

CAPITULO 1

1. INTRODUCCION

Hoy en día se ofrecen en el mercado internacional toda una variedad de proteínas fabricadas empleando a la Ingeniería Genética. Estas van desde factores de crecimiento hasta anticoagulantes. La lista de estos productos crece día a día, lo que ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado biofarmacéutico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Escamilla-Treviño, L. ,1996).

En 1976 la nueva Biotecnología llega a ser una realidad, ya que metodologías para clonación del DNA, síntesis de oligonucleótidos y expresión de genes, convergen en un solo experimento, en el cual una proteína de un gen humano es producida en forma recombinante por primera vez. La proteína fue somatostatina, un neurotransmisor de escasos 14 aminoácidos. El gen que codifica para este péptido no fue el natural, sino uno sintetizado químicamente y clonado en un vector para su expresión en *E. coli*. Posterior a este primer logro, el siguiente éxito fue la producción bacteriana de la insulina humana primer producto comercial de la nueva industria biotecnológica.

Esta nueva tecnología ha revolucionado la investigación en la biología y medicina, desarrollándose así una nueva industria enfocada a la clonación y producción de proteínas de importancia tanto para la industria como para la medicina. Ahora las proteínas son producidas mediante la tecnología del DNA recombinante para el tratamiento de numerosas enfermedades, tales como cáncer, alergias, enfermedades autoinmunes, desórdenes neurológicos, infecciones, quemaduras y enfermedades genéticas, así como para otro tipo de

enfoque como es el uso de enzimas en detergentes de lavandería y producción de alimentos (Watson, J. D., 1998).

En la actualidad para lograr producir proteínas recombinantes se dispone de una gran variedad de sistemas de expresión, los cuales emplean sendos hospederos que van desde bacterias hasta células en cultivo de mamíferos o de insectos. La bacteria más empleada para estos fines ha sido *Escherichia coli*, aunque también se han utilizado *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp.*, y otras. Considerando las levaduras, la más empleada ha sido *Saccharomyces cerevisiae*, aunque recientemente se ha incrementado notablemente el empleo de *Pichia pastoris*, gracias a la disponibilidad de un estuche comercial y a una serie de características favorables que posee esta levadura. También han sido empleadas *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha*, *Trichoderma reesei*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus nidulans*, etc. Por lo que respecta a las células de mamífero en cultivo, también existe una gran variedad de líneas celulares empleadas para estos fines (Escamilla-Treviño, L. ,1996).

Una expresión eficiente de proteínas heterólogas no siempre es fácil de conseguir, por lo que se requiere tanto de un vector como de un sistema de expresión adecuados (Marta Izquierdo, 1993).

1.1 *Pichia pastoris*: un nuevo hospedero biotecnológico

Durante la época de los noventas se desarrollaron herramientas eficientes para convertir a la levadura *P. pastoris* en un sistema de producción de proteínas recombinantes. En la Tabla I se citan algunas de las ventajas y desventajas de *P. pastoris* como hospedero biotecnológico (Fernández-Hoeffler, 1999).

Tabla I.-Ventajas y desventajas del sistema de expresión de *P. pastoris*

Ventajas:	Desventajas:
<p>Cultivo Crecimiento rápido Alta densidad celular:> 100g /litro Medios simples compuestos de sales, biotina, y una fuente de carbono. Fácil escalamiento a volúmenes grandes, cultivos en fermentadores con alta densidad celular</p> <p>Genética Métodos de Genética Clásica disponibles Métodos Moleculares similares a <i>S. cerevisiae</i> Integración estable de los vectores de expresión</p> <p>Promotores AOX1p- Promotor fuerte, regulado de forma precisa y fácilmente regulado GAPp- Promotor fuerte y de expresión constitutiva</p> <p>Expresión Medio ambiente eucariótico que ayuda al plegamiento de proteínas heterólogas de eucariotes superiores Altos niveles de expresión</p> <p>Secreción Modificaciones postraduccionales adecuadas Formación de enlaces sulfhidrilo Procesamiento de secuencia señal Plegamiento adecuado</p> <p>Glicosilación Altos niveles de expresión (g/l) en cultivos de fermentadores Pocas proteínas en el medio y por ende alta pureza inicial de la proteína heteróloga</p>	<p>Frecuentemente se necesitan cultivos en fermentadores para producir altas cantidades de la proteína heteróloga</p> <p>Disponibilidad limitada de vectores</p> <p>Modificaciones postraduccionales inapropiadas</p> <p>Las señales nativas no siempre son procesadas Algunas proteínas son plegadas incorrectamente, afectando su secreción</p> <p>Glicosilación es del tipo de los eucariotes inferiores (alto contenido de manosa) Proteasas en el medio que degradan proteínas, incluyendo la de interés</p>

Fernández y Hoeffler, 1999.

Al ser *Pichia pastoris* un microorganismo eucariote, posee muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de eucariotes superiores, tales como procesamiento y plegamiento de proteínas, modificaciones postraduccionales, además de ser tan fácil de manipular como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. El sistema que emplea a *Pichia pastoris* como hospedero es más sencillo y menos costoso que otros sistemas de expresión basados en eucariotes superiores, y con el se obtienen generalmente niveles de expresión mayores que en estos últimos, alcanzando densidades celulares de hasta ~100 g /L de peso seco (Siegel y Brierley, 1989). Como levadura, *P. pastoris* comparte las ventajas de manipulación genéticas y moleculares con *S. cerevisiae*, pero además posee la ventaja de alcanzar niveles de producción 10 a 100 veces mayores de proteínas heterólogas que esta última (Invitrogen, 1994).

Pichia pastoris pertenece a la familia de los ascomicetos y su característica fundamental resulta ser su habilidad para utilizar el metanol como fuente de carbono y energía, por lo que se le denomina metilotrófica. La ruta metabólica para la conversión del metanol a bióxido de carbono y agua involucra a las enzimas alcohol oxidasa (AOX), catalasa, formaldehído deshidrogenasa, S-formil-glutatió hidrolasa y formato deshidrogenasa (Ellis, 1985). 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, produciendo peróxido de hidrógeno (Figura 1). La AOX tiene poca afinidad por el O₂, lo cual es compensado con la síntesis de grandes cantidades de la enzima, llegando a representar el 35% de la proteína total celular (Invitrogen, 1994).

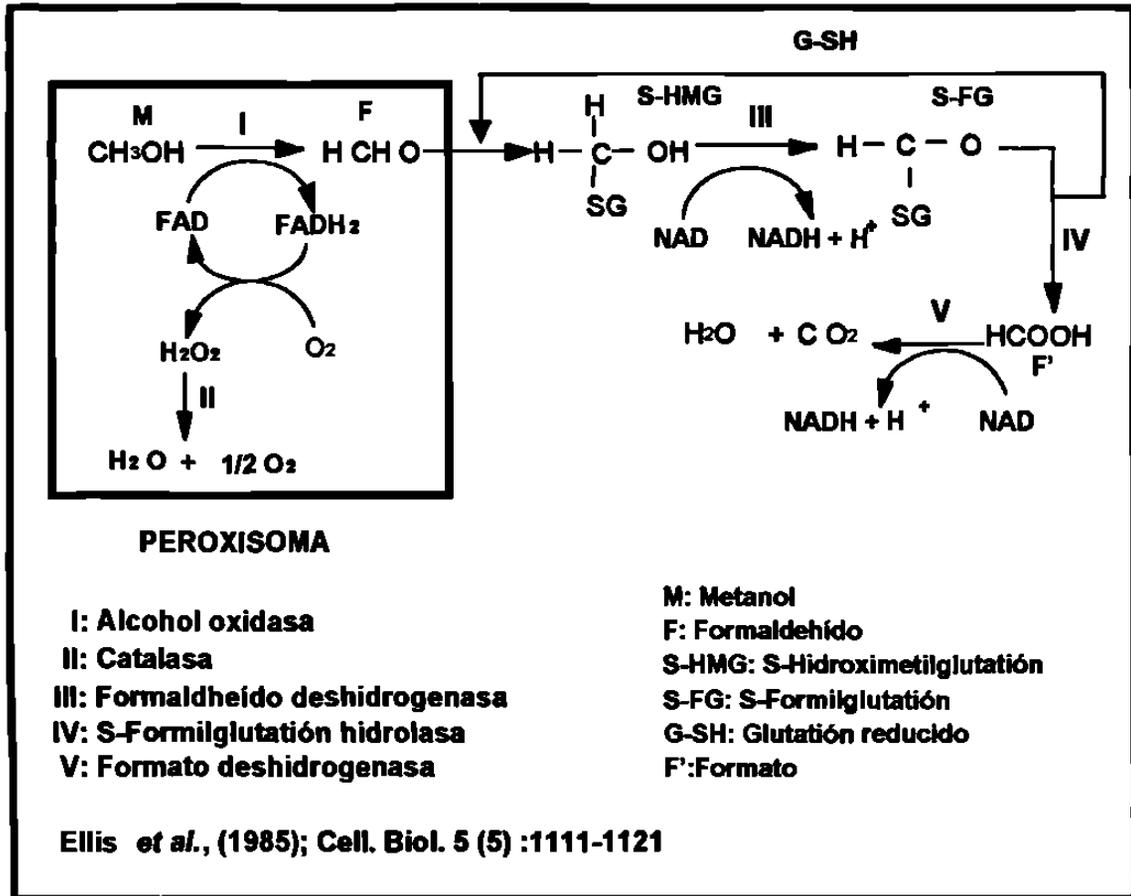


Figura 1.- Vía metabólica para la oxidación del metanol en levaduras. Las enzimas participantes están representadas por números Romanos y sus productos mediante abreviaciones.

La expresión del gen que codifica la enzima está regulada de modo que es reprimida en presencia de otras fuentes de carbono que no sean el metanol, (sea etanol, glicerol, o glucosa), pero es estimulada por éste (Buckholz y Gleeson, 1991), lo que permite que el empleo del promotor de dicho gen confiera un control fino de la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* (Cregg et al., 1993).

Existen dos genes en *P. pastoris* que codifican para la AOX, los genes *AOX1* y *AOX2*. 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 tanto, la enzima

que es responsable de casi toda la degradación del metanol es la codificada por el gen *AOX1* (Cregg *et al.*, 1993).

Otra ventaja que ofrece *P. pastoris* es el hecho que al crecer en medios minerales simples y secretar bajas cantidades de proteínas endógenas, la proteína heteróloga puede ser secretada al medio de cultivo para encontrarse relativamente pura (>50% de la proteína extracelular total).

1.1.1 Vectores de expresión para *Pichia pastoris*

Debido a que *P. pastoris* no posee plásmidos nativos, se han desarrollado varios vectores de expresión, los cuales se integran en el *locus* genómico *AOX1* o *His4* por recombinación homóloga, generando cepas genéticamente estables. Todos los vectores de expresión para *P. pastoris* están diseñados para transformar tanto a *E. coli* como a *P. Pastoris* (son vectores transformadores). Para propagarse en *E. coli*, los plásmidos contienen un origen de replicación y un gen de selección que confiere resistencia a ampicilina. Para *P. pastoris*, como marcador de selección, la mayoría de los vectores contienen el gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*), el cual es utilizado en combinación con cepas hospederas de *P. Pastoris* auxotrófas para histidina a causa de defectos en el gen *his4* (Cregg *et al.*, 1985).

Para la expresión de los genes heterólogos, los vectores contienen un cassette de expresión compuesto por una región de DNA de aproximadamente 0.9 kb el cual contiene la secuencia 5' (promotor) del gen *AOX1* (*AOX1p*) y un fragmento de aproximadamente 0.3 kb que contiene la secuencia 3' del gen (terminador de la transcripción o *tt*) (Koutz *et al.*, 1989). Los fragmentos del promotor y terminador están separados por uno o más sitios únicos de

clonación. Además, para la secreción de las proteínas heterólogas, los vectores cuentan con secuencias codificantes para las señales de secreción como la del factor α -MF pre-pro de *S. cerevisiae* o bien la de la fosfatasa ácida de *P. pastoris*. Ambas se han utilizado fusionándolas de forma adecuada a *AOX1p*. La Figura 2 muestra una representación gráfica del vector pPIC9K.

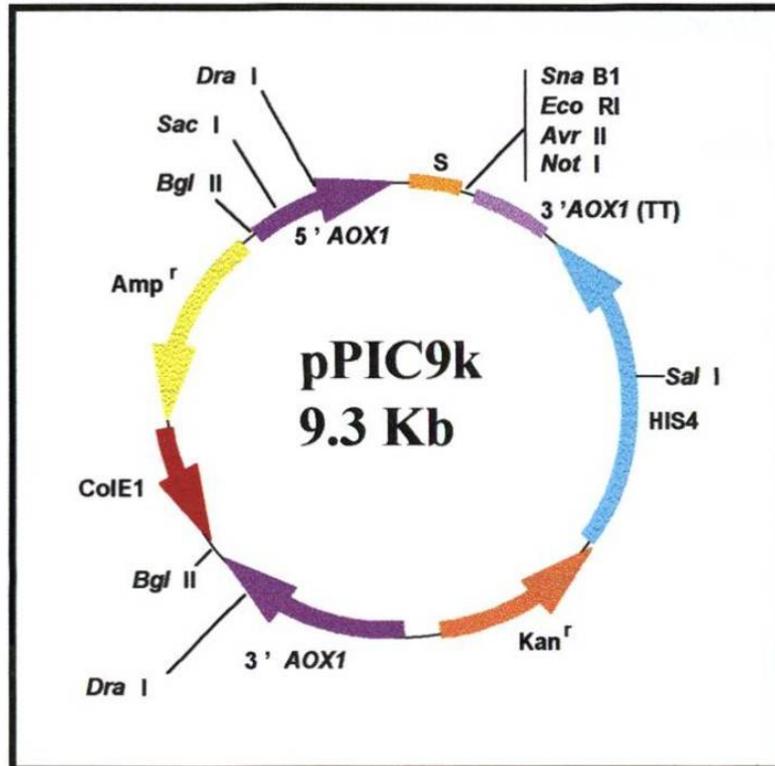


Figura 2.- El plásmido pPIC9K como vector modelo para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Se representan en forma esquemática las diferentes regiones que componen el plásmido: Promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5' *AOX1* y 3' *AOX1* y TT, respectivamente), región 3' del mismo gen (3' *AOX1*), gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) de *P. pastoris*, la secuencia señal (S). También contiene secuencias necesarias para propagación del plásmido en *Escherichia coli*, tales como el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación (ColE1), además de un sitio de policlonación precedido de la secuencia señal.

Se cuenta también con vectores de expresión que poseen como promotor alternativo (Waterham *et al.*, 1997; Invitrogen, Carlsbad, CA); al *GAPp*, un promotor fuerte constitutivo derivado del gen de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAP*). En cultivos suplementados con glucosa, los

niveles de expresión obtenidos con *GAPp* son similares a aquellos observados con *AOX1p* en cultivos crecidos con metanol. Una ventaja de *GAPp* sobre *AOX1p* es que, debido a que es constitutivo, no es necesario cambiar el cultivo de un medio a otro para inducir la expresión. Sin embargo, el uso de *GAPp* es apropiado solo para genes cuyos productos no sean tóxicos para la célula. Además, los niveles de expresión de *AOX1p* son frecuentemente incrementados en cultivos con condiciones limitantes de crecimiento alimentados con metanol. Un fenómeno similar no es observado con *GAPp*

Además se ha desarrollado toda una familia de vectores para *P. pastoris* que contienen el gen *Sh ble*, el cual confiere resistencia a la droga llamada Zeocina (Higgins *et al.*, 1998). En estos vectores, el gen *Sh ble* o *Zeo* es el marcador de selección tanto para *E. coli* como para *P. pastoris*, contribuyendo a reducir el tamaño de dichos vectores.

1.1. 2 Integración del vector al genoma de *Pichia pastoris*

Para mantener la estabilidad de la expresión de las cepas, los vectores de expresión de *Pichia* son integrados al genoma de la célula hospedera mediante recombinación homóloga. El modo más común de inserción es linearizar los vectores antes de la transformación, utilizando uno de los diferentes sitios de restricción únicos localizados dentro de las secuencias para *HIS4* o *5'AOX1p*. El DNA linear estimula los eventos de recombinación homóloga entre el DNA transformante y las regiones de homología dentro del genoma de la levadura, dando como resultado un tipo de entrecruzamiento simple (integración). La integración dentro de este *locus* se lleva a cabo con una alta frecuencia (50–80% de transformantes His⁺) (Figura 3A). Sin embargo, una alta proporción de las células transformadas no integran el vector, sino que

parecen sufrir un evento de conversión del gen, en el cual sólo el gen *HIS4* del vector es integrado dentro del locus mutado *his4*, por lo que no expresan el gen heterólogo y representan un evento de conversión génica (Fernández y Hoeffler, 1999).

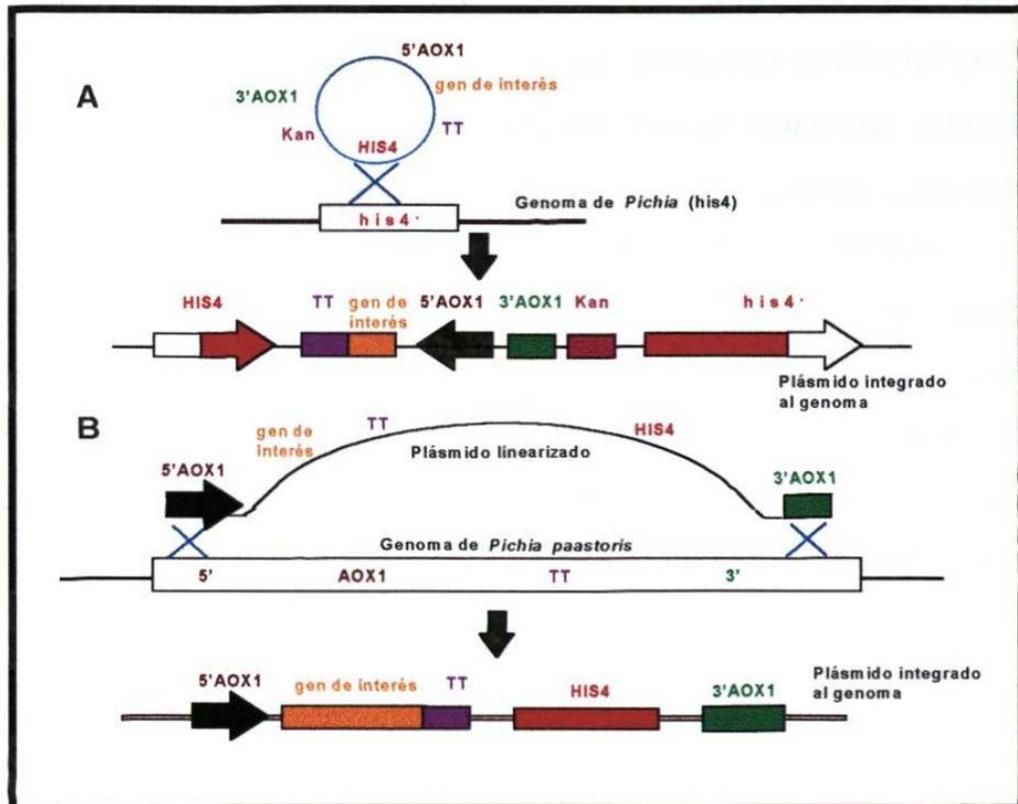


Figura 3.- Integración del vector de expresión dentro del genoma de *P. pastoris*. (A) Integración génica del cassette de expresión en el locus *his4*⁻; (B) Reemplazamiento del cassette de expresión vía un evento de recombinación doble.

En la estrategia de integración, se cuenta con vectores de expresión para *P. pastoris* que portan un fragmento adicional derivado de la secuencia 3' del gen *AOX1* (Cregg *et al.*, 1987). Estos vectores pueden ser cortados con una enzima de restricción seleccionada que libere al cassette de expresión (por ejemplo, desde el fragmento que contiene el promotor, pasando por el gen heterólogo, y hasta la secuencia del terminador) y al gen *HIS4* en un mismo

fragmento de DNA que está flanqueado por las secuencias *AOX1* 5'y 3' terminal. Los tipos de mutantes que se pueden obtener son dos :

a) **Mut^S**: Son aquellas que sufrieron delección en el gen *AOX1*, y que por lo tanto crecen lentamente en metanol (**Mut^S**: "*Metanol utilization slow*"), al depender de la enzima codificada por el gen *AOX2* para degradar éste. Aproximadamente del 10-20% de los eventos de transformación His⁺ con estos vectores, son la consecuencia de un evento de reemplazamiento del gen en el cual el gen *AOX1* es suprimido y reemplazado por la expresión del cassette y el gen *HIS4* (Figura 3B). Las cepas resultantes por lo tanto son forzadas a contar con la débil transcripción del gen *AOX2* para crecer en metanol y, como resultado, metabolizan el metanol a una velocidad reducida. Las cepas con reemplazamiento de este gen se identifican fácilmente de aquellas colonias transformadas His⁺ mediante su réplica en placa con metanol y selección de aquellas que tienen una capacidad reducida de crecer sobre metanol (fenotipo **Mut^S**). Una ventaja potencial de las cepas **Mut^S** es que en algunos de los casos los niveles de expresión de la proteína heteróloga son mayores que en el caso de cepas silvestres (**Mut⁺**), especialmente si se utilizan cultivos a nivel de matraz (Cregg *et al.*, 1987).

b) **Mut⁺**: Este otro tipo de mutantes es el que conserva el gen *AOX1* genómico intacto (Figura 4) y por lo tanto emplean eficazmente el metanol como única fuente de carbono, al igual que una cepa silvestre de *Pichia pastoris* (**Mut⁺**) (Invitrogen, 1994).

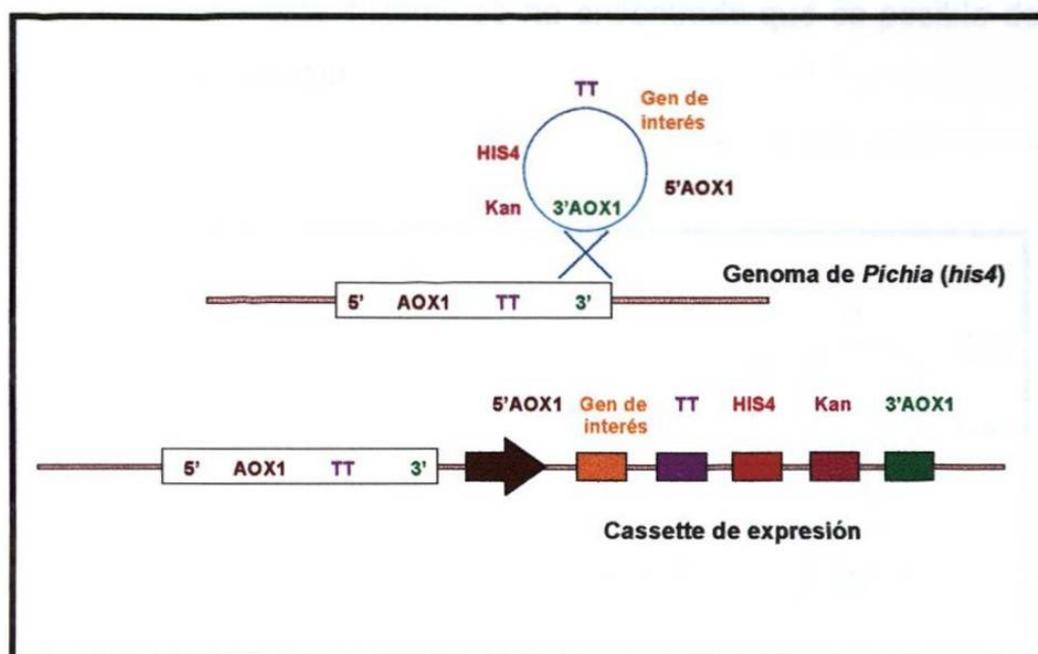


Figura 4.- Inserción génica del cassette de expresión en el locus AOX1. Los eventos de inserción génica en el locus AOX1 surgen de un evento de entrecruzamiento simple entre el locus AOX1 en el cromosoma y alguna de las tres regiones AOX1 en el vector (5', 3' o TT). El resultado es la inserción de una o más copias del vector, mientras que el gen AOX1 nativo queda intacto (Mut⁺).

Los eventos de entrecruzamiento simple (inserciones) tienen mayor probabilidad de ocurrir que los eventos de entrecruzamiento doble (reemplazamiento). Eventos múltiples de inserción ocurren espontáneamente en cerca del 1 al 10% de los transformantes y son mucho más frecuentes que dos eventos independientes de entrecruzamiento simple (Invitrogen, 1994).

Se ha encontrado que del 5 al 10% de las transformantes presentan integraciones múltiples del cassette de expresión de la proteína recombinante. Para la selección de estas cepas multicopias se ha desarrollado un sistema que utiliza un plásmido transformante portando el gen Tn903 kan^r que confiere resistencia a G418 (Scorer *et al.*, 1994).

Las transformantes son propagadas en placas de agar conteniendo cantidades crecientes de G418. El nivel de resistencia de las cepas a G418

está en relación al número de copias del plásmido integradas en el genoma (Figura 5). Mediante este sistema se ha encontrado que es posible detectar hasta 30 copias por genoma.

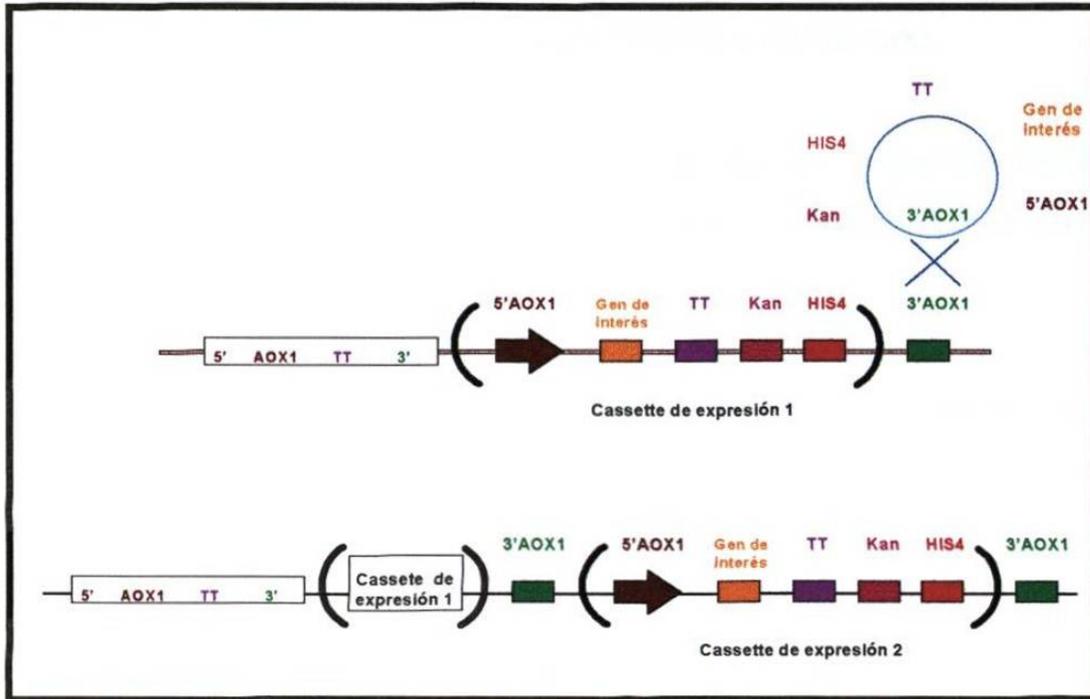


Figura No 5.- Múltiples eventos de inserción génica. Estos pueden ocurrir espontáneamente con baja frecuencia, que va desde el 1 al 10% de los transformantes His⁺. Los eventos de múltiples-copias pueden ocurrir como inserciones, ya sea en el locus AOX1 o en el his4.

1.1.3 Producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*

P. pastoris es una levadura de las más empleadas actualmente como hospedero para la expresión de genes recombinantes. Sólo de 1987 a 1998 se publicaron más de 300 artículos relacionados con *P. pastoris*, de los cuales alrededor del 70% tienen que ver con la producción de alguna proteína heteróloga (Escamilla-Treviño *et al.*, 1999).

Con el sistema de expresión génica de *P. pastoris* se han logrado producir proteínas heterólogas de forma intracelular, de secreción hacia el medio de cultivo, y como proteínas de membrana. En 1999 Fernández y Hoffler reportan un compendio de 73 proteína heterólogas, donde dichas proteínas provienen de la expresión de genes tanto de bacterias, hongos, plantas, invertebrados, mamíferos (diferentes al humano) y de humano.

En la Tabla II se muestran algunas de las proteínas heterólogas producidas en *P. pastoris* y los niveles de producción alcanzados (Escamilla-Treviño *et al.*, 1999).

Tabla II.- Niveles de producción de proteínas recombinantes sintetizadas en *P. pastoris* a nivel fermentador

Proteína	NC	I/S	Rend. (g/L)	Referencia
HBsAg	1	I	0.4	Cregg <i>et al.</i> , (1987)
F. de Necrosis Tumoral	>20	I	8.0	Sreekrishna <i>et al.</i> , (1989)
Lisozima Bovina c2	1	S	0.58	Digan <i>et al.</i> , (1989)
Frag. C Toxina tetánica	14	I	12.0	Clare <i>et al.</i> , (1991a)
Albúmina Humana	1	S	4.0	Barr <i>et al.</i> , (1992)
P. Anticoag. (TAP)	1	S	1.7	Loewen <i>et al.</i> , (1997)
P. Anticoag. de pez	II	S	0.04	Laroche <i>et al.</i> , (1994)
Peractina (P69)	>10	I	3.0	Romanos <i>et al.</i> , (1991)
Interleucina Humana-2	II	I	4.0	Cregg <i>et al.</i> , (1993)
Interleucina Humana-2	II	S	1.0	Cregg <i>et al.</i> , (1993)
EGF de Humano	M	S	0.5	Siegel <i>et al.</i> , (1990)
Invertasa	1	S	2.5	Tschopp <i>et al.</i> , (1987b)
Ligando trimérico CD40	1	I	0.26	McGrew <i>et al.</i> , (1997)
Estreptoquinasa	II	I	0.08	Hagenson <i>et al.</i> , (1989)
Superóxido dismutasa	1	I	0.33	Sreekrishna <i>et al.</i> , (1996)
Superóxido dismutasa	2	I	0.74	Sreekrishna <i>et al.</i> , (1996)
Aprotinina	1	S	0.14	Vedvick <i>et al.</i> , (1991)
Aprotinina	2	S	0.32	Vedvick <i>et al.</i> , (1991)
Aprotinina	5	S	0.93	Vedvick <i>et al.</i> , (1991)
Horm. crecim. salmón	18	I	0.30	Sreekrishna <i>et al.</i> , (1996)
Antígeno BM86	II	S	1.5	Rodríguez <i>et al.</i> , (1994)

NC: Número de copias del cassette de expresión
I/S Producto intracelular o secretado
Rend.: Rendimiento
II: Número de copias indeterminado
M: Número de copias múltiple, mas no determinado
Escamilla-Treviño *et al.*, (1999).

1.1.4 Fermentación

Las fermentaciones con cepas recombinantes de *P. pastoris* se llevan a cabo en dos fases (Figura 6): En la primera fase se busca el aumento de masa celular empleando un medio de cultivo mínimo, pero suplementado con glicerol o glucosa como fuente única de carbono y energía. En esta etapa se encuentra reprimida la producción de la proteína recombinante debido a que el promotor que dirige la síntesis se encuentra apagado. En la segunda fase, se activa el promotor de *AOX1*, al reemplazar la fuente de carbono y energía por el metanol. En esta etapa se produce la proteína recombinante, (Invitrogen, 1994).

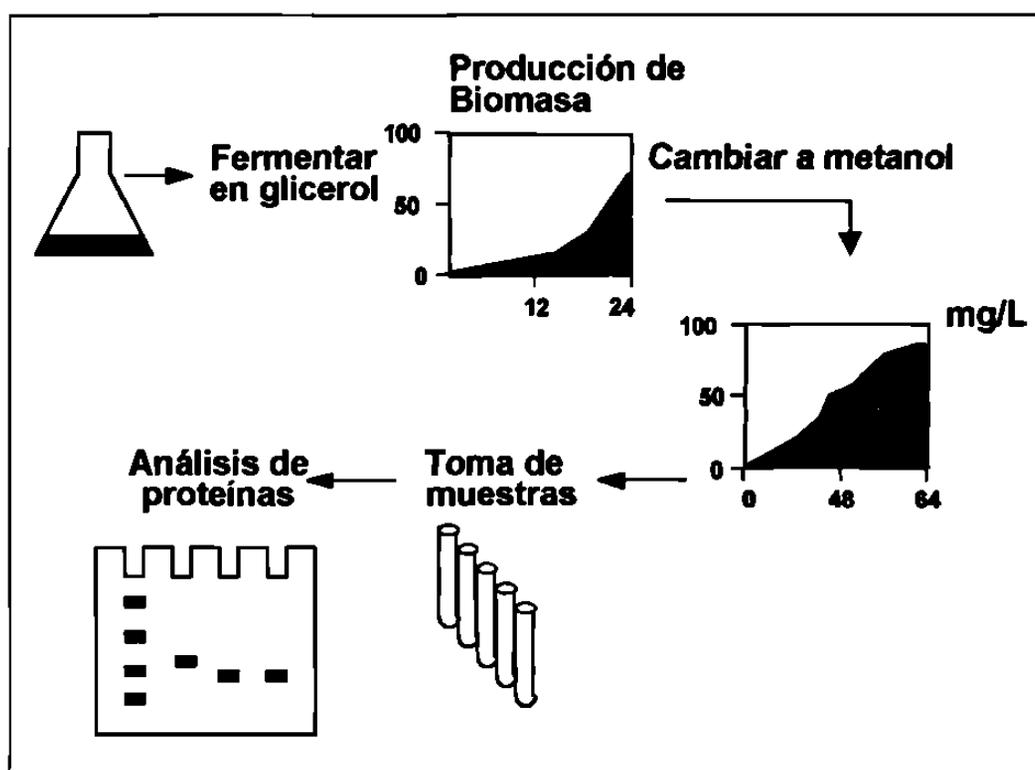


Figura 6.- Etapas de la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Se muestra en un inicio el aumento de la masa celular y posteriormente la inducción mediante metanol de la proteína de interés, así como el análisis de muestras.

1.2 Hormona del crecimiento humano de 20kDa

Las primeras observaciones de la existencia de la isoforma de 20 kilodaltons de la hormona del crecimiento humano (HGH 20K), fueron hechas a mediados de la década de los 70s (Singh, Seavey y Lewis, 1974) y luego confirmadas por diferentes estudios (Lewis *et al.*, 1978; Lewis *et al.*, 1980; Chapman *et al.*, 1981; DeNoto *et al.*, 1981).

La HGH 20K es la segunda hormona más abundante en la pituitaria, posee una cadena sencilla de 176 aminoácidos, con un peso molecular de 20,269, un $pI=5.5$ y dos enlaces disulfuro, los mismos que ocurren en la isoforma de HGH de 22K (Bauman, 1991).

Los estudios moleculares demostraron que la HGH 20K no es el resultado de la ruptura proteolítica de alguna de las porciones terminales de la cadena de HGH 22K y tampoco se encontró un gen adicional que codificara para ésta y que pudiera explicar su existencia (Kostyo, 1987; Wallis, 1980). Lo que se descubrió, fue que la HGH 20K es una isoforma natural de HGH que resulta de una vía alternativa de maduración del transcrito primario del gen hGH-N, misma que conduce a la generación de un RNAm carente de los codones correspondientes a los residuos 32 y 46 de la HGH 22K (De Noto *et al.*, 1981). En la glándula pituitaria del 5 al 10% de la producción de HGH corresponde a esta isoforma.

La HGH 20K, al igual que la isoforma de 22K, se sintetiza como una prehormona de 202 aminoácidos con un péptido señal de 26 residuos hidrofóbicos en el extremo amino terminal de la proteína madura. Su estructura terciaria aún no ha sido determinada, ya que es muy propensa a formar homodímeros y heterodímeros con HGH 22K (Lewis *et al.*, 1978; Chapman *et*

al., 1981). La HGH 20K fue primero aislada a partir de una fracción dimérica (Lewis *et al.*, 1978) y se demostró que consistía de cuatro variantes moleculares (Brostedt, 1988). Se desconoce si estas variantes son productos nativos o son generados por los procesos de extracción. HGH 20K se encuentra evolutivamente conservada, habiéndosele ya descrito en otras especies (Sinha, 1984; Howaland *et al.*, 1987; Sinha, 1987).

1.2.1 Actividad biológica y propiedades terapéuticas

Aunque las propiedades biológicas de la HGH 20K han sido investigadas desde su descubrimiento en 1978, éstas son distintas a las reportadas para la HGH de 22K y controversiales. Esto es debido a la dificultad para preparar cantidades suficientes de HGH de 20K purificada y con su estructura auténtica (Uchida *et al.*, 1997).

Lewis y cols., mencionan que la HGH de 20K tiene una actividad similar de promover el crecimiento a la de HGH 22K (Lewis *et al.*, 1978). Frigeri y cols. describen que HGH 20K carece de actividad parecida a insulina (Frigeri *et al.*, 1979). Aunque otros autores describieron que tanto la forma recombinante como la natural poseen un efecto metabólico parecido a insulina marcadamente disminuido (Goodman *et al.*, 1986; Kostyo *et al.*, 1985).

En un intento por probar el efecto insulino-agonista, se han comparado las formas metionil de las dos hormonas de 20 y 22K, sin encontrar diferencias en las respuestas (Tinsley *et al.*, 1986; Ader *et al.*, 1987). Más tarde Ohmae y cols. las utilizaron para probar la actividad promotora del crecimiento, encontrando el 10.7% y 93.5% de actividad para HGH 20 y 22K,

respectivamente, con respecto a la hormona derivada de hipófisis (Ohmae *et al.*, 1989).

En estudios hechos con ratas hipofisectomizadas se ha encontrado que las dos formas de HGH (20 y 22K) tienen potencia similar para promover el crecimiento y generar somatomedinas (Chawla *et al.*, 1983; Kostyo *et al.*, 1985). Pero se les han encontrado efectos diferentes sobre el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos libres, tanto "*in vitro*" como "*in vivo*" (Kostyo *et al.*, 1985; Culler *et al.*, 1987; Campbell *et al.*, 1990).

En contraste con la 22K, la isoforma de 20K no acelera el empleo de glucosa y tiene actividad marcadamente disminuída, aunque no ausente, en sus efectos lipogénico e hiperglicemiante. La capacidad de HGH para aumentar la secreción de insulina y el consecuente aumento en la captación de glucosa por las células, reside principalmente en los residuos aminoacídicos 32 al 38, lo que puede explicar la disminución de este efecto en HGH 20K (Ortíz-López, 1992).

Se ha determinado que la secuencia Tyr-Ile-Pro presente en la región removida en la variante, está presente en la insulina y se piensa que ésta podría ser la responsable de este efecto. Sin embargo, aun no está claro si GH tiene este efecto insulino-agonista *per se* o si tiene un efecto potenciador sobre la insulina (Phillips III y Vnencak-Jones, 1989).

El glutamato, normalmente presente en la posición 33 de HGH 22K es el principal residuo responsable de la unión de esta hormona con algunos receptores hepáticos, en un proceso mediado por calcio. La ausencia de este residuo en la HGH 20K altera la alta dependencia del ion calcio en la unión de HGH 20K con dichos receptores y estos hallazgos son consistentes con el bajo efecto insulino-agonista de HGH 20K (Phillips III y Vnencak-Jones, 1989).

En un modelo que utiliza la conversión de fibroblastos preadipocíticos a adipocitos, Morikawa y cols. (1984) encontraron que HGH 20K es capaz de inducir el fenómeno de diferenciación adipocítica, proporcionando a esta variante una actividad adipogénica.

1.2.2 Síntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGH 20 y 22K)

Las limitaciones que se han presentado para el estudio de HGH 20K radican principalmente en su obtención en forma abundante, pura y activa. Una alternativa para superar estos problemas fue la producción de esta variante mediante la tecnología del DNA recombinante para evitar la heterogeneidad e incrementar las cantidades disponibles. La producción de HGH recombinante (HGHr) ha sido reportada principalmente en *E. coli* (Barrera-Saldaña, 1998) y de forma particular para HGH 22K, no siendo así para HGH 20K, ya que son pocos los reportes que se tienen acerca de ésta. Adelman y cols. (1983) y posteriormente otros grupos (Tinsley *et al.*, 1986; Ader *et al.*, 1987) obtuvieron biosintéticamente en bacterias la forma recombinante metionil-HGH 20K, lo cual trajo como consecuencia el estudio de esta hormona, utilizando la forma recombinante en lugar de la natural obtenida de la hipófisis. La isoforma HGH 20K recombinante también ha sido utilizada para analizar algunas de sus actividades biológicas (Kostyo *et al.*, 1985; Mc Carter *et al.*, 1990), pero aún persisten controversias sobre las mismas.

La producción de met-HGHr 20K fue una alternativa muy útil para evitar los problemas de contaminación y escasez antes mencionados, sin embargo, la molécula producida en bacterias tiene un residuo metionil extra en el extremo amino y existen varios informes en la literatura que indican que aparentemente

este residuo puede eventualmente ocasionar rechazo inmune con el uso prolongado de la hormona (Tinssley *et al.*, 1986; Ohmae *et al.*, 1989).

La HGHr también ha sido producida en *S. cerevisiae* por Tokunaga y cols., quienes en 1985 reportaron la expresión de un gen sintético para HGH y pre-HGH bajo el control del represor del promotor de la fosfatasa ácida. Los genes fueron expresados con una producción de 2.5 a 8.5 mg/L, a pesar de haber sido contruidos con un uso preferencial de los codones de *E. coli* (Tokunaga *et al.*, 1985).

Otro sistema de hospedero utilizado para expresar HGH es el que emplea *Bacillus subtilis*. En 1991, Franchi y cols. reportan una producción de HGH hacia el medio de cultivo de *Bacillus subtilis* de 35 mg/L.

En 1990 Rincón-Limas logró la clonación de los DNAs codificantes de la HGH de 22K como de la variante de 20K (Rincón-Limas, 1990). Posteriormente, en 1992, Ortíz-López logra por primera vez la obtención de una línea celular eucariótica productora de HGH 20K (Ortíz-López, 1992).

En 1993, Rincón-Limas y cols. transfectaron células COS-7 con minigenes expresores de ambas isoformas (Rincón-Limas *et al.*, 1993). Los niveles secretados de HGH de 20K en el medio de estas células resultaron mucho más bajos en comparación con los de HGH de 22K. Los valores secretados de HGH de 22K fueron en promedio de 1259 ng en una placa de 60 mm de células COS-7, mientras que los de HGH 20K fueron 41 ng. Esta diferencia se explicó en parte por la diferencia de los sistemas de inmunodetección empleado en la cuantificación, mismo que era específico para la isoforma 22K.

Escamilla-Treviño en 1996 (cepa unicopia) y mas tarde Sanchez-Domínguez en 1998 (cepa multicopia) logran la construcción de cepas

productoras de HGH 22K utilizando como hospedero a *Pichia pastoris*. En este sistema de expresión se obtuvieron valores de producción de 12.3 mg/L y 32.18 mg/L (cepa unicopia y cepa multicopia respectivamente).

Recientemente H. Uchida y cols., utilizando el gen de la proteasa neutra de *Bacillus amyloliquefaciens* (npr), construyó un sistema de secreción de HGH 20K en *E. coli*, logrando una producción de 28.2 mg/L de HGH 20K secretada. En este sistema se encontró que la co-expresión de glutatión reductasa notablemente incrementaba la acumulación de los niveles de HGH 20K en periplasma (76.1 mg/L) y se confirmó que la HGH 20K secretada fué correctamente procesada (Uchida *et al.*, 1997)

Recientemente Kerr y cols. (1998) reportan la generación de un ratón transgénico el cual expresa HGH en el epitelio de vejiga, dando como resultado la secreción en orina de HGH a niveles de 100-500 ng/ml. Los niveles de concentración de HGH en orina permanecen constantes durante más de 8 meses. Mencionan además, que debido a que la orina posee pocas proteínas y lípidos, el utilizarla como material de partida facilita la purificación de la proteína recombinante.

1.2.3 Potencial farmacológico de HGH 20K y perspectivas para su producción

En el campo farmacológico, HGH 22K ha demostrado ser útil para el tratamiento de niños con enanismo hipofisario (Phillips III y Vnencak-Jones, 1989), en ancianos parece contrarrestar algunos de los efectos de la vejez, en pacientes con quemaduras de piel, úlceras y fracturas óseas, acelera el metabolismo y la regeneración tisular, en personas que sufren hipoglicemia su

actividad hiperglicemiante se ha aprovechado (Birnbaum y Goodman, 1976), y entre los atletas ha despertado gran interés por su potencial anabólico (Takano, 1983).

Sin embargo, se ha reportado que el tratamiento prolongados con HGH 22K puede desencadenar diabetes mellitus, hipertensión arterial y/o aterosclerosis, como consecuencia de la actividad diabetogénica y lipogénica de esta hormona. Por lo que se ha contemplado utilizar a la variante de 20K como alternativa para el tratamiento, con la finalidad de disminuir los efectos secundarios mencionados, ya que algunos autores manifiestan la carencia del efecto diabetogénico en esta variante (Culler *et al.*, 1987; Campbell *et al.*, 1990).

1.3 Justificación

Para examinar la actividad biológica de la forma nativa de HGH 20K, es esencial construir un sistema eficiente de producción con su estructura auténtica. Con ello se aportaría una fuente apropiada para la purificación de la hormona en cantidades suficientes para realizar estudios fisiológicos y farmacológicos que contribuyan al conocimiento de su función.

CAPITULO 2

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Construir clonas de *Pichia pastoris* sobreproductoras de la isoforma de HGH 20K.

2.1.1 Objetivos particulares

1. Construir un vector plasmídico de integración para *P. pastoris* portador del cassette de expresión del DNAc de la hGH de 20K.
2. Integrar de forma sitio dirigida el vector recombinante construido, en el genoma de *P. pastoris*
3. Verificar la integración y caracterizar las clonas recombinantes obtenidas.
4. Seleccionar las clonas que integraron múltiples copias del cassette de expresión.
5. Caracterizar el producto recombinante.
6. Seleccionar la cepa sobreproductora de HGH de 20K

CAPITULO 3

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Area 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 fueron adquiridas de New England Biolabs (NEB, Beverly Ma, EUA) y Bethesda Research Laboratories (BRL, Gaithersburg MD, EUA); para las digestiones enzimáticas realizadas, se recurrió a los amortiguadores y las recomendaciones señaladas por dichos proveedores.

Los reactivos para las diferentes soluciones provienen de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo, EUA), Merck de México (Monterrey, N.L.) y Reactivos Monterrey (Monterrey, N.L.). El plásmido pPIC9hGH22K (Escamilla-Treviño, L. L. 1996) y la cepa XL1-Blue de *E. coli* provienen de la colección de plásmidos y bacterias del laboratorio de Biotecnología de la U.L.I.E.G., Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, de la U.A.N.L. El sistema de expresión de *Pichia pastoris* el cual incluye la cepa GS115, GS115-Albúmina, GS115- β -

Galactosidasa, la cepa de *E. coli* TOP10F', vectores, iniciadores y el Kit para formación de esferoplastos, se adquirieron de Invitrogen Corporation (San Diego Ca, EUA).

3.2 Equipo

Se utilizó un horno de microondas GoldStar modelo MA-857M (Seul, Corea), microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415 (Westbury, N. Y.), una fuente de poder Biorad 200/2.0 (Nebraska, EUA), un agitador de tubos Barnstead/Thermolyne 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 Enviromental 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 Göttingm Germany), un concentrador centrífuga al vacío marca Labconco Corporation modelo 78100-00 (K.C., Missouri, EUA). El termociclador utilizado fue el modelo PT 150 de MJ Research (Watertown, Mass., EUA).

El procesador de datos empleado fue una computadora modelo Power Macintosh 6100/66 (Apple Computer, Inc.; Cupertino California. EUA).

El procesador de texto utilizado fue: *Microsoft Word* versión 5.1a (© 1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *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.).

Los programas computacionales de Biología Molecular fueron: *Amplify* versión 1.2b (Bill Engeles © 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI EUA), *DNA Strider*™ 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), *Clustal* versión 1.5 (Multiple Sequence Alignments) y el servicio Basic Local Alignment Search Tool de NCBI, secuencias *Blast* versión 2.0.

Para la determinación del % relativo de HGH con respecto a las proteínas totales se utilizó un aparato de fotodocumentación de imágenes Gel DOC 1000 de Bio-Rad (Hercules, CA)

3.3 Métodos

3.3.1 Estrategia general

La parte experimental fue realizada de acuerdo a las siguientes etapas:

- a) Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGh22K en *E. coli* XL1-Blue;
- b) Construcción del vector pPIC9KhGH20K;
- c) Análisis de los vectores construidos mediante caracterización enzimática y secuenciación;
- d) Transformación de *P. pastoris* GS115 con el vector pPIC9KhGH20K;
- e) Caracterización de los genotipos y fenotipos de las transformantes obtenidas;
- f) Selección de clones conteniendo multicopias del cassette de expresión; y
- g) Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K. Una representación esquemática de la estrategia general y sus etapas se muestra en la Figura 7.

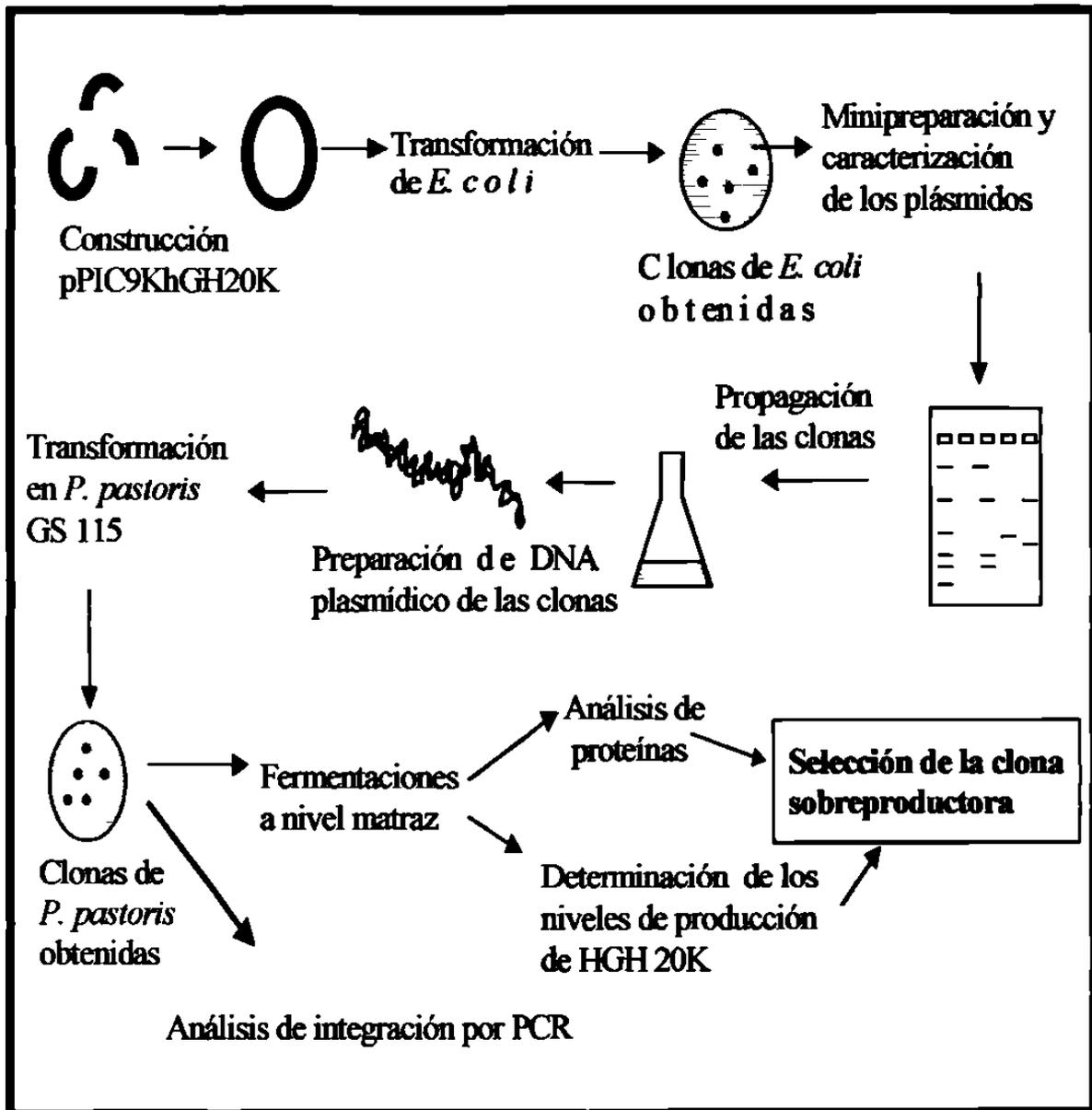


Figura 7.- Representación esquemática de la estrategia general. Muestra cada una de las etapas realizadas para la construcción de la clona de *P. pastoris* sobreproductora de HGH 20K.

3.3.1.1 Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGH22K en *E. coli* XL1-Blue

Células calcio-competentes de *E. coli* XL1-Blue fueron transformadas con los plásmidos: pBS (Stratagene, Co.), pJV (construido por H. Barrera y D. Baty, resultados no publicados; ver Anexo 4), pPIC9K (Invitrogen) y pPIC9hGh22K (Escamilla-Treviño, 1996). La preparación de las bacterias calcio-competentes, así como la transformación se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook y cols. en 1989. Posteriormente se levantaron las colonias de bacterias portando cada uno de los plásmidos (pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGh22K) y se cultivaron en 1L de caldo LB para después realizar el aislamiento de DNA plasmídico a gran escala utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad en cloruro de cesio, de acuerdo a una modificación al método descrito por Clewell y Helsinki en 1970 (Cab-Barrera y Barrera-Saldaña, 1988). De esta manera se obtuvo una fuente de plásmidos de buena calidad para llevar a cabo la construcción del plásmido pPIC9KhGH20K.

Para la construcción del vector pPIC9KhGH20K fue necesaria la fabricación adicional de tres plásmidos: pBS20K, pBSPIC9, y pBSPIC20 (Ver Anexos 5 y 6). La construcción de cada uno de estos plásmidos se describe a continuación.

3.3.1. 2 Construcción del plásmido pBS20K

Para construir pBS20K, se utilizó al plásmido pBluescript SK (pBS) como receptor y a pJV como donador. Mientras que el primero es un vector simple

depropagación, el segundo contiene la secuencia completa del DNAC de hGH de 20K. Tanto pBS como pJV se digirieron con las endonucleasas de restricción: *Xho* I y *Hind* III, generando así extremos compatibles para su ligación. La digestión de pBS con *Xho* I y *Hind* III generó dos fragmentos: uno pequeño de 21 pb (correspondiente a la región de policlonación) y otro mayor de 2940 pb (resto del plásmido). Mientras que la digestión de pJV con *Xho* I y *Hind* III generó también dos fragmentos: uno pequeño de 609 pb (correspondiente al DNAC de hGH 20K) y el otro mayor de 5253 pb (correspondiente al resto del plásmido). La ligación se llevó a cabo entre el fragmento de 609 pb (DNAC hGH20K) y el fragmento de 2940 pb (vector pBS), generando así el primer plásmido: pBS20K (3549 pb, que contiene la secuencia completa del DNAC de hGH 20K). Las clonas recombinantes se analizaron mediante digestión con las endonucleasas de restricción: *Pvu* II, *Xba* I y *Bgl* II, principalmente. En la Fig. 8 se muestra una representación esquemática de la construcción de este vector.

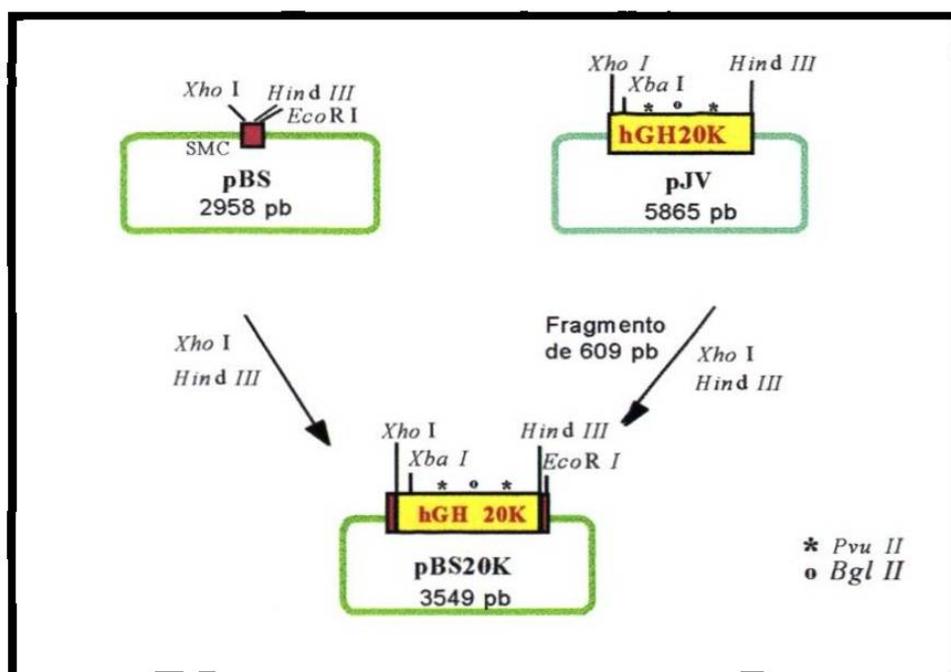


Figura 8.- Representación esquemática de la construcción del vector pBS20K. Para esta clonación se utilizó como plásmido donador a pJV y como plásmido receptor a pBS. El tamaño del fragmento clonado fue de 609 pb, el cual contenía el DNAC de hGH 20K.

3.3.1.2.1 Preparación de los fragmentos de ligación

Las digestiones preparativas de pBS y pJV con *Xho* I (NEB) y *Hind* III (NEB), se llevaron a cabo bajo las recomendaciones de las casas comerciales que distribuyen dichas enzimas de restricción, y se integraron mezclando lo siguiente:

	pJV μL	pBS μL
Solución amortiguadora #2 10X (NEB)	20	10
Agua ultrapura	58	64
BSA 100X	2	1
DNA	100 (200 ng/μL)	15 (700 ng/μL)
Enzima <i>Xho</i> I (4 U/μL)	10	5
Enzima <i>Hind</i> III (10 U/μL)	10	5
Volumen total de reacción	200	100

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante toda la noche y las digestiones fueron verificadas por el análisis de alícuotas de 4 μL mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Una vez verificada la digestión completa, se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a nivel preparativo. El gel fue teñido con bromuro de etidio (2 μg/mL en TBE). Los fragmentos de 609 pb de la digestión de pJV con *Xho* I y *Hind* III y de 2940 pb de la digestión de pBS con *Xho* I y *Hind* III, fueron recuperados del gel cortando las bandas correspondientes con ayuda de un bisturí. Estos fragmentos fueron extraídos de la matriz de agarosa utilizando la técnica de fibra de vidrio siliconizada (Zavala-Díaz de la Serna, 1995) y se resuspendieron en el amortiguador TE de pH=7.4 y se almacenaron a -20°C hasta su empleo.

3.3.1.2.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo en una proporción 1:5 (vector de 2940 pb:fragmento de 609 pb) utilizando la DNA ligasa del fagoT4 (BRL) y los siguientes reactivos.

	Vector + fragmento μL	Vector <i>Xho</i> I- <i>Hind</i> III μL	Vector <i>Hind</i> III μL
Amortiguador de ligación 5X	3	2	2
Agua ultrapura	—	2	2
Vector (pBS)	6 (200 ng/ μL)	5	5
Fragmento (hGH 20K + <i>Xho</i> I + <i>Hind</i> III)	5 (200 ng/ μL)	—	—
Enzima Ligasa (1 U/ μL)	1	1	1
Volumen total de reacción	15 (26.66 ng/ μL)	10	10

La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 16°C y se corroboró la ligación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y tinción del mismo con bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TBE). Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* XL1-Blue con 5 μL del producto de ligación utilizando bacterias calcio-competentes de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook y cols. 1989. Las células transformadas fueron crecidas en placas que contenían además del medio de cultivo y los antibióticos (ampicilina y tetraciclina), IPTG y X-Gal. Se tomaron 5 μL de cada una de las reacciones antes de agregar la enzima ligasa, para utilizarlos como controles al correr el gel (2.5 μL para la verificación de la ligación), así como para la

transformación (2.5 μ L). Además se utilizaron como controles: Amortiguador TE (Tris-EDTA), pUC18 (para determinar la eficiencia de transformación), la reacción de ligación de ambos fragmentos pero sin la enzima ligasa, el vector (pBS)+ *Hind* III con y sin ligasa y el vector (pBS) + *Xho* I + *Hind* III con y sin ligasa.

3.3.1.2.3 Selección y análisis de clonas de *E. coli* XL1-Blue portadoras de pBS20K

La selección de colonias transformantes se realizó tomando en cuenta dos parámetros: a) su crecimiento en medios de cultivo que contenían tetraciclina y ampicilina como marcadores de selección, ya que solamente las células que integrarán el plásmido serían capaces de crecer en medios de cultivo que contenían ambos antibióticos; b) su coloración, ya que se utilizó el ensayo de colonias azules y blancas (Cab-Barrera y Barrera-Saldaña, 1989) para determinar de forma visual las clonas que aceptaron el plásmido recombinante (blancas) de la que no lo hicieron (azules).

De las colonias obtenidas por transformación (selección por resistencia a tetraciclina y ampicilina) se levantaron colonias blancas para su posterior análisis. Se inocularon de forma individual en tubos con 4 mL de caldo LB con ampicilina (100 μ g/mL) y tetraciclina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37°C a 250 rpm durante toda la noche. Posteriormente se tomaron 3 mL de cada cultivo y se realizó aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (minipreparación) de acuerdo al método descrito por Gilles Morelle (Morelle, 1989). El DNA plasmídico aislado de cada una de las colonias fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y las clonas que mostraron el patrón esperado mediante la migración del DNA de forma superenrollada, fueron sometidas a

digestión con un juego de endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Hind* III, *Sac* I, *Xho* I, *Pst* I, *Xho* I-*Hind* III, *Pvu* II, *Xba* I, y *Xba*-*Sma* I. Finalmente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar cada una de las digestiones. Los fragmentos teóricos fueron obtenidos mediante el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* alimentado con la secuencia del plásmido pBS20K.

3.3.1.3 Construcción del plásmido pBSPIC9

Se utilizó el plásmido pBluescript SK (pBS), como plásmido receptor y a pPIC9hGH22K como plásmido donador, el cual contiene la secuencia completa del DNAC de hGH 22K. Tanto pBS como pPIC9hGH22K fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sac* I y *Xba* I generando así extremos compatibles para su ligación. La digestión de pBS con *Sac* I y *Xba* I generó dos fragmentos: uno pequeño de 24 pb (correspondiente a la región de policlonación) y otro mayor de 2937 pb (resto del plásmido). La digestión de pPIC9hGH22K con *Sac* I y *Xba* I generó tres fragmentos: el primero de 1018 pb (este fragmento incluye 739 pb del extremo 5'AOX1 de pPIC9K desde la posición 209 hasta la posición 948; la región codificante para la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y por último posee 19 pb del extremo 5' de DNAC de hGH 22K, correspondientes a la proteína madura); el segundo de 1377 pb (este fragmento incluye el resto de la secuencia de la proteína madura de hGH de 22K, con todo y su codón de terminación, además de 17 pb de la región de policlonación de pPIC9hGH22K y 333 pb de la región de terminación de la transcripción del extremo 3' AOX1) y el tercero y último de 6194 pb (resto del vector pPIC9). La ligación se llevó a cabo entre el fragmento de 1018 pb (pPIC9hGH22K) y el fragmento de 2937 pb (vector pBS), generando así el segundo plásmido: pBSPIC9 (3955 pb). Las clonas recombinantes se

analizaron mediante digestión con las endonucleasas de restricción: *Pvu* II, *Xba* I, y *Bgl* II, principalmente. En la Figura 9 se muestra una representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC9.

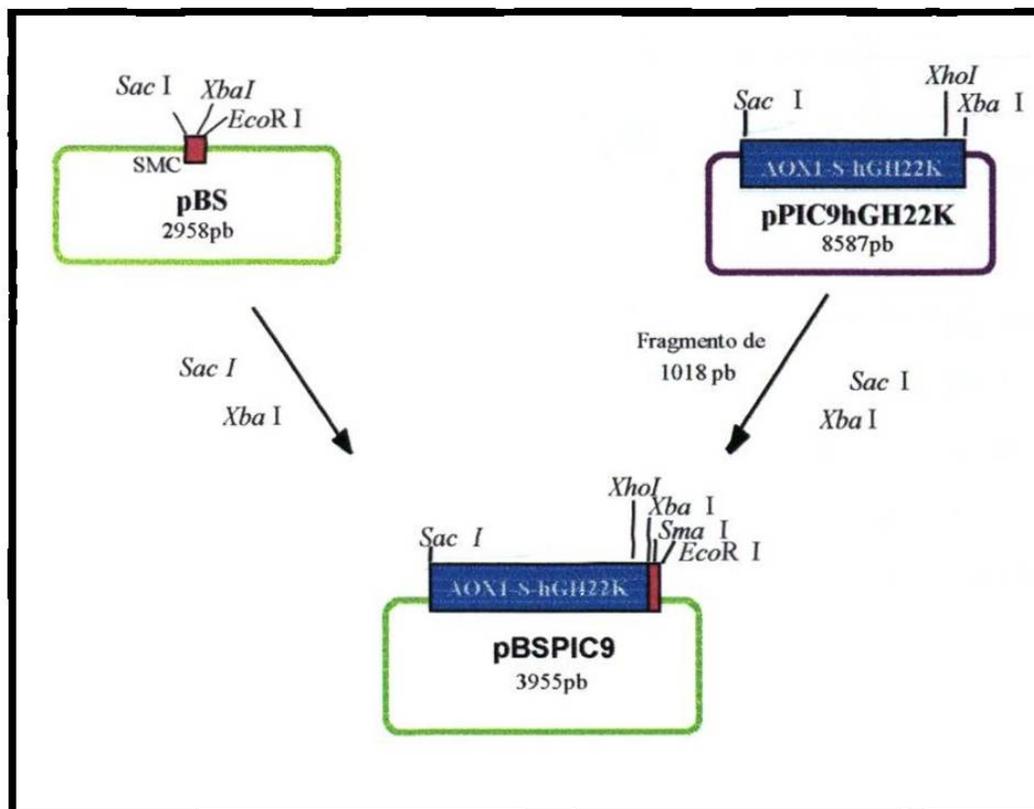


Figura 9.- Representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC9. Se utilizó como plásmido donador a pPIC9hGH22K y como receptor a pBS. El fragmento clonado fue de 1018 pb.

3.3.1.3.1 Preparación de los fragmentos de ligación

Las digestiones preparativas de pBS y pPIC9hGH22K con *Sac* I (NEB) y *Xba* I (NEB), se llevaron a cabo bajo las recomendaciones de las casas comerciales que distribuyen dichas enzimas de restricción y fueron preparadas como sigue:

	pBS μL	pPIC9hGH22K μL
Solución amortiguadora #4 10X (NEB)	5	10
Agua ultrapura	23	60
DNA	16 (500 ng/μL)	20 (1 μg/μL)
Enzima <i>Sac</i> I (10 U/μL)	3	5
Enzima <i>Xba</i> I (10 U/μL)	2	5
Volumen total de reacción	50	100

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante toda la noche y las digestiones fueron verificadas por el análisis de alícuotas de 1 μL de la mezcla de reacción siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el punto 3.3.1.2.1 para pBS20K. En este caso los fragmentos recuperados fueron de 1018 pb y 2937 pb de la digestión de pPIC9hGH22K y pBS con *Sac* I y *Xba* I, respectivamente.

3.3.1.3.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación se integró como sigue:

	μL
Amortiguador de ligación 5X	3.0
Agua ultrapura	5.3
Vector (pBS + <i>Sac</i> I + <i>Xba</i> I)	3.0 (285 ng/μL)
Fragmento (1018pb de <i>Sac</i> I + <i>Xba</i> I)	2.7 (100 ng/μL)
Enzima Ligasa (1 U/μL)	1.0
Volumen total de reacción	15.0 (75 ng/μL)

La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 16°C, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el punto 3.3.1.2.2, para pBS20K. En este caso se utilizaron como controles de transformación: 1) amortiguador de TE; 2) la reacción de ligación de ambos fragmentos pero sin la enzima ligasa y 3) pUC18 para determinar la eficiencia de transformación.

3.3.1.3.3 Selección y análisis de clonas de *E. coli* XL1-Blue portadoras de pBSPIC9

De las colonias obtenidas por transformación (selección por resistencia a tetraciclina y ampicilina) se levantaron solamente colonias blancas y se analizaron como se describe en el punto 3.3.1.2.3. Las clonas que mostraron el patrón esperado fueron sometidas a digestión con un juego de endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Sac* I, *Sma* I, *Xba* I, *Sac* I-*Sma* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Xho* I y *Xba* I-*Sma* I. Finalmente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar cada una de las digestiones. Los fragmentos teóricos fueron obtenidos mediante el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* alimentado con la secuencia del plásmido pBSPIC9

3.3.1.4 Construcción del plásmido pBSPIC20

Se utilizó el plásmido pBSPIC9, como plásmido receptor y como plásmido donador del fragmento de interés a pBS20K. Tanto pBSPIC9 como pBS20K se cortaron con *Xba* I y *Sma* I, generando así extremos compatibles para su ligación. La digestión de pBSPIC9 con *Xba* I y *Sma* I genera dos fragmentos: uno pequeño de 18 pb (de la región de policlونación) y otro mayor de 3937 pb

(resto del vector). La digestión de pBS20K con *Xba* I y *Sma* I genera cuatro fragmentos: uno de 18 pb (región de policonación), otro de 35 pb (vector), uno mas de 516 pb (que incluye el fragmento a partir de 7° codon del DNAC de hGH 20K de la proteína madura) y por último uno de 2980 pb (resto del vector). La ligación se llevó a cabo entre el fragmento de 516 pb (DNAC hGH 20K) y el de 3937pb (vector pBSPIC9), generando así el tercer plásmido: pBSPIC20 (4453 pb). Las clonas recombinantes se analizaron mediante digestión con las endonucleasas de restricción: *Pvu* II, *Xba* I, y *Bgl* II, principalmente. En la Figura 10 se muestra una representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC20.

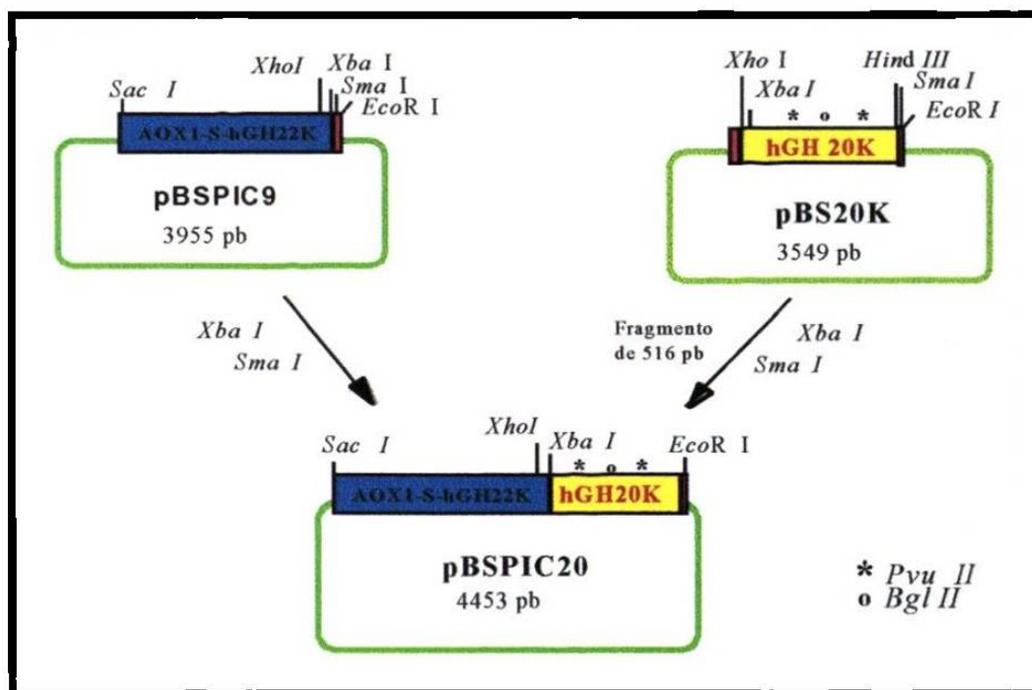


Figura 10.- Representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC20. Se utilizó como plásmido donador a pBS20K y como plásmido receptor a pBSPIC9. El fragmento clonado fue de 516 pb, el cual contenía el DNAC de hGH 20K.

3.3.1.4.1 Preparación de los fragmentos de ligación

Las digestiones preparativas de pBS20K y pBSPIC9 con *Xba* I y *Sma* I, se ensamblaron como sigue:

	pBS20K μL	pBSPIC9 μL
Solución amortiguadora #4 10X (BRL)	5	10
Agua ultrapura	36	60
DNA	6 (1.8 μg/μL)	20 (1 μg/μL)
Enzima <i>Xba</i> I (10 U/μL)	3	5
Volumen total de reacción	50	100

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se verificó la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Además se guardó una pequeña alícuota (de 5μL la cual fue utilizada como referencia de corte, ya que la digestión de pBS20K con *Xba* I, libera dos fragmentos: uno de 2980 pb y otro de 569 pb, y este último fragmento es el que posteriormente se corta con la enzima *Sma* I, generando los fragmentos de 516 pb, 35 pb y 18 pb. El fragmento de 516 pb (DNAc de hGH 20K) se utiliza para la construcción del plásmido pBSPIC20 por lo que fue necesario asegurar que ambas enzimas cortaran de forma adecuada (Ver Figura 11).

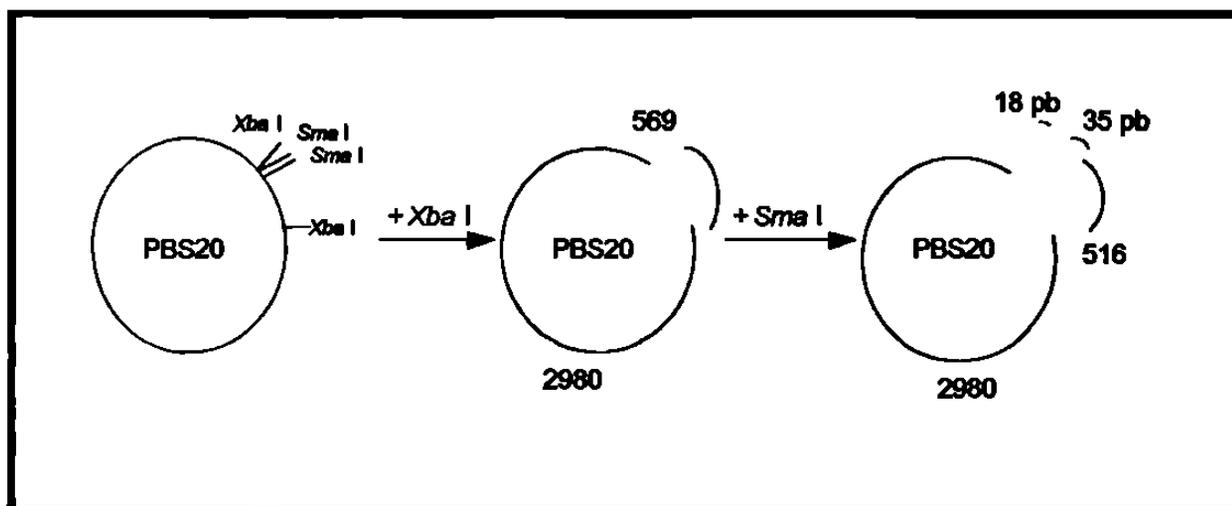


Figura 11.- Corte enzimático de pBS20K con *Xba* I y *Sma* I. Muestra una representación esquemática de la liberación del fragmento de 516pb (DNAC de hGH 20K).

Posteriormente a la mezcla de reacción se le agregó:

	pBS20K μL	pBSPIC9 μL
Solución amortiguadora #4 10X (NEB)	1	1
Agua ultrapura	6	6
Enzima <i>Sma</i> I (10 U/μL)	3	3
Volumen final de reacción	10	10

Las mezclas de reacción se incubaron en este caso a 25°C durante toda la noche y las digestiones fueron verificadas por el análisis de alícuotas de 1.5 μL mediante electroforesis en geles de agarosa 1.0%, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el punto 3.3.1.2.1 para pBS20K. En este caso los fragmentos recuperados fueron de 516 pb y 3937 pb de la digestión de pBS20K y pBSPIC9 con *Sma* I y *Xba* I respectivamente.

3.3.1.4.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo tal como se describe en el punto 3.3.1.2.2 pero en una proporción 1:5 (vector de 3937 pb: fragmento de 516 pb). Se llevó a cabo la transformación de *E. coli* XL1-Blue con 5 µl del producto de ligación utilizando bacterias calcio-competentes. Se utilizaron como controles de transformación: 1) amortiguador de TE; 2) la reacción de ligación solo del vector (sin el fragmento) y 3) pUC18 para determinar la eficiencia de transformación.

3.3.1.4.3 Selección y análisis de clonas de *E. coli* XL1-Blue portadoras de pBSPIC20

De las colonias obtenidas por transformación (selección por resistencia a tetraciclina y ampicilina) se levantaron colonias blancas y se analizaron de igual manera como se describe en el punto 3.3.1.2.3. Las clonas que mostraron el patrón esperado mediante la migración del DNA de forma circular, fueron sometidas a digestión con una batería de endonucleasas de restricción dentro de las que destacan: *Xba* I, *Bgl* II y *Pvu* II. Finalmente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar cada una de las digestiones. Los fragmentos teóricos fueron obtenidos mediante el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* alimentado con la secuencia del plásmido pBSPIC20.

3.3.1.5 Construcción del vector pPIC9KhGH20K

Se utilizó a pPIC9K como vector receptor y como plásmido donador a pBSPIC20. Tanto pPIC9K como pBSPIC20 se cortaron con las enzimas de restricción *Sac* I y *Eco* RI, generando así extremos compatibles para su ligación. La digestión de pBSPIC20 con *Sac* I y *Eco* RI generó dos fragmentos: uno de 1546 pb (este fragmento incluye 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9K desde la posición 209 hasta la posición 948; la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, además 19 pb del extremo 5' de DNAc de hGH 22K, correspondientes a la proteína madura y por último contiene a partir del codón 7 del DNAc de hGH 20K) y el otro de 2907 (resto del vector). La digestión de pPIC9K con *Sac* I y *Eco* R I genera dos fragmentos: uno de 1018 pb (este fragmento incluye 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9K desde la posición 209 hasta la posición 948; la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y además posee el sitio de policlonación para la enzima *Sna* B1) y el último de 8258 pb (resto del vector pPIC9K). La ligación se llevó a cabo entre el fragmento de 1546 pb (secuencia señal y DNAc hGH 20K) y el fragmento de 8258 (vector pPIC9K), generándose así el vector pPIC9KhGH20K (9804 pb). Las clonas recombinantes se analizaron mediante digestión con las endonucleasas de restricción: *Pvu* II, *Xba* I, y *Bgl* II. En la Figura 12 se muestra una representación esquemática de la construcción de pPIC9KhGH20K.

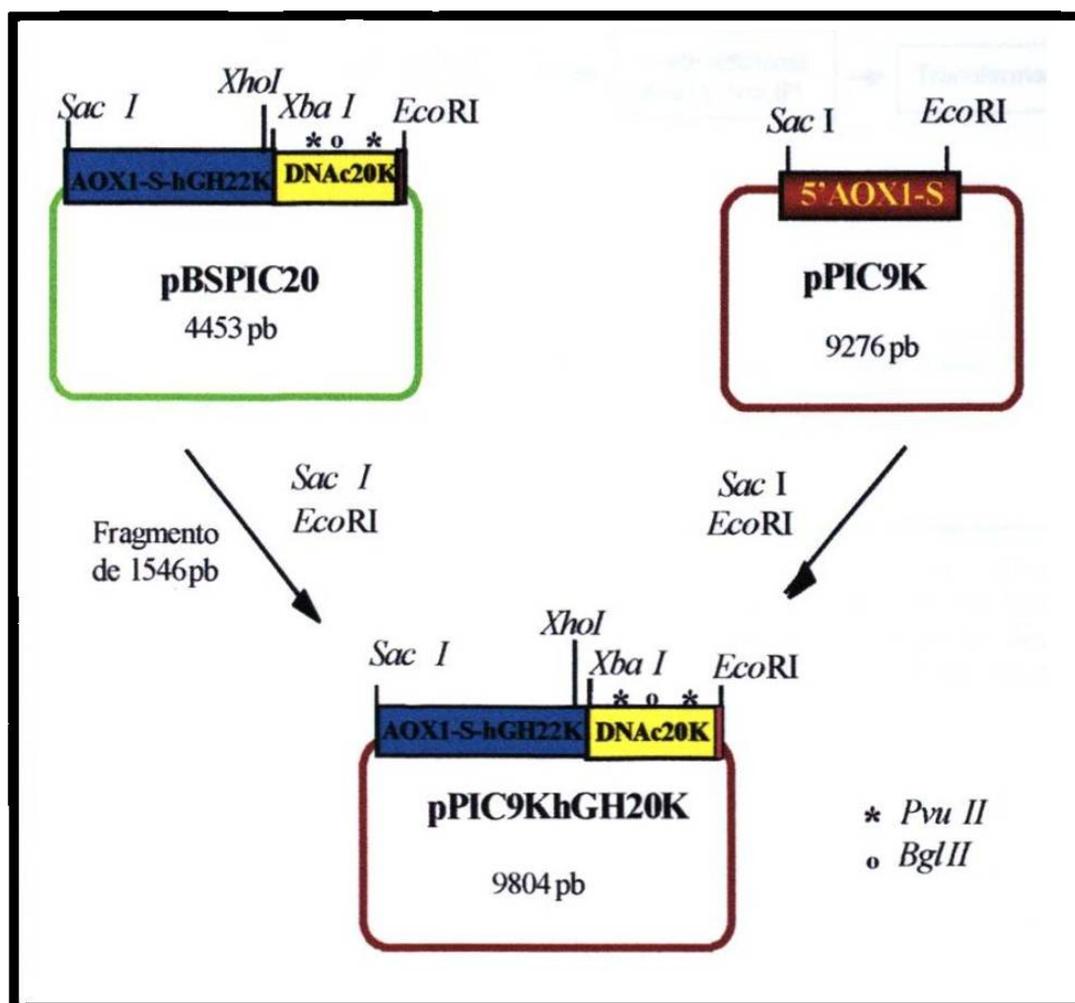


Figura No 12.- Representación esquemática de la construcción del vector pPIC9KhGH20K. Se utilizó como plásmido donador a pBSPIC20 y como plásmido receptor a pPIC9K. El fragmento clonado fue de 1546 pb que corresponde a la secuencia señal y DNAc hGH 20K.

3.3.1.5.1 Preparación de los fragmentos de ligación

En este caso se llevaron a cabo dos estrategias experimentales de ligación tal como se muestra en la Figura 13.

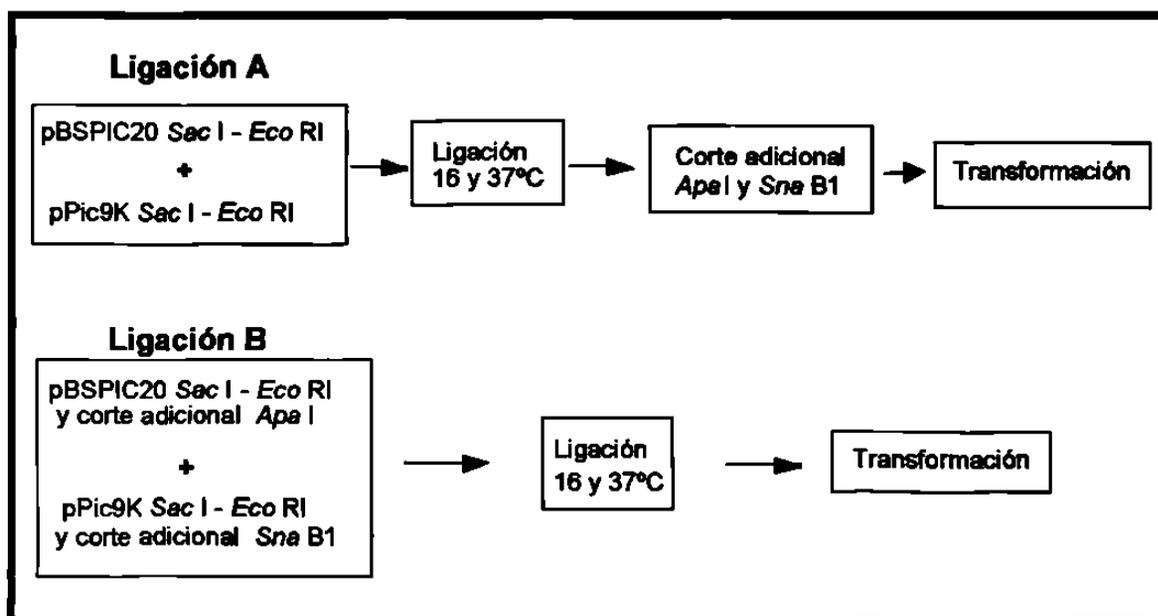


Figura 13.- Estrategias de ligación. Muestra un diagrama de flujo de las estrategias de ligación utilizadas. En la ligación A el corte adicional con *Apa I* y *Sna B1* se llevó a cabo posterior a la ligación. En la ligación B el corte adicional con estas enzimas se llevó a cabo antes de la ligación. Además se utilizaron dos temperaturas (16 y 37°C) de incubación en ambas ligaciones.

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo a escala semipreparativa para ambos DNAs (pBSPIC20 y pPIC9K) con las enzimas *Sac I* y *Eco RI*, bajo las recomendaciones de las casas comerciales que distribuyen dichas enzimas de restricción, tal y como se ilustra a continuación:

	pBSPIC20 μL	pPIC9K μL
Solución amortiguadora #3 10X (BRL)	2	2
Agua ultrapura	9	3
DNA	8 (1 μg/μL)	4 (1 μg/μL)
Enzima <i>Eco RI</i> (10 U/μL)	1	1
Volumen total de reacción	20	100

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se verificó la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al

0.8%. Posteriormente a la mezcla de reacción se le agregó 10 μL de acetato de amonio 7.5 M y 50 μL de etanol absoluto, esto con el fin de precipitar el DNA y después realizar la digestión con Sac I.

El DNA precipitado se resuspendió en:

	pBSPIC20 μL	pPIC9K μL
Solución amortiguadora #3 10X (BRL)	2	2
Agua ultrapura	17	17
Enzima Sac I (20 U/ μL)	1	1
Volumen total de reacción	20	20

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche y se verificó el éxito de la digestión, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Posteriormente se separaron 10 μL del volumen total de la reacción de digestión de pBSPIC20 los cuales fueron sometidos adicionalmente a digestión con la enzima de restricción *Apa* I (NEB). Esta enzima de restricción solamente corta el plásmido original pBSPIC920 y no el plásmido recombinante pPIC9KhGH20K. Los 10 μL restantes de la mezcla de reacción se utilizaron de igual manera para llevar a cabo la reacción de ligación, pero en este caso la digestión adicional con *Apa* I (NEB) se realizó después de la ligación.

En el caso de pPIC9K la enzima adicional de corte utilizada fué *Sna* B1 (NEB). Esta enzima de restricción solamente corta el plásmido original pPIC9K y no el plásmido recombinante pPIC9KhGH20K. Los 10 μL restantes de la

mezcla de reacción se utilizaron de igual manera para llevar a cabo la reacción de ligación, pero en este caso la digestión adicional con *Sna* B1 (NEB) se realizó después de la ligación.

Las digestiones adicionales con las enzimas *Apa* I y *Sna* B1 se realizaron debido a que los fragmentos involucrados en la ligación no fueron purificados previamente (es decir se encontraban en la reacción de ligación junto con el resto del plásmido). Al cortar con estas enzimas se digerían los DNAs de los plásmidos originales (pBSPIC20 y pPIC9K) y no el plásmido recombinante (pPIC9KhGH20K), de esta manera al momento de transformar tendríamos selectivamente transformación solo con el plásmido recombinante, ya que los plásmidos originales por estar en forma linearizada no son capaces de transformar. En la Figura 14 se muestra una representación esquemática de la estrategia de digestión.

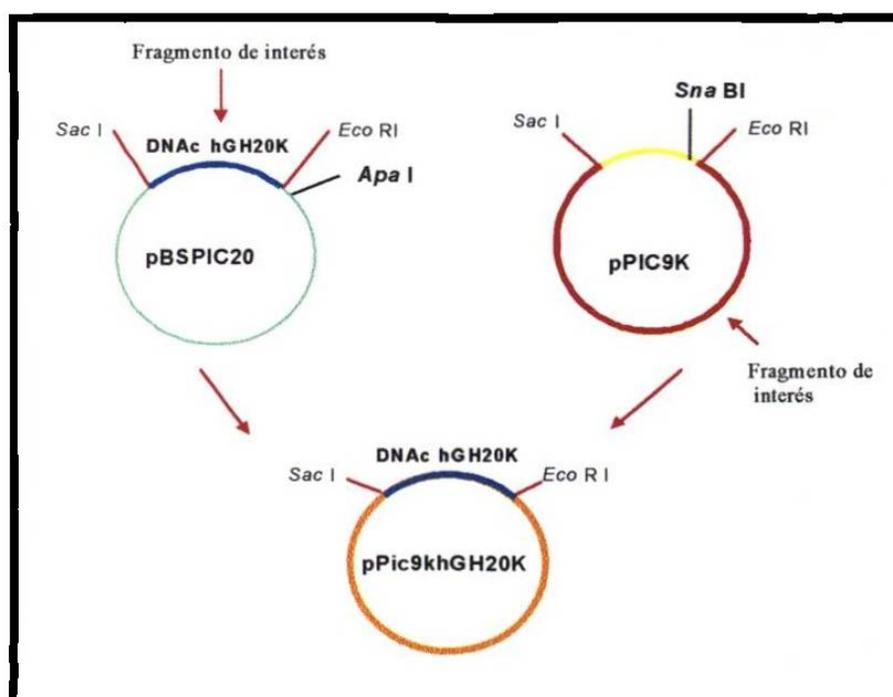


Figura 14.- Digestión adicional con las enzimas de restricción *Apa* I y *Sna* B1. El plásmido pPIC9KhGH20K no es cortado con las enzimas *Apa* I y *Sna* B1, solo los plásmidos que le dan origen. Debido a esto, el plásmido pPIC9KhGH20K permanece intacto en la reacción de ligación y es capaz de transformar las células de *E. coli* XL1-Blue. Los plásmidos originales (pBSPIC20K y pPIC9K) son digeridos por estas enzimas y no son capaces de transformar las células de *E. coli* XL1-Blue.

Las digestiones fueron verificadas por el análisis de alícuotas de 0.5 μ L mediante electroforesis en geles de agarosa 0.6%. El gel fue teñido con bromuro de etidio (2 μ g/mL en TBE).

3.3.1.5.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo en una proporción 1:4 (fragmento de 8258 pb:fragmento de 1546 pb). Una alícuota de la mezcla de reacción se incubó 1 h con T4 DNA ligasa (BRL) a 37°C y la otra durante toda la noche a 16°C. Las características de las variantes de estas reacciones de ligación se muestran a continuación:

	Ligación A: Sin corte adicional <i>Apa</i> I, <i>Sna</i> B1	Ligación B: Con corte adicional <i>Apa</i> I, <i>Sna</i> B1
	μ L	μ L
Agua ultrapura	7	7
Amortiguador de ligasa 5X	3	3
Vector (pPIC9K + <i>Eco</i> RI + <i>Sac</i> I)	2	2
Fragmento (pBSPIC20 + <i>Eco</i> RI + <i>Sac</i> I)	2	2
Enzima Ligasa (1 U/ μ L)	1	1
Volumen total de reacción	15	15

Se tomaron 5 μ L antes de agregar la enzima ligasa, como control de ligación y transformación y se corroboró la ligación mediante electroforesis en

gel de agarosa al 0.8% y tinción del mismo con bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TBE). Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* XL1-Blue con el producto de ligación utilizando bacterias calcio-competentes. Como controles de transformación se utilizaron cada una de las reacciones de ligación a probar, pero sin la enzima ligasa, además el amortiguador de TE y los plásmidos pBS322 y pPIC9K para verificar la eficiencia de transformación.

3.3.1.5.3 Selección y análisis de las clonas de *E. coli* XL1-Blue portadoras de pPIC9KhGH20K.

De las colonias obtenidas por transformación (selección por resistencia a kanamicina, ampicilina y tetraciclina) se levantaron colonias para su posterior análisis. Se inocularon de forma individual en tubos con 4 mL de caldo LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tetraciclina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se analizaron de igual manera como se describe en el punto 3.3.1.2.3. Las clonas que mostraron el patrón esperado mediante la migración del DNA de forma superenrollada, fueron sometidas a digestión con las siguientes endonucleasas de restricción: *Sal* I, *Dra* I, *Sac* I-*Eco* RI, *Sac* I *Avr* II, *Bgl* II, *Pst* I, *Xba* I, *Xho* I, *Bgl* II y *Pvu* II. Finalmente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar cada una de las digestiones. Los fragmentos teóricos según el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* alimentado con la secuencia del plásmido pPIC9KhGH20K.

3.3.1.5.4 Aislamiento a mediana escala del DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K

Una vez asegurada la identidad de pPIC9KhGH20K, se realizó una preparación a mediana escala (Sambrook y cols., 1989) del mismo, y de esta manera se obtuvo una fuente de plásmidos de buena calidad para llevar a cabo la transformación de *Pichia pastoris*. Células de *E. coli* cepa XL1-Blue conteniendo el plásmido pPIC9KhGH20K se cultivaron en 100 mL de caldo LB a 37°C y 250 rpm durante 18 h. Las células fueron cosechadas por dos centrifugaciones sucesivas en tubos falcon de 50 mL a 5000 rpm por 5 min (Centrífuga IEC Centra MP4R Rotor 854). El paquete celular se resuspendió en 15 mL de Solución I (50 mM de Glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH=8, 10 mM de EDTA, y 4 mg/mL de lisozima), se agregaron 15 mL de la Solución II (solución de lisis: 0.2N de NaOH, y 1% de SDS) y se mezcló por inversión. Posteriormente se añadió 15 mL de la Solución III (Acetato de amonio 7.5 M pH=7.8) y se mezcló por inversión varias veces y se centrifugó a 5000 rpm por 15 min. El sobrenadante claro se transfirió por filtración (a través de una malla de gasa) a dos tubos nuevos falcon de 50 mL. Se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló por inversión a temperatura ambiente para precipitar el DNA plasmídico. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min a 4°C. se descartó el sobrenadante, la pastilla de DNA se resuspendió en 2 mL de TE (10 mM de Tris-HCl pH=8 y 1 mM de EDTA) y se sometió a tratamiento con RNAsa (20 µg/mL) y proteinasa K (100 µg/mL). Se agregó 1/2 volumen de fenol y se agitó muy bien durante 1 min y luego se agregó 1/2 volumen de cloroformo y se continuó extrayendo por 1 min. Se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm. Después se transfirió la fase acuosa (superior) a otro tubo. Además se realizó otra extracción con un volumen de cloroformo durante 1 min, nuevamente se centrifugó a 5000 rpm y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. En ambas extracciones se descartó la fase orgánica (fase inferior).

Posteriormente el DNA fue precipitado con 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla fue centrifugada a 14,000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf durante 15 min. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70 %, el DNA fue resuspendido en el amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl pH=8 y 1 mM de EDTA) y almacenado a 4°C hasta su uso.

Una vez verificada la identidad del plásmido pPIC9KhGH20K y preparado a mediana escala, éste fue sometido a secuenciación.

3.3.1.5.5 Secuenciación

La secuenciación del DNAC de hGH 20K contenido en el plásmido pPIC9KhGH20K fue realizada con el apoyo del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

La técnica utilizada para la secuenciación es una adaptación de la descrita por Sanger y cols. en 1977. La secuenciación enzimática se realizó siguiendo las especificaciones del Kit AmpliCycle (Perkin Elmer). Los fragmentos sintetizados se marcaron al incorporar P^{32} - α -dATP y se resolvieron en un gel de electroforesis de acrilamida 6%-urea 50%. La lectura de la secuencia se realizó sobre la autorradiografía.

3.3.2 Transformación de *P. pastoris* GS115

Una vez obtenido el plásmido pPIC9KhGH20K a mediana escala, se realizaron digestiones preparativas con las endonucleasas de restricción *Sa*I y *Dra*I y de esta manera poder llevar a cabo la transformación de la cepa GS115 de *P. pastoris*. El plásmido linearizado con *Sa*I favorece la inserción en el *locus HIS4*, mientras que el corte con *Dra*I genera reemplazamiento en el *locus AOX1* (Invitrogene, 1996). Las células de *Pichia pastoris* cepa GS115 fueron transformadas por la técnica de formación de esferoplastos (Invitrogen, 1994) con el plásmido (pPIC9KhGH20K) previamente digerido (*Sa*I y *Dra*I).

3.3.2.1 Crecimiento celular

Células de *Pichia pastoris* cepa GS115 se inocularon por estría en placas con YPD para aislar colonias sencillas y posteriormente crecerlas de forma individual, la placa se incubó a 30°C por dos días. Se transfirió una colonia de *Pichia pastoris* cepa GS115 a un matraz de 100 mL, conteniendo 10 mL de YPD caldo y se dejó crecer durante toda la noche con agitación a 250 rpm a 30°C. Posteriormente se inocularon tres matraces diferentes de 500 mL cada uno, conteniendo 200 mL de medio YPD caldo, con 5, 10 y 20 µL de células del cultivo de toda la noche. Los matraces se incubaron nuevamente durante toda la noche a 30°C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente se midió la D.O._{600nm} de cada uno de los tres cultivos, las células que alcanzaron una D.O._{600nm} entre 0.2 y 0.3 se cosecharon por centrifugación a temperatura ambiente durante 10 min a 1500 g. La pastilla de células se resuspendió en 20 mL de agua estéril y se cosechó nuevamente por centrifugación a 1500 g

durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, y la pastilla de células se utilizó para preparar los esferoplastos (Invitrogen, 1994).

3.3.2.2 Formación de esferoplastos

Primeramente se lavó la pastilla con 20 mL de SED (19 ml de SE: 1M sorbitol, 25 mM de EDTA, pH 8 y 1 mL de DTT 1M) preparado en fresco, y se centrifugó a 1500 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se lavó nuevamente ahora con 20 mL de sorbitol 1 M y se centrifugó como anteriormente se menciona. Las células se resuspendieron finalmente en 20 mL del amortiguador SCE (1 M sorbitol, 1 mM de EDTA y 10 mM de amortiguador de citrato de sodio, pH 5.8) por agitación suave. La suspensión se dividió en dos tubos falcon de 50 mL, uno de ellos se mantuvo en hielo (tubo A), mientras que el otro (tubo B) se utilizó para monitorear la formación de esferoplastos mediante el tratamiento con zimolasa. La zimolasa es una enzima que digiere pared celular y hace extremadamente frágiles las células por lo que se deben manejar con cuidado. Al momento de la adición de la zimolasa la digestión de la pared celular empieza. Se prepararon 20 mL de solución de SDS al 5% los cuales se utilizaron posteriormente. Se ajustó el espectrofotómetro en UV/Vis a 800 nm, utilizando como blanco 800 μ L de SDS al 5% y 200 μ L de SCE (Sorbitol 1 M, EDTA 1 mM y amortiguador de citrato de sodio 10 mM, pH 5.8). Se preparó un juego de 17 tubos de microcentrífuga estériles y marcados como: 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50, a los cuales se les agregó 800 μ L de SDS al 5%. Se retiraron 200 μ L de células contenidas en el tubo B y se añadieron al tubo marcado como "0". Esta muestra se utilizó como tiempo cero. Al resto de la suspensión de células del tubo B se le añadió 7.5 μ L (3 mg/mL) de zimolasa (es importante mezclar la suspensión antes de su uso para asegurar una cantidad consistente de

zimolasa), se mezcló perfectamente y se incubó las células a 30°C. La formación de esferoplastos se monitoreó de la siguiente manera: a los dos minutos de tiempo, se retiraron 200 µL de células (tubo B + zimolasa) y se añadieron al tubo marcado "2" (con 800 µL de SDS al 5%). Esto mismo se repitió para cada uno de los diferentes tiempos; $t = 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, \text{ y } 50$. Cada una de las muestras fue leída D.O._{600 nm}. Finalmente, se determinó el porcentaje de esferoplastos para cada punto del tiempo utilizando la ecuación:

$$\% \text{ de esferoplastos} = 100 - [(D.O._{600nm} \text{ al tiempo } t / D.O._{600nm} \text{ al tiempo } 0) \times 100]$$

Una vez determinado el tiempo mínimo de incubación donde se formaron el 70% de esferoplastos se procedió al tratamiento con zimolasa del tubo remanente (tubo A en hielo). Se agregó 7.5 µL de zimolasa (3mg/mL) al tubo A y se incubó a 30°C durante el tiempo establecido para la formación de un 70% de esferoplastos. Los esferoplastos fueron cosechados por centrifugación a 750g durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y los esferoplastos se lavaron con 10 mL de sorbitol 1M (mezclando suavemente). Se centrifugó como se menciona anteriormente y los esferoplastos se resuspendieron en 0.6 mL de CaS (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCL, pH 7.5 y 10 mM de CaCl₂). Esta preparación debe ser utilizada inmediatamente (hasta 30 min) para su transformación (Invitrogen, 1994).

3.3.2.3 Transformación

Se colocaron 100 µL del preparado de esferoplastos en tubos falcon de 15 mL y se agregaron 10 µg de DNA (tanto de pPIC9KhGH20K, como de pPIC9K en otro tubo, ambos cortados con *Sal I* y *Dra I*, además amortiguador

TE pH=7.4), incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 mL de solución de PEG/CaT preparada en fresco (mezcla 1:1 de poetilenglicol al 40% y CaT [20 mM Tris, pH 7.5 y 20 mM CaCl₂]) y se mezcló por inversión, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se obtuvieron los esferoplastos por centrifugación a 750g durante 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y los esferoplastos se resuspendieron en 150 µL de medio SOS (1 M sorbitol, 0.3X YPD, y 10 mM CaCl₂) y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se les agregó 850 µL de sorbitol 1 M y se procedió a sembrar en la placa (Invitrogen, 1994).

3.3.2.4 Selección de recombinantes

Se mezclaron 200 µL de cada una de las soluciones de esferoplastos-DNA preparadas con 10 mL de agarosa fundida y se vaciaron en placas con RDB-agar (sin histidina, solo las transformantes crecen en este medio). Una vez solidificada la agarosa, las placas se invirtieron e incubaron a 30°C. La aparición de transformantes se controló durante 4 a 6 días. Además se realizó una prueba de viabilidad celular, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera: Se mezclaron 100 µL de esferoplastos (sin DNA) con 900 µL de sorbitol 1 M. Posteriormente se mezclaron solamente 100 µL de esta dilución con 10 mL de agarosa fundida, esta mezcla se vertió en placas con RDHB-agar (con histidina). Una vez solidificada la agarosa, las placas se invirtieron e incubaron a 30°C. La aparición de colonias se observó durante 4 a 6 días. Este método proporciona una selección inicial de transformantes HIS4⁺, ya que solamente las células que integraron en su genoma el vector de integración (conteniendo el cassette de expresión), podrán crecer en medio carente de histidina (Invitrogen, 1994).

3.3.3 Caracterización de genotipos y fenotipos de las clonas recombinantes

La caracterización genotípica se realizó verificando la integración del cassette de expresión en el genoma de levadura mediante ensayos de PCR, y la caracterización fenotípica mediante la inducción del gen clonado y la caracterización de su producto recombinante.

3.3.3.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA genómico de *Pichia pastoris* se utilizó la técnica previamente descrita por Martínez-Soriano y cols. en 1993. Las levaduras se crecieron en 4 mL de caldo YPD durante 24 h a 30°C. El paquete celular de 3 mL, se obtuvo mediante dos centrifugaciones sucesivas de 1.5 mL, en tubos Eppendorf a 16000g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y al paquete celular se le agregaron 200 µL de solución amortiguadora de lisis TSNT (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH=8), se agitó perfectamente por inversión y después se le añadieron 500 µL de Fenol saturado (con Tris-HCl, pH=8), agitando nuevamente por inversión. Posteriormente, se agregaron a la mezcla 100 µL de Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1), se mezcló al vortex durante 5 min y se agregó 200 µL de TE 1X (10 mM de Tris-HCl, pH=8, y 1 mM de EDTA, pH=8) y se procedió a centrifugar por 10 min a 16000 g. Se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. El DNA se precipitó al agregar 1 mL de etanol al 100% y mezclar lentamente por inversión hasta la aparición de una hebra blanca. El DNA se recuperó por centrifugación a 16000 g durante 10 min descartando el sobrenadante. Después, la pastilla de DNA se lavó con 500 µL

de etanol al 70%, y se centrifugó nuevamente a 16000 g durante 5 min. Finalmente la pastilla se secó a 37°C durante 15 min y se resuspendió en 48 μL de TE y 2 μL de RNAsa (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las muestras obtenidas de DNA genómico fueron almacenadas a 4°C hasta su empleo.

3.3.3.2 Análisis de DNA por espectrofotometría

Una vez obtenido el DNA genómico, se realizó una estimación cuantitativa del mismo mediante espectrofotometría, tomando en cuenta un factor de conversión de 50, ya que una D.O.=1 corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de doble cadena. Además la calidad del DNA se estima mediante la relación de absorbancia a 260 nm y a 280 nm ($\text{D.O.}_{260 \text{ nm}}/\text{D.O.}_{280 \text{ nm}}$). Una preparación de DNA con alto grado de pureza se caracteriza por presentar valores de $\text{D.O.}_{260 \text{ nm}}/\text{D.O.}_{280 \text{ nm}}$ entre 1.8 y 2.0. De las muestras de DNA genómico se realizó una dilución de la preparación del DNA (1:200 y 1:400) en TE 1X pH=7.4. Se calibró el espectrofotómetro a cero con amortiguador TE 1X pH=7.4. Se realizaron las lecturas a 260 nm y 280 nm de cada una de las diluciones preparadas. Finalmente, se determinó la concentración de la preparación empleando el factor de conversión 50 y la pureza de la muestra, mediante la relación de las absorbancias a 260 nm y a 280 nm ($\text{D.O.}_{260 \text{ nm}}/\text{D.O.}_{280 \text{ nm}}$)