Tabla XV. Valores de logaritmos naturales de UFC/mL corregidos (LnV<sub>c</sub>) para cada cepa y a cada tiempo. Cada valor es el promedio de tres valores de LnVc. Al valor de UFC/mL originalmente obtenido se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de corrección anteriormente descrito (sección 3.3.5.1 pag 39), obteniendo de esta manera el LnV<sub>c</sub>.

Tiempo (h)	LnV <sub>c</sub>	LnVc	LnV <sub>c</sub>	LnV <sub>c</sub>
	GS <u>1</u> 15-Tr	GS115-Tg	GS115-22K	GS115-pPIC9K
0	0	0	0	0
0.5	0.1757	-0.2217	0.0219	0.3428
1	0.1664	0.0211	0.0708	0.2316
1.5	0.3743	ND	ND	ND
2	0.3700	-0.4884	0.0714	0.3329
2.5	0.4430	ND	ND	ND
3	0.5063	-1.0237	0.0834	0.3197
3.5	0.5384	ND	ND	ND
4	0.5897	-1.6281	0.1434	0.3022
5	0.4536	-1.8633	0.3199	0.6028
6	0.5097	-3,4528	0.4504	0.4714
8	0.4592	-4.1897	0.4127	0.6357
10	0.5040	-2.9809	0.7178	0.8273
12	0.5391	-3.4942	0.8376	1.0923
14	0.5403	-1.6136	0.9863	1.3429
16	ND	-2.6747	1,4075	1.3219

ND: No determinado

En base a los resultados mostrados en las tablas XIV y XV se construyeron las gráficas mostradas en la figura 26 y los resultados de velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación mostrados en la tabla XVI.

La cepa GS115-Tr presentó un tiempo de duplicación 1.72 y 1.98 veces menor (diferencia estadísticamente significativa con p<0.05) que el de las dos cepas controles (GS115-22K y GS115-pPIC9K respectivamente), por lo tanto una mayor velocidad específica de crecimiento (tabla XVI), sin embargo este aparente crecimiento dio lugar en un intervalo muy corto de tiempo ya que la fase estacionaria se alcanzó alrededor de las 2-3 h (en DO600 y UFC/mL) de inducción.

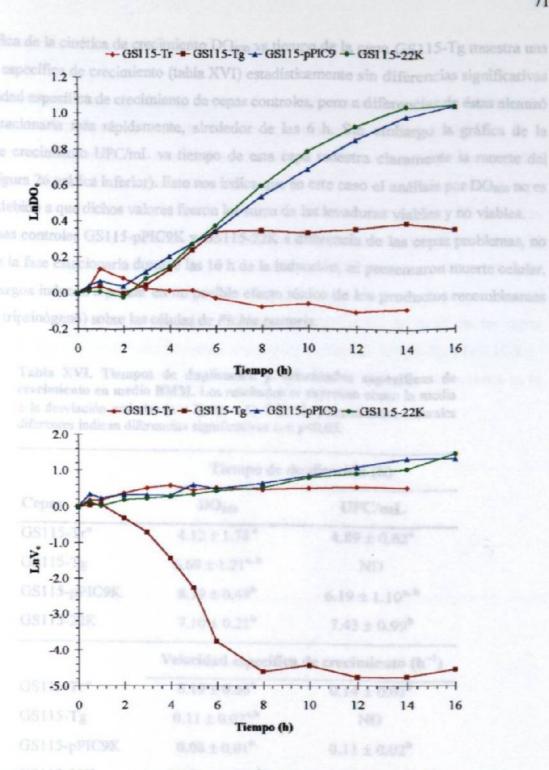


Figura 26. Cinéticas de crecimiento de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* bajo condiciones de inducción en medio BMM (gráficas promedio). La gráfica superior fue construida por mediciones de DO<sub>600</sub> mientras que la gráfica inferior fue construida por determinaciones de UFC/mL. El eje de la ordenadas muestra los valores de LnDO<sub>c</sub> (gráfica superior) y LnV<sub>c</sub> (gráfica inferior) mientras que el eje de las abscisas muestra los valores de tiempo en horas. El color café ( ) representa a la cepa GS115-Tg, el color rojo ( ) a la cepa GS115-Tr, el color azul ( ) a la cepa GS115-pPIC9K y el color verde ( ) a la cepa GS115-22K. Los valores de cada punto representan una media de n=3.

La gráfica de la cinética de crecimiento DO<sub>600</sub> va tiempo de la cepa GS115-Tg muestra una velocidad específica de crecimiento (tabla XVI) estadísticamente sin diferencias significativas a la velocidad específica de crecimiento de cepas controles, pero a diferencias de éstas alcanzó la fase estacionaria más rápidamente, alrededor de las 6 h. Sin embargo la gráfica de la cinética de crecimiento UFC/mL vs tiempo de esta cepa muestra claramente la muerte del cultivo (Figura 26 gráfica inferior). Esto nos indica que en este caso el análisis por DO<sub>600</sub> no es confiable debido a que dichos valores fueron las suma de las levaduras viables y no viables.

Las cepas controles GS115-pPIC9K y GS115-22K a diferencia de las cepas problemas, no alcanzaron la fase estacionaria durante las 16 h de la inducción, ni presentaron muerte celular. Estos hallazgos inducen a pensar en un posible efecto tóxico de los productos recombinantes (tripsina y tripsinógeno) sobre las células de *Pichia pastoris*.

Tabla XVI. Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMM. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (n = 3) \*(n = 5). ND: No determinado. Literales diferentes indican diferencias significativas con p<0.05.

	Tiempo de duplicación (h)			
Cepas	DOGGG	UFC/aL		
GS115-Tr*	4.12 ± 1.78 *	4.89 ± 0.62*		
GS115-Tg	6.69 ± 1.21 ** b	ND		
GS115-pPIC9K	$8.19 \pm 0.49^{h}$	$6.19 \pm 1.10^{a,b}$		
GS115-22K	7.10 ± 0.21 b	$7.43 \pm 0.99^{b}$		
_	Velocidad específica	de crecimiento (h <sup>-1</sup> )		
GS115-Tr*	0.19 ± 0.06*	0.14 ± 0.01*		
GS115-Tg	$0.11 \pm 0.02^{a,b}$	ND		
GS115-pPIC9K	$0.08 \pm 0.01^{b}$	$0.11 \pm 0.02^{b}$		
GS115-22K	$0.098 \pm 0.003^{b}$	<b>0.09</b> ± 0.01 <b>b</b>		

#### 4,4,2 Determinación enzimática de alcohol oxidasa y catalasa

Las actividades específicas de alcohol oxidasa de las fermentaciones de las cinéticas de crecimiento para los tres ensayos realizados de cada cepa se muestran en la tabla XVII.

En los tres ensayos realizados para la determinación de AOX no se detectó la actividad específica de la enzima a los tiempos estudiados en la cepa GS115-Tr, mientras que en la cepa GS115-Tg2 la actividad específica aumento durante las primeras 6-8 h (Fig. 27) pero esta disminuyó rápidamente hasta niveles con actividades próximas a cero en las siguientes 4-6 h. Para el caso de la cepas controles GS115-pPIC9K y GS115-22K la actividad específica de AOX tendió a aumentar durante las primeras 4-6 h, las siguentes 6-8 h presentaron un comportamiento variable entre ensayos, sin embargo las actividades de AOX en las cepas control de las 8 a las 12 h fueron mucho mayor a las cepas problema (GS115-Tg y GS115-Tr).

La gráfica de los tres ensayos de actividad específica de AOX vs tiempo se muestra en la figura 27.

Tabla XVII. Valores de actividad de alcohol oxidasa de extractos celulares de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a diferentes tiempos de inducción en medio BMM.

Actividad de Alcohol Oxidasa (U/mg) Ensavo 1

Tiempo (h)	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115- pPIC9K	GS115-22K
0	0,000	0.000	0.000	0.011
2	0.000	0.011	0.102	0.074
4	0,000	0.064	0.148	0.251
6	0,000	0.107	0.071	0.210
8	0.000	0.046	<b>0</b> .088	0.257
10	0.000	0.013	0.089	0,328

Actividad de Alcohol Oxidasa (U/mg) Ensayo 2

Tiempo (h)	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115- pPIC9K /
0	0.000	0.000	0,000
2	0,000	0,007	0.065
4	0.000	0.097	0.357
6	0,000	0.252	0.305
8	0.000	0.214	0.201
10	0,000	0.072	0.486
12	0,000	0.009	0.536

Actividad de Alcohol Oxidasa (U/mg) Ensayo 3

Tiempo (h)	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-Tg	GS115-22K
Ō	0.000	0.000	0,000	0.000
2	0.000	0.002	0,000	0.078
4	0.000	0.069	0.036	0.055
6	0.000	0.247	0.284	0,752
8	0.000	0.337	0,329	0.458
10	0.000	0.130	0.035	0.438
12	0.000	0.014	0.003	0.264

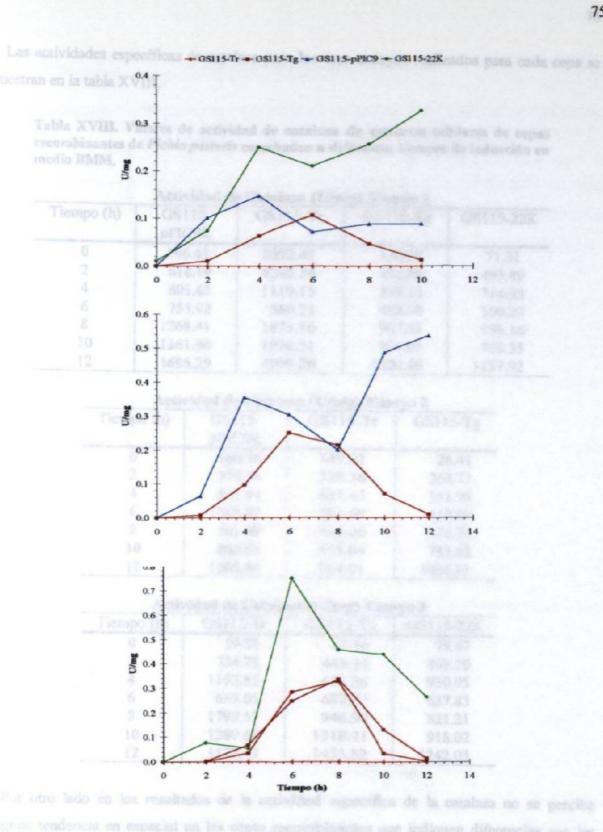


Figura 27. Actividad específica de la enzima AOX de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos. Se muestran los tres ensayos realizados. Cepa GS115-Tg (■), cepa GS115-Tr (♦), cepa GS115-pPIC9K (▲), cepa GS115-22K (●).

Las actividades específicas de catalasa para los tres ensayos realizados para cada cepa se muestran en la tabla XVIII.

Tabla XVIII. Valores de actividad de catalasa de extractos celulares de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a diferentes tiempos de inducción en medio BMM.

Actividad de Catalasa (U/mg) Ensayo	Actividad	d de (	Catalasa	(U/mg)	Ensavo	1
-------------------------------------	-----------	--------	----------	--------	--------	---

Tiempo (h)	GS115- pPIC9K	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-22K
0	166,41	2052,41	150,58	71.31
2	618,19	4260.34	401,88	493,89
4	803.65	1110,15	579,30	714.93
6	755.92	860.21	498.90	500.29
8	1268,41	1873.16	907,55	996.16
10	1361.96	1076.51	914.05	768.55
12	1686.29	4999,26	1200.46	1137,92

Actividad de Catalasa (U/mg) Ensayo 2

Tiempo (h)	GS115-	GS115-Tr	G\$115-Tg
	pPIC9K		
0	100.26	349.31	26,41
2	370.36	339.36	263.73
4	841.94	631,45	511.95
6	1088. <b>82</b>	561.69	419,89
8	761.39	535.06	578.74
10	866.65	455.04	783.62
12	1208.86	584.91	1096.81

Actividad de Catalasa (U/mg) Ensayo 3

Tiempo (h)	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-22K
0	19.28	17.10	78.67
2	724.78	443,14	809.50
4	1193.55	688.36	930.05
6	63 <b>7.05</b>	687.57	637,83
8	1799.57	946.90	821,21
10	1289.69	1318.41	918.02
12	1177.43	1455.82	1242.03_

Por otro lado en los resultados de la actividad específica de la catalasa no se percibe ninguna tendencia en especial en las cepas recombinantes que indiquen diferencias con las cepas control. Las gráfica de actividad específica de catalasa vs tiempo se muestra en la figura 28.

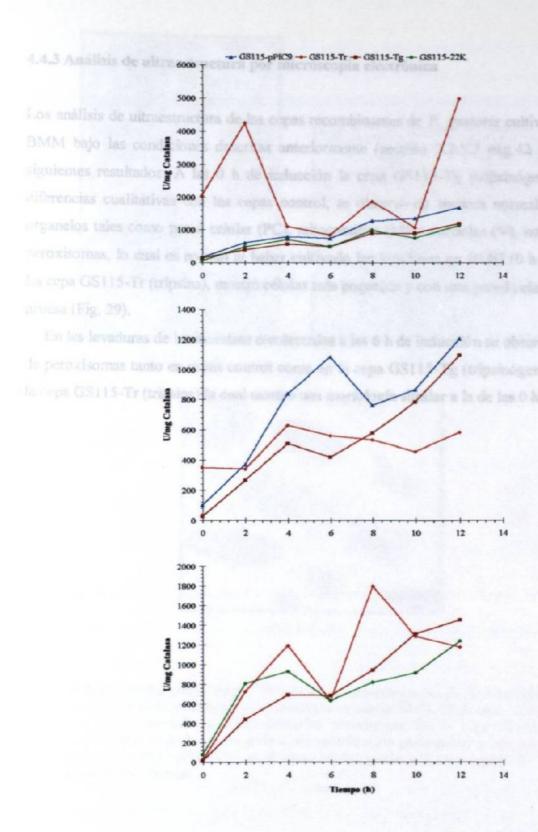


Figura 28. Actividad específica de la enzima catalasa de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos. Se muestran los tres ensayos realizados. Cepa GS115-Tg (■), cepa GS115-Tr (♦), cepa GS115-pPIC9K (♠), cepa GS115-22K (♠).

#### 4.4.3 Análisis de ultraestructura por microscopia electrónica

Los análisis de ultraestructura de las cepas recombinantes de *P. pastoris* cultivadas en medio BMM bajo las condiciones descritas anteriormente (sección 3.3.5.2 pag.42) muestran los siguientes resultados: A las 0 h de inducción la cepa GS115-Tg (tripsinógeno) no mostró diferencias cualitativas con las cepas control, se observó de manera normal los diferentes organelos tales como pared celular (PC), mitocondrias (M) y vacuolas (V), no se observaron peroxisomas, lo cual es normal al haber cultivado las levaduras en BMG (0 h de inducción). La cepa GS115-Tr (tripsina), mostró células más pequeñas y con una pared celular mucho más gruesa (Fig. 29).

En las levaduras de las muestras recolectadas a las 6 h de inducción se observó la presencia de peroxisomas tanto en cepas control como en la cepa GS115-Tg (tripsinògeno), no así para la cepa GS115-Tr (tripsina) la cual mostró una morfología similar a la de las 0 h.

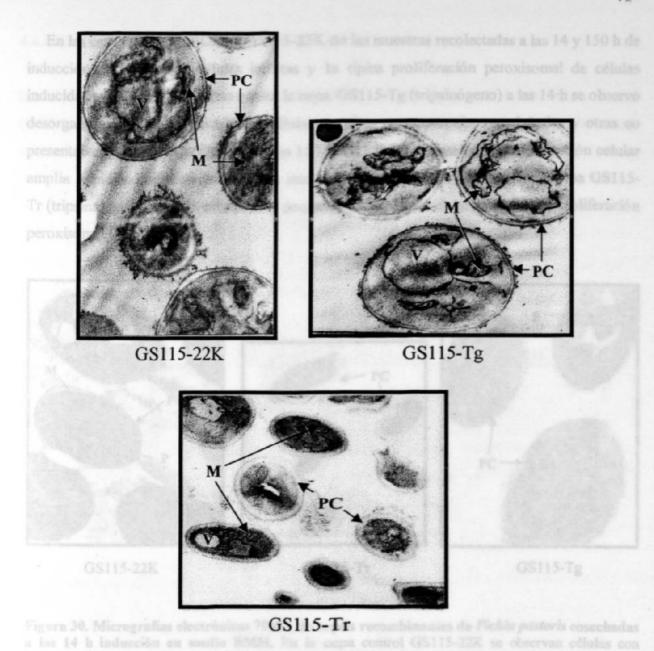


Figura 29. Micrografías electrónicas 7000X de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a las 0 h inducción es decir durante su crecimiento en medio BMG. En la cepa control GS115-22K, se observan células normales y sin proliferación peroxisomal. En la cepa GS115-pPIC9KTr, se observan células más pequeñas de lo normal, sin proliferación peroxisomal y una muy gruesa pared celular. En la cepa GS115-pPIC9KTg, se observan células iguales a la cepa control. PC: Pared celular, M: Mitocondria y V: Vacuola.

En las cepas GS115-pPIC9K y GS115-22K de las muestras recolectadas a las 14 y 150 h de inducción se observaron células intactas y la típica proliferación peroxisomal de células inducidas con metanol, mientras que en la cepa GS115-Tg (tripsinógeno) a las 14 h se observó desorganización celular. En algunas células se observaron peroxisomas dañados y otras no presentaban peroxisomas (Fig. 30). A las 150 h las células mostraban desorganización celular amplia impidiendo distinguir organelos intactos incluyendo peroxisomas. En la cepa GS115-Tr (tripsina) se observaron células muy pequeñas, con pared celular gruesa y sin proliferación peroxisomal (Fig. 30).

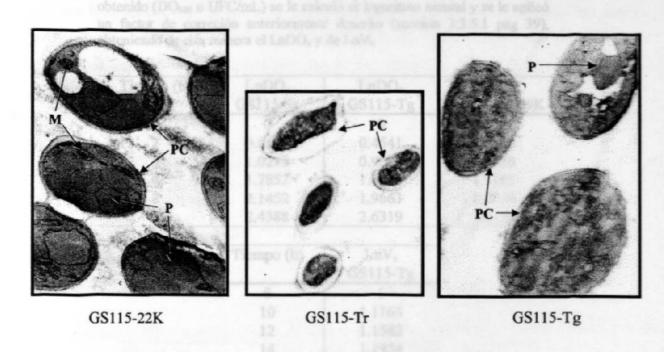


Figura 30. Micrografías electrónicas 7000X de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a las 14 h inducción en medio BMM. En la cepa control GS115-22K se observan células con morfología intacta y la típica proliferación peroxisomal de células inducidas con metanol. En la cepa GS115-pPIC9KTr, se observan células más pequeñas de lo normal, sin proliferación peroxisomal y una pared celular muy gruesa. En la cepa GS115-pPIC9KTg, se observan células dañadas, desorganización celular y ausencia de proliferación peroxisomal. P: Peroxisoma, PC: Pared celular, M: Mitocondria.

Las células de GS115-Tr (tripsina) no presentaron muchas diferencias ultraestructurales entre las 0, 6, 14 y 150 h de inducción. Esto en conjunto con previos estudios de cinéticas de crecimiento y actividad de alcohol oxidasa, conduce a pensar que estas cepas permanecieron en un estado de latencia durante la inducción.

#### 4.4.4 Cinéticas de crecimiento en medio BMG

Las cinéticas de crecimiento de las cepas GS115-Tr, GS115-Tg y GS115-pPIC9K en medio BMG (condiciones de mo inducción) estimadas tanto por DO<sub>600</sub> como UFC/mL, arrojaron los valores de LnDO<sub>c</sub> vs tiempo y de LnV<sub>c</sub> vs tiempo mostrados en la tabla XIX.

Tabla XIX. Valores de LaDO<sub>e</sub> y de LaV<sub>e</sub> para cada tiempo obtenidos durante las cinéticas de crecimiento en medio BMG. Cada valor es el promedio de tres valores de LaDO<sub>e</sub> o de LaV<sub>e</sub>. Al valor originalmente obtenido (DO<sub>600</sub> o UFC/mL) se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de correción anteriormente descrito (sección 3.3.5.1 pag 39), obteniendo de esta manera el LaDO<sub>e</sub> y de LaV<sub>e</sub>.

Tiempo (h)	LnDOc	LnDOc	LnDOc
	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-pPIC9K
0	0	0	0
2	0.6138	0,4541	0.3746
4	1.0233	0.9019	0.9720
6	1.7852	1.3823	1.3155
8	2.1452	1.9663	1.9049
10	2.4388	2.6319	3,0170

Tiempo (h)	LnV <sub>e</sub> GS115-Tg
	1
10	1.1163
12	1,1582
14	1.1954

Tiempo (h)	LuV <sub>e</sub> GS115-Tr
	1
3	0.9777
4	1.0030
5	1,0020
7	1,0398
8	1,0727
10	1.0518
23.25	1.2207
25.25	1,2321
28.25	1,2539

Las cinéticas de crecimiento en medio BMG mostraron que existen diferencias en las velocidades específicas de crecimiento y por lo tanto en el tiempo de duplicación entre las cepas recombinantes GS115-Tg y GS115-Tr, y a su vez de éstas con la cepa control GS115-pPIC9K. El tiempo de duplicación de la cepa GS115-Tg es 1.05 veces mayor que el de la cepa control GS115-pPIC9K (p<0.05), mientras que el tiempo de duplicación de la cepa GS115-Tr es 1.43 veces mayor que el de la cepa control y 1.37 veces mayor que el de la cepa GS115-Tg (p<0.01). Las velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación de estas cepas en medio BMG se muestran en la tabla XX. Reportes anteriores en la literatura (11) indican que aún bajo estas condiciones de no inducción, existe una expresión basal de los genes heterólogos los cuales están controlados por el promotor de AOX1. La diferencia percibida en velocidades específicas de crecimiento podría ser efecto de los productos heterólogos sintetizados a causa de esta expresión basal.

Tabla XX. Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMG. Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar (n = 3). ND: No determinado. Literales diferentes indican diferencias significativas con p<0.01 en las comparaciones con GS115-C2B4 de los valores obtenidos por DO<sub>600</sub> y p<0.05 para los demás.

	Tiempo de duplicación (h)				
Cepas	D.O.	UFC/mL			
GS115-Tr	3.48 ± 0.02*	2.99 ± 0.45			
GS115-Tg	$2.54 \pm 0.02^{b}$	1.54 ± 0.40 b			
GS115-pPIC9K	2.43 ± 0.07 °	ND			
	Velocidad específica de crecimiento (h <sup>-1</sup> )				
GS115-Tr	0.199 ± 0.001*	0.235 ± 0.039°			
GS115-Tg	$0.273 \pm 0.002^{b}$	$0.475 \pm 0.14^{6}$			
GS115-pPIC9K	0.286 ± 0.008°	ND			

#### 4.4.5 Cinéticas de crecimiento en medio BMM suplementado con sorbitol (BMM + S)

Las cinéticas de crecimiento de las cepas GS115-Tg, GS115-Tr y GS115-pPIC9K en medio BMM suplementado con sorbitol estimadas tanto por DO<sub>600</sub> como UFC/mL, arrojaron los valores de LnDO<sub>c</sub> va tiempo mostrados en la tabla XXI y los valores de LnV<sub>c</sub> va tiempo mostrados en la tabla XXII.

Tabla XXI. Valores de logaritmos naturales de DO<sub>600</sub> corregidos (LnDO<sub>c</sub>) de los tres ensayos realizados para cada cepa y a cada tiempo. Al valor de DO<sub>600</sub> originalmente obtenido se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de corrección anteriormente descrito (sección 3.3.5.1 pag 39), obteniendo de esta manera el LnDO<sub>c</sub>.

	Lnl	LnDOc GS115-Tr			LnDO <sub>c</sub> GS115-Tg			LnDO, GS115-pPIC9K		
Tiempo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	
_ (h <u>)</u>	1	_ 2	3	<u> </u>	_2	3	<u>l</u>	2	3_	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	0.4112	0.5735	0.5085	0.1595	0.1769	0.2679	0.3039	0.2716	0.2968	
4	0,8989	1.0275	0.8641	0.2324	0.3540	0.4014	0,4480	0.3991	0,4533	
6	1,1707	1.2722	1,2434	0.3378	0.5300	0.5918	0.6822	0.6803	0.6557	
10	2.0126	2.1226	2.1999	0.2900	0.5550	0.5370	1.1731	1.1782	1.1084	
14	2,8612	2.9496	2,7711	0.4023	0.6604	0.6116	1.5650	1.4658	1.5581	
16	<u>3.1766</u>	3,3301	2.9503	0.4747	0.7038	0.7051	1.6065	1,5118	1.6776	

Tabla XXII. Valores de logaritmos naturales de UFC/mL corregidos (LnV<sub>c</sub>) de los tres ensayos realizados para cada cepa y a cada tiempo. Al valor de UFC/mL originalmente obtenido se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de corrección anteriormente descrito (sección 3.3.5.1 pag 39), obteniéndose de esta manera el LnV<sub>c</sub>.

	LaV, GS115-Tr			LnV <sub>e</sub> GS115-Tg			LaV <sub>e</sub> GS115-pPIC9K		
Tiempo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Елѕауо	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Ensayo	Eosayo
(h)	1	<u> </u>	3	I	2	3	<u> </u>	2	3
0	0	0	Ö	0	0	0	0	0	0_
2	1.2536	1.0799	1.0371	0.3675	0.1709	0,3568	0.6194	0.3621	-0.0793
4	1.4937	1.2327	1.5937	-0.3027	-0.0974	-0.9171	0.7817	0.5034	0.2078
6	2.2201	1.7079	1.7576	-1.3863	-1.3101	-0.8401	0.7302	0.7298	0,4558
10	3,3851	2.8250	2,7085	-2.5543	-2.4265	-2.7668	0,7817	1.0734	0,3533
14	3.9805	3.6381	3.4147	-2.6676	-2.7317	-2.6000	1.6882	2.3494	1,1735
_16	4.2777	3.7105	3,4016	-2. <u>14</u> 84	-2.3505	1.9457	1.3555	2.1161	_1,3477_

En base a los resultados mostrados en las tablas XXI y XXII se construyeron las gráficas mostradas en la figura 31 y se calcularon las velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación mostrados en la tabla XXIII.

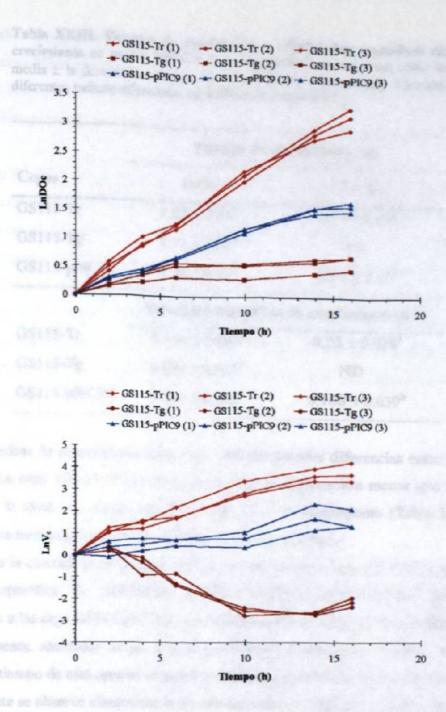


Figura 31. Cinéticas de crecimiento de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* en medio BMM suplemantado con sorbitol. La gráfica superior fue construida con mediciones de DO<sub>600</sub> mientras que la gráfica inferior fue construida con determinaciones de UFC/mL. El eje de la ordenadas muestra los valores de LnDO<sub>c</sub> (gráfica superior) y LnV<sub>c</sub> (gráfica inferior) mientras que el eje de las abscisas muestra los valores de tiempo en horas. El color café (■) representa a la cepa GS115-Tg, el color rojo (◆) a la cepa GS115-Tr, y el color azul (▲) a la cepa GS115-pPIC9K.

Tabla XXIII. Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMIM + S. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar (n = 3). ND: No determinado. Literales diferentes indican diferencias significativas con p<0.01.

	Tiempo de duplicación (h)				
Cepas	D.O.	UFC/mL			
GS115-Tr	3.52 ± 0.01*	2,79 ± 0.27			
GS115-Tg	8.73 ± 3.02 <sup>b</sup>	ND			
GS115-pPIC9K	$6.36 \pm 0.12^{b}$	$6.95 \pm 2.17^{6}$			
	Velocidad específic	a de crecimiento (h <sup>-1</sup> )			
GS115-Tr	0.197 ± 0.008*	0.25 ± 0.024*			
GS115-Tg	0.0 <b>79</b> ± 0.022 <sup>b</sup>	ND			
GS115-pPIC9K	$0.109 \pm 0.002^{b}$	0.108 ± 0.039 <sup>b</sup>			

Estas cinéticas de crecimiento indican que existen grandes diferencias entre las tres cepas estudiadas. La cepa GS115-Tr presentó un tiempo de duplicación menor que el de la cepa control, por lo tanto una mayor velocidad específica de crecimiento (Tabla XXIII), y este crecimiento se mantuvo constante durante las 16 h de la cinética.

Al realizar la cinética de crecimiento DO<sub>600</sub> vs tiempo de la cepa GS115-Tg se observó una velocidad específica de crecimiento (Tabla XXIII) estadísticamente sin diferencias significativas a las cepa GS115-pPIC9K, pero a diferencia de éstas alcanzó la fase estacionaria más rápidamente, alrededor de las 6 h. Sin embargo al realizar la cinética de crecimiento UFC/mL vs tiempo de esta cepa se observó crecimiento solamente en las primeras dos horas y posteriormente se observó claramente la muerte del cultivo (Figura 31, gráfica inferior). Como ya se había mencionado en una sección anterior el análisis por DO<sub>600</sub> no es confiable debido a que dichos valores fueron las suma de las levaduras vivas y muertas.

# 4.5 Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinantes

## 4.5.1 Detección de transcritos por RT-PCR

El análisis de RT-PCR de las cepas recombinantes de *P. pastoris* cultivadas bajo condiciones de inducción en medio BMM arrojó los siguientes resultados: Para la cepa GS115-Tr no fue posible detectar el transcrito específico esperado de 1183 pb. Para la cepa GS115-Tg se detectó el transcrito específico esperado de 1225 pb aunque la banda en el gel de agarosa se presentó de manera tenue. También se detectó el transcrito específico para cada una de la cepas control GS115-22K y GS115-pPIC9K de 1060 y 493 pb, respectivamente. Los transcritos correspondientes al gen de *AOX1* de 2107 pb no fueron detectados para ninguna cepa. En la figura 32 se observa una electroforesis en gel de agarosa que muestra los resultados descritos.

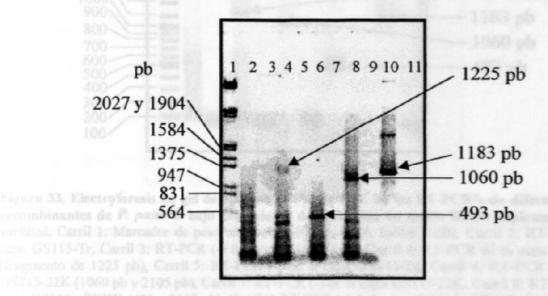


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de las RT-PCR's de diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris* a las 6 h de inducción en medio BMM. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: RT-PCR de la cepa GS115-Tr, Carril 3: RT-PCR (-) de la cepa GS115-Tr, Carril 4: RT-PCR de la cepa GS115-Tg (fragmento de 1225 pb), Carril 5: RT-PCR (-) de la cepa GS115-Tg, Carril 6: RT-PCR de la cepa GS115-pPIC9K (493 pb). Carril 7: RT-PCR (-) de la cepa GS115-pPIC9K, Carril 8: RT-PCR de la cepa GS115-22K (1060 pb), Carril 9: RT-PCR (-) de la cepa GS115-22K, Carril 10: PCR del plásmido pPIC9Tr, Carril 11: PCR (-).

Los resultados del análisis de RT-PCR de las cepas de *P. pastoris* cultivadas en medio BMM suplementado con sorbitol son los siguientes: Para la cepa GS115-Tr no fue posible detectar el transcrito específico esperado de 1183 pb, mientras que para las demás cepas si fueron detectados los transcritos específicos, para la cepa GS115-Tg de 1225 pb, para la cepa GS115-22K de 1060 pb y para la cepa GS115-pPIC9K de 493 pb. Los transcritos correspondientes al gen de *AOX1* de 2107 pb fueron detectados solamente para las cepas control (GS115-22K y GS115-pPIC9K). En la figura 33 se observa una electroforesis en gel de agarosa que muestra los resultados descritos.

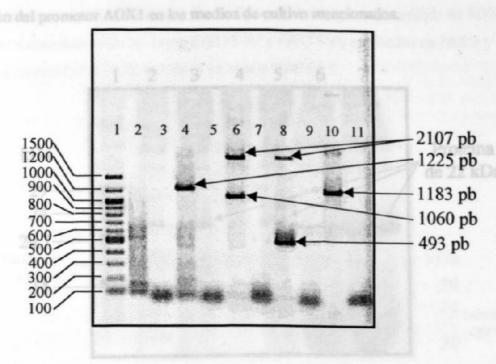


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de las RT-PCR's de diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris* bajo condiciones de inducción en medio BMM suplementado con sorbitol. Carril 1: Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder NEB), Carril 2: RT-PCR de la cepa GS115-Tr, Carril 3: RT-PCR (-) de la cepa GS115-Tr, Carril 4: RT-PCR de la cepa GS115-Tg (fragmento de 1225 pb), Carril 5: RT-PCR (-) de la cepa GS115-Tg, Carril 6: RT-PCR de la cepa GS115-22K (1060 pb y 2105 pb), Carril 7: RT-PCR (-) de la cepa GS115-22K, Carril 8: RT-PCR de la cepa GS115-pPIC9K (493 y 2105 pb), Carril 9: RT-PCR (-) de la cepa GS115-pPIC9K, Carril 10: PCR del plásmido pPIC9Tr (1183 pb), Carril 11: PCR (-).

Al realizar el arálisis de SDS-PAGE de los tres mantes de cuntro de las lecturos de con la cepa GS115-Tg no fue posible detectar una banda probable de tripsinógeno (Fig. 35), sin embargo cuando se realizó la immunodetección por la técnica de Western biot, se obtuvo un resultado positivo (Fig. 36), detectando el tripsinógeno en fermentaciones con el medio

## 4.5.2. Análisis de proteínas de fermentaciones a altas densidades celulares

Las fermentaciones con altas densidades celulares (DO<sub>600</sub> = 60 al iniciar la inducción) con tres diferentes medios de inducción: BMM, BMM suplementado con sorbitol y BMMY arrojaron los siguientes resultados: Para el caso de la cepa GS115-22K, los análisis por SDS-PAGE de medios de cultivo libre de células de los tres medios de cultivo estudiados mostraron una intensa banda de 22 kDa correspondiente a la proteína heteróloga esperada (Fig. 34). Al llevarse a cabo la producción de la proteína heteróloga de 22 kDa se demostró que no existió represión del promotor AOX1 en los medios de cultivo mencionados.

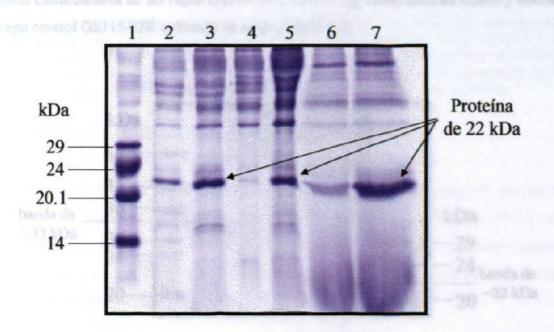


Figura 34. Electroforesis SDS-PAGE al 15% de proteínas exracelulares de fermentaciones con la cepa GS115-22K. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2 y 3: En medio BMM 12 y 24 h de inducción, Carril 4 y 5: En medio BMM suplemantado con sorbitol 12 y 24 h de inducción, Carril 6 y 7: En medio BMMY 12 y 24 h de inducción.

Al realizar el análisis de SDS-PAGE de los tres medios de cultivo de las fermentaciones con la cepa GS115-Tg no fue posible detectar una banda probable de tripsinógeno (Fig. 35), sin embargo cuando se realizó la inmunodetección por la técnica de Western blot, se obtuvo un resultado positivo (Fig. 36), detectando el tripsinógeno en fermentaciones con el medio

BMM suplementado con sorbitol, mientras que en los medios BMM y BMMY la inmunodetección resultó negativa.

El medio de cultivo libre de células de fermentaciones con la cepa GS115-Tr cultivada en medio BMM suplementado con sorbitol presentó una banda de tamaño aproximado a 33 kDa (tamaño similar al de la tripsina de camarón purificada de fuente natural 31 kDa) (Fig. 35) que no se observó en los otros medios de cultivo ni en las cepas control. Sin embargo la inmunodetección por Western blot resultó negativa (Fig. 36).

La cepa GS115-pPIC9K no mostró patrones electroforéticos significativamente diferentes en los diferentes medios empleados. En la figura 35 se muestra un análisis de SDS-PAGE de proteínas extracelulares de las cepas GS115-Tr y GS115-Tg cultivadas en BMM y BMM + S y la cepa control GS115-22K cultivada en medio BMM + S.

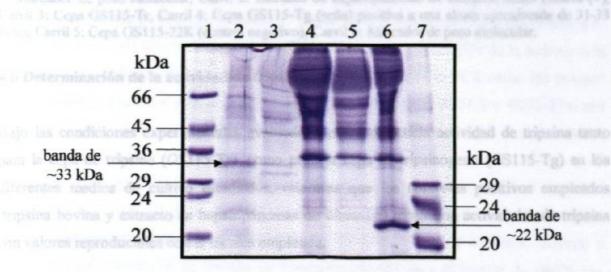


Figura 35. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de proteínas exracelulares de fermentaciones de diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2 y 3: Cepa GS115-Tr a las 24 h de inducción en medio BMM suplementado con sorbitol y BMM respectivamente, Carril 4 y 5: Cepa GS115-Tg a las 24 h de inducción en medio BMM suplementado con sorbitol y BMM respectivamente. Carril 6: Cepa GS115-22K a ls 24 h de inducción en medio BMM suplementado con sorbitol.

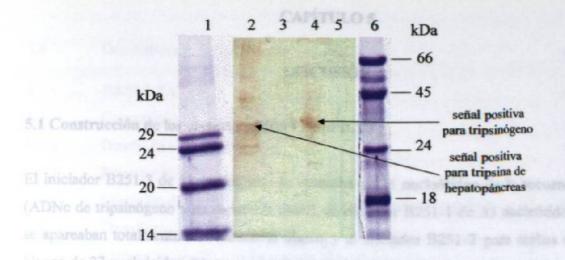


Figura 36. Western blot de medios de cultivo libre de células de fermentaciones a altas densidades celulares con las cepas GS115-Tg y GS115-Tr a las 48 h de inducción en medio BMM + S. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Extracto de hepatopáncreas de camarón como control (+), Carril 3: Cepa GS115-Tr, Carril 4: Cepa GS115-Tg (señal positiva a una altura aproximada de 31-33 kDa), Carril 5: Cepa GS115-22K (control negativo), Carril 6: Marcador de peso molecular.

#### 4.6 Determinación de la actividad de tripsina

Bajo las condiciones experimentales evaluadas no fue detectada actividad de tripsina tanto para la cepa de tripsina (GS115-Tr), como para la cepa de tripsinógeno (GS115-Tg) en los diferentes medios de cultivo estudiados, mientras que los controles positivos empleados (tripsina bovina y extracto de hepatopáncreas de camarón) mostraron actividades de tripsina con valores reproducibles con la técnica empleada.

libera un fragmento de 36 pis y del sa sense esperante de compara de la compara de la

#### CAPÍTULO 5

## DISCUSIÓN

## 5.1 Construcción de los vectores pPIC9Tr y pPIC9Tg

El iniciador B251-3 de 32 nucleótidos se apareaba en 23 mucleótidos de la secuencia blanco (ADNc de tripsinógeno y su secuencia señal), el iniciador B251-1 de 33 nucleótidos, solo 22 se apareaban totalmente a la secuencia blanco y el iniciador B251-2 para ambas secuencias blanco de 27 nucleótidos, 24 se apareaban totalmente. Los nucleótidos sin complementariedad correspondían a sitios de restricción o bien parte de la secuencia del factor α de *S. cerevisiae* que debian incluirse de acuerdo a la estrategia de construcción descrita en material y métodos. Cada iniciador se diseñó para que al menos 17 nucleótidos se aparearan de manera continua en su extremo 3' lo cual favorecía la amplificación debido a que la extensión de la cadena en la PCR ocurre en dirección del extremo 3'. Tanto la simulación de la PCR como los ensayos reales resultaron positivos para una banda de 738 pb (iniciadores B251-3 y B251-2) o una banda de 780 pb (iniciadores B251-1 y B251-2), corroborando con esto que el diseño de los iniciadores fue correcto.

Para realizar la clonación de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno en pPIC9 se empleó el vector pPIC9hGH22K debido a que al digerir con las enzimas de restricción Xho I y Avr II se obtenía exactamente el mismo esqueleto al del vector pPIC9 digerido con estas enzimas y además con pPIC9hGH22K se liberaba un fragmento de 603 pb a diferencia de pPIC9 que libera un fragmento de 36 pb, y así se podía comprobar la digestión completa. También esta estrategia permitió realizar una mejor purificación del esqueleto del plásmido por la técnica del "Geneclean" ya que era posible distinguir entre el vector digerido con una sola enzima (digestión parcial) y el vector digerido con ambas (digestión completa), y así con un bisturí obtener la porción de agarosa correspondiente a la banda del vector digerido con ambas enzimas y posteriormente realizar la técnica de "Geneclean". Con la técnica de "Geneclean" fue posible purificar el vector digerido con las enzimas de restricción Xho I y Avr II y los productos amplificados digeridos con las mismas enzimas. Todas las colonias que se analizaron para identificar la presencia del plásmido de interés después de la transformación

3.4	Determinación de la actividad de tripsina	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Construcción de los vectores	53
4.1.1	Diseño de oligonucleótidos	53
4.1.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
4.1.3	Clonación de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno en pPIC9	58
4.2	Transformación en Pichia pastoris	61
4.3	Caracterización de genotipos y fenotipo de las clonas	
	recombinantes	62
4.3.1	Verificación de la integración del vector de expresión	62
4.3.2	Inducción de la expresión de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno	65
4.4	Determinación de los posibles factores que afectan la producción	
	de las proteina de interés	68
4.4.1	Cinéticas de crecimiento en medio BMM	68
4.4.2	Determinación enzimática de alcohol oxidasa y catalasa	73
4.4,3	Análisis de ultraestructura por Microscopia Electrónica	78
4.4.4	Cinéticas de crecimiento en medio BMG	81
4.4.5	Cinéticas de crecimiento en medio BMM suplementado con	
	sorbitol (BMM + S)	83
4.5	Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la	
	biosíntesis de los productos recombinantes	86
4.5.1	Detección de transcritos por RT-PCR	86
4.5.2	Análisis de proteínas de fermentaciones a altas densidades	
	celulares	88
4.6	Determinación de la actividad de tripsina	90
5	DISCUSIÓN	91
5.1	Construcción de los vectores pPIC9Tr y pPIC9Tg	91
5.2	Transformación de P. pastoris con los vectores pPIC9Tr v	

de células de *E. coli* con los productos de ligación resultaron positivas al poseer el plásmido de interés, lo que evidenció que los procedimientos realizados fueron eficientes.

La integridad de los plásmidos construidos pPIC9Tg (portador del ADNc de tripsinógeno) y pPIC9Tr (portador del ADNc de tripsina) fue corroborada mediante la digestión de éstos con la endonucleasa *Pst* I. Los tamaños de cada uno de los fragmentos obtenidos con estas digestiones correspondieron a los tamaños teóricos obtenidos por el programa *DNA Strider I.I.*, además con esta digestión fue posible diferenciar entre los plásmidos pPIC9Tg, pPIC9Tr y pPIC9hGH22K debido a que cada uno éstos presentó un producto de digestión distintivo. El pPIC9Tg de 710 pb, el pPIC9Tr de 668 pb y el pPIC9hGH22K de 365 pb.

#### 5.2 Transformación de P. pastoris con los vectores pPIC9Tr y pPIC9Tg

Al realizar la transformación de la cepa GS115 (His') de *P. pastoris* con los vectores de integración pPIC9Tr o pPIC9Tg digeridos con *Sac* I o *Sal* I y la selección de clonas mediante un cultivo en placa en medio mínimo sin histidina se obtuvieron aproximadamente 500 colonias para cada transformación.

Debido a que el plásmido confiere la capacidad de crecer en un medio mínimo sin histidina (His<sup>+</sup>) a las células de *P. pastoris* este primer proceso de selección indica que el plásmido fue integrado en el genoma salvo muy raros eventos de conversión de His<sup>-</sup> a His<sup>+</sup>.

## 5.3 Caracterización de genotipos y fenotipos de cepas recombinantes

## 5.3.1 Verificación de la integración de los vectores de expresión

La integración del vector pPIC9Tg fue corroborada en una clona obtenida de la transformación del vector digerido con Sal I (integración en el locus his4) y en otra obtenida de la transformación del vector digerido con Sac I (integración en el locus AOXI) al llevar a cabo la PCR y obtener dos productos amplificados de 1225 y 2105 pb (correspondientes al vector recombinante y al gen AOXI respectivamente), mientras que al llevar a cabo el análisis de

PCR de cuatro clonas para comprobar la integración de pPIC9Tr por la misma metodología: 2 obtenidas de la transformación del vector digerido con Sac I, presentaron solo un producto amplificado de transformación del vector digerido con Sac I, presentaron solo un producto amplificado de 1183 pb identificado por una banda tenue en un gel de agarosa al 1% (correspondiente al vector recombinante), el fragmento de 2105 pb proveniente del gen AOXI no fue detectado. Inicialmente se pensó que el gen heterólogo o su producto ocasionaba alguna alteración en la célula, debido a que al realizar el aislamiento de ADN genómico se presentaron mayores dificultades con estas cepas (GS115-Tr) que con las demás cepas analizadas (GS115-Tg, GS115-22K y GS115-pPIC9) por ejemplo, se obtenía menor cantidad de ADN genómico debido a que fueron más dificil de lisar dichas células. También se pensó que estas alteraciones afectaban la eficiencia de la PCR por lo que dificilmente se obtenía una sola banda y muy tenue.

#### 5,3.2 Inducción de la expresión de los ADNc's heterólogos

La banda de ~33 kDa detectada en los análisis de proteínas extracelulares realizados por SDS-PAGE de fermentaciones (medio BMM) con las cepas GS115-Tr se pensó que se trataba de tripsina de camarón recombinante por su tamaño similar a la tripsina de camarón aislada de fuente natural 31 kDa además de que esta banda estuvo ausente en el patrón de proteínas extracelulares de las cepas control. El resultado negativo en la inmunodetección para esta banda (~33 kDa) sugiere dos posibilidades: La banda detectada por SDS-PAGE es tripsina recombinante, pero los patrones de glicosilación distintos de *P. pastoris* respecto a los del camarón impiden que ésta sea reconocida por los anticuerpos específicos, o bien que la banda (~33 kDa) no es tripsina sino otra proteína detectada por la alteración del metabolismo protéico en esta cepa recombinante. Los análisis de proteínas intracelulares solubles por SDS-PAGE de esta misma cepa cultivada bajo las mismas condiciones de inducción, confirman que existen alteraciones en el metabolismo protéico debido a que el patrón de bandas es claramente distintos al de la cepa control (GS115-pPIC9K), en el patrón de bandas de esta última se observó una banda gruesa e intensa correspondiente a la enzima alcohol oxidasa, la cual no fue observada en el patrón de las cepas GS115-Tr.

En cuanto a los análisis electroforéticos de proteínas intracelulares solubles de fermentaciones (medio BMM) con las cepas GS115-Tg, no se logró identificar el producto recombinante esperado, mientras que en los análisis de SDS-PAGE de medios de cultivo libre de células se observó una banda de un tamaño ~35 kDa, sin embargo en la cepa control fue detectada una banda con tamaño sirnilar, para cada caso el Western blot fue negativo.

Por otro lado, distintos reportes en la literatura (29, 30, 31, 32) han mencionado de las dificultades encontradas al tratar de producir tripsina de mamífero en forma recombinante, siendo los problemas más comunes: actividad protelítica contra proteínas endógenas del hospedero, inestabilidad de la proteína, autodigestión de tripsina, inadecuado plegamiento y degradación del producto recombinante por proteasas endógenas, de esta manera con los resultados obtenidos, se pensó que algunos de estos problemas podrían haber sucedido en las cepas recombinantes construidas impidiendo que se acumularan cantidades suficientes del producto recombinante (tripsina o tripsinógeno) para ser detectado tanto por SDS-PAGE como por Western blot.

Debido a esta situación, se plantearon dos estrategias a seguir: Determinar los posibles factores que afectaban la producción de tripsina y del tripsinógeno de camarón y realizar una búsqueda condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinantes.

## 5.4 Factores que afectan la producción de las proteínas de interés

#### 5.4.1 Cinéticas de crecimiento en BMM

En las gráficas de las cinéticas de crecimiento en medio BMM se observan grandes diferencias entre las dos cepas construidas (GS115-Tr y GS115-Tg) y también de éstas con respecto a las cepas control. La cepa GS115-Tr presentó inexplicablemente un tiempo de duplicación 1.72 y 1.98 veces menor (diferencia estadísticamente significativa p<0.05) a las dos cepas controles (GS115-22K y GS115-pPIC9 respectivamente). Sin embargo este aparente crecimiento se dio en un intervalo muy corto de tiempo y se alcanzó muy rápidamente la fase estacionaria tanto en las cinéticas evaluadas por DO<sub>600</sub> como UFC/mL. Por otro lado hasta las 16 h evaluadas no

se observó disminución de la viabilidad lo que sugiere que las células se encontraban en estado de latencia bajo las condiciones estudiadas.

La cinética de crecimiento de la cepa GS115-Tg evaluada por DO<sub>600</sub> muestra una velocidad específica de crecimiento (tabla XVI) estadísticamente sin diferencias significativas a la velocidad específica de crecimiento de las cepas control, pero a diferencias de éstas alcanzó la fase estacionaria más rápidamente, alrededor de las 6 h. Sin embargo la cinética de crecimiento evaluada por UFC/mL de esta cepa muestra claramente la muerte del cultivo. Esto indica que en este caso el análisis por DO<sub>600</sub> no es confiable debido a que dichos valores fueron las suma de las levaduras viables y no viables. Las cepas controles GS115-22K y GS115-pPIC9 a diferencias de las cepas problema, no alcanzaron la fase estacionaria durante las 16 h de inducción evaluadas, ni presentaron muerte celular. Con estos hallazgos se pensó en un posible efecto tóxico de los productos recombinantes sobre las células de *Pichia pastoris*.

#### 5.4.2 Determinación enzimática de alcohol oxidasa y catalasa

A pesar de que se realizaron tres ensayos para las determinaciones de las actividades de alcohol oxidasa y catalasa para cada cepa a diferentes tiempos, no fue posible obtener valores promedio debido a la gran variabilidad obtenida en la actividad de estas enzimas entre ensayos, por lo cual no fue posible establecer una comparación de este parámetro entre las cepas construidas y las cepas control, sin embargo se observaron ciertas tendencias repetitivas entre ensayos. Una de ellas bastante contundente, fue que las cepa GS115-Tr no presentó actividad de alcohol oxidasa a ningún tiempo estudiado. Este resultado nos conduce al siguiente razonamiento: Debido a que la alcohol oxidasa es la única enzima responsable de iniciar la degradación del metanol para adquirir energía, y el metanol era la única fueme de carbono y energía disponible en el medio BMM, la ausencia de actividad de alcohol oxidasa indica la incapacidad de esta cepa de adquirir energía para cualquier actividad metabólica que requiera, razón por lo que estas cepas se mostraron en estado de latencia durante las cinéticas de crecimiento en medio BMM.

Con la cepa GS115-Tg se observó otra tendencia repetitiva: La actividad de AOX incrementó en las primeras horas de inducción de manera similar a las cepas control hasta las 6-8 h, pero posteriormente disminuyó notoriamente hasta niveles cercanos a cero, fenómeno no observado en las cepas control. Con estos resultados se cree que el incremento de la actividad de AOX durante las primeras horas le permitió a la célula poseer energía para realizar todas las tareas celulares incluyendo la producción de tripsinógeno y este último desencadenó la muerte celular observada en las cinéticas de crecimiento evaluadas por UFC/mL. Los resultados de ultraestructura por Microscopía Electrónica discutidos en la siguiente sección reforzaron los fenómenos hipotéticos planteados para las cepas GS115-Tr y GS115-Tg.

Los resultados de actividad de catalasa fueron muy variables por lo cual no fue posible establecer una comparación de este parámetro entre las cepas construidas y las cepas control y además no fue posible observar alguna tendencia repetitiva.

#### 5.4.3 Análisis de ultraestructura por Microscopía Electrónica

Las cepa GS115-Tr mostró una ultraestructura celular muy diferente a las demás cepas estudiadas y sin cambio considerable a los diferentes tiempos de inducción evaluados (0, 6, 14 y 150 h). La ausencia de proliferación peroxisomal durante la inducción está en concordancia con los datos de ausencia de actividad de AOX1, enzima que se ensambla como octámero en los peroxisomas. Además, el hecho de que no presentó cambios en su ultraestructura durante el tiempo de inducción es una prueba más de que estas celulas se encontraban en un probable estado de latencia.

La cepa GS115-Tg cultivada en medio BMM no mostró diferencias a las 0 h en su ultraestructura celular con la mostrada por las cepas control, a las 6 h se observaron peroxisomas de igual manera que en las cepas control, mientras que a las 14 y 150 h de inducción mostraron daño y desorganización celular, fenómeno no observado en las cepas control. A pesar que la muerte celular de las cepa GS115-Tg comienza casi de manera inmediata de acuerdo a las cinéticas al iniciar la inducción en medio BMM y que la

disminución de actividad de AOX se observa a partir de las 6-8 h, los daños en la ultraestructura celular son evidentes solo hasta las 14 h de inducción.

Estos fenómenos de muerte celular, disminución de actividad de AOX, desorganización y daño celular probablemente sea ocasionado por la proteólisis de proteínas endógenas, entre las que se encuentra el monómero de la alcohol oxidasa, por el producto recombinante (tripsinógeno) o el producto recombinante activado (tripsina), producidos durante la inducción del ADNc de tripsinógeno.

#### 5.4.4 Cinéticas de crecimiento en medio BMG

Los resultados de las cinéticas de crecimiento en medio BMG indican que la velocidad específica de crecimiento de la cepa GS115-Tr fue menor que la cepa control (GS115-pPIC9), mientras que la cepa GS115-Tg mostró una ligera diferencia (menor) en el crecimiento que el mostrado por la cepa control. Anteriores reportes en la literatura (11) indican que aún bajo estas condiciones de no inducción, existe una expresión basal de los genes heterólogos los cuales están controlados por el promotor de *AOXI*. La diferencia percibida en velocidades específicas de crecimiento podría ser efecto de los productos heterólogos sintetizados a causa de esta expresión basal.

#### 5.4.5 Cinética de crecimiento en medio BMM +S

Las cinéticas de crecimiento en medio BMM + S indican que existen grandes diferencias entre las tres cepas estudiadas. La cepa GS115-Tr presentó un mayor crecimiento que la cepa control, manteniéndose el crecimiento constante durante las 16 h de la cinética. El crecimiento superior de la cepa GS115-Tr sobre el de la cepa control no tiene una explicación lógica debido a que es improbable que solo el efecto del gen heterólogo origine dicha diferencia.

Con este resultado se puede recapitular que estas cepas presentan una velocidad específica de crecimiento distinta en todos los medios empleados con respecto a la cepa control, además de presentar una ultraestructura muy distinta a las cepas control a todos los tiempos de

inducción estudiados. A pesar de tener una morfología de colonia igual a las cepas de P. pastoris y crecer en un medio mínimo sin histidina como las cepas transformadas, se cree que esta cepa tiene alteraciones genéticas que influyen en sus características fisiológicas.

La gráfica de las cinética de crecimiento en medio BMM + S de la cepa GS115-Tg indica que hay muerte celular tal como lo hay en el medio BMM, sin embargo la fase de muerte celular en BMM + S inicia alrededor de 2 h después respecto a la iniciado en BMM, lo que indica que el sorbitol ayuda ligeramente en la viabilidad celular pero no impide la muerte celular. Estos resultados sugieren que el probable efecto negativo del producto heterólogo sobre las células de *P. pastoris* sea no solo sobre el metabolismo del metanol sino también sobre otros procesos vitales para la célula.

# 5.5 Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinante

## 5.5.1 Detección de transcritos por RT-PCR

Con el análisis de RT-PCR fue posible detectar el transcrito específico que codifica para tripsinógeno en las células de la cepa GS115-Tg bajo condiciones de inducción tanto en medio BMM como en BMM + S, así como también se detectó el transcrito específico para cada una de la cepas control GS115-22K y GS115-pPIC9K en ambos medios de cultivo. Los transcritos específicos detectados en las cepas recombinantes de *P. pastoris* cultivadas en BMM + S indican que el sorbitol añadido al medio de cultivo no reprimió la expresión de los genes beterólogos. El gen de tripsinógeno en las cepas GS115-Tg cultivadas en medio BMM o BMM + S se expresó y de esta manera se refuerza la hipótesis de que el fenómeno de muerte celular es ocasionado por la actividad del tripsinógeno recombinante sobre la célula.

Para la cepa GS115-Tr no fue posible detectar su transcrito específico (que codifica para tripsina) en ninguno de los medios empleados. Esta cepa presentó durante la mayoría de los estudios realizados grandes diferencias con las cepas control e incluso en muchas de las ocasiones presentó comportamientos inexplicables, por ejemplo presentó mejor crecimiento que las cepas control en medio BMM + S, pero sin embargo los transcritos no fueron

detectados cuando la cepa se cultivo en este medio. No presentó actividad de AOX bajo condiciones de inducción y su ultraestructura celular fue muy distinta a la de las demás cepas. El hecho de que no presentó proliferación peroxisomal, ni actividad de AOX concuerda con el hecho de que no fue posible amplificar la banda de 2105 correspondiente al gen de AOX. Estos resultados sugieren que no está presente el gen de AOX o bien sufrió una alteración durante la integración. El hecho de que las cuatro cepas GS115-Tr analizadas presentaron un fenotipo His<sup>†</sup> indica que la integración ocurrió debido a que el gen HIS4 del vector, complementó a la cepa GS115 que tiene inactivo este gen. Por otro lado en la literatura se menciona (9) que ocurren eventos de conversión his4 (incapaz de producir su propia histidina) a HIS4 (capaz de producir su propia histidina) y en estas cepas no se produce la proteína heteróloga, sin embargo estos eventos de conversión ocurren con una frecuencia muy baja (menor al 1%), por lo que se piensa que es improbable que en las cuatro cepas analizadas baya ocurrido dicho fenómeno. Se cree que ocurrió un evento raro de integración de alta frecuencia ocasionado probablemente por el gen heterólogo.

#### 5,5.2 Análisis de proteínas de fermentaciones de altas densidades celulares

En los geles de poliacrilamida la banda intensa correspondiente a la proteína de 22 kDa de la cepa GS115-22K fue observada en los tres medios de cultivo empleados (BMM, BMMY y BMM + S) es una prueba más de que no existió represión del promotor *AOXI* y además se llevó a cabo la traducción en los medios de cultivo mencionados.

La tripsina recombinante de camarón no fue detectada al cultivar la cepa GS115-Tr a altas densidades celulares en los medios de cultivo empleados. A pesar de que las cinéticas de crecimiento en medio BMM + S muestran un crecimiento sostenido de esta cepa no fue detectado el producto heterólogo, ni el transcrito correspondiente. Con este resultado se sostiene la hipótesis de que ocurrió un evento raro de integración afectando al gen de AOX y al gen heterólogo.

Para el caso de los medios de cultivo procedentes de las fermentaciones con altas densidades celulares en BMM+S de la cepa GS115-Tg una banda de apróximadamente 35 kDa fue positiva para la inmunodetección con anticuerpos específicos anti-tripsina de camarón. Es

importante enfatizar que los medios procedentes de las fermentaciones de la cepa control no dieron señal positiva para esta banda en el análisis por Western blot. Estos resultados muestran que el sorbitol añadido como fuente de carbono y energía adicional al medio BMM fue útil para aumentar la concentración de tripsinógeno recombinante a un nivel detectable por Western blot. Sin embargo los niveles producidos aún son muy bajos ya que apenas son detectables por Western blot y empleando altas densidades celulares al iniciar la inducción. En la literatura (45), se ha mencionado que el sorbitol es una de las fuentes de carbono que no reprimen al promotor de AOX, en este trabajo no solo a quedado confirmada esta aseveración (detección de transcritos específicos y proteína heteróloga) sino también fue observado que mejora el crecimiento de las cepas de *Pichia pastoris* respecto a cuando se emplea solamente metanol. Por lo tanto el sorbitol podría ser útil en otras fermentaciones que emplean este sistema de expresión, para mejorar el aumento de biomasa sin reprimir el promotor de AOX durante la fase de inducción. En el medio de cultivo BMM asi como con la adición de otras fuentes de energía como peptona y extracto de levadura no fue detectado el tripsinógeno en las cepas GS115-Tg.

# CAPÍTULO 6

#### **CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

En este trabajo se logró la construcción del vector pPIC9Tr, portador del ADNc de tripsina de camarón y del vector pPIC9Tg, portador del ADNc de tripsinógeno de camarón, los cuales contienen los elementos genéticos necesarios para su integración en el genoma de *P. pastoria* y su expresión heteróloga. Estos vectores se emplearon para construir cepas recombinantes de *P. pastoris* portadoras en su genoma del ADNc de tripsina (GS115-Tr) y de tripsinógeno (GS115-Tg) de camarón, los cuales fueron integrados bajo la regulación del promotor de *AOX1*.

Las cepas recombinantes construidas y cultivadas bajo condiciones habituales de inducción resultaron negativas en la producción de tripsina y tripsinógeno tras el análisis por SDS-PAGE o Western blot del medio de cultivo libre de células y la fracción protéica intracelular soluble.

Al realizar la búsqueda de los factores que afectaban la producción de tripsina o tripsinógeno se encontraron importantes diferencias entre las cepas construidas (GS115-Tr y GS115-Tg) y las cepas control (GS115-22K y GS115-pPIC9K).

La cepa GS115-Tr cultivada bajo las diversas condiciones en estudio presentó un comportamiento diferente respecto a las cepas control. Así bajo condiciones de inducción no se detectó actividad de AOX, ni la proliferación peroxisomal esperada y no fue posible detectar los transcritos específicos para tripsina y para AOX, así como el producto recombinante esperado. Estos resultados sugieren que el gen de AOX pudo haber sido afectado durante la integración lo cual pudo haber ocurrido por un evento de integración poco habitual.

Por otro lado, la cepa GS115-Tg mostró una serie de alteraciones durante la inducción tales como muerte celular, disminución de la actividad de AOX e importantes alteraciones ultraestructurales, bajo condiciones de no inducción dichas alteraciones no se presentaron La detección de transcritos y el producto heterólogo (tripsinógeno) en conjunto con los resultados antes descritos sugieren que las alteraciones de la cepa GS115-Tg bajo condiciones de inducción son provocadas por la producción a niveles bajos del producto heterólogo.

Con el empleo de sorbitol como fuente de carbono alterna al metanol y cultivos de altas densidades celulares se lograron determinar condiciones de cultivo que permitieron retrasar la muerte del cultivo en las cepas GS115-Tg, además de permitir la biosíntesis de tripsinógeno recombinante en cantidades detectables por western blot.

Los resultados obtenidos son comparables con los encontrados en la literatura donde se mencionan las dificultades encontradas al tratar de producir tripsina, tales como actividad proteolítica contra proteínas endógenas del hospedero, inestabilidad de la proteína, autodigestión de tripsina, etc. Por lo tanto las prespectivas de este trabajo son llevar a cabo la producción de análogos de tripsinógeno tal como se menciona recientemente en la literatura (29). Estos análogos contienen modificaciones en la secuencia del péptido líder del tripsinógeno que consisten en sustituir la secuencia del péptido líder natural por 2 a 6 aminoácidos diferentes de arginina o lisina. De esta manera el precursor de tripsina producido es inactivo y bastante estable a diferencia del precursor natural (tripsinógeno) por lo que no causa problemas a la cepa hospedero. Posterior a su producción el precursor inactivo producido es tratado con una aminopeptidasa para activarlo (29).

# CAPÍTULO 7

#### BIBLIOGRAFÍA

- Walsh, G., Headon, D.R. (1995). Protein Biotechnology. 1era Edición. Jhon Wiley and Sons. Chichetster, Nueva York, Brisbane, Toronto, Singapur.
- Cregg, J.M. (1999). Expression in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* en Gene expression systems. Fernandez, J.M., Hoejfler, J.P. Invitrogen Corporation. Carlsbad California.
- 3. Fernandez, J.M., Hoejfler, J.P. (1999). Introduction en Gene expression systems. Fernandez, J.M., Hoejfler, J.P. Invitrogen Corporation. Carlsbad California.
- 4. Sudbery, P.E. (1996). The expression of recombinant proteins in yeasts. Current Opinion in Biotechnology 7: 517-524.
- 5. Eckart, M.R., Bussineau, C.M. (1996). Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 525-530.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Rascke, W.C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 11, 905-910.
- 7. Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. y Gingeras, T.R. (1985). Isolation of Alcohol Oxidasa and two other methanol regulatable genes from the yeast, *Pichia pastoris. Mol. Cell. Biol.* 5, 111-1121
- Izquierdo-Rojo, M. (1993). Ingenieria Genética. Ediciones Pirámide S.A. Madrid, España.
- 9. Romanos, M.A. (1995). "Advances in the use of *Pichia pastoris* for high level gene expression". *Current Opinion in Biotechnology*, 6: 527-533.
- Creeg, J.M., Tschopp, J.F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W.S., Buckholz, R.G., Madden, K.R., Kellaris, P.A., Davis, G.R., Smily, B.L., Cruze, J., Torregrosa, R., Velicelebi, G., Thill, G.P. (1987). "High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*" *Biotechnology* 5, 479-485.
- 11. Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., Parker, K. (1989). "High-level expression,

- purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the thylotropphic yeast *Pichia pastoris*"; *Biochemestry* 28, 4117-4125.
- Digan, M.E., Laair, S.V., Brierly, R.A., Siegel, R.S., Williams, M.E., Ellis, S.B., Kellaris, P.A., Prorow, S.A., Craig, W.S., Velicelebi, G., Harpold, M.M., Thill, G.P. (1989). "Continuos Production of a novel lisezyme via secretion from the yeast"; *Pichia pastoris. Biotechnology* 7, 160-164.
- 13. Clare, J.J., Rayment, F.B., Bollantine, S.P., Sreekrishna, K., Romanos, M.A. (1991). 
  "High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene". *Biotechnology* 9, 455-460.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990). Molecular Cell Biology. Segunda Edición.
   Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, Nueva York.
- 15. Dayhoff, M.O. (1972). Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5 National Biomedical Research Foundation, Washington, DC.
- Hermodson M. A., Ericsson D. H., Neurath H., Walsh K. A. (1973) Determination of the amino acid sequence of porcine trypsin by sequenator analysis. Biochemistry 12, 3146-3153.
- 17. Gibson, R., Barker, P.L. (1979). The decapod hepatopancreas. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. 17, 285-346.
- 18. Zwilling, R., Neurath, H., Ericsson, L.H., Enfield, D.L. (1975). The amino-terminal sequence of an invertebrate trypsin (crayfish Astacus leptodactylus): homology with other serien proteases. *FEBS Lett.* 60, 247-249.
- 19. Kimoto, K., Kusama, S., Murakami, K. (1983). Purification and characterization of serine proteinases from Euphausia superba. *Agric. biol. Chem.* 47, 2577-2583.
- 20. Baden, H.P. (1970). Enzymatic hydrolysis of the alpha-protein of epidermis. J Invest Dermatol. 55(3): 184-187.
- Jost, R., Monti, J.C. (1977). Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. Biotechnol. Bioeng. 20 1173-1185.
- 22. Gates B.J., Travis J. (1969) Isolation and comparative properties of shrimp trypsin (Penaeus setiferus). Biochemistry 8, 4483-4489.
- 23. Lee, P.G., Lawrence, A.L. (1982) A quantitative analysis of digestive enzymes in penaeid shrimp: influence of diet, age and species. *Physiologist* 25, 241.

- 24. Honjo, I., Kimura, S., Nonaka, M. (1990) Purification and characterization of trypsin-like enzyme from shrimp *Penaeus indicus*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 56(10), 1627-1634.
- Galgani, F.G., Benyamin, Y., Van Wormboudt, A. (1985) Purification, properties and immunoassay of trypsin from the shrimp *Penaeus japonicus*, Comp. Biochem. Physiol. 81B, 447-452.
- 26. Sellos, D., Van Wormhoudt, A. (1992) Molecular cloning of a cDNA that encodes a serine protease with chymotryptic and collagenolytic activities in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacca, Decapoda). *FEBS Lett*, 309, 219-224.
- 27. Galgani, F., (1983). Etude des proteases digestives de creccevettes peneides (Crustacea, Decapoda). Thése de Docteur de 3eme Cycle on Océanologia. Université de Marseille II. Faculté des Sciences de luminy. 70.
- 28. Klein, B. LeMoullac, G., Sellos, D., Van Wormhoudt, A. (1996) Molecular Cloning and Sequencing of Trypsin cDNAs from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): Use in Assessing Gene Expression during the Moult Cycle. J. Biochem. Cell Biol. 28(5), 551-563.
- Hanquier, J.M., Hbrshberger, C.L., Desplanca, D., Lardson, J.L., Rosteck, P.R. (2000)
   Production of soluble recombinant trypsinogen analogs. WO 00/17332,
   PCT/US99/21047.
- Woldike, H.F., Kjeldsen, T.B. (1999). Process for producing trypsin (trypsinogen).
   United States Patent 5,945,328.
- 31. Higaki, J.N., Evin, L.B., Craik, C.S. (1989). Introduction of a cysteine protease active site into trypsin. *Biochemestry* 28: 9256-9263.
- 32. Yee, L. y Blanch, H.W. (1993). Recombinant trypsin production in high cell density fedbatch cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 41; 781-790.
- 33. Morelle G. (1989). A plasmid extraction procedure on a miniprep scale. Focus 11.7.
- 34. Rychik 1990
- 35. Badino 1989
- Sambrook, J., Fristsch, E.F., Maniatis, T., (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- 37. Sreekrishna, K., Kropp, K.E. (1996). *Pichia pastoris* en Nonconventional yeast in Biotechnology: A Handbook, Wolf, K: Ed. Springer-Verlag Inc.

- 38. Escamilla-Treviño, L.L. (1996). Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHr) en *Pichia pastoris y Escherichia coli*. Tesis de Maestría. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la U.A.N.L., Monterrey N.L., México.
- 39. Cab-Barrera, E.L., (2000). Construcción de una cepa de *Pichia pastoris* sobreproductora de la isoforma de 20 kDa de la hormona del crecimiento humano. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Escamilla-Treviño, L.L., Viader-Salvadó, J.M., Barrera-Saldaña, H.A., Guerrero-Olazarán, M. (2000). Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in Pichia pastoris. Biotechnology Letters 22 (2): 109-114.
- Hedges, A.J., Shannon, R., Hobbs, R.P. (1978). Comparison of the precision obtained in counting viable bacteria by spiral plate marker, the droplette and the Miles and Misra methods. J Appl Bacteriol. 45 (1): 57-65.
- 42. Janssen, F.W., Ruelius, H.W. (1968). Alcohol oxidase, a flavoprotein from several Basidiomycetes species. Crystallization by fractional precipitation with polyethylene glycol. *Biochim. Biophys Acta* 151: 330-342.
- 43. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105: 121-126.
- 44. Bradford, M.A. (1976). Rapid and sensitive method for quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72.
- 45. Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kroop, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A., Birkenberger, L.A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris. Gene* 190: 55-62.
- 46. Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. y Grassl, M. (1974) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U. ed), Vol I: 515-516, Academic Press, Inc., Nueva York, NY.

#### CAPÍTULO 8

#### ANEXO

#### Reporte del Genebank del ADNe de tripsina de camarón

```
PVTRYPSIN
                          854 bp
                                    RNA
                                                    INV
                                                              01-OCT-1996
LOCUS
DEFINITION P. vannamei mRNA for trypsin.
ACCESSION X86369
            g785034
NID
KEYWORDS
            trypsin.
SOURCE
            Penagus vannamei.
  ORGANISM Penaeus vannamei
            Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa; Arthropoda;
            Crustacea; Malacostraca; Eucarida; Decapoda; Dendrobranchiata;
            Penaeidae; Penaeus.
REFERENCE
            1 (bases 1 to 654)
  AUTHORS
            Klein, B., Le Moullac, G., Sellos, D. and Van Wormhoudt, A.
            Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from Penaeus
  TITLE
            vannamei (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression
            during the moult cycle
  JOURNAL
           Int. J. Biochem. Cell Biol. 28 (5), 551-563 (1996)
            96252881
  MEDLINE
REFERENCE
           2 (bases 1 to 854)
  AUTHORS
           Van Wormhoudt, A.E.
            Direct Submission
  TITLE
            Submitted (18-APR-1995) A.E. Van Wormhoudt, College de France /
  JOURNAL
            CNRS, Laboratoire de Biologie Marine, BP 225, 29182 Concarneau.
            FRANCE
FEATURES
                     Location/Qualifiers
                     1..854
     Source
                     /organism≈"Penaeus vannamei"
                     /db xref="taxon:6689"
                     /dev stage="adult"
                     /tissue_type="hepatopancreas"
     sig_peptide
                     3..41
     CDS
                     3..803
                     /EC number="3.4.21.4"
                     /codon start=1
                     /product="trypsin"
                     /db_xref="FID:g785035"
                     /translation="MKTLILCVLLAGAFAAPSRKPTFRRGLNKIVGGTDATPGELPYQ
                     LSFQDISFGFAWHFCGASIYNENWAICAGHCVQGEDMNNPDYLQVVAGELNQDVDEGT
                     EQTVILSKIIQHEDYNGFTISNDISLLKLSQFLSFNDNVRAIDIPAQGHAASGDCIVS
                     GWGTTSEGGSTPSVLQKVTVPIVSDDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGGKDSCQGDS
                     GGPLACSUTASTYLAGIVSWGYGCARPGYPGVYAEVSYHVUWIKANAV"
BASE COUNT
                         277 c
                                  222 g
                                           181 t
ORIGIN
        1 ocatgaagae cotcatecte tgtgtgetee ttgctggage ttttgccgcc coctccaggs
       61 agoccaectt Cegeogoggt otCaacaaga tegteggagg aactgacgee actcccggag
      121 agetgeetta ecageteagt ttecaggaca teteettegg etttgeetgg caettetgeg
      181 gegeeteeat etacaacgaq aactgggeea tetqeqeeqq ceaetgegte caqqqeqagg
      241 acatgaacaa coccgattac cttcaggtcg ttgccggaga acttaaccag gatgtggatg
      301 agggcaccga gcagacggte atcototoca agateateca acacgaggae tacaacgget
      361 teaccateag caacgacate tecctgetea agetqtetea geetetgage tteaatgaca
      421 acqttcqcqc catcqatatt cccqctcaqq qtcacqctqc ctctgqcqac tqcatcqtct
      481 coggetgggg caccacctcc gagggaggaa gcaccccag tgtcctgcag aaggtgaccg
      541 treceatest stetsacsac saststesses atgettates ecasasesac attgassact
      601 coatgatety tycogyagty cocyaggycy geaaqqaete qtyccaggyt qaetetyycy
```

- 661 geoccettge etgetetgae aeggeeteea cetaeetgge eggeategtg teetgggget 721 aeggetgtge eegteeegge taeeetggeg tgtaegetga ggteteetae eatgtegatt 781 ggattaagge caatgetgtt taatcaagtt gtttaaeatg taettaeett gaaageaata
- 841 aagaaaaaaa tata



