>* integrados en el genoma de *Pichia*. Una sola copia confiere resistencia a G418 a una concentración aproximada de 0.25 mg/mL; múltiples copias integradas de pPIC9K pueden proporcionar resistencia a concentraciones de 0.5 mg/ml (1-2 copias) hasta 4 mg/ml (7-12 copias). Debido a que el gen *Kan<sup>r</sup>* está incluido en el cassette de expresión, se puede inferir que las clonas multicopias también son multicopias del gen de interés incluido en el cassette de expresión (Invitrogen, 1994; 1996).



**FIGURA 3.** Representación esquemática de los elementos constituyentes del vector de integración pPIC9: Dichos elementos incluyen a los de origen eucariótico (de la levadura) como en el caso del promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 TT, respectivamente), región 3' del mismo gen (3'AOX1), gen de la *histidinol deshidrogenasa* (*HIS4*) de *P. pastoris* y secuencia señal del factor alfa de *S. cerevisiae* (SS). También contiene secuencias de origen bacteriano, necesarias para propagación del plásmido en *Escherichia coli* tales como el gen de *resistencia a ampicilina* (*amp<sup>r</sup>*) y el origen de replicación (*ColE1*). Además, incluye un sitio múltiple de clonación (SMC), precedido de la secuencia señal para propiciar la secreción de la proteína recombinante de interés (Invitrogen, 1994).



**FIGURA 4.** Representación esquemática de los elementos constituyentes del vector de integración pPIC9K: Este plásmido es empleado para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris* y selección de clones con múltiples integraciones del cassette de expresión de acuerdo al nivel de resistencia a G418 (geneticina). Además de los elementos ya descritos para pPIC9 en la FIGURA 3, este otro plásmido también incluye al gen de resistencia a kanamicina (*Kan<sup>r</sup>*) que confiere resistencia a kanamicina en *E. coli* y a G418 en *Pichia* (Invitrogen, 1996).

**TABLA 5.**  
**CARACTERISTICAS, DESCRIPCION Y FUNCION DE LOS ELEMENTOS**  
**CONSTITUYENTES DE LOS VECTORES DE INTEGRACION pPIC9 Y pPIC9K.**

Característica	Descripción	Beneficio
5'AOX1 1-948* 1-948**	Fragmento de aproximadamente 1000 pb que contiene el promotor AOX1	Permite altos niveles de expresión inducibles por metanol en <i>Pichia</i> Permite la integración sitio dirigida en el locus AOX1
Secuencia señal del factor alfa de <i>S. cerevisiae</i> 949-1218* 949-1218**	Fragmento de 269 pb codificante para la secuencia señal para la secreción en <i>Pichia</i>	Permite la secreción de la proteína de interés al medio
Sitio múltiple de clonación (MCS) 1192-1241* 1192-1241**	Sitios únicos de restricción, <i>Sna</i> BI, <i>Eco</i> RI, <i>Avr</i> II, <i>Not</i> I	Permiten la inserción del gen de interés en el vector de expresión
Terminador de la transcripción (TT) 253-1586* 253-1586**	Señal nativa para terminar la transcripción y poliadenilación del RNAm	Permite la terminación eficiente de transcripción y poliadenilación del RNAm
HIS4 4514-1980* 4514-1980**	Gen de <i>Pichia</i> tipo nativo, codificante para la <i>histidinol deshidrogenasa</i> (aprox 2.4 kb) y usado para complementar cepas de <i>Pichia his4</i>	Dota de un marcador de selección para aislar las cepas <i>Pichia</i> recombinantes
Amp 7725-6865* 8966-8106**	Gen de resistencia a ampicilina	Permite la selección en <i>E. coli</i>
Origen ColE1 6723-6104* 7961-7288**	Origen de replicación de <i>E. coli</i>	Permite la replicación y mantenimiento en <i>E. coli</i>
<i>Not</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Sac</i> I, <i>Sal</i> I	Sitios de restricción	Permiten linearizar el vector para una integración eficiente en el genoma de <i>Pichia</i> y generación de recombinantes <i>Mut+</i> o <i>Muts</i>
<i>Kan</i> <sup>r</sup> 5743-4928**	Gen de resistencia a Kanamicina de <i>Tn903</i> el cual confiere resistencia a G418 (geneticina) en <i>Pichia</i> y resistencia a kanamicina en <i>E. coli</i>	Permite el tamizaje in vivo de insertos multicopia por incremento al nivel de resistencia a G418 Permite la selección por resistencia a Kanamicina en <i>E. coli</i>

Fuente: Invitrogen, (1994; 1996).

\* Posición nucleotídica en el vector pPIC9.

\*\* Posición nucleotídica en el vector pPIC9K.

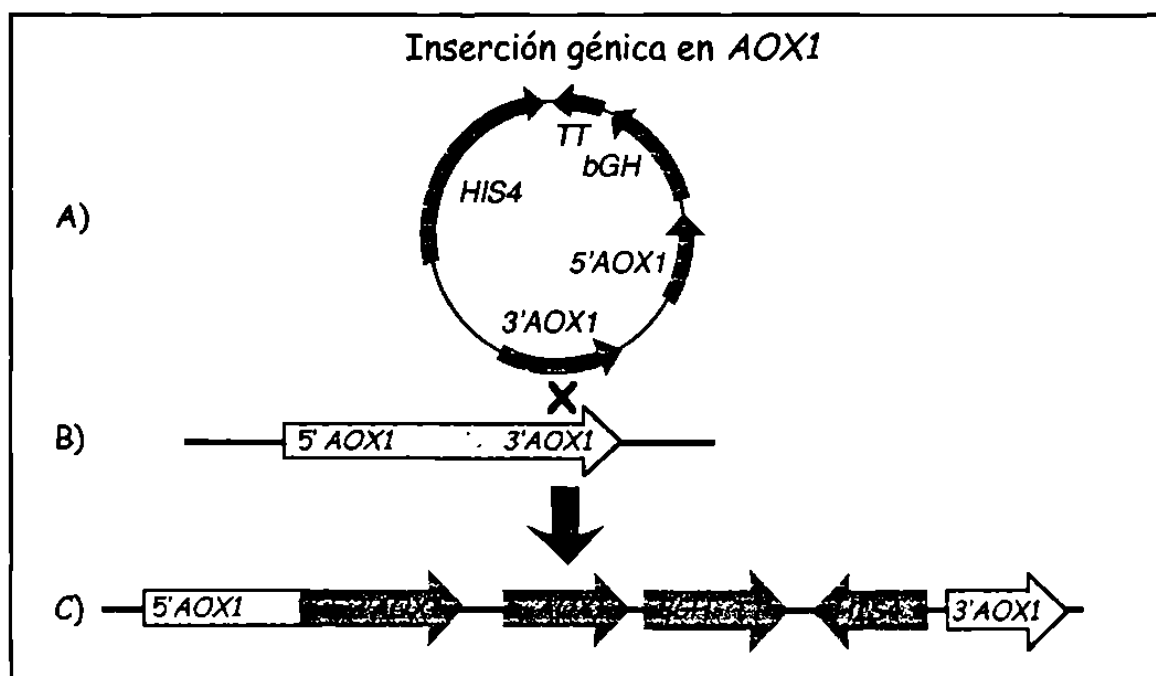
### 1.3.6 Integración del Cassette de Expresión al Genoma de *P. pastoris*.

El *DNA* integrado en el genoma de *Pichia* se mantiene estable a través de muchas generaciones, con lo cual se evita el problema de la pérdida, segregación o inserción de secuencias de *DNA* extraño en el cassette de expresión integrado debido a la inestabilidad propia de un plásmido de replicación autónoma (Invitrogen, 1994).

El *DNA* linearizado del vector portador del cassette de expresión puede generar clones estables de *Pichia pastoris*, al integrarse vía recombinación homóloga dentro del genoma de la levadura. Tales integrantes muestran alta estabilidad en ausencia de presión selectiva, aún cuando presenten copias múltiples del cassette de expresión. Los tipos de mutantes que se pueden obtener son dos: 1) Aquellos que sufrieron delección en el gen *AOX1*, al ser reemplazado por el cassette de expresión. Este tipo de mutantes crecen lentamente en metanol (*Mut<sup>S</sup>*: "Metanol utílizacion slow"), comparado con una cepa nativa. Esto se debe a que dichos mutantes *Mut<sup>S</sup>* aún conservan el gen *AOX2* (Clare *et al.*, 1991a), el cual se transcribe 32 veces menos respecto al gen *AOX1*. 2). El otro tipo de mutante es aquel en el cual el cassette de expresión se integra por inserción, por lo que no elimina al gen *AOX1* y que por lo tanto crece en metanol como única fuente de carbono a una velocidad igual a la de una cepa nativa de *Pichia pastoris* (*Mut<sup>+</sup>*) (Invitrogen, 1994; 1996). La integración del cassette de expresión en el genoma de *P. pastoris* se favorece que sea por inserción o por reemplazamiento, dependiendo del sitio de linearización del vector, antes de llevar a cabo la transformación.

#### 1.3.6.1 Inserción Génica en *AOX1*:

Esta es originada por un evento de entrecruzamiento simple entre el locus *AOX1* del genoma y alguna de las regiones *AOX1* del vector (promotor *AOX1*, *AOX1 TT* o 3'*AOX1*). Este tipo de integración se favorece al transformar *P. pastoris* con el plásmido linearizado por cortes en las regiones *AOX1* (FIGURA 5). El resultado es una o mas copias del vector insertadas y el gen *AOX1* endógeno intacto y funcional. La inserción también puede ocurrir con plásmidos no linearizados o religados. El fenotipo de las transformantes es *His<sup>+</sup>Mut<sup>+</sup>*. Los eventos de inserción múltiple ocurren con baja frecuencia.

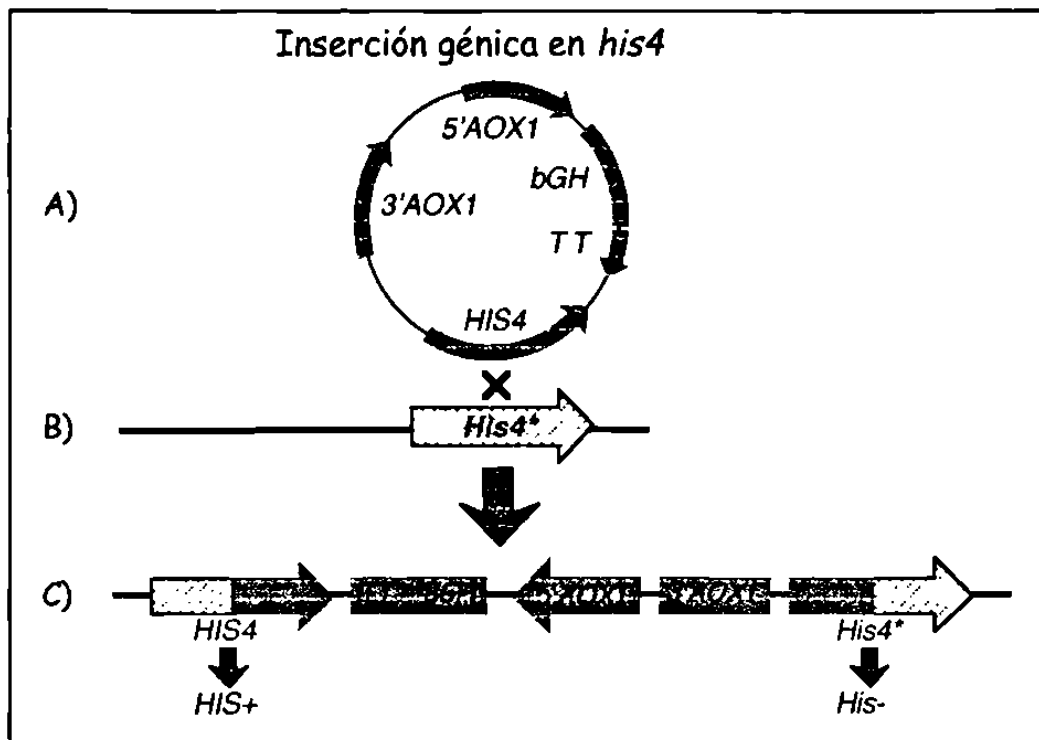


**FIGURA 5.** La inserción génica en *AOX1* es originada por un evento de entrecruzamiento simple entre el locus *AOX1* del genoma y las regiones *AOX1* del vector.

La inserción génica en el locus *AOX1* presenta alta frecuencia de transformación usando esferoplastos o electroporación y es ideal para uso de rutina. Aproximadamente el 100% de las transformantes expresan la proteína. La clonas pueden llegar a incorporar hasta 10 copias del cassette de expresión (Invitrogen, 1994; 1996).

#### 1.3.6.2 Inserción Génica en *his4*:

Esta surge de un evento de entrecruzamiento simple entre el locus *his4* del genoma y el gen *HIS4* del vector. El resultado es una o mas copias del vector insertadas y el gen *HIS4* endógeno intacto y funcional (FIGURA 6). Los eventos de inserción múltiple ocurren con baja frecuencia, pero la frecuencia de transformación usando esferoplastos o electroporación es alta. Aproximadamente el 100% de las transformantes expresan la proteína y las clonas alcanzan a integrar hasta 10 copias del cassette de expresión (Invitrogen, 1994 y 1996).

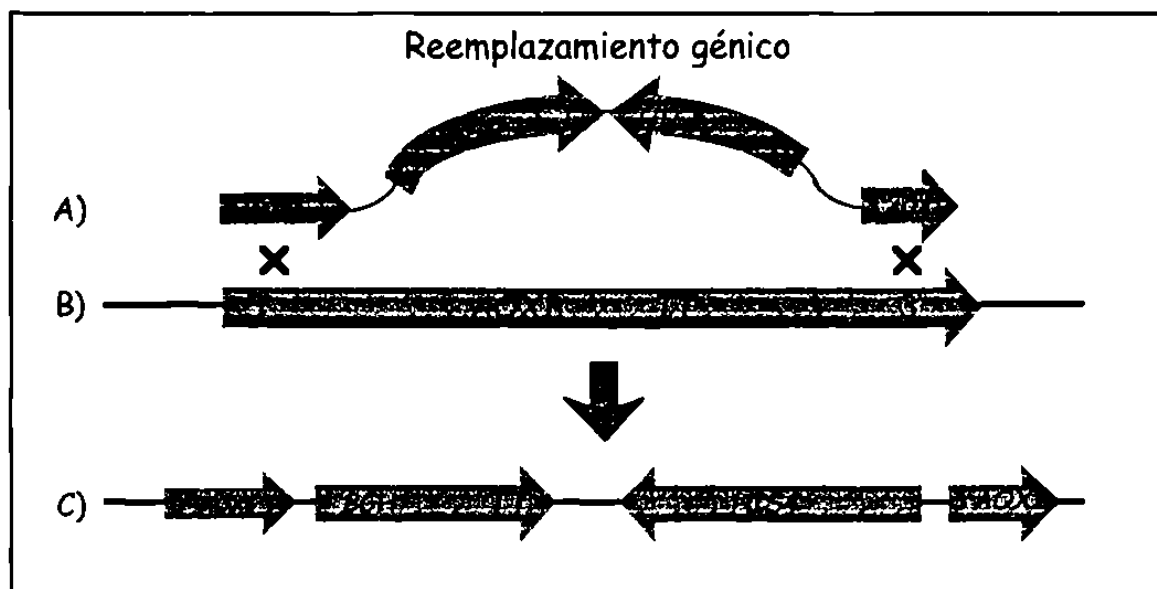


**FIGURA 6.** La inserción génica en *his4* es originada por un evento de entrecruzamiento simple entre el locus *his4* del genoma y el gen *HIS4* del vector.

### 1.3.6.3 Reemplazamiento Génico en *AOX1*:

La expresión de genes heterólogos inducida con metanol en *Pichia* se mejora dramáticamente en algunos casos empleando una cepa en donde se ha roto el gen de la *alcohol oxidasa* (fenotipo *Mut<sup>S</sup>*).

El reemplazamiento génico en *AOX1* se lleva a cabo mediante un doble entrecruzamiento entre las regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 del vector con el genoma (FIGURA 7). Este tipo de integración se favorece al transformar células con el plásmido cortado en las regiones 5'AOX1 y 3'AOX1. Aunque se podría esperar solo clones *Mut<sup>S</sup>* de una sola copia, un detallado análisis revela que la mayoría de los clones no contienen el vector, por lo que no expresan la proteína y probablemente representen una conversión génica de *his4*. Aun así, del 5 al 30 % de los clones son verdaderos reemplazamientos (*Mut<sup>S</sup>*), mientras que los restantes tienen integraciones en *AOX1* o *His4* y son *Mut<sup>+</sup>*. Finalmente del 1 al 10 % de los clones *Mut<sup>S</sup>* tienen hasta 30 copias integradas.



**FIGURA 7.** El reemplazamiento génico. Este se lleva a cabo en AOX1, mediante un doble entrecruzamiento entre las regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 del vector con el genoma de la levadura.

El evento de reemplazamiento presenta baja eficiencia de transformación, por esto se recomienda el método de esferoplastos porque da mejores resultados. Es el mejor método para obtener clonas multicopias, con una frecuencia de 1 a 10% y hasta 30 copias. Se genera una población heterogénea de transformantes *Mut<sup>S</sup>* y *Mut<sup>t</sup>*, incluyendo algunas que no expresan, probablemente a causa de una reversión génica (Invitrogen 47 y 48).

### 1.3.7 El Procesamiento de la *Secuencia Señal* en *P. pastoris*:

La remoción de la secuencia señal del factor alfa de *S. cerevisiae* se aplica para favorecer la secreción de la proteína de interés y se lleva a cabo mediante la proteasa producto del gen *Kex2*, el cual corta entre arginina y glutamina en la secuencia Glu-Lis-Arg\*Glu-Ala-Glu-Ala. Luego, las repeticiones Glu-Ala son posteriormente cortadas por el producto del gen *Ste13*.

En *S. cerevisiae* se encontró que las repeticiones Glu-Ala no son necesarias para el corte por *KEX2*, pero el corte es más eficiente cuando las repeticiones Glu-Ala están presentes. Un número de aminoácidos son tolerados en el sitio X, de la secuencia Glu-Lis-Arg-X. Entre los aminoácidos se incluyen aminoácidos aromáticos, aminoácidos pequeños, e histidina. Prolina no obstante puede inhibir el corte *Kex2*. En algunos casos el corte de *Ste13* de las repeticiones Glu-Ala no es eficiente, y



repeticiones Glu-Ala quedan presentes en el extremo *N-terminal* de la proteína procesada (Invitrogen 47 y 48).

#### 1.4 ¿Es *Pichia pastoris* una Panacea?

Existen ejemplos de bajas producciones o falla en la expresión, la mayoría de estos trabajos se mantienen sin publicar. Probablemente el problema más común encontrado es la proteólisis de los polipéptidos secretados. Otro problema común es la secreción ineficiente de proteínas extrañas a *Pichia*, por ejemplo *HIV-1 gp120*. Algunos genes no producen proteína detectable, a causa de que el *RNA<sub>m</sub>* producto del gen exógeno resulta truncado debido a una confusión de los terminadores transcripcionales de la levadura. En *S. cerevisiae* la transcripción de las secuencias génicas altamente ricas en AT, como en el caso del gen de la toxina tetánica, es abortada. Este problema fue resuelto incrementando el contenido de GC del gen exógeno. El mismo problema fue encontrado y resuelto de la misma forma en *Pichia* (Scorer *et al.*, 1993).

Los factores que afectan la producción y la calidad del producto recombinante son principalmente la *secuencia señal*, el procesamiento, la proteólisis y la glicosilación. Otros factores que influyen drásticamente en la producción de la proteína recombinante en *Pichia* incluyen: el número de copias del cassette de expresión, las regiones 5' y 3' no traducibles (*UTR*) del *RNA<sub>m</sub>*, secuencias alrededor del codón de inicio de la traducción (*AUG*), la composición A+T del *DNA<sub>c</sub>*, obstrucciones transcripcionales y traduccionales, naturaleza de la *señal de secreción (secuencia señal)*, actividad *proteasa* endógena, fisiología de la cepa hospedera, medio, condiciones de crecimiento y parámetros de fermentación (Sreekrishna, 1993; Sreekrishna *et al.*, 1997) (TABLA 6).

**TABLA 6.**  
**FACTORES QUE AFECTAN LA SINTESIS Y SECRECIÓN DE PROTEÍNAS**  
**HETEROLOGAS (RECOMBINANTES) EN *Pichia pastoris*.**

Factor	Explicación
Sitio de integración del cassette de expresión	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cuando la integración se realiza en el locus <i>HIS4</i> ocurre conversión génica entre la copia mutante cromosómica <i>his4</i> y el gen <i>HIS4</i> del cassette de expresión. Por esto se recomienda el locus <i>AOX1</i> para la integración.</li> </ul>
Fenotipo de utilización del metanol, <i>Mut</i> <sup>+</sup> o <i>Mut</i> <sup>S</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Para expresión intracelular, usar el fenotipo <i>Mut</i><sup>S</sup> a causa de que los niveles de alcohol oxidasa son menores y la proteína puede ser purificada.</li> <li>Para secreción, <i>Mut</i><sup>+</sup> o <i>Mut</i><sup>S</sup>.</li> </ul>
Número de copias	<p>Aun existe controversia pues:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Generalmente una copia del cassette de expresión es suficiente para una producción óptima y el incremento del número de copias no afecta de modo importante la producción.</li> <li>En otros casos las clonas multicopias pueden incrementar notablemente el nivel de expresión.</li> <li>En algunos casos el incremento del número de copias tiene un efecto negativo en el nivel de producción.</li> </ul>
Regiones no traducibles (UTR) 5' y 3' del <i>RNA</i> <sub>m</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>La secuencia nucleotídica y la longitud del 5'-UTR pueden perjudicar la producción. Para una síntesis óptima de la proteína heteróloga de preferencia el 5'-UTR debe ser idéntico al <i>RNA</i><sub>m</sub> de <i>AOX1</i>. El nivel de expresión de la albúmina sérica humana (<i>HSA</i>) se incrementó 50 veces ajustando el 5'-UTR para hacerlo idéntico al <i>RNA</i><sub>m</sub> de <i>AOX1</i> (Barr <i>et al.</i>, 1992).</li> </ul>
Inicio de la traducción	<ul style="list-style-type: none"> <li>La región codificante cercana al codón de inicio de la traducción (AUG) puede ajustarse para evitar estructuras secundarias, rediseñando la porción inicial de la secuencia.</li> </ul>
Composición A+T	<ul style="list-style-type: none"> <li>Genes con alto contenido de A+T no son transcritos eficientemente (terminación prematura). Para diseñar genes sintéticos usar codones preferidos por <i>Pichia pastoris</i>.</li> </ul>
Señal de secreción	<ul style="list-style-type: none"> <li>Si se usa el factor alfa de la invertasa de <i>S. cerevisiae</i> (AMF), es recomendable conservar los espaciadores Glu-Ala adyacentes al sitio de corte de la proteasa <i>KEX2</i>, para evitar la interferencia estérica de la proteína de fusión resultante (V-S-S-L-E-Lys-Arg-<i>vKEX2</i>-Glu-Ala-<i>vDAP</i>-Glu-Ala-<i>vDAP</i>). La glicosilación puede interferir.</li> </ul>
Estabilización del producto	<ul style="list-style-type: none"> <li>Se recomienda usar un intervalo de pH entre 2.8 y 6.5. Usar Casaminoácidos o extracto de levadura y peptona en el medio. Usar cepas deficientes de proteasas.</li> </ul>
Consecuencias de la sobreproducción	<ul style="list-style-type: none"> <li>En algunos casos puede resultar en cambios cuantitativos y cualitativos de la proteína secretada.</li> </ul>
Estrategia de fermentación	<ul style="list-style-type: none"> <li>El glicerol reprime el promotor <i>AOX1</i>, por lo cual se recomienda usar sorbitol+metanol como fuente de carbono para incrementar la masa celular, especialmente con cepas <i>Mut</i><sup>S</sup>.</li> </ul>

Fuente: Sreekrishna (1993); Sreekrishna *et al.* (1997).

Hay evidencias que sugieren la existencia de varias señales que son usadas en levaduras y actúan unidireccionalmente y bidireccionalmente marcando la señal de terminación de la transcripción (Irniger *et al.*, 1991). Ciertas secuencias poco definidas situadas río abajo de la secuencia consenso parecen estar involucradas en la terminación de la transcripción y la formación del extremo 3' terminal (Zaret y Sherman,

1984; Henikoff y Cohen, 1984). La formación de dicho extremo del *RNA<sub>m</sub>* ocurre en *S. cerevisiae*, como en los eucariotes superiores involucrando el corte y poliadenilación del *RNA<sub>m</sub>* precursor. Sin embargo, en las levaduras este proceso parece ser que ocurre a una distancia mas corta, casi en el extremo 3' del gen (Butler *et al.*, 1990).

En otro caso se analizó la expresión del gen de *HIV-1* que codifica para *ENV* en *P. pastoris* y no se encontró producto proteico detectable incluso con el uso de Western Blott. Un posterior análisis por Northern blot reveló que los transcritos producto del gen gp120 (*ENV*) estaban truncados en su totalidad y su tamaño aproximado fue de 700 nuc., lo cual es contrario al tamaño del transcrito esperado. Posteriormente el transcrito se logró hibridar con la sonda *AOX1 5'*, sin embargo no hibridó con la sonda *AOX1 3'*; con esto se reveló una iniciación correcta de la transcripción pero no una transcripción total, pues el extremo 3' no fue transcrito.

Varios estudios han encontrado que existen secuencias consenso que están implicadas en la formación del extremo 3' terminal en *S. cerevisiae*. Entre éstas se incluyen las secuencias TAG.. (rica en T), TA(T)GT..(rica en A+T), TTT (Zaret y Sherman, 1984) y TTTTTATA (Henikoff y Cohen, 1984). Revisando la secuencia codificante de *HIV-1 gp120* se encontró una secuencia ATTATTTTATAAAA cercana al presunto extremo 3' terminal del transcrito truncado de 700 nuc, la cual es similar a la secuencia consenso TTTTTATA. Se rediseñó esta secuencia por mutagénesis sitio dirigida (Zoller y Smith, 1983) obteniendo la secuencia TTTCTTCTACAAG (Apéndice D). Se analizaron por Northern blot los transcritos obtenidos, los cuales eran ligeramente mas largos pero de baja abundancia. Entre éstos incluidos el *RNA<sub>m</sub>* de *ENV* de longitud normal. El descubrimiento del *RNA<sub>m</sub>* truncado de *ENV* fue inesperado en *P. pastoris*, debido a que con este gen se ha producido *RNA<sub>m</sub>* de longitud normal en *S. cerevisiae*. Con el fin de obtener una producción eficiente de la proteína *ENV*, se decidió realizar una modificación radical de los nucleótidos codificantes, sin alterar los aminoácidos codificados, empleando la síntesis química del gen *ENV* (se incrementó el contenido de G+C de 37.6% a 43.6%, al rediseñar el 69% del gen) y generando clonas multicopia del gen sintético. Con esto se obtuvo una transcripción, expresión y producción eficiente de *ENV* (Scorer *et al.*, 1993).

Es necesario señalar que el *DNA* de *ENV* es rico en AT, pero mas relevante aun es que presenta regiones de alto contenido de AT. Su secuencia es eficientemente transcrita en *S. cerevisiae*, pero en cambio no se obtuvieron transcritos completos en *Pichia* (Scorer *et al.*, 1993).

## 1.5 Producción de GHs en Nuestro Laboratorio.

En la ULIEG, se han seguido diferentes estrategias para lograr la expresión en *E. coli* del DNAC de *bGH* en diversos sistemas de expresión. Por ejemplo, empleando el promotor *Trc* del plásmido pKK233-2, Ramírez (1991) probó en *E. coli* : 1) La expresión del DNAC nativo y 2) la expresión del DNAC con modificaciones en su extremo 5', introducidas mediante su reemplazo con DNA sintético. Siempre que el hospedero fue *E. coli*, se trató de detectar la proteína mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y por "Western blot", sin lograr visualizarla. Ni la identidad, ni la integridad del DNAC estaban en duda, pues Alvidrez (1990) demostró la correcta expresión del DNAC de *bGH* en cultivo de células de riñón de mono verde africano (Cos-7).

Buscando una estrategia de expresión alternativa, Martínez (1994) logró producir *BGHr* fusionada con la proteína de unión a maltosa (y *hGH20* y *22 kDa*) en *E. coli* bajo la acción del promotor *Tac*, con un valor de la proteína híbrida cercano al 30 % de la proteína celular total.

Como un paso mas de la línea de investigación y desarrollo que por mas de 10 años se ha venido trabajando en la ULIEG sobre hormonas del crecimiento, Escamilla (1996) construyó un plásmido portador del cassette de expresión del DNAC de la *hGH* de *22 kDa* (pPIC9hGH22k). Por recombinación homóloga, logró la integración de dicho cassette de expresión en el genoma de la levadura *Pichia pastoris* GS115, obteniendo clonas unicopias productoras de *HGHr*. Seleccionó una de éstas, con la cual obtuvo secreción al medio de cultivo de la *HGHr* de *22k*, con un valor cercano al 50% del total de las proteínas del medio y valoró la producción en alrededor de 12 mg/L).

Luego, Sánchez (1998) transfirió el cassette de expresión del DNAC de *hGH* *22 kDa* al vector pPIC9k. Puesto que el plásmido resultante confiere resistencia a geneticina en levaduras, ella seleccionó clonas con múltiples integraciones del cassette de expresión. En la fermentación de una de tales clonas, se logró una producción mayor de la *HGHr* que con la clona unicopia de Escamilla, llegando a representar casi el 80% del total de proteínas secretadas al medio de cultivo.

## 1.6 Justificación:

En la ULIEG se ha venido trabajando en la producción de *BGHr*, habiéndose tenido un éxito parcial al lograr producir ésta tanto en *Escherichia coli* como proteína de

fusión (con la *proteína de unión a maltosa*), como en cultivo de células de mamífero (COS). La experiencia positiva reciente con la producción de *HGHr* en *P. pastoris* y la demanda considerable de *BGHr* para apoyar a la industria productora de leche, motivaron el presente trabajo.

Para su realización se plantearon los objetivos que se describen a continuación.

### 1.7 Objetivo General:

Construir clonas de *Pichia pastoris* que porten múltiples copias del *DNAc* de la *hormona del crecimiento bovino*, capaces de sobreproducir ésta y secretarla al medio de cultivo.

#### 1.7.1 Objetivos Específicos:

- 1 Diseñar oligonucleótidos que permitan la amplificación por *PCR* del *DNAc* de *bGH*, y que al mismo tiempo modifiquen éste para facilitar su manipulación .
- 2 Insertar el *DNAc* de *bGH* modificado en el vector de expresión pPIC9K de *Pichia pastoris* .
- 3 Verificar la integridad del plásmido de expresión resultante del objetivo anterior (pPIC9kbGH), por patrones de restricción y secuenciación nucleotídica.
- 4 Introducir mediante recombinación homóloga con el genoma de *Pichia* el cassette de expresión de *BGH* presente en pPIC9K.
- 5 Caracterizar el genotipo y fenotipo de las clonas de *Pichia pastoris* resultantes de la recombinación homóloga.
- 6 Someter dichas clonas a selección para identificar aquellas con múltiples copias del cassette de expresión.
- 7 Seleccionar de entre las clonas con múltiples copias, aquellas sobreproductoras de *BGHr*.

## CAPITULO 2

### MATERIAL Y MÉTODOS.

#### 2.1 Área de Trabajo, Reactivos y Material Biológico.

El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (U.L.I.E.G.), del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.

Las enzimas de restricción utilizadas, así como la enzima *DNA Ligasa de T4* fueron obtenidas de New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA) y Bethesda Research Laboratories (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), y el "Kit" de secuenciación AmpliCycle™ fue adquirido de Perkin-Elmer PCR, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New jersey, EUA, y el "Kit ClearCut"™ de Stratagene® (La Jolla, CA, EUA). Para las reacciones enzimáticas se siguieron las recomendaciones dadas por los proveedores.

Los reactivos para las diferentes soluciones proceden de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EUA), Merck de México (Monterrey, N.L.) y Reactivos Monterrey (Monterrey, N.L.). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa se sintetizaron, cuantificaron y purificaron en la U.L.I.E.G.

La cepa *XL1-Blue* de *E. coli* y los marcadores de peso molecular provienen de la bacterioteca y genoteca de la U.L.I.E.G., Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, de la U.A.N.L. El sistema de expresión de *Pichia pastoris*, el cual incluye la cepa *GS115*, el vector pPIC9, el vector pPIC9K, oligonucleótidos, catálogos y otros, se adquirieron de Invitrogen Corporation (San Diego, CA, EUA)

## 2.2 Equipo.

Se utilizó un horno de microondas GoldStar modelo MA-857M (Seul, Corea), microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, una fuente de poder Biorad 200/2.0 (Nebraska, EUA), un agitador de tubos Barntead/Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, Iowa, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un ultracongelador marca So-Low Environmental Equipment (Cincinnati, Ohio, EUA) y una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (K. C., Missouri, EUA), una báscula digital marca Sartorius modelo 1206MP (Camibh Göttingen Germany), un evaporador centrífugo al vacío marca Labonco Corporation modelo 78100-00 (K. C., Missouri, EUA). Y un sistema de corrimiento electroforético automatizado Genomyx LR (Genomyx Co., 353 Hatch Drive, Foster City, CA 94404).

El procesamiento de datos fue realizado en dos plataformas distintas; una computadora modelo Power Macintosh 5260/100 (Apple Computer, Inc.; Cupertino California. EUA) y el Gel Doc 1000 Video Gel Documentation System-PC (BIO-RAD Laboratories). Los periféricos compatibles para Macintosh utilizados fueron: un Modem de Global Village Communication Inc. modelo Teleport/Silver A801 (East Middlefield Road Mountain View Ca. EUA) y un digitalizador de imágenes de cama plana UMAX data System Inc. modelo UC630 MaxColor (Industrial Park Hsinchu, Taiwan).

El procesador de texto utilizado fue; *Microsoft Word* versión 5.1a (© 1987-1992 Microsoft Corporation), los procesadores de gráficos fueron *Microsoft PowerPoint* Versión 3.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition* 2.5.1 (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y *UMAX Scan* (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.). El programa utilizado para comunicación en la red fue el Netscape Navigator Version 2.0.(© 1994-1995 Netscape Communications Corporation, Mountain View, CA).

Los programas computacionales de Biología Molecular fueron: *Amplify*, versión 1.2b (Bill Engels ©1992, University of Wisconsin Genetics, M. Madison, WI. EUA), *DNA Strider*™, version 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *Oligo*, versión 4.0 (© 1992, Plymouth, MN, EUA), *MacPlasmap*, versión 1.82 (© 1988-1990 Jingdong Liu, Biology Department, University of Utah, Salt Lake City, UT EUA). *Molecular Analyst*™/PC, Version 1.5, (©BIO-RAD, Windows Software for Image Analysis

Systems. Molecular Bioscience Group, Hercules, CA). *RASMac*, version 2.5, Molecular Graphics Program (© 1994, Roger Sayle, Biomolecular Structure, Glaxo Research and Development, Middlesex, UK). *GraphicConverter*, version 2.9.1 (US) (© 1997, Shareware, Thorsten Lemke, E-Mail: 100102.1304@compuserve.com, lemkesoft@aol.com) y *CLUSTAL W* Multiple Sequence Alignment Program version 1.6, Marzo 1996 (Des Higgins; E-mail: Higgins@EBI.ac.uk. Toby Gibson; E-mail: Gibson@EMBL-Heidelberg.DE).

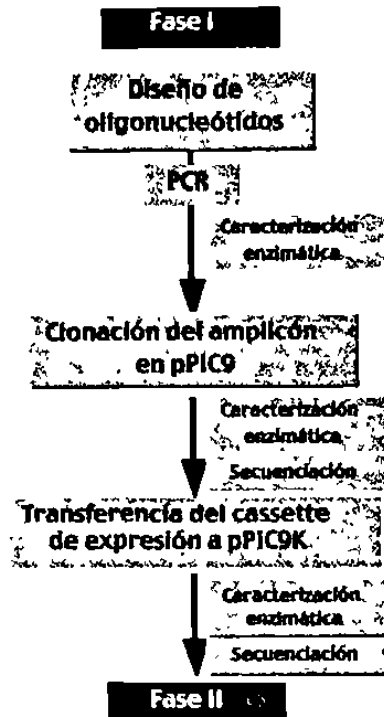
Los programas utilizados por vía Internet en un servidor remoto fueron: *Entrez*, del National Center for Biotechnology Information (NCBI); *BLAST* de *Network Service* (Blaster) y *Retrieve* del NCBI, finalmente, el banco de *DNA* que se consultó fue el *GENEBANK* (ICEGEB, Trieste, Italia).

### 2.3 Métodos.

El trabajo experimental se dividió en 3 fases:

- I En la primera fase se llevaron a cabo las etapas experimentales requeridas para la construcción del vector pPIC9KbGH (FIGURA 8), mismas que fueron:
  - a) Diseño de los oligonucleótidos que amplifican por *PCR* el *DNAc* de *bGH*, y que al mismo tiempo modifican éste para facilitar su manipulación .
  - b) Clonación del producto amplificado en el vector de expresión pPIC9.
  - c) Verificación de la integridad de los plásmidos de expresión resultantes por restricción y secuenciación.
  - d) Transferencia del *DNAc* de *bGH* al vector pPIC9K
  - e) Verificación de la integridad de los plásmidos de expresión resultantes por análisis de restricción y secuenciación nucleotídica.

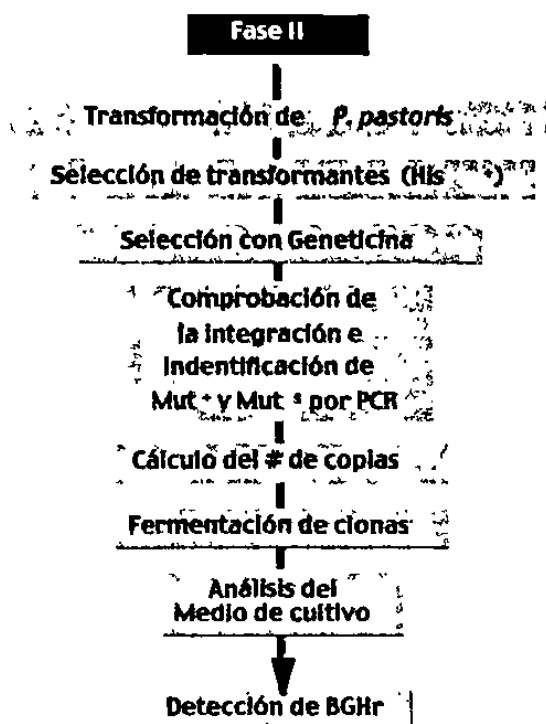




**FIGURA 8.** Representación esquemática de la fase I. Construcción del vector de integración pPIC9KbGH.

- II En la segunda fase se llevaron a cabo las etapas experimentales requeridas para la construcción de clonas de *Pichia pastoris* portadoras de múltiples copias del *DNAc de la bGH* y para realizar la detección de la *BGHR* producida (FIGURA 9). Dichas etapas fueron:
- Transformación de *Pichia pastoris* con pPIC9KbGH por electroporación.
  - Selección de clonas capaces de crecer en ausencia de histidina en el medio de cultivo, debido a la integración del vector pPIC9KbGH, el cual porta el gen *HIS4*.
  - Selección e identificación de clonas portadoras de múltiples copias del cassette de expresión de *BGHR* en base a su nivel de resistencia a *Geneticina (G418)*.
  - Comprobación de la integración del cassette de expresión de *BGHR* y diferenciación de clonas *Mut<sup>+</sup>* y *Mut<sup>S</sup>* por *PCR*.
  - Estimación del número de copias del cassette de expresión de *BGHR* en las clonas.
  - Fermentación de las clonas seleccionadas a nivel matraz.

- g) Análisis de las proteínas presentes en el medio de cultivo por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.
- h) Detección de la *BGHR*.



**FIGURA 9.** Representación esquemática de la fase II. Construcción de clones de *Pichia pastoris* portadoras de múltiples copias del cassette de expresión de la *bGH*.

- III En una tercera fase del trabajo, debida a la falta de producción de la *BGHR*, se analizaron detalladamente todos los pasos seguidos para la obtención de las clones recombinantes y los resultados obtenidos para justificar la aparente ausencia de producción.

### 2.3.1 Primera Fase.

Las herramientas biocomputacionales utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos fueron las descritas en materiales e indicadas en la FIGURA 10.

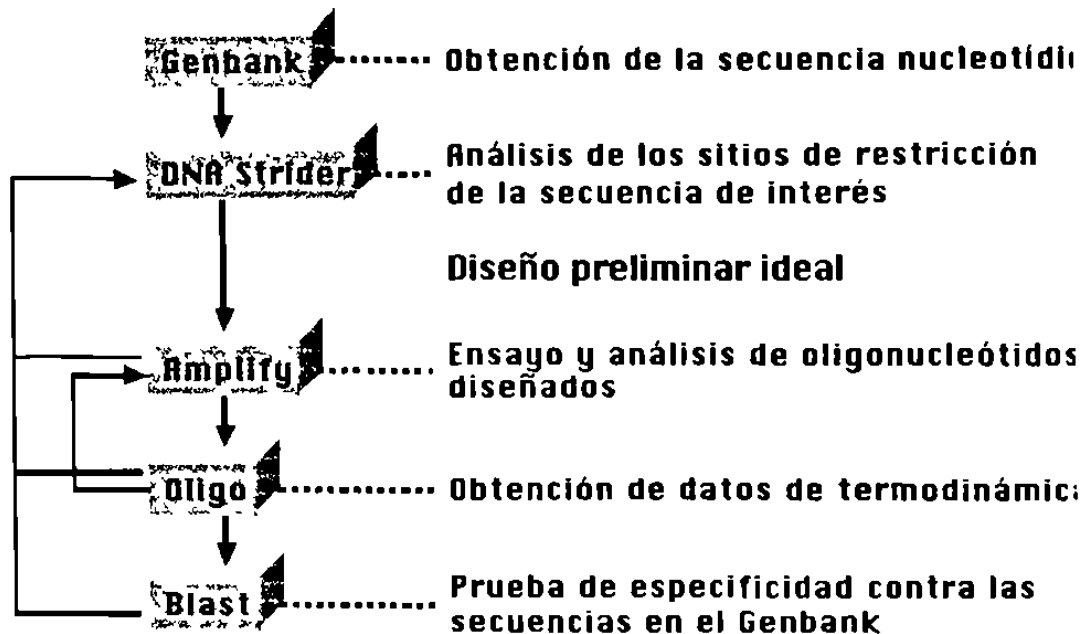
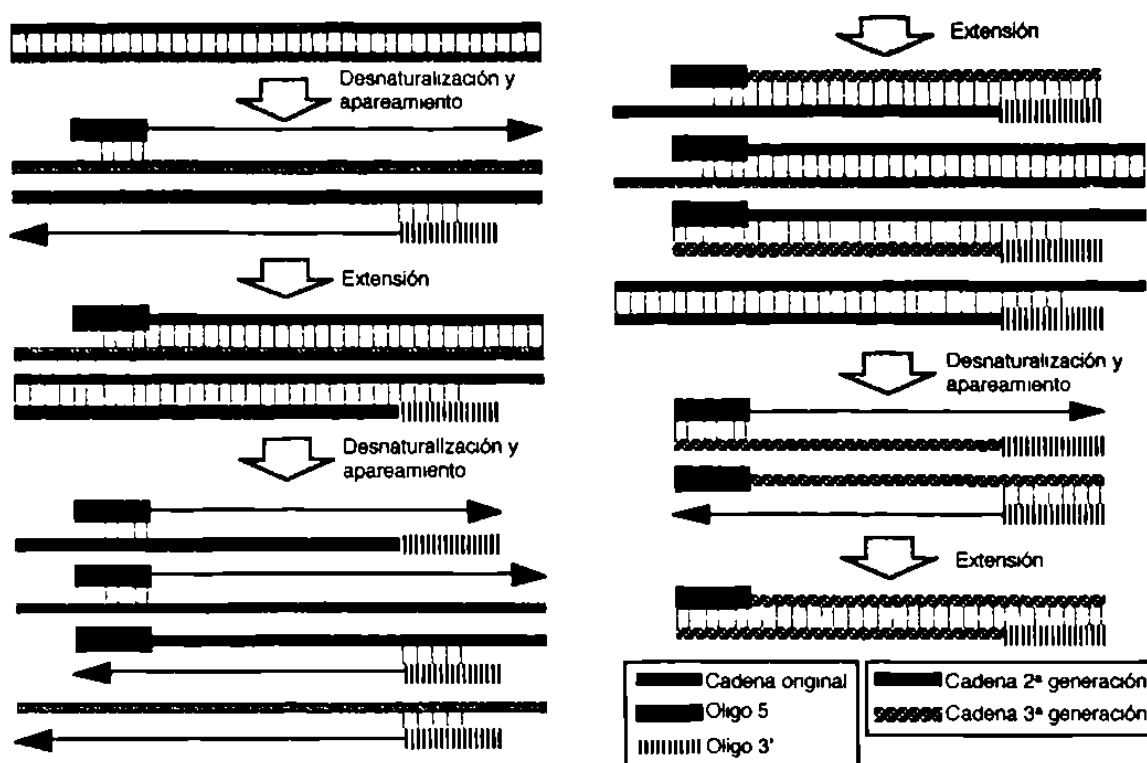


FIGURA 10. Representación del procedimiento experimental para el diseño de los oligonucleótidos.

### 2.3.1.1 Amplificación: *Reacción en Cadena de la Polimerasa*.

En la FIGURA 11 se ilustran los ciclos de la *PCR*: desnaturalización, apareamiento y extensión. Los oligonucleótidos al aparearse inicialmente no son complementarios totalmente a la secuencia molde, pero después de varios ciclos se originan productos amplificados con la secuencia 100% correspondiente a la de éstos. Así mismo, se ilustra el vector de expresión utilizado como secuencia blanco, la región que se amplificó y que es esperada por la mutagénesis sitio-dirigida por *PCR*, con los sitios de restricción relevantes para la clonación y subsecuente caracterización enzimática. Los sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción *Xho* I y *Avr* II, fueron producto de la mutagénesis inducida por los oligonucleótidos en la *PCR*.



**FIGURA 11. Mutagénesis sitio-dirigida por PCR.** El esquema ilustra los ciclos de la PCR: desnaturalización, apareamiento y extensión. Inicialmente los oligonucleótidos 5' y 3' no son totalmente complementarios a la secuencia blanco, pero después de varios ciclos de extensión se originan productos amplificados con la secuencia de los oligonucleótidos mutagénicos.

Las temperaturas de desnaturalización y extensión son generalmente estándares para todas las reacciones. Sin embargo, como la temperatura de alineamiento depende de la temperatura media de fusión ( $T_m$ ) de los oligonucleótidos. Esta fue calculada para nuestro caso en base al análisis computacional (programa OLIGO) de los "primers" y mediante una fórmula empírica.

Es posible obtener una estimación razonable de la temperatura media de fusión o  $T_m$ , de un oligonucleótido cuando son conocidas su concentración y composición de bases. Conocer la secuencia de bases es un requisito para una mejor estimación de la  $T_m$  del oligonucleótido. La  $T_m$  está en función de la concentración total de sales; conocer y controlar esta variable es esencial (Mueller y Duclos, 1993) y se facilita mediante la siguiente ecuación:

Con ésta ecuación se determinó la  $T_m$  de los oligonucleótidos con longitud de 10-40 bases:

$$T_m = [\Delta H \{ \Delta S + S^\circ - R \cdot \ln (C/4) \} ] - 273.15 + 16.6 \log [K^+]$$

$\Delta H$  = entalpía.

$\Delta S$  = entropía.

$S^\circ$  = iniciación de la entropía.

$C$  = concentración del oligómero

$K$  = sales monovalentes.

En ésta ecuación se hace uso de la composición en bases y es usada para oligonucleótidos mayores de 40 bases y sirve para calcular la  $T_m$  de productos amplificados por la PCR:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \cdot \log [K^+] - 675/l + 0.41 \cdot (\%GC).$$

$l$  = número de bases del oligómero.

$\%GC$  = porcentaje de residuos G y C en la secuencia.

Una vez que se determinaron las condiciones mas favorables, se montó un experimento para determinar cual es la concentración del ión  $Mg^{2+}$  óptima para la amplificación. Se realizaron 5 experimentos a concentraciones distintas de  $Mg^{2+}$ , todos los demás parámetros quedaron constantes.

En la TABLA 7, se ilustra el ensayo de ajuste de concentración de  $MgCl_2$  para obtener una notoria producción del fragmento amplificado por PCR.

**TABLA 7.**  
**CONDICIONES DE LA REACCIÓN DONDE SE PROBARON DIFERENTES**  
**CONCENTRACIONES DE  $Mg^{++}$  PARA OPTIMIZAR LA**  
**PRODUCCIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO.**

Reactivo	Concentración
dNTPs (10 mM)	0.2 mM
p63 (10 ng/ $\mu$ L)	0.4 ng/ $\mu$ L
Oligo 5' (5 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M
Oligo 3' (5 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ M
Amortiguador 10X	1 X
$MgCl_2$ (25 mM)	(variable)
DNA pol Taq (5u/ $\mu$ L)	0.04 u/ $\mu$ L
Agua MilliQ	*
Volumen total	50.0 $\mu$ L

\* Para completar el volumen final.

Una vez realizada la mezcla de reacción, se repartió en volúmenes de 50  $\mu$ l (5 alícuotas), se añadieron 2 gotas de aceite mineral a cada alícuota para evitar evaporación durante el proceso de amplificación, se centrifugó rápidamente y el tubo fue colocado en la máquina termocicladora. Esta última había sido previamente programada para brindar las temperaturas y tiempos requeridos en cada ciclo, como se muestra en la TABLA 8.

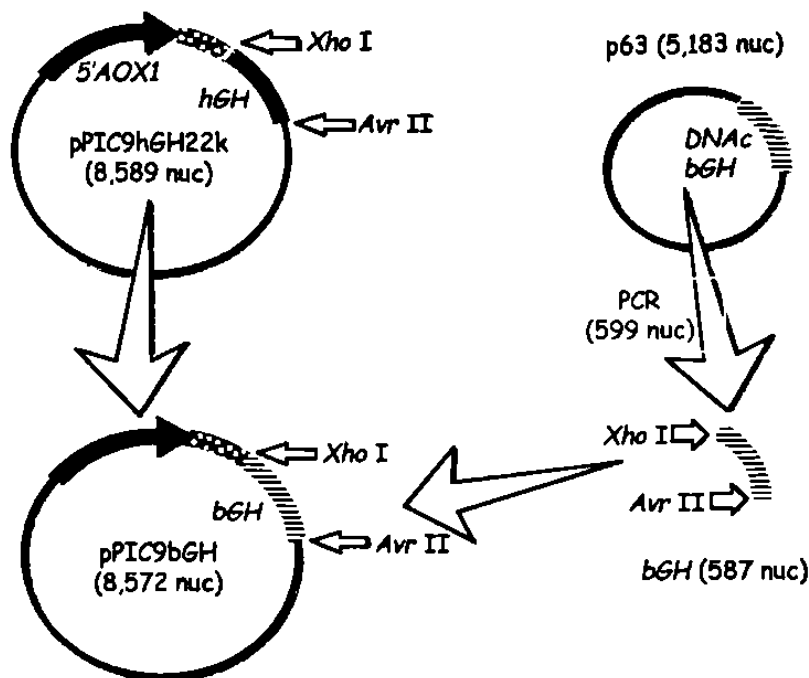
**TABLA 8.**  
**CONDICIONES DE AMPLIFICACION.**

PASO		
1	95°C, 5 min	Desnaturalización inicial prolongada
2	94°C, 15 seg.	Desnaturalización
3	60°C, 30 seg.	Alineamiento
4	72°C, 60 seg.	Extensión
5	(Repetir 25 ciclos pasos 2 al 4).	
7	72°C, 5.0 min	Extensión prolongada.

El fragmento de interés, con un tamaño aproximado de 600 nucleótidos, se analizó a partir de 5  $\mu$ l de la reacción en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 1X, tiñendo después con bromuro de etidio para su análisis bajo luz ultravioleta.

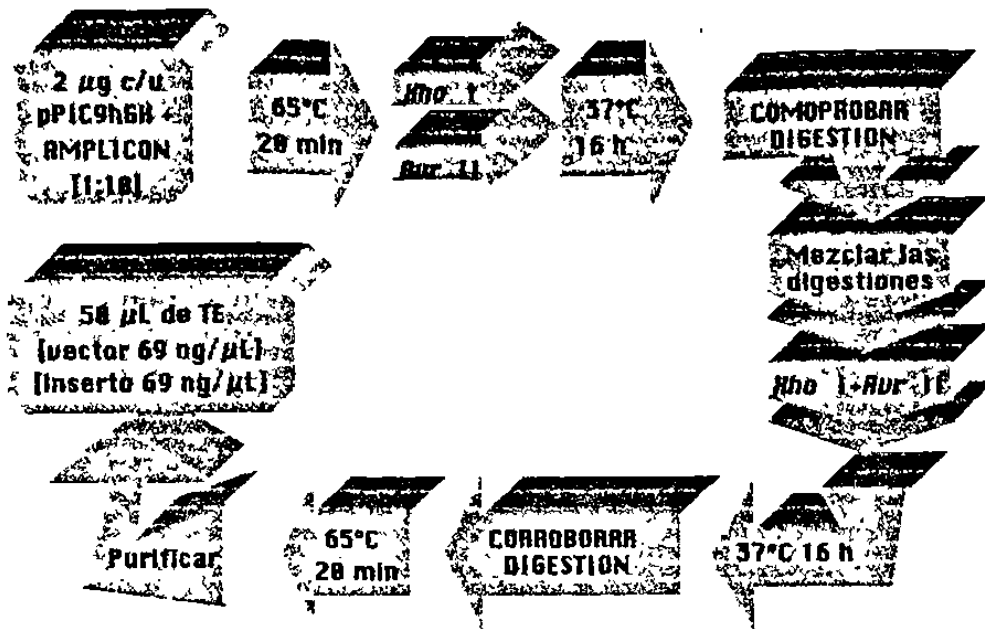
### 2.3.1.2 Clonación.

Para facilitar el proceso de clonación del fragmento de *DNA* amplificado, éste fue recuperado y purificado con la técnica denominada "ClearCut"™ (Stratagene®). Con esta técnica es posible separar el producto amplificado de las sales, enzima, dNTPs no incorporados y oligonucleótidos libres, los cuales pueden interferir en la clonación (la *DNA* polimerasa *Taq* rellena los extremos de cadena sencilla (5' a 3') producto de la digestión con endonucleasas de restricción.



**FIGURA 12.** Estrategia de clonación en pPIC9. Mediante el reemplazo del cassette de expresión para *HGHr* presente en el vector pPIC9hGH22K, se clonó el producto amplificado correspondiente al *DNAc* de *bGH*, el cual fue amplificado a partir del inserto de p63 (Amaya F 1988). Los sitios de clonación usados fueron *Xho* I y *Avr* II, con los cuales se reemplazó el *DNAc* de *HGH* por el de *BGH*.

Para la clonación del producto amplificado correspondiente al *DNAc* de *bGH* (FIGURA 12 y 13) se utilizó el vector pPIC9hGH22K, el cual se mezcló con el producto amplificado (en una relación molar ~1:10, vector:inserto), para asegurar la digestión de los dos *DNAs*, (pues no se podría verificar la digestión del producto amplificado en gel de agarosa). Se digirió la mezcla de *DNAs* con las endonucleasas de restricción *Xho* I y *Avr* II por separado, se incubó 16 h a 37°C y se corroboró la digestión del vector con las dos enzimas por separado en gel de agarosa al 0.6% en TBE; al verificar que si ocurrió la digestión del vector, se asumió la digestión del producto amplificado. Se procedió a mezclar las dos digestiones, y se añadió nuevamente *Xho* I y *Avr* II para llevar a cabo la digestión total, incubando a 37°C durante 16 h. Se corroboró por electroforesis en gel de agarosa la digestión total. Se dio un tratamiento térmico a 65°C/20 min para inactivar exonucleasas que pudieran estar contaminando la reacción. Se purificaron los *DNAs* con la técnica de "Clearcut", y se resuspendió el *DNA* resultante en TE, ajustando la concentración a 69 ng/μl del vector y del inserto.



**FIGURA 13.** Esquema de preparación de los fragmentos de *DNA* a ligar, para la construcción del vector pPIC9bGH. Se indican los pasos, reactivos y condiciones empleadas en la construcción del vector de expresión de la *BGHr*.

Como no se realizó proceso alguno de separación de los distintos tipos de fragmentos digeridos, se previó que al proceder a la ligación pudieran presentarse dos posibilidades: a) obtener clonas portadoras del vector pPIC9hGH22K y b) clonas portadoras del vector pPIC9bGH. Sin embargo, se buscó favorecer la clonación del *DNA* de *bGH* al incluir un exceso molar de diez veces éste último.

Se procedió a ligar el vector con un exceso del producto amplificado digerido, mezclando en un tubo Ependorff los *DNA*s del procedimiento anterior. Se llevó el volumen a 8 µl en agua MiliQ estéril y se mezcló por pipeteo. Se añadieron los ingredientes necesarios para la reacción de ligación (10 µL) con la concentración final siguiente; 27.6 ng/µl de vector y 27.6 ng/µl de inserto, amortiguador de ligación 1X, *DNA* ligasa de *T4* a 0.1 U/µL; se incubó por 12 h a 16°C.

### 2.3.1.3 Inactivación de Enzimas.

La mayoría de las *endonucleasas* de restricción y de las *exonucleasas* son inactivadas por calor (65°C por 20 minutos), lo que es importante hacer antes de realizar una clonación, pues se evita degradación y así se incrementa la eficiencia para obtener las clonas deseadas. En el caso de las *endonucleasas* de restricción, es



necesario consultar el catálogo de NEB y verificar si son inactivables, mientras que las RNAsas no son inactivadas con el tratamiento térmico.

#### 2.3.1.4 Transformación.

Las técnicas tradicionales utilizadas para la preparación de las bacterias competentes dan eficiencias de transformación de  $10^5$  a  $10^6$  colonias transformadas por microgramo de *DNA plasmídico* superenrollado, en éste trabajo se utilizó una técnica modificada la cual utiliza el amortiguador FSB; la forma de preparar las bacterias y de transformarlas está descrita en Sambrook et al. (1989). La eficiencia de transformación se incrementa de 100 a 1000 veces y puede alcanzar un valor superior o igual a  $5 \times 10^8$  colonias transformadas por microgramo de *DNA plasmídico* superenrollado, pero varía con el tamaño del plásmido transformante empleado. La combinación de cationes divalentes por largos periodos de tiempo y el tratamiento de la bacteria con DMSO, agentes reductores y cloruro de hexaminocobalto permiten el incremento de la eficiencia de transformación. Los factores críticos para lograr altas frecuencias de transformación son: la pureza de los reactivos empleados en los amortiguadores de transformación, la fase del crecimiento en la que se procesan las células y la limpieza de los recipientes empleados.

La técnica fue adaptada para cumplir con los objetivos anteriormente planteados. Se sembró por estria una placa SOB-agar con un inóculo de *XL1-Blue* (cepa de *E. coli*) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}/16$  h. Se tomaron de 4 a 5 colonias, se dispersaron en 1 ml de SOB (con 20mM de  $\text{MgSO}_4$ ) y se diluyó el cultivo en un sólo matraz de 1 litro con 100 ml de SOB (con 20mM de  $\text{MgSO}_4$ ). Se crecieron las células de 2-3 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y se determinó la absorbancia cada 30 minutos hasta alcanzar 0.6 de absorbancia a 600 nm. Se enfrió el matraz en hielo por 10 minutos, se mezcló cuidadosamente el cultivo y se transfirió a dos tubos falcon de 50 mL, se centrifugó 10 min a 4,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó el sobrenadante decantando cuidadosamente. Se resuspendieron las células cuidadosamente en 20 ml de FSB por cada 50 ml de cultivo centrifugado y se incubó en hielo 10 minutos. Se centrifugaron 10 min a 4,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se eliminó cuidadosamente el FSB, se resuspendieron las células cuidadosamente en 4 ml de FSB enfriado en hielo (por tubo de 50 mL). Se añadieron 140  $\mu\text{l}$  de DMSO por 4 ml de células resuspendidas y se incubó en hielo 15 min. Se añadieron otros 140  $\mu\text{l}$  de DMSO a cada suspensión en el hielo. Se distribuyó rápidamente en volúmenes de 50-200  $\mu\text{l}$  y se congeló por inmersión en nitrógeno líquido.

Después de la ligación el *DNA* se diluyó 5 veces en H<sub>2</sub>O estéril para transformar. Se tomaron 80 µl de las bacterias competentes previamente divididas en alícuotas, que se conservaban a -70°C y se colocaron en hielo hasta que se descongelaron. Se agregó 1 µl de la ligación (0.2 - 2ng de *DNA* ligado) a los 80 µl de células y se mezcló cuidadosamente con la puntilla. Se cerró el tubo y se incubó en hielo por 30 minutos. Se hizo el choque térmico a 37°C durante 2 minutos, sin agitación. Se colocó el tubo en hielo otros 2 minutos. Se agregaron 900 µl de medio SOC a temperatura ambiente. Se incubó 1 h a 37°C, en agitación a 225 rpm. Se centrifugó, descartó el sobrenadante y se reconstituyó la pastilla con 150 µl de medio SOC. Con una varilla esterilizada, se esparcieron las células en una placa de agar-SOC. Una vez sembradas las cajas, se esperó 15 minutos a que se absorbiera el exceso de líquido y las placas se colocaron en forma invertida en una incubadora a 37°C por 12-16 h.

### 2.3.1.5 Minipreparaciones.

Se levantaron las colonias y se propagaron en 6 ml de medio 2xYT, incubándose a 37°C por 12 h con agitación vigorosa (Morelle 1989). Se cosecharon las células centrifugando 1.5 ml del cultivo bacteriano a 14,000 rpm por 1 min en un tubo Eppendorf, repitiendo este paso por segunda ocasión en el mismo tubo (para un total de 3 mL). La pastilla se resuspendió en 200 µl de amortiguador de lisis [50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA], mezclando al vortex e incubando 5 min en hielo. Se añadieron 400 µl de una solución alcalina recién preparada [NaOH 0.2 N y SDS al 1%], mezclando inmediatamente por inversión de 3 a 6 veces y manteniendo en hielo por 5 min (La suspensión debe tornarse clara y viscosa). Después se añadieron 300 µl de una solución de acetato de amonio 7.5 M (pH 7.8 sin ajustar), mezclando cuidadosamente el contenido del tubo por unos segundos y se incubó 20 min en hielo para permitir que las proteínas, el *RNA* de alto peso molecular y el *DNA cromosómico* precipitaran. Se centrifugó por 9 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente y se removió el sobrenadante claro, el cual fue transferido a un tubo nuevo de 1.5 mL. Al sobrenadante se le añadió isopropanol hasta completar 1.5 ml y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue aspirado y la pastilla fue lavada con 1 ml de etanol al 70% (v/v). Se centrifugó 3 min, se descartó el sobrenadante y se lavó nuevamente con etanol al 70%, posteriormente se lavó con 1 ml de etanol al 100%, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. La pastilla se secó por 15 min en una estufa a 37°C. Se disolvió la pastilla en 100 µl de TE (1 mM de EDTA y 10 mM de Tris-HCl, pH de 8.0) y se añadió *RNA*se ajustando a 1

$\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  de solución, e incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se verificó la concentración y calidad del *DNA* plasmídico por corrimiento en gel de agarosa al 0.6 %. Las minipreparaciones se almacenaron a 4°C.

### 2.3.1.6 Caracterización Enzimática.

Las clonas recombinantes obtenidas se caracterizaron con la endonucleasa de restricción *Bgl* II, con la cual se diferenciaron las que portaban los vectores pPIC9hGH22K, pPIC9bGH y pPIC9, por corrimiento en gel de agarosa al 0.6% en TBE (TABLAS 9 y 10).

**TABLA 9.**

**CALCULO DE FRAGMENTOS PRODUCIDOS POR DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN PARA VECTORES pPIC9.**

	pPIC9 (nuc)	pPIC9hGH22K (nuc)	pPIC9bGH (nuc)
Digestión con <i>Sac</i> I	8023	8589	8572
Digestión con <i>Bgl</i> II	5620 2403	4574 2403 1612	6169 2403

**TABLA 10.**

**CALCULO DE FRAGMENTOS PRODUCIDOS POR DIGESTION CON ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN PARA VECTORES pPIC9K.**

	pPIC9K (nuc)	pPIC9KhGH22k (nuc)	pPIC9KbGH (nuc)
Digestión con <i>Sac</i> I	9276	9843	9825
Digestión con <i>Bgl</i> II	6783 2403	5828 2403 1612	7422 2403

### 2.3.1.7 Secuenciación.

La secuenciación se realizó con el Kit comercial AmpliCycle™ de la compañía Perkin Elmer, utilizando las condiciones especificadas por el proveedor. Los productos marcados con  $^{32}\text{P}$  fueron resueltos en un gel de poliacrilamida urea al 6% y 50% respectivamente en el equipo para secuenciación "GenomixLR™" y después de exponer el gel en película sensible se determinó la secuencia de las clonas.

### 2.3.1.8 Purificación de Fragmentos de DNA con Fibra de Vidrio Siliconizada.

La fibra de vidrio se colocó en un frasco de vidrio con tapa, se esterilizó en autoclave por 20 min en modo "instrumental". Se tomó una porción de la fibra de vidrio estéril y se colocó dentro de una jeringa estéril de polipropileno de 10 mL, llenándola a una capacidad de 3 ml de fibra compactada. Se tomaron 5 ml de una solución de silicón (Glass shield) no tóxico con la jeringa, usando el émbolo. Se dejó 5 minutos a temperatura ambiente la solución de silicón en contacto con la fibra, se descartó la solución y se lavó la fibra con 3 volúmenes de 10 ml de etanol al 70%. Se lavo después con 3 volúmenes de 10 ml de agua mili-Q. Posteriormente, se tomaron 5 ml de TE y se dejó reposando 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó todo el TE que fue posible usando el émbolo para expulsarlo. La jeringa, la cual contiene la fibra de vidrio siliconizada se almacenó sellada con el tapón de la aguja a 4°C, hasta su uso.

Posteriormente se les quitó el fondo a varios tubos de microcentrífuga de 0.5 ml con la ayuda de una navaja de bisturí, procurando dejar un agujero de 1-2 mm de diámetro. Se relleno el tubo con un poco de fibra de vidrio siliconizada, solo hasta tapar el agujero, con un espesor de 3 mm. Los tubos de microcentrífuga anteriormente descritos se colocaron dentro de tubos de microcentrífuga de 2.0 mL. Estos cartuchos así preparados sirvieron para filtrar el DNA embebido en la agarosa al 1%. Para ello, se colocó en el cartucho el fragmento de gel correspondiente a la banda cortada, asegurándose que fuera hasta el fondo, se procedió a centrifugar a velocidad máxima en una microcentrífuga (~14,000 rpm) por 5 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el líquido contenido en el tubo de 2 mL, llevándose a un volumen de ~300 µl con TE pH 8.0. Se añadió 1 volumen de Fenol y otro volumen de Sevag, se mezcló por 1 min en vortex, se centrifugó 5 min a 14,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 3 volúmenes de etanol al 100%. Se incubó a temperatura ambiente por 3 h, se centrifugó 15 min a temperatura ambiente (14,000 rpm). Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante, se repitió el lavado y la centrifugación, lavando ahora con 1 ml de etanol al 100%, centrifugando y descartando el sobrenadante. La pastilla se secó en estufa a 37°C por ~15 min

### 2.3.1.9 Transferencia del *DNAc* de *bGH* al Vector pPIC9K (Ligación de dos Fragmentos).

Esta estrategia se diseñó desde el momento de clonar en pPIC9, con el fin de poder transferir el *DNAc* de *bGH* a pPIC9K (FIGURA 14).

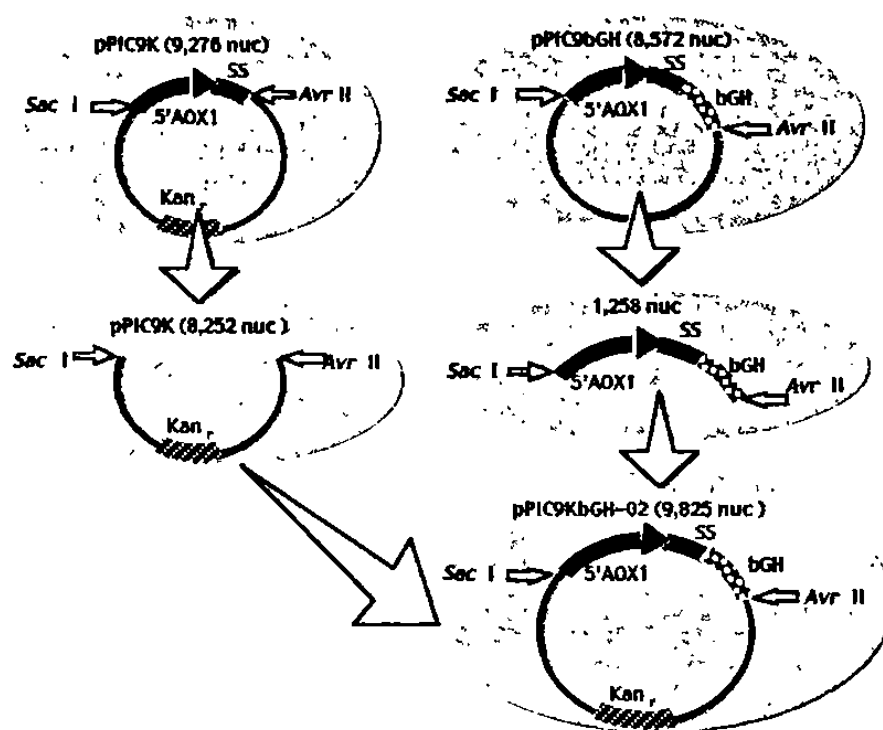


FIGURA 14. Transferencia del *DNAc* de *bGH* al vector pPIC9K (ligación de dos fragmentos). Aquí se muestra la clonación que fue inicialmente diseñada, en la cual a partir de los vectores pPIC9K y pPIC9bGH se construiría el vector pPIC9KbGH, las enzimas involucradas en la clonación son *Sac* I y *Avr* II.

### 2.3.1.10 Transferencia y Reparación del *DNAc* de *bGH* en el Vector pPIC9K (Ligación de Tres Fragmentos).

Esta estrategia se implementó cuando se descubrieron mutaciones indeseables introducidas por la *PCR* en el *DNAc* de las clonas obtenidas en pPIC9 (FIGURA 13). Para corregirlas, se optó por utilizar la porción correcta del *DNAc* de *bGH* clonado en el vector pPIC9bGH, reemplazando la porción incorrecta con un fragmento proveniente del vector pMALcbGH (Martínez 1993), transfiriendo la porción del *DNAc* de *bGH* corregido a pPIC9K, las enzimas involucradas en la clonación fueron *Sac* I, *Apa* I, *Avr* II y *Xba* I (FIGURA 15). Se realizaron las digestiones siguiendo las

recomendaciones dadas por el manual de NEB (TABLA 11). La incubación fue a 37°C por 12 h. Se purificaron los fragmentos separados en gel de agarosa al 1 % con fibra de vidrio siliconizada.

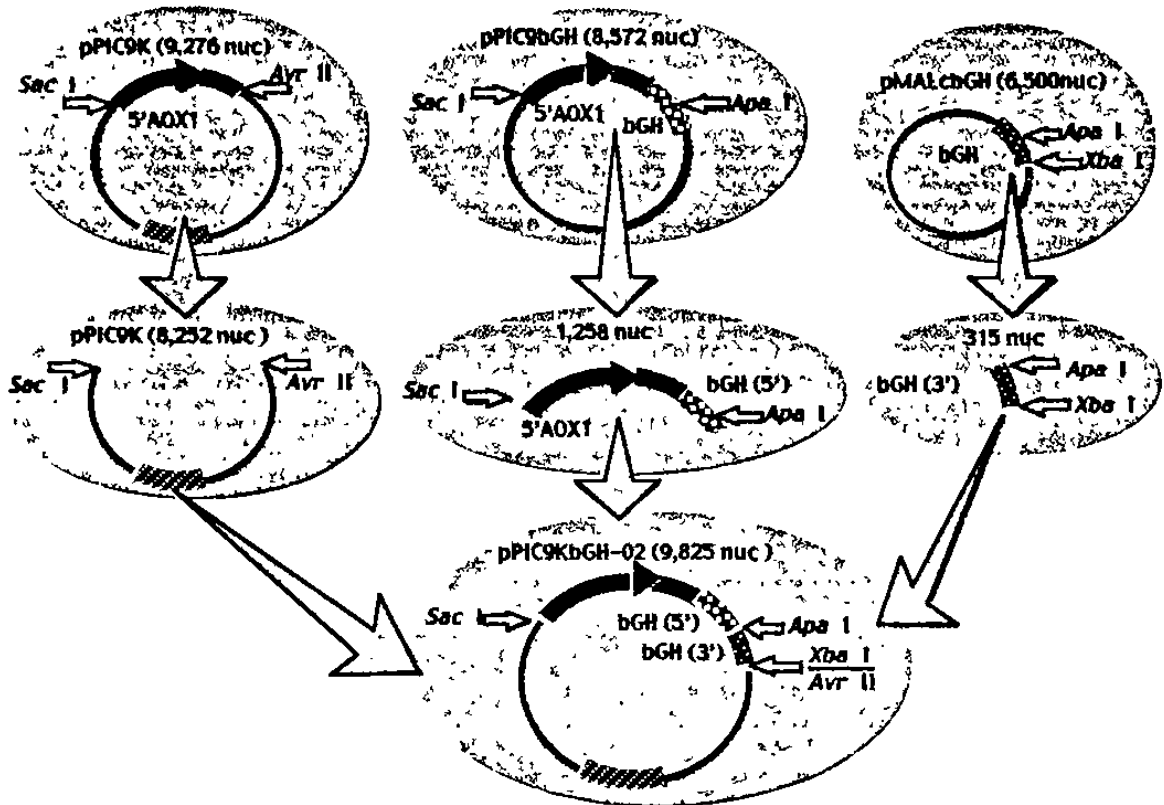


FIGURA 15. Transferencia y reparación del DNA de bGH en el vector pPIC9K (ligación de tres fragmentos). Aquí se muestra la clonación que se diseñó posteriormente para transferir y reparar el DNA de bGH en pPIC9K, en la cual a partir de los vectores pPIC9K, pPIC9bGH y pMALcbGH se construiría el vector pPIC9KbGH, las enzimas involucradas en la clonación son Sac I, Apa I, Avr II y Xba I.

TABLA 11.

CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS FRAGMENTOS REQUERIDOS PARA LA CLONACIÓN EN pPIC9K.

Reactivo	pPIC9K	pPIC9bGH	pMALcbGH
DNA	140.0 ng/μL	140.0 ng/μL	200.0 ng/μL
agua mili-Q	*	*	*
NEB amortiguador # 4	1 X	1 X	1 X
Sac I (20.0 u/μL)	0.80 u/μL	0.80 u/μL	—
Avr II (4.0 u/μL)	0.16 u/μL	—	—
Apa I (10.0 u/μL)	—	0.40 u/μL	0.50 u/μL
Xba I (10.0 u/μL)	—	—	0.50 u/μL
Total	50.0 μL	50.0 μL	50.0 μL

Se corrieron geles de agarosa al 1% en TBE preparativos, para separar los fragmentos de *DNA* que se deseaban purificar. Se cortaron con un bisturí las bandas correspondientes. Se filtraron los *DNA*s con la fibra de vidrio, pero como existía un fragmento de 300 pb que estaba presente en baja concentración, se optó por juntar los filtrados de los tres fragmentos, para así favorecer la co-precipitación del fragmento de 300 pb. Se resuspendió la pastilla en 60 µl de TE. Se realizó la ligación, en un volumen de 20µL, con una relación molar 1:1:3 (vector:inserto a:inserto b) incubando, por 12 h a 16°C (TABLA 12).

**TABLA 12.**  
**CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA LA REACCION DE LIGACION DE TRES**  
**FRAGMENTOS (CONSTRUCCION DEL VECTOR pPIC9kbGH).**

Reactivo	Concentración
Vector pPIC9K Sac I-Avr II (8,252 pb)	30 ng/µL
Inserto (a) Sac I-Apa I (1258 pb)	2.5 ng/µL
Inserto (b) Apa I-Xba I (315 pb)	2.5 ng/µL
agua mili-Q	*
Amortiguador de ligación 5 X BRL	1 X
Ligasa 1 u/µl BRL	0.1 u/µL
Volumen final	20.0 µL

Se efectuó la transformación en *E. coli*, la obtención del *DNA* plasmídico y su caracterización, como se ha explicado anteriormente.

### 2.3.2 Segunda Fase:

#### 2.3.2.1 Electroporación.

Este método no requiere la generación y mantenimiento de esferoplastos, lo cual es muy conveniente para la generación de transformantes de *Pichia*. La eficiencia de transformación es similar a la obtenida con el método de esferoplastos (Scorer *et al* 1994). La presente metodología fue modificada para facilitar la manipulación (versión de volúmenes escalados a 1/2).

1. Se creció 5 ml de *GS115* en YPD en un tubo cónico a 30°C toda la noche. Se inoculó 500 ml de YPD en un matraz de 1 l con 0.1-0.5 ml de cultivo de toda la noche. Se creció toda la noche hasta obtener una  $DO_{600} = 1.3-1.5$ . Se centrifugó las células a 4000 x g por 5 min a +4°C (Se dividió en alícuotas de 50 ml c/u = 10 tubos). Se descartó el sobrenadante tanto como fue posible. Se resuspendió c/u de las pastillas con 50 ml de agua estéril

enfriada en hielo. Se centrifugó las células nuevamente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 25 ml de agua estéril enfriada en hielo c/u, y se juntó los volúmenes de dos en dos (5 tubos, 50 ml c/u). Se centrifugó las células nuevamente, se descartó el sobrenadante, se resuspendió y se mezcló las 5 pastillas en 10 ml de sorbitol 1M enfriado en hielo (1 tubo con 10 mL). Se centrifugó las células, se descartó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en sorbitol 1M enfriado en hielo, se llevó a un volumen final aproximado de 1-1.5 ml (Se aforó en tubo de 2 mL).

2. Transformación: se quitó la envoltura de plástico a las cubetas de 0.2 cm y se colocaron en hielo, junto con la cámara de seguridad. Se ajustó el aparato GenePulser a 1.5 kV ( $E_0=7.5$  kV/cm) y 25  $\mu$ F. Se ajustó el controlador de pulso a 200  $\Omega$ . Con esto se debe producir un pulso con un tiempo constante de 4.5 a 5 msec. Se mezcló generosamente 80  $\mu$ l de las células del paso 1 con 20  $\mu$ g de *DNA* linearizado (en 5-10  $\mu$ l de amortiguador TE) en un tubo de polipropileno y se transfirió a la cubeta de electroporación de 0.2 cm previamente enfriada en hielo. Se incubó la cubeta con la células en hielo por 5 minutos, se golpeó suavemente la cubeta, haciendo que baje el contenido, para que estuviera en contacto con ambas caras del aluminio de la cubeta. Se colocó la cubeta en la cámara de seguridad fría. Se presionó las cubetas para que hicieran contacto con los electrodos en la base de la cámara. Se aplicó un pulso con los ajustes previamente fijados. Se removió la cubeta de la cámara, e inmediatamente se añadió 1 ml de sorbitol 1 M a la cubeta. Se mezcló generosamente el contenido con una P1000. Se transfirió a un tubo de microcentrífuga estéril. Se incubó las placas a 30°C hasta la aparición de colonias (2-6 días). Se tamizó los fenotipos *Mut<sup>+</sup>/Mut<sup>S</sup>* por *PCR*.

Se evaluó el experimento de transformación. Al término de los 4-6 días, se observó transformantes *His<sup>+</sup>* en las placas. La eficiencia de transformación debe ser entre  $10^3$  a  $10^4$  transformantes *His<sup>+</sup>*/ $\mu$ g de *DNA* usado. No se deben tener colonias en el testigo sin *DNA* o en la placa de transformación con pBR322, ni en la placa sin células.

Tamizaje de transformantes *Mut<sup>+</sup>* y *Mut<sup>S</sup>*: La linearización con *Bgl* II de pPIC9 y pPIC9K favorece la recombinación en el locus *AOX1*. El desplazamiento del gen de la alcohol oxidasa tiene una frecuencia del 5-35 % de las transformantes *His<sup>+</sup>*. Por



replicación de placas con medio Mínimo con Dextrosa (MD) versus medio Mínimo con Metanol (MM), los transformantes que son His<sup>+</sup> y a su vez *Mut*<sup>+</sup> o *Mut*<sup>S</sup> pueden ser distinguidos. La linearización de las construcciones con *Sal* I o *Stu* I da transformantes *Mut*<sup>+</sup> mayoritariamente. La recombinación se favorece en el locus *HIS4*.

### 2.3.2.2 Tamizaje de Multicopias.

pPIC9K posee el gen bacteriano *Kan<sub>r</sub>* (*kan*, del transposón Tn903 que aporta la resistencia a kanamicina en bacterias), que confiere resistencia a geneticina (G418) en *Pichia*. El nivel de resistencia a geneticina depende básicamente del número de copias del gen de kanamicina integradas en el genoma de la levadura. Con una sola copia de pPIC9K se logra resistencia a una concentración aproximada de 0.25 mg/mL, mientras que múltiples copias pueden proporcionar resistencia a concentraciones desde 0.5 mg/ml (2 copias) hasta 4.0 mg/ml (7-12 copias). Debido a que el gen *Kan<sub>r</sub>* está incluido en el mismo *DNA* del cassette de expresión que lleva también al gen de interés, se puede inferir que las clonas son también multicopias para éste último.

El tamizaje de transformantes resistentes a G418 aunque maneja un número reducido de clonas y es tediosa, es una técnica segura. Involucra crecimientos sucesivos de clonas en placas de microtitulación, donde todas las clonas finalmente alcanzan la misma densidad. Se colocan 10 µl de *c/u* de los cultivos en placas YPD-G418 y se determina la resistencia a G418. Se debe tener precaución pues se tiende a obtener falsos positivos cuando se tamiza con G418; por lo que es muy importante purificar las clonas resistentes que se han crecido en caldo YPD y confirmar su resistencia creciéndolas en placas YPD-G418.

**Método:** se requiere de tres juegos de parejas de placas de microtitulación (6 en total) para tamizar ±180 recombinantes *His*<sup>+</sup>. La idea es crecer las clonas a aproximadamente la misma densidad por inoculaciones sucesivas para asegurar el número equivalente de células que se colocarán en las placas con G418. Debe recordarse incluir controles para comparar con clonas con una copia del gen. Por cada 100 clonas, se puede esperar aislar entre 1 y 10 clonas resistentes a G418.

En condiciones estériles, se añadió 200 µl de caldo YPD a cada pozo de la placa de microtitulación. Se inoculó cada pozo del primer juego de placas con una transformante *His*<sup>+</sup>, usando un palillo de dientes y se agitó para resuspender las células. Se cubrió la placa de microtitulación e incubó a 30°C por dos días (no requiere

agitación). Después de dos días, se tomaron nuevas placas de microtitulación y se añadieron 190  $\mu$ l de YPD a cada pozo. Se inoculó el segundo juego de placas de microtitulación con 10  $\mu$ l del primer juego, con el uso de una pipeta multicanal. Se aseguró que el segundo set de placas de microtitulación estuviera marcado y orientado en la dirección de los otros pozos. Se cubrió e incubó el segundo juego de placas a 30°C por toda la noche. Se preparó un tercer juego de placas de microtitulación, se inoculó e incubó, para luego resuspender las células en cada pozo con la pipeta multicanal. Se tomaron 10  $\mu$ l de cada pozo y se inocularon en placas de YPD con G418 a concentraciones de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL. Se colocó en un patrón regular usando una cuadrícula debajo de la placa. Se dejó absorber el líquido y se incubó las placas a 30°C. Se revisó después de algunos días (2 a 5) para ver el surgimiento de las clonas resistentes a G418. Posteriormente se procedió al análisis de los resultados.

Generalmente se espera obtener pocas colonias resistentes a G418 y éstas pueden presentar diferentes tamaños, pero la morfología debe ser igual. Se debe enlistar las colonias resistentes a G418, y confirmar el nivel de resistencia a G418 observado para cada colonia. Puede no encontrarse colonias resistentes a concentraciones de G418 de 2.0, 3.0 o 4.0 mg/mL. Las colonias resistentes a estos altos niveles de G418 son muy raras y por lo tanto se debe tamizar cientos de colonias de transformantes *His+* para lograr obtener colonias resistentes a tales concentraciones de G418.

**Análisis de la presencia del inserto por PCR.** La PCR en condiciones estándares solo verifica la presencia del gen, no puede precisar cuantas copias del gen están integradas en el locus o en que locus lo están. Deben incluirse como testigos al vector sólo y a la construcción original con una copia, para interpretar el resultado de la PCR. No se garantiza que múltiples copias del gen incrementen la cantidad de proteína expresada, mucha gente opta por proceder directamente a la expresión y ver cual de estas colonias sobreexpresa la proteína (refer). Debe asegurarse de que todas las colonias resistentes a G418 tengan también el fenotipo *Mut+* para una expresión apropiada.

**Determinación del número de copias.** Si se encontró que las recombinantes *His+* resistentes a G418 sobreexpresan la proteína, se debe cuantificar el número de copias del cassette integrado por hibridación Southern blott o Dot blott

cuantitativo (Brierley, *et al.*, 1994; Clare, *et al.*, 1991a; Romanos, *et al.* 1991; Scorer, *et al.*, 1993; Scorer, *et al.*, 1994).

### 2.3.2.3 PCR Analítico.

**Método 1:** Se estableció un protocolo para la PCR, ajustando las condiciones de reacción para ahorrar *Taq DNA polimerasa*, para obtener una relación de las bandas amplificadas cercana a 1 (una producto del genoma de *Pichia* y la otra del cassette de expresión integrado) cuando se posee una sola copia del cassette de expresión en el genoma de *Pichia*. Este protocolo se debe realizó con *DNA genómico* cuantificado. Nos permitió identificar clonas multicopia (Sanchez, 1998), mas no precisar el número de copias del cassette de expresión integrados en el genoma (TABLAS 13 y 14).

**TABLA 13.**  
**CONDICIONES DE REACCION DEL METODO 1.**

Reactivo concentrado	Concentración final
Agua estéril	*
Amortiguador 10X	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	0.2 μM
Oligo 5' (5μM)	0.5μM
Oligo 3' (5μM)	0.5μM
DMSO	5%
<i>DNAg</i> (50 ng/μL)	2 ng/μL
<i>TaqDNA pol</i> (5u/μL)	1 u/25 μL
Volumen total	25 μL

**Método 2:** Este protocolo solo es recomendable para la comprobación de la integración del cassette de expresión en el genoma de *Pichia* y permite analizar un gran número de clonas recombinantes. No puede ser usado para identificar clonas multicopia, pues se practica con lisado celular donde el *DNA* no está cuantificado; debido a esto, no se obtendrían resultados confiables en lo que respecta a la relación 1:1 producto del cociente de los productos amplificados a partir del cassette de expresión y el *DNA genómico*.

Para la obtención del lisado celular, primero se toma 1 μl del asentamiento de un cultivo líquido, o de la pastilla si se centrifugó, o un pequeño trozo de colonia y se lleva a un volumen de 10 μl con agua estéril se añaden 5 μl de una solución de liticasa a 5U/μL, se mezcla e incuba 10 min a 30°C, se congela por inmersión en nitrógeno líquido

por 1 minuto, antes de utilizar el lisado, se centrifuga por 3 min a 14,000 rpm o máxima velocidad en una microcentrífuga y se recupera el sobrenadante.

Las condiciones de amplificación se ajustaron para poder realizar una rápida determinación, a partir de restos celulares tratados con *liticase* (TABLAS 14 y 15).

**TABLA 14.**  
**CONDICIONES DE REACCION DEL METODO 2.**

Reactivo concentrado	Concentración final
Agua MiliQ	*
Amortiguador 10X	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	0.2 μM
Oligo 5' (5μM)	0.5μM
Oligo 3' (5μM)	0.5μM
DMSO	5%
Lisado celular	1/5 del volumen final de Reacción
TaqDNA pol (5u/μL)	1 u/25 μL
Volumen total	25 μL

**TABLA 15.**  
**PROGRAMAS DE AMPLIFICACION DEL METODO 1 Y METODO 2.**

Paso	Temperatura	Tiempos Método 1	Tiempos Método 2
1	94°C	5 min	5 min
2	94°C	45 seg	45 seg
3	60°C	1 min	1 min
4	72°C	2 min	2 min
5		18 ciclos	30 ciclos
6	72°C	10 min	10 min

Los dos protocolos anteriormente mencionados utilizan programas de amplificación distintos, pero los mismos reactivos para la reacción de amplificación. También difieren en la calidad y cantidad del *DNA* a amplificar (*DNA* extraído y cuantificado o lisado celular). Los oligonucleótidos utilizados se denominan 5' y 3' AOX1, por que se aparean por complementariedad a las regiones homólogas en los extremos del gen AOX1, mismas que también flanquean al gen de interés clonado en el vector. Cualquier región incluida entre las dos regiones homólogas a los oligonucleótidos es amplificada: el producto amplificado del gen AOX1 es de 2,100 nuc, mientras que el producto amplificado a partir del gen de interés contenido en el cassette de integración se estimó en 1044 nuc.

### 2.3.2.4 Fermentaciones.

Se inoculó sembrando por estrias en tres campos en una placa con agar YPD, a partir de un "stock" conservado en glicerol al 15% a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  hasta la aparición de las colonias (generalmente dos días). Se recogió una colonia de la placa y se inoculó en 25 ml de medio BMG (Medio mínimo amortiguado y glicerol) contenidos en un matraz de 250 mL. Se tapó la placa con papel parafilm y se guardó a  $+4^{\circ}\text{C}$  para poder usarla posteriormente (máximo 3 semanas). Se incubó el matraz a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación a 250 rpm. Se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  que se diluyeron 1:10 con BMG. Se midió la DO a 600 nm hasta que el cultivo alcanzó una  $\text{D.O.} \geq 4.0$ . Se tomó el volumen de cultivo necesario para obtener la  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1.0$  en 25 ml de BMM o BMG, se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min y se resuspendió la pastilla obtenida en BMG o BMM hasta completar 25 ml (relación 1:10). Se revisó que la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  fuera aproximada a 1.0 y se registró la lectura obtenida. Se pasó la suspensión al matraz anteriormente usado y se agregó metanol a una concentración de 0.5%. Se determinó la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ . Se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  en agitación a 250 rpm. Luego se midió la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  cada 24 h, haciendo una dilución de 1:100 con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Se agregó metanol cada 24 h a igual concentración hasta tener un tiempo de fermentación de 144 h (FIGURA 16).

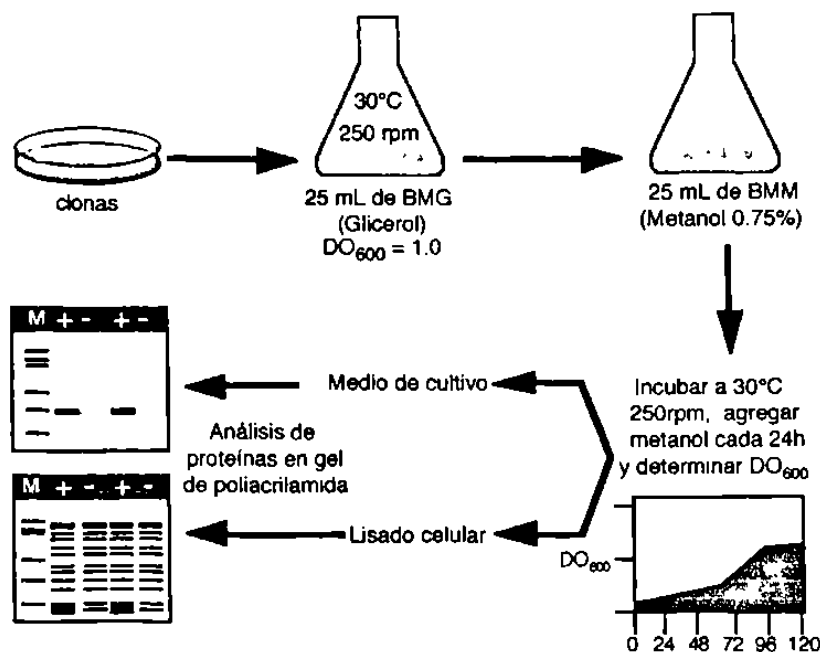


FIGURA 16. Diagrama de flujo para la fermentación en matraces de 250 ml y su posterior análisis. El estudio abarca desde la propagación de la clona a partir de una caja de petri, hasta el análisis del lisado celular en geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Se realizó la lectura de la densidad óptica del cultivo, procurando que la dilución no excediera de 0.5  $DO_{600nm}$ ; y cuando fue necesario se diluyó mas para evitar error en la determinación de la  $DO_{600nm}$ .

#### **2.3.2.5 Diálisis del Medio de las Fermentaciones.**

Se enfrió tres vasos que contenian dos litros de agua destilada cada uno hasta alcanzar una temperatura de 4°C. Se remojó las membranas de diálisis en agua destilada 15 min. Se hicieron dos nudos en la parte inferior de la membrana de diálisis, y se agregó el medio de la fermentación, para luego hacer un nudo en la parte superior, donde luego se amarró un hilo para sostener la membrana en el vaso. Se dializó el medio fermentado en el agua destilada fría. Se cambió el agua cada dos horas, realizándose dos cambios de agua en total. El medio dializado se concentró en un evaporador centrífugo al vacío, llevando a un volumen 20 veces menor que el original.

#### **2.3.2.6 Lisis celular.**

Se requirió preparar Amortiguador de Ruptura (BB), y perlas de vidrio lavadas con ácido sulfúrico 2 M y 5 volúmenes de agua bidestilada estéril. Se tomó las pastillas de células y rápidamente se puso en hielo, se resuspendió en agua bidestilada estéril para determinar la  $DO_{600nm}$  con una dilución 1:100. Se tomó el volumen necesario para tener una  $DO_{600nm}$  de 20 en un volumen de 200  $\mu$ l (completar a 200  $\mu$ l con agua bidestilada estéril) y se añadieron 500  $\mu$ l de BB. Se resuspendió y centrifugó a 14,000 rpm/3 min a temperatura ambiente y se resuspendió nuevamente pero ahora en 200  $\mu$ l de BB ( $OD_{600} = 20.0$ ). Se añadió un volumen equivalente de perlas de vidrio (0.5 mm de tamaño) lavadas con ácido. Se estimó el volumen equivalente en un tubo de microcentrífuga de 0.5 mL. Se agitó 30 seg en agitador, se incubó en hielo por 30 seg. Se repitió para un total de 10 ciclos (esto reduce la desnaturalización de la proteína). Se centrifugó a velocidad máxima por 5 min a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante claro a un tubo nuevo de microcentrífuga. Se tomaron 50  $\mu$ l del sobrenadante (lisado celular) y se mezcló con 50  $\mu$ l de amortiguador de muestra 2X. Se calentó en baño en ebullición por 10 minutos y usaron de 10 a 20  $\mu$ l por carril. La muestra restante se almacenó a -20°C. Los lisados celulares pueden ser almacenados a -80°C para análisis futuros.

### 2.3.2.7 Geles de Poliacrilamida SDS-PAGE.

El límite de detección para SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie es de 1  $\mu\text{g}$  por banda, mientras que para el teñido con plata es de 0.1  $\mu\text{g}$ . La electroforesis en minigeles se hizo a voltaje constante de 20-30 v/cm de longitud del gel. El gel se preparó con los ingredientes y las concentraciones indicadas en la TABLA 16 (APENDICE E).

Primero los vidrios son lavados con detergente, luego enjuagados con agua y secados con etanol, posteriormente son ensamblados en la cámara de acuerdo a las especificaciones del equipo. Posteriormente se añaden en un tubo de 15 ml con tapón, los ingredientes de la TABLA 17 uno por uno en el orden ilustrado (al momento de añadir cada uno se mezcla por inversión).

**TABLA 16.**  
**REACTIVOS Y CONCENTRACIONES REQUERIDAS PARA EL GEL SEPARADOR.**

Reactivo	Concentración requerida
Agua Milli Q	*
Tris HCl 1.5 M pH 8.8	375 mM
SDS 10%	0.1%
Acrilamida 30%	12 %
PSA 10%	0.033 %
TEMED	0.066 %
Total	10 mL

Una vez mezclados los ingredientes, se vació la mezcla del gel separador y se cubrió con una capa de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada de 1 cm de espesor. Se esperó una hora a que ocurriera la polimerización. Se retiró el  $\text{H}_2\text{O}$  con papel secante y se preparó el gel concentrador (TABLA 17):

**TABLA 17.**  
**REACTIVOS Y CONCENTRACIONES REQUERIDAS PARA EL GEL CONCENTRADOR.**

Reactivo	Concentración requerida
Acrilamida 30%	4%
Tris HCl 0.5 M pH 6.8	125 mM
SDS 10%	0.1%
Agua Milli Q	*
PSA 10%	0.05%
TEMED	0.1%
Volumen Total	10.0 mL

Se vació la mezcla para el gel concentrador y se colocó el peine, se esperó 45 min a que polimerizara, se colocó el gel en la cámara y se llenaron con amortiguador los compartimentos de ésta. Cuando la muestra era líquida, se mezcló un volumen con un volumen de amortiguador 2X. Cuando la muestra era seca, se diluyó el amortiguador 2X a 1X y se reconstituyó la muestra. Se calentó en baño María a ebullición por 5 min en tubos de microcentrifuga de 0.5 mL. Se colocaron como máximo 20 µl por carril. Se corrió a 80 V hasta que el colorante llegó al gel separador, y luego se subió a 120 V. Se corrió hasta que se saliera el azul de bromofenol. Se tiño con cuidado, para lo cual se desmontó el gel y se eliminó la porción del gel concentrador. La otra porción, la del gel separador, se sometió a las soluciones y tiempos de agitación (a 10 rpm) siguientes: Solución fijadora=30 minutos; Solución de Coomassie=45 minutos; Solución decolorante=toda la noche con cambios de solución. Cuando estuvo desteñido, se dejó en agitación con agua.



## CAPÍTULO 3

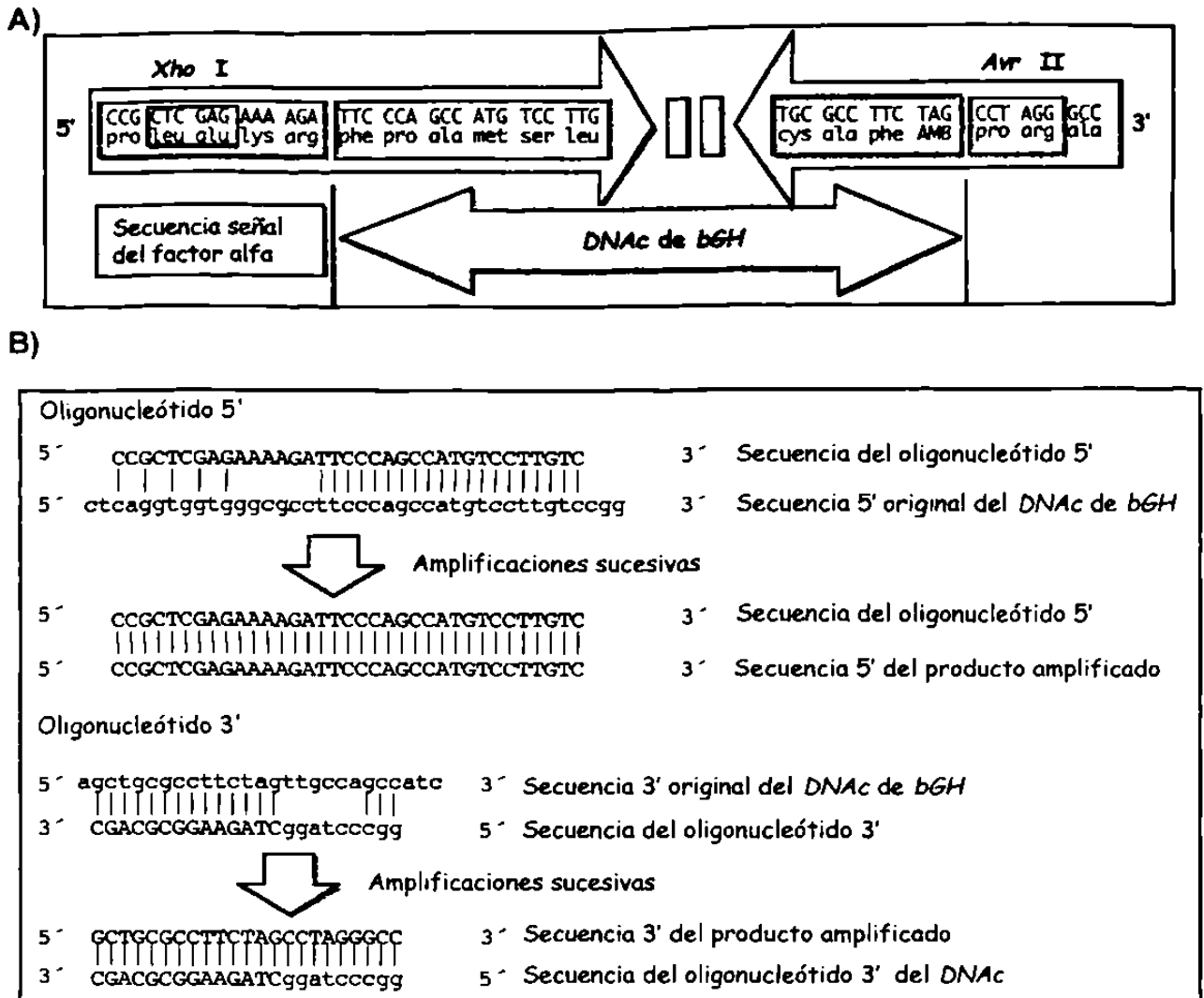
### RESULTADOS

#### 3.1 Primera Fase.

##### 3.1.1 Oligonucleótidos Diseñados para Amplificar *bGH* por *PCR*.

Se efectuó el diseño de los oligonucleótidos que permitieron tanto amplificar por la *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* el *DNAc de bGH*, como modificarlo durante la amplificación para facilitar su inserción correcta en el vector de integración para *P. pastoris*. Dichos oligonucleótidos flanquean los extremos 5' y 3' del *DNAc de bGH*; el oligonucleótido 5' se ubicó para que fuera complementario a los primeros 6 codones de la proteína madura, y en el extremo 5' del mismo oligonucleótido se agregó una secuencia (sitio de restricción para la endonucleasa *Xho I*) que permitió posteriormente la clonación del *DNAc de bGH* amplificado por la *PCR*, en registro con la misma fase de lectura que la secuencia señal del factor alfa contenida en los vectores pPIC9 y pPIC9KbGH. El oligonucleótido 3' se diseñó de manera que fuera complementario a 17 nucleótidos del extremo 3' del *DNAc de bGH*, incluido el codón de terminación, y al mismo tiempo se le incluyó un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *Avr II* (FIGURA 17).

Los criterios tomados en cuenta para la selección de la secuencia de los oligonucleótidos fueron: especificidad, longitud y temperatura teórica de apareamiento al *DNA* molde, la cual resultó de 66.6°C.



**FIGURA 17.** A) Regiones donde se aparean los oligonucleótidos 5' y 3' en el DNAc de bGH. B) Cambios introducidos por los iniciadores durante la PCR en el producto amplificado. El oligonucleótido 5' tiene una longitud de 35 nucleótidos de los cuales solo se aparean 25 nucleótidos; el oligonucleótido 3' tiene una longitud de 23 nucleótidos de los cuales 17 se aparean con el DNAc de bGH.

### 3.1.2 Condiciones Establecidas para la PCR.

Se montó una estrategia para determinar la concentración del ión  $Mg^{++}$  óptima para la amplificación. Se realizaron 5 experimentos a concentraciones distintas de  $MgCl_2$  (de 1 mM a 3 mM con incrementos de 0.5 mM), manteniendo todos los demás parámetros constantes. Dada la alta sensibilidad de la técnica de PCR, se trabajó con 0.4 ng/ $\mu$ l del DNA molde.

En la TABLA 7, se ilustra el ensayo de ajuste de concentración de  $MgCl_2$  para mejorar la producción del fragmento amplificado por *PCR*.

Una vez montada la reacción, se inició el programa de temperaturas y tiempos requeridos en cada ciclo, tal y como se muestra en la TABLA 8.

El producto amplificado con una longitud de 599 nucleótidos se analizó a partir de 5  $\mu$ l de la reacción en electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE, tiñendo con bromuro de etidio para su análisis bajo luz ultravioleta. El mejor resultado se obtuvo con 2 mM de  $MgCl_2$ .

### 3.1.3 Clonación del *DNA*c de *bGH* en el Vector pPIC9.

La transformación de las bacterias calcio-competentes se realizó con 1  $\mu$ l de la reacción de ligación (69 ng correspondientes al vector) diluido 1:5 con TE (TABLA 18), del cual se obtuvieron 62 clonas recombinantes. De éstas se hicieron minipreparaciones a 53 y a un testigo de transformación. Del control negativo de ligación se obtuvo una colonia (69 ng del vector sin ligasa), lo que indicó que el vector fue digerido casi en su totalidad. El *DNA* de un vector en forma superenrollada (sin digerir) tiene una eficiencia de transformación de 10-100 veces mayor que un *DNA* circular producto de una reacción de ligación, debido a que este último, se encuentra en forma relajada.

**TABLA 18.**  
**CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE LIGACIÓN PARA**  
**OBTENER EL VECTOR pPIC9bGH<sub>Taq</sub>.**

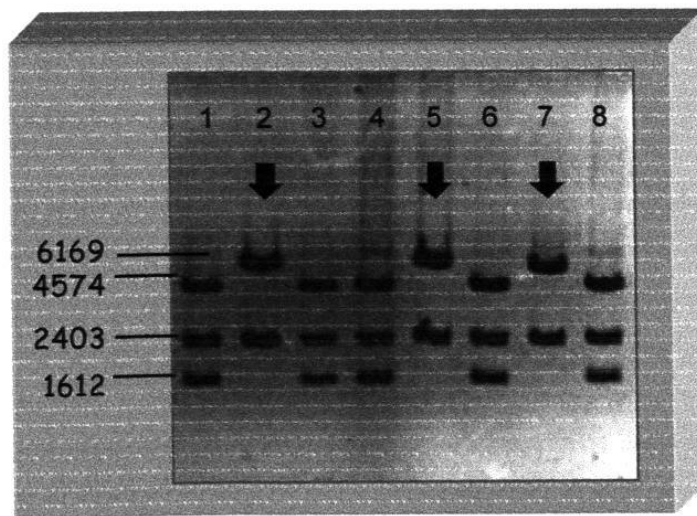
Reactivos	Condiciones
<i>DNA</i> pPIC9hGH22k y digerido con <i>Xho</i> I/ <i>Avr</i> II	27.6 ng/ $\mu$ L
Producto amplificado y digerido con <i>Xho</i> I/ <i>Avr</i> II	27.6 ng/ $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	—
Amortiguador de ligasa 5 X	diluido a 1 X
Ligasa (1 u/ $\mu$ L)	0.1 U/ $\mu$ L
(Volumen total)	(10 $\mu$ L)
Tiempo de incubación	por 16 h
Temperatura de incubación	a 16°C
(Clonas obtenidas)	(62)

### 3.1.4 Caracterización Enzimática de las Clonas pPIC9bGH.

Se seleccionaron al azar 14 de los DNAs plasmídicos de las minipreparaciones de las clonas obtenidas, se les caracterizó enzimáticamente con *Bgl* II, con el fin de diferenciar las clonas pPIC9hGH22k de las clonas pPIC9bGH (TABLA 9). Debido a que la ligación se realizó con una mezcla de tres fragmentos (uno perteneciente al vector, otro perteneciente al DNAc de *hGH22kDa* y otro perteneciente al DNAc de *bGH*) se esperaba obtener dos tipos de clonas: las portadoras del vector pPIC9hGH22K (tres sitios para *Bgl* II) y las portadoras del vector pPIC9bGH (dos sitios para *Bgl* II).

Al comparar el patrón de digestión teórico de las clonas con el patrón de digestión obtenido, se corroboró la integridad de las clonas y se pudieron diferenciar las portadoras del DNAc de *bGH* de las portadoras del DNAc de *hGH22K* (TABLA 9).

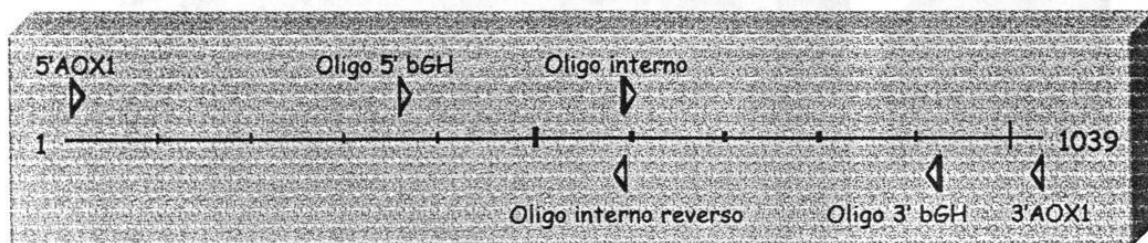
De las 14 clonas caracterizadas (clonas 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 51,52), 6 resultaron portadoras del DNAc de *bGH* (Clonas 9, 14, 16, 20, 51 y 52) y las 8 restantes del DNAc de *hGH22K* (Apéndice B). Un gel representativo de las caracterizaciones realizadas se muestra en la FIGURA 18.



**FIGURA 18.** Caracterización enzimática con *Bgl* II de algunas de las clonas recombinantes obtenidas. Carril 1) pPIC9hGH22K; 2) Clona 9; 3) Clona 10; 4) Clona 12; 5) Clona 14; 6) Clona 15; 7) Clona 20; 8) Clona 21. Con las flechas se indican las clonas con el DNAc de *bGH*.

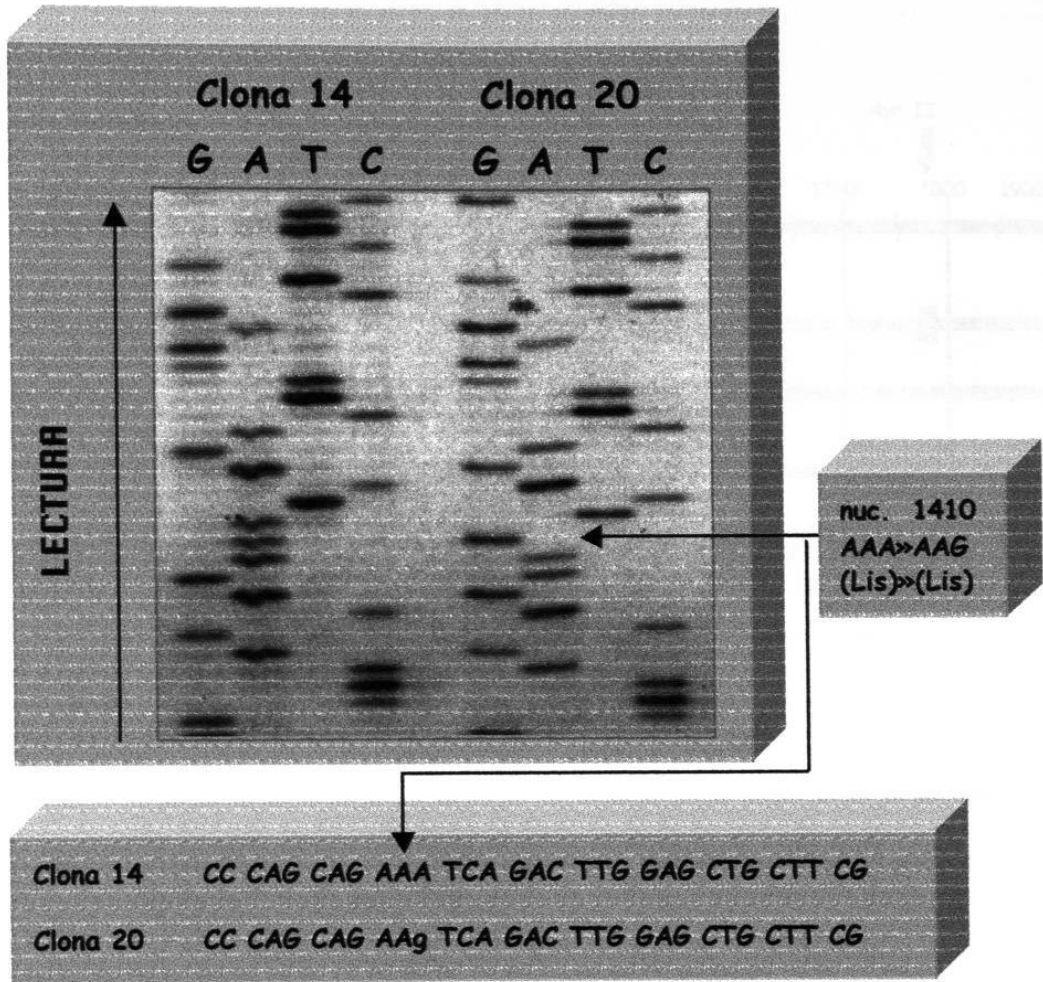
### 3.1.5 Secuenciación de las Clonas.

Se seleccionaron cuatro de las 14 clonas (9, 14, 20 y 51) para determinar su secuencia nucleotídica a partir de los extremos 5' y 3' del *DNAc* de *bGH*, empleando los oligonucleótidos 5' y 3' *AOX1*, los cuales se aparean en las regiones 5' y 3' *AOX1* de los vectores pPIC9 y pPIC9K (FIGURAS 3 y 4, Apéndice B). Para verificar la región interna, se utilizaron unos oligonucleótidos que se aparean dentro del *DNAc* de *bGH* (FIGURA 19).



**FIGURA 19.** Representación del área secuenciada en las clonas, con el uso de los oligonucleótidos 5'AOX1, 3'AOX1, oligo interno y oligo interno reverso. Con cada oligonucleótido usado para secuenciar se lograron leer hasta 300 nucleótidos del *DNAc* de *bGH*, incluida gran parte de los extremos no traducibles 5'AOX1 y 3'AOX1.

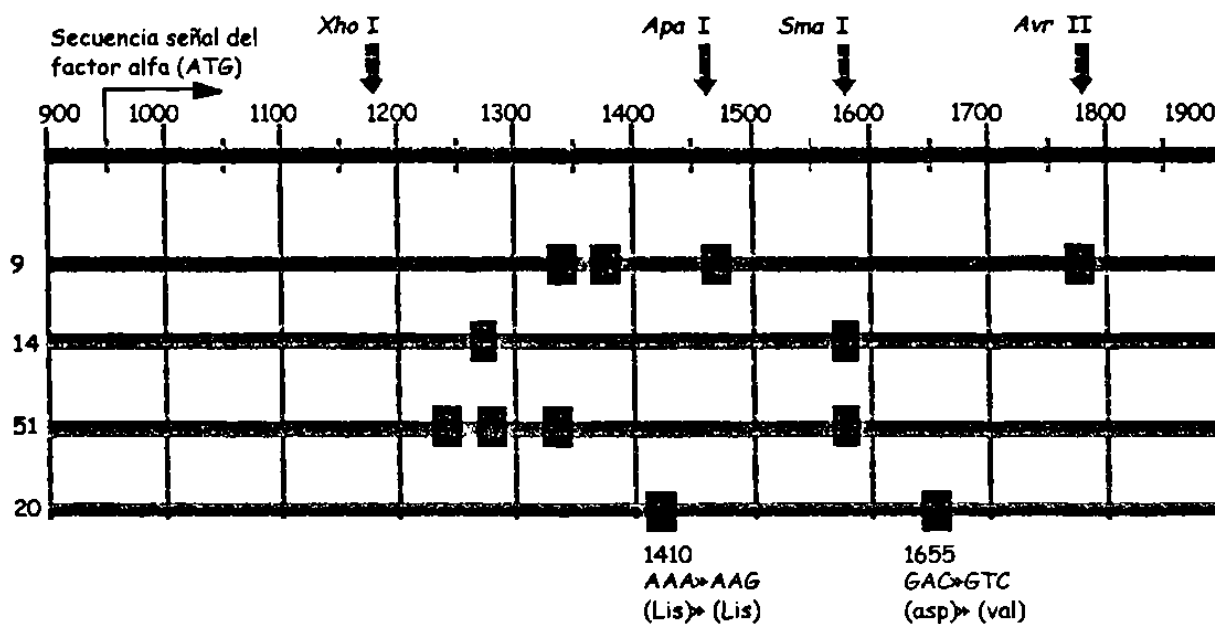
Contrario a lo que se esperaba, se encontraron de 2 a 3 mutaciones al azar por clona (3 mutaciones por cada 541 nucleótidos), las cuales fueron originadas por errores introducidos durante la amplificación por la *DNA polimerasa Taq*. Un ejemplo de las mutaciones encontradas se muestra en la autorradiografía de la FIGURA 20, en donde se comparan dos clonas (clonas 14 y 20). En la clona 20 se encontró una mutación en la región mostrada, la cual es una mutación silenciosa, pues no cambia el aminoácido codificado; la secuencia correcta para esta región la presenta la clona 14.



**FIGURA 20.** Autorradiografía de gel de secuenciación. Se muestra una clona con la secuencia normal en esta región (clona 14) y una con una mutación silenciosa (clona 20).

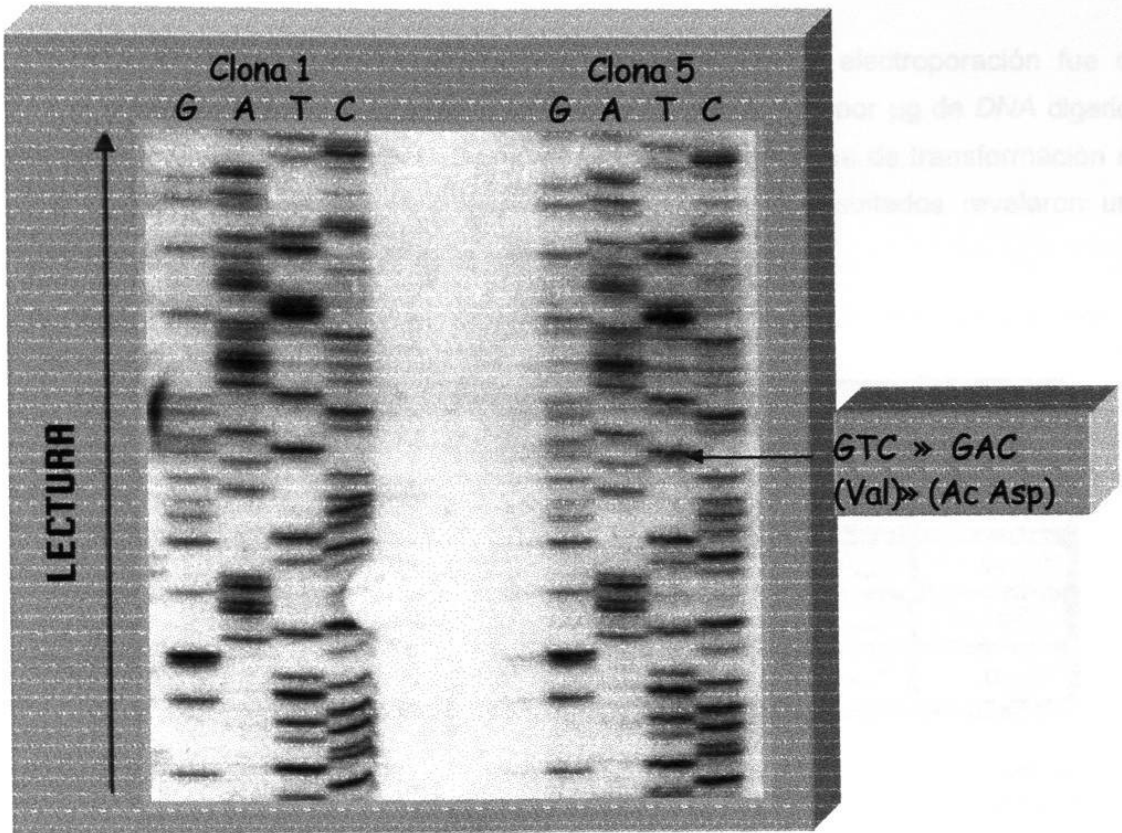
### 3.1.6 Transferencia y Reparación del *DNAc* de *bGH* en pPIC9K.

Comparando las mutaciones detectadas en las clonas, se encontró que ninguna de ellas tenía una secuencia codificante íntegra (es decir sin cambios en los aminoácidos codificados), por lo que se optó por seleccionar una de ellas, para reparar la secuencia errónea (FIGURA 21). La estrategia de reparación elegida consistió en tomar el fragmento desde el extremo 5' de *bGH* hasta el sitio *Apa* I de la clona 20, el fragmento desde el sitio *Apa* I hasta el sitio *Xba* I del vector pMALcbGH (Martínez, 1994) y del sitio *Apa* I a *Avr* II del vector pPIC9K (FIGURA 15).



**FIGURA 21.** Esquema en donde se ubican las mutaciones encontradas en las clonas 9, 14, 51 y 20. Al encontrarse que la clona 20 presenta solo dos mutaciones, una de ellas silenciosa, se planteó reparar el área con la mutación en el nucleótido 1655, y clonar a la vez el *DNAC de bGH* en pPIC9K.

De la transformación con la reacción de ligación (1  $\mu$ l de ligación + 100  $\mu$ l de bacterias FSB) se obtuvieron 9 clonas, de las cuales al caracterizar con *Bgl* II y *Sac* I+*Not* I, se verificó que 4 portaban el *DNAC de bGH*. Se determinó la secuencia nucleotídica de la región reparada en dos de las clonas (clonas pPIC9KbGH #1 y #5), corroborando su correcta codificación (FIGURA 22).



**FIGURA 22.** Autorradiografía de dos clonas reparadas pPIC9kbGH. la porción del gel de secuenciación aquí incluido, muestra la secuencia nucleotídica de dos clonas distintas de pPIC9KbGH en la región reemplazada con la región 3' del *DNAC* de *bGH* proveniente del vector pMALcbGH. La mutación presentada por la clona 20 fue reemplazada por la secuencia que se ilustra en las clonas 1 y 5 (secuencia complementaria).

### 3.2 Segunda Fase.

#### 3.2.1 Transformación de *P. pastoris* con la Técnica de Electroporación.

Después de verificar la secuencia nucleotídica de la clona reparada, se procedió a digerir el *DNA* del vector pPIC9KbGH (clona 1) con las enzimas *Bgl* II y *Sac* I por separado. Se transformó *P. pastoris* con 20 µg de cada digestión, obteniendo 44 clonas con *Bgl* II, y 1018 clonas con *Sac* I. Con esto se determinó que la eficiencia de transformación con *Bgl* II es 23 veces menor a la transformación con *DNA* del vector digerido con *Sac* I; resultados semejantes están reportados en la literatura (Scorer *et al.*, 1994).



La eficiencia de transformación con la técnica de electroporación fue de 50.9 clonas por  $\mu\text{g}$  de *DNA* digerido con *Sac* I, y de 2.2 clonas por  $\mu\text{g}$  de *DNA* digerido con *Bgl* II (FIGURA 23). Con esta técnica se reportan eficiencias de transformación de 1000-10,000 clonas por  $\mu\text{g}$  de *DNA*, por lo que nuestros resultados revelaron una eficiencia de transformación muy baja (FIGURA 23).

Condiciones de electroporación							
	Miliseg	Kv	$\mu\text{F}$	$\Omega$	DNA ( $\mu\text{g}$ )	Cels ( $\mu\text{L}$ )	Clonas obtenidas
9KbGH- <i>Sac</i> I	7.8	1.5	25	400	20	80	1,018
9KbGH- <i>Bgl</i> II	8.0	✓	✓	✓	✓	✓	44
9KhGH- <i>Sac</i> I	7.7	✓	✓	✓	✓	✓	6,284
TE	8.2	✓	✓	✓	—	✓	0

FIGURA 23. Condiciones en las cuales se realizó la electroporación de la cepa GS115. Se incluyeron un control de presencia de contaminación (TE) y tres *DNA*s distintos.

### 3.2.2 Estandarización del *PCR* Semicuantitativo para *Pichia pastoris*.

Se efectuaron experimentos para determinar de modo aproximado las condiciones mas favorables para detectar el cassette de expresión integrado en el genoma de *Pichia*, las condiciones de reacción que se mantuvieron constantes en los ensayos se ilustran en la FIGURA 24. Se modificó el programa de amplificación (*PCR*) previamente ensayado por Escamilla (1996), reduciendo el tiempo de desnaturalización e incrementando el tiempo de extensión y la cantidad de *DNA* polimerasa Taq 2.5 veces (FIGURAS 25 y 26). A su vez, se observó el cociente de las bandas 2,105/1,042 producto de la amplificación, seleccionando el experimento cuyo cociente estuviera más cercano de 1 (usando como punto de referencia a la clona unicopia GS115-pPIC9hGH22K), para poder identificar clonas multicopia.