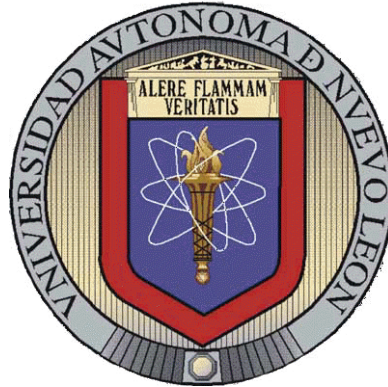


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TÍTULO DE TESIS

“PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y BIOENSAYO DE PROLACTINAS
RECOMBINANTES.”

POR

Q.F.B. ARTEMISA LUÉVANO DE LA CRUZ.

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Con especialidad en

BIOLOGÍA MOLECULAR EN INGENIERÍA GENÉTICA.

OCTUBRE, 2011


Título: "PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y BIOENSAYO DE PROLACTINAS RECOMBINANTES".

Aprobación de la tesis:



DR. C. JORGE ANGEL ISIDRO ASCACIO MARTÍNEZ

Director de Tesis



DR. C. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA

Co-Director de Tesis



DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Co-Directora de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Jorge A. I. Ascacio Martínez y la co-dirección del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña y la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Biotecnología.....	1
1.2 Proteínas Recombinantes.	2
1.3 Sistemas de Expresión.	3
1.3.1 Bacterias.	5
1.3.2 Células de mamífero y de insecto.	5
1.3.3 Levaduras.	6
1.4 <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión.	6
1.4.1 Metabolismo de <i>Pichia pastoris</i>.	8
1.4.2 Vectores de expresión.	10
1.4.3 Vector pPICZa.	10
1.4.4 Recombinación e integración de pPICaZ a <i>Pichia pastoris</i>.	11
1.4.5 Fermentación en levaduras.	13
1.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	14
1.5.1 Metabolismo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	15
1.5.2 Vectores de expresión.	16
1.5.3 Vector pYE2NT.	18
1.6 Purificación por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC).....	19
1.7 Prolactina humana (PRL).	20
1.8 Isoforma de la prolactina de 16 kDa.	23
1.9 Antecedentes del laboratorio de biotecnología.	24
1.9.1 Hormona del Crecimiento Humano (HGH).	24

1.9.2 Purificación de la HGH.	24
CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.	26
CAPÍTULO III. OBJETIVOS.	27
3.1 OBJETIVO GENERAL.	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	27
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	28
4.1 MATERIAL.	28
4.1.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.	28
4.1.2 Biológicos.	29
4.1.3 Infraestructura.	29
4.2 MÉTODOS.	31
4.2.1 Estrategia general.	31
4.2.2 Amplificación de la secuencia codificante de las isoformas de la prolactina humana.	32
4.2.2.1 Extracción de ADN plasmídico.	32
4.2.2.2 Diseño de los iniciadores.	33
4.2.2.3 Amplificación de la secuencia codificante de las isoformas de PRL por PCR. 34	
4.2.2.4 Adición de la secuencia para 6His por PCR.	36
4.2.3 Clonación en el plásmido pCR 2.1-TOPO.	37
4.2.3.1 Transformación de células DH5α electrocompetentes.	37
4.2.3.2 Análisis de la clonación en TOPO.	37
4.2.4 Subclonación de las secuencias de PRL y su isoforma de 16 kDa en los plásmidos pPICZα y pYES2NT.	39
4.2.4.1 Liberación del fragmento de la PRL a partir de TOPO.	40
4.2.4.2 Doble digestión de pPICZα.	40

4.2.4.3	Purificación de un fragmento de ADN a partir de un gel de agarosa al 1%.	41
4.2.4.4	Ligación de los fragmentos purificados.....	41
4.2.4.5	Transformación de células electrocompetentes.....	42
4.2.4.6	Análisis de la clonación en los vectores pPICZ α y pPYES2NT.	42
4.2.4.7	Extracción de ADN plasmídico de las construcciones de las isoformas en los vectores de expresión.....	44
4.2.5	Caracterización de las construcciones en el plásmido pPICZ α y pPYES2NT.....	44
4.2.6	Transformación de la levadura.	44
4.2.6.1	Linearización con <i>Sac I</i>	44
4.2.6.2	Electroporación de <i>Pichia pastoris</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
4.2.6.3	Análisis de integración al genoma de <i>Pichia pastoris</i>	45
4.2.6.4	Análisis de la transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
4.2.7	Ensayos de expresión en tubo cónico de 50mL en <i>Pichia pastoris</i>	48
4.2.8	Ensayos de expresión en tubo cónico de 50mL en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
4.2.9	Análisis de la expresión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	49
4.2.9.1	Precipitación de proteínas en la muestra obtenida de las cepas de <i>Pichia pastoris</i>	49
4.2.9.2	Preparación de la muestra para SDS-PAGE.....	49
4.2.9.3	Electroforesis de las muestras.	50
4.2.9.4	Densitometría.....	50
4.2.10	Ensayos de purificación.....	50
4.2.10.1	Purificación a pequeña escala.	50

4.2.10.2	Precipitación de proteínas en la muestra.	51
4.2.10.3	Preparación de la muestra para SDS-PAGE.	51
4.2.10.4	Electroforesis de las muestras.	51
4.2.10.5	Densitometría.	52
4.2.11	Ensayo de la actividad biológica.	52
4.2.11.1	Propagación de los pre-adipocitos.	52
4.2.11.2	Tinción con Rojo Oleoso.	53
4.2.11.3	Propagación de la línea celular HUVEC.	53
4.2.11.4	Ensayo de angiogénesis.	54
CAPÍTULO V. RESULTADOS.		55
5.1	Amplificación de la secuencia codificante de las isoformas de la prolactina humana.	55
5.1.1	Extracción del ADN plasmídico de la cepa ATCC 31723.	55
5.1.2	Diseño de los iniciadores para amplificar cada ADNc de la prolactina.	56
5.2	Clonación en el vector topo de la secuencia codificante de las isoformas de la prolactina humana.	61
5.2.1	Análisis de la clonación.	61
5.2.2	Extracción del ADN plasmídico.	62
5.3	Subclonación de las secuencias de PRL 23 y PRL 16 en el vector de expresión pPICZα.	63
5.3.1	Liberación de los fragmentos de PRL 23 y PRL 16 y preparación pPICZ α	63
5.3.2	Ligación de los fragmentos purificados.	64
5.3.3	Transformación de bacterias electrocompetentes.	65
5.3.4	Análisis de las clonas obtenidas.	66
5.3.5	Extracción del plásmido pPICZ α - PRL 23 y 16.	66

5.4	Caracterización de los plásmidos pPICZα-PRL23 y pPICZα-PRL16.....	67
5.5	Construcción de la cepa productora de las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa.....	68
5.5.1	Linearización de los plásmidos pPICZ α -PRL23 y pPICZ α -PRL16 con <i>Sac I</i> y transformación de la levadura.	69
5.5.2	Análisis de la integración al genoma de <i>Pichia pastoris</i>	70
5.6	Subclonación de la secuencia PRL-23 y 16 en el vector de expresión pPYES2NT.....	70
5.6.1	Liberación del fragmento PRL 23 y 16 kDa y preparación de pPYES2NT.....	71
5.6.2	Ligación de los fragmentos purificados.	72
5.6.3	Transformación de bacterias electrocompetentes.	72
5.6.4	Análisis de las clonas obtenidas.	73
5.6.5	Extracción del plásmido pPYES2NT.	73
5.7	Caracterización de los plásmidos pPYES2NT-PRL 23 y 16.	74
5.8	Construcción de la cepa productora de la PRL-de 23 y 16 kDa.	75
5.8.1	Transformación de la levadura.	75
5.8.2	Análisis de la integración al genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	75
5.9	Comparación en la producción de los sistemas <i>P. pastoris</i> y <i>S. cerevisiae</i>.	76
5.10	Producción de PRL-HIS, HIS-EK-PRL23 y HIS-EK-PRL16.	77
5.10.1	Fermentación y análisis de la producción en el sobrenadante mediante SDS-PAGE y Western blot.....	77
5.11	Ensayo de purificación mediante IMAC.....	80
5.12	Ensayo de la actividad biológica.	81
5.12.1	Ensayo de la actividad biológica en la línea celular HUVEC.	82
5.12.2	Ensayo de la actividad biológica en la línea celular 3T3.	83

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....84
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.....88
CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.89
ANEXOS94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo metabólico del metanol en <i>Pichia pastoris</i>	10
Figura 2.	Partes que conforman al vector pPICZ α	12
Figura 3.	Proceso de la inserción del plásmido en su fragmento homólogo 3' en el locus intacto AOX1 (His ⁺ mut ⁺).....	13
Figura 4.	Etapas de la producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i> ...	15
Figura 5.	. Vía de utilización de la galactosa.....	17
Figura 6.	Partes que conforman al vector pPYES2/NT.....	20
Figura 7.	Modelo de interacción entre la etiqueta de histidinas y el Ni ²⁺ con la proteína de interés.....	21
Figura 8.	Esquema de la estrategia general.....	32
Figura 9.	Variantes de las isoformas de la prolactina.....	36
Figura 10.	Esquema de la construcción del vector de expresión pPICZ α , a partir de la secuencia clonada en TOPO.....	40
Figura 11.	Esquema de la construcción del vector de expresión pPYES2NT, a partir de la secuencia clonada en TOPO.....	40
Figura 12.	ADN plasmídico de la cepa ATTC 31723.....	56
Figura 13.	Iniciadores empleados para la amplificación de la prolactina de 23 kDa.....	59
Figura 14.	Iniciadores empleados para la amplificación de la prolactina de 16 kDa.....	60
Figura 15.	PCR en gradiente de la prolactina.....	61
Figura 16.	Amplificación de la PRL-23 kDa.....	61

Figura 17.	Amplificación de la PRL-16 kDa.....	62
Figura 18.	Análisis por PCR de la clonación de las isoformas de la prolactina en TOPO.....	63
Figura 19.	Extracción de los plásmidos TOPO- PRL23 y 16.....	64
Figura 20.	Doble digestión de pPICZ α y de las isoformas de la prolactina de 23 y 16.....	65
Figura 21.	Ligación de vector pPICZ α y los fragmentos de las variantes de prolactina de 23 y 16 kDa.....	66
Figura 22.	Esquema de la construcción del vector de expresión pPICZ α , a partir de la secuencia clonada en TOPO	66
Figura23.	Análisis por PCR de la clonación en el plásmido pPICZ α de las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa.....	67
Figura 24.	Extracción de los plásmidos pPICZ α -PRL23 Y 16.....	68
Figura 25.	Análisis mediante patrones de restricción de los plásmidos pPICZ α -PRL23 y pPICZ α -PRL16.....	69
Figura 26.	Linearización de pPICZ α -PRL23 y pPICZ α -PRL16 y sus variantes..	70
Figura 27.	<i>Pichia pastoris</i> transformada.....	70
Figura 28.	Análisis de la integración al genoma de <i>Pichia pastoris</i>	71
Figura 29.	Doble digestión de pPYES2NT y las isoformas de la prolactina de 23 y 16 kDa.....	72
Figura 30.	Ligación de vector pPYES2NT y los fragmentos de las variantes de prolactina de 23 y 16 kDa.....	73
Figura 31.	Esquema de la construcción del vector de expresión pPYES2NT, a partir de la secuencia clonada en TOPO.....	73

Figura 32.	Análisis por PCR de la transformación en bacterias de las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa.....	74
Figura 33.	Extracción de los plásmidos pPYES2NT-PRL23 y 16.....	75
Figura 34.	Análisis mediante patrones de restricción de los plásmidos pPYES2NT-PRL23 y pPYES2NT-PRL16.....	75
Figura 35.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> transformada.....	76
Figura 36.	Análisis por PCR de la transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
Figura 37.	Comparación de los sistemas de expresión.....	78
Figura 38.	Análisis de la producción de proteínas secretadas al medio de cultivo.....	79
Figura 39.	Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales.....	80
Figura 40.	Densitogramas obtenidos a partir de los análisis de los sobrenadantes por SDS-PAGE.	81
Figura 41.	Densitograma obtenido para el análisis de pureza mediante IMAC..	82
Figura 42.	Ensayo de la línea celular HUVEC.....	83
Figura 43.	Diferenciación de las células 3T3 a adipocitos.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Consideraciones para la elección de un sistema de expresión para proteínas heterólogas.....	4
Tabla 2.	Características de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes.....	4
Tabla 3.	Variantes moleculares de la prolactina humana.....	22
Tabla 4.	Producción y pureza de hormonas recombinantes de diferentes especies.....	26
Tabla 5.	Lista de iniciadores utilizados.....	34
Tabla 6	Condiciones de la reacción de PCR para amplificar las isoformas de la PRL.....	36
Tabla 7.	Programa de PCR para la amplificación de las isoformas de la PRL.	37
Tabla 8.	Condiciones de la reacción de PCR para la adición de la etiqueta de 6His.....	37
Tabla 9.	Condiciones de la reacción de PCR para verificar la clonación en el vector TOPO.....	39
Tabla 10.	Programa de PCR para verificar la clonación en el vector TOPO TA.	39
Tabla 11.	Condiciones para la doble digestión.....	41
Tabla 12.	Condiciones de ligación.....	42
Tabla 13.	Condiciones de la reacción de PCR para verificar la clonación en los vectores pPICZ α y pPYES2NT.....	43
Tabla 14.	Programa de PCR para verificar la clonación en los vectores pPICZ α y pPYES2NT.....	44
Tabla 15.	Condiciones para la digestión con la enzima Sac <i>I</i>	45

Tabla 16.	Condiciones de la reacción de PCR para verificar la integración de la secuencia de las isoformas de la prolactina en el genoma de <i>Pichia pastoris</i>	47
Tabla 17.	Programa de PCR para verificar la integración de la secuencia de las isoformas de la prolactina en el genoma de <i>Pichia pastoris</i>	47
Tabla 18.	Condiciones de la reacción de PCR para verificar la integración de los vectores de expresión episomales en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	48
Tabla 19.	Programa de PCR para verificar la integración de los vectores de expresión en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	48
Tabla 20.	Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	81
Tabla 21.	Pureza y rendimiento obtenido por IMAC.....	82

ABREVIATURAS

aa	Residuos aminoacídicos.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
AOX1	Alcohol oxidasa 1.
aox1	Gen de la alcohol oxidasa 1.
<i>AOX1</i>	Promotor del gen aox1.
Cols.	Colaboradores.
dNTP's	Desoxirribonucleósidos Trifosfato.
DO ₆₀₀	Densidad Óptica a 600nm
EK	Enterocinasa
HGH	Hormona del Crecimiento Humana
HGH-6His	HGH con la etiqueta de 6 histidinas
HIS	Etiqueta de 6 histidinas
HIS-EK-PRL16	Prolactina humana de 16 kDa etiquetada con 6 histidinas y un sitio de enterocinasa en el extremo amino terminal.
HIS-EK-PRL16-Sc	Prolactina humana de 16 kDa etiquetada con 6 histidinas y un sitio para una enterocinasa en el extremo amino terminal para su uso en <i>S. cerevisiae</i> .
HIS-EK-PRL23	Prolactina humana de 23 kDa etiquetada con 6 histidinas y un sitio de enterocinasa en el extremo amino terminal.
HIS-EK-PRL23-Sc	Prolactina humana de 23 kDa etiquetada con 6 histidinas y un sitio de enterocinasa en el extremo amino terminal para su uso en <i>S. cerevisiae</i> .
IMAC	Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados.

NTA	Acido Nítrilotriacético.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction).
pPICZ α -HIS-EK-PRL23	Vector de expresión pPICZ α , portador de la secuencia de PRL con la adición de la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas en el extremo amino terminal y un sitio de reconocimiento para la enterocinasa.
pPICZ α -PRL23-HIS	Vector de expresión pPICZ α , portador de la secuencia de PRL con la adición de la secuencia codificante para la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo terminal.
PRL	Prolactina.
PRL16	Isoforma de la prolactina de 16 kDa.
PRL16-EK-HIS	Prolactina humana de 16 kDa etiquetada con 6 histidinas y un sitio de enterocinasa en el extremo carboxilo terminal.
PRL16-HIS	Prolactina humana de 16 kDa etiquetada con 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal.
PRL23	Prolactina humana de 23 kDa.
PRL23-EK-HIS	Prolactina humana de 23 kDa etiquetada con 6 histidinas y un sitio de enterocinasa en el extremo carboxilo terminal.
PRL23-HIS	Prolactina humana de 23 kDa etiquetada con 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal.

RESUMEN

Artemisa Luévano de la Cruz

Fecha de Graduación: Octubre 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. Facultad de Medicina

Título del Estudio. “Producción, purificación y bioensayo de prolactinas recombinantes”.

Número de páginas: 95 **Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Área de Estudio: Biotecnología.

Introducción: Con los avances en la Biotecnología, Ingeniería Genética y Biología Molecular, el número de proteínas recombinantes producidas se ha incrementado exponencialmente, lo que ha hecho posible la producción de vacunas y terapias para los humanos y animales. *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* son levaduras usadas como sistemas exitosos de expresión de proteínas recombinantes. La prolactina es una hormona sintetizada y secretada en la adenohipófisis, consta de 199 residuos aminoacídicos y con un peso molecular de 23 kDa, es una proteína multifuncional, participa en la secreción de la leche, entre otras actividades fisiológicas, además, a partir de esta, se puede generar su isoforma de 16 kDa la cual tiene efecto anti-angiogénico. El uso de etiquetas de histidinas permite que diferentes proteínas sean purificadas por una alta afinidad a un ion metálico fijado en una matriz. **Objetivo:** Producir, purificar y ensayar la actividad biológica de la prolactina humana. **Metodología:** Se amplificó por PCR el ADNc de la prolactina humana a partir de la cepa ATCC31723 utilizando iniciadores que incluyen la secuencia que codifica para 6 histidinas en el extremo 5', el amplicón se clonó en un vector de propagación y se subclonó en los vectores de expresión pPICZa y pYES2NT con los que se realizó la transformación por electroporación en las levaduras *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente. Se llevó a cabo la producción de la prolactina por inducción metanólica y por inducción con galactosa en las respectivas levaduras. Se recuperaron las proteínas recombinantes y se purificaron en una columna de Niquel-agarosa, las proteínas fueron eluidas con imidazol, estas se analizaron por SDS-PAGE y se les ensayó su actividad biológica *in vitro*. **Resultados:** Se obtuvo por PCR un amplicón de aproximadamente 600 pb correspondiente al ADNc de la prolactina humana de 23 kDa y uno de 450 pb para su isoforma de 16 kDa, después estos fueron clonados en el vector de propagación Topo-TA; a partir de este, se liberó cada fragmento de ADNc con las enzimas de restricción *Xho I* y *Not I* y posteriormente se subclonaron en el vector pPICZa y pYES2NT respectivamente, para luego ser introducidos a *P. pastoris* y a *S. cerevisiae* obteniéndose las cepas transformadas, las cuales se sometieron a fermentación e inducción, lográndose solo la expresión en el sistema de *P. pastoris* con una producción de proteínas totales de alrededor de 100 µg/mL, de los que más del 75% correspondieron a la prolactina humana recombinante de 23 kDa. Al ensayar la purificación, se logró una pureza del 97% y además, la prolactina purificada resultó biológicamente activa. **Conclusiones:** Se logró la construcción de las levaduras *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* con el casete de expresión de la prolactina humana. La cepa mejor productora fue la de *Pichia pastoris* con la prolactina de 23 kDa etiquetada con histidinas en el extremo amino, lográndose una producción de proteínas totales de aproximadamente 100 µg/mL, de estos, 78 µg/mL correspondieron a la prolactina, la cual conservó su actividad biológica después de haber sido purificada.

Dr. Jorge A. I. Ascacio Martínez
Director

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

1.1 Biotecnología.

La biotecnología por definición es toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. La humanidad ha utilizado algunas prácticas biotecnológicas desde hace miles de años para la producción de bebidas alcohólicas, pan, queso, yogurt y vinagre, entre otros (Sánchez Cuevas, 2003).

A mediados de 1970 la biotecnología sufrió un importante avance tecnológico con el inicio del desarrollo de la ingeniería genética basada en la tecnología del ADN recombinante que marcó a su vez, el comienzo de la industria biofarmacéutica actual (Drago Serrano y Sainz Espuñes, 2006) además, con los avances en la biotecnología, ingeniería genética y proteómica, el número de proteínas recombinantes producidas se ha incrementado exponencialmente, lo que ha hecho posible la producción de vacunas y terapias para los humanos y animales. (Arnau y cols., 2006). Estos derivados biotecnológicos, proteínas recombinantes, forman una nueva clase de drogas para diversas enfermedades como desórdenes genéticos, cáncer, hipertensión y SIDA para las cuales no existe el mejor tratamiento o la cura (Meena Rai y Padh, 2001).

La biotecnología de proteínas recombinantes para el sector industrial es un proceso atractivo ya que una vez establecido un sistema de expresión, los costos de producción se reducen y el producto final tiene menor costo que el que se recupera mediante métodos convencionales a partir de sus fuentes naturales. Aunado a esto, está el hecho de que los productos recombinantes se encuentran libres de toxinas, pirógenos y de microorganismos patógenos infecciosos que no rara vez contaminan dichas fuentes (Salazar-Sessaty, 2010).

1.2 Proteínas Recombinantes.

La aplicación de la biotecnología en Medicina ha experimentado un desarrollo espectacular en los últimos años. Ejemplos de reciente actualidad son la terapia génica y el empleo de células madre totipotenciales en terapias celulares y tisulares, potenciados todos ellos por el desarrollo del Proyecto del Genoma Humano. Otros casos más conocidos y de aplicación práctica más extendida son las proteínas, especialmente las enzimas, los factores de crecimiento y los anticuerpos monoclonales. El mayor empleo de las proteínas se debe en parte al progreso en el conocimiento de sus funciones y a la capacidad de producir proteínas recombinantes también conocidos como biofármacos. (López- Hoyos y Fernández-Fresnedo, 2003).

Un biofármaco es una molécula biológica obtenida con fines terapéuticos a partir de un organismo vivo, ya sea a partir de bacterias, hongos, células animales, levaduras, entre otros. La gran mayoría de estos biofármacos son proteínas recombinantes. La obtención de proteínas recombinantes se logra mediante la inserción del gen que expresa la proteína de interés en un organismo diferente. La expresión de estas proteínas se ha convertido en una herramienta muy popular, ya que es posible obtener altas cantidades de proteína con bajos costos de producción y alta pureza de una o varias proteínas de interés.(Gamboa y Trujillo. 2009).

En diversos estudios se ha demostrado que la importancia de las proteínas terapéuticas recombinantes se ha incrementado exponencialmente en los últimos 30 años. Los primeros productos biotecnológicos en el mercado mundial realizados por medio de ADN recombinante fueron la insulina, interferones, eritropoyetina, la vacuna contra la hepatitis B y las enzimas industriales utilizadas para el tratamiento de alimentos, detergentes y en el cuidado de la salud. En la actualidad el número de biofármacos se ha incrementado cubriendo más del 10% de toda la industria farmacéutica por los que las grandes compañías farmacéuticas tienen sus mayores ingresos de la venta de estos productos, por lo tanto la investigación en este rubro también ha aumentado en gran medida (Porro y cols., 2005).

1.3 Sistemas de Expresión.

Con el desarrollo de la capacidad para clonar y expresar un gen extraño en un huésped heterólogo, se desarrolló una notable capacidad de hacer casi cualquier proteína en gran cantidad que pueden utilizarse como agentes terapéuticos o de diagnóstico, pero rápidamente se llegó a la conclusión que las proteínas producidas en diferentes huéspedes son diferentes en muchos sentidos, en particular en sus modificaciones post-traduccionales (Meena Rai y Padh, 2001).

Los sistemas celulares de expresión de genes heterólogos son generalmente sistemas procariotas o eucariotas, con sus ventajas e inconvenientes. Para seleccionar un sistema óptimo de expresión hay que tener en cuenta por un lado la productividad, bioactividad y características fisicoquímicas de la proteína de interés; por otro lado, el costo y la bioseguridad del sistema. (ver tabla 1).

Existen diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes por ejemplo bacterianos como *Escherichia coli*, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, líneas celulares de insectos y de mamíferos e incluso células vegetales. (Arnau y cols., 2006). Todos estos sistemas de expresión presentan una serie de ventajas y desventajas que deben ser consideradas según los puntos establecidos con anterioridad (INVITROGEN, 2010), estos se describen en la tabla 2.

Tabla 1. Consideraciones para la elección de un sistema de expresión para proteínas heterólogas.

TIPO DE MICROORGANISMO	Eucariota	Características físico-químicas-biológicas	Secuencia nucleotídica	Aplicación	Biomedicina	Vacunas	Bioproceso	Tipo
			Codones Preferenciales			Diagnóstico		
			Sitios de Restricción			Agente Terapéutico		
			Interacciones epigenéticas		Alimentos	Proceso Industrial		Condiciones de cultivo
			Tamaño			Aditivos		
	Modificación Postraduccional		Suplementos					
	Toxicidad		Industria		Reactivo analítico	Escala		
	Destino Celular				Papel			
	Grado de pureza				Textil	Costo		
	Secuencia aminoacídica				Farmacéutica			
	pI		Medio ambiente		Combustibles	Recursos		
	Tm				Remediación			
	pH				Tratamiento de residuos			

Tabla 2. Características de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Sistema de expresión	Aplicaciones	Ventajas	Desventajas
Células libres	<ul style="list-style-type: none"> Detección rápida de expresión. Proteínas tóxicas. Incorporación de etiquetas o aa no naturales. Ensayos funcionales. Interacciones proteicas. 	<ul style="list-style-type: none"> Expresión rápida y directa de plásmido. Fácil adición de componentes para aumentar solubilidad o funcionalidad. Escalable. 	<ul style="list-style-type: none"> Expresión mayor a 3 mg.
Bacteria	<ul style="list-style-type: none"> Análisis estructural. Ensayos funcionales. Generación de anticuerpos. Interacciones de proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> Escalable. De bajo costo. Requerimientos de cultivo simple. 	<ul style="list-style-type: none"> Proteínas solubles. Pocas modificaciones postraduccionales. Posible dificultad de expresar proteínas funcionales de mamíferos.
Levadura	<ul style="list-style-type: none"> Análisis estructural. Ensayos funcionales. Generación de anticuerpos. Interacciones de proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> Procesamiento de proteínas eucariotas. Escalables a fermentación (gramos por litro) de proteína. Requerimientos de cultivo simples. 	<ul style="list-style-type: none"> La fermentación es necesaria para obtener rendimientos muy altos. Las condiciones de cultivo requieren optimización.
Células de insecto	<ul style="list-style-type: none"> Análisis estructural. Ensayos funcionales. Generación de anticuerpos. Interacciones de proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> Modificaciones postraduccionales similares a los sistemas de mamíferos Mayor rendimiento que en células de mamífero. 	<ul style="list-style-type: none"> Requieren mayor exigencia en condiciones de cultivos.
Células de mamífero	<ul style="list-style-type: none"> Ensayos funcionales. Generación de anticuerpos. Interacciones de proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> El más alto nivel de modificaciones postraduccionales. Mayor probabilidad de obtener proteínas humanas funcionales. 	<ul style="list-style-type: none"> Rendimientos de mg/l solo es posible en medio de cultivos. Condiciones estrictas de cultivo.

1.3.1 Bacterias.

Por muchas razones, *Escherichia coli* fue el organismo seleccionado inicialmente para elaborar proteínas recombinantes humanas, como la insulina y la HGH. En efecto, es un organismo unicelular cuya reproducción es asexual, en la mayoría de los casos; su simplicidad y el conocimiento de su fisiología y genética, hacen que se facilite la expresión y bajen los costos de producción, consistente con una fuente de alimento común y estrategias simples para crecer y mantener el microorganismo. El corto tiempo de replicación de *E. coli* permite su duplicación en menos de media hora (Córdoba y cols., 2003).

La estabilidad de plegamiento de dominios globulares de proteínas procariotas y eucariotas (Por ejemplo, los dominios catalíticos o dominios de interacción de proteínas) son un foco importante tanto de la comunidad de investigación biomédica. Estas proteínas son generalmente adecuadas para expresión en *E. coli*. Con los años, mucho esfuerzo se ha puesto en la optimización de *E. coli* como huésped para la expresión de proteínas de organismos superiores. Esta estrategia ha generado un amplio arsenal de herramientas que se pueden utilizar para aumentar el rendimiento de proteína soluble (Graslund y cols., 2008). Sin embargo *E. coli* tiene ciertas desventajas para la expresión de proteínas humanas, ya que comúnmente las bacterias no tienen la capacidad de glicosilar proteínas tanto en enlaces N- y O- terminal (Meena Rai y Padh, 2001).

1.3.2 Células de mamífero y de insecto.

Los cultivos de células animales son los sistemas con la más alta similitud a las células humanas, respecto a los patrones y capacidad de las modificaciones postraduccionales que realizan. Sin embargo, su cultivo es más complicado, costoso y usualmente la producción alcanza rendimientos bajos. Entre los sistemas más conocidos de células de insecto están las transformadas con vectores de Baculovirus, las cuales han alcanzado gran popularidad dado que se consideran más resistentes al estrés, son fáciles de

manipular y más productivas en comparación con los sistemas de mamíferos(Schmidt, 2004).

Idealmente, sí las proteínas de mamíferos requieren modificaciones postraduccionales, éstas se deberían expresar en células de mamíferos, ya que la autenticidad del producto es absolutamente esencial para la eficacia clínica, entonces a pesar de que muestran ciertas desventajas, las células de mamífero son la única opción que ofrece el producto de mayor grado de fidelidad. Sin embargo el uso de líneas celulares humanas no es perfecto, ya que la transformación, requiere en la mayoría de los casos producir una línea celular que resulta con un perfil de glicosilación alterado. También las técnicas de expresión de células de mamíferos consumen mucho tiempo y son mucho más difíciles de realizar a gran escala, además los requisitos nutrimentales son más complejos.(Meena Rai y Padh 2001).

1.3.3 Levaduras.

La clonación en bacterias ha permitido obtener a escala industrial algunas proteínas recombinantes, especialmente de interés terapéutico. Sin embargo, no siempre las proteínas de origen eucariótico se producen adecuadamente en huéspedes procarióticos ya que a menudo son inestables o carecen de actividad biológica. Por lo que las levaduras son una alternativa favorable para la expresión de proteínas heterólogas usadas en investigación, en la industria y en medicina. Como representantes principales de este sistema de expresión están *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* y *Hansenula polymorpha* (Iáñez-Pareja, 2005).

1.4 *Pichia pastoris* como sistema de expresión.

Pichia pastoris miembro de la familia de los ascomicetos, es una levadura metilotrófica, es decir que es capaz de utilizar el metanol como única fuente de carbono y de energía, su aplicación en la biotecnología se estableció para la producción de proteína celular y

más tarde para la producción de proteínas recombinantes por lo que es considerada como un sistema de expresión exitoso (Hartner y Glieder, 2006).

La compañía de Petróleos Phillips desarrolló la tecnología para el uso de *P. pastoris* como fuente de proteína unicelular para alimento de ganado durante los años setenta. Esta tecnología permitió realizar procesos de fermentación con densidades celulares mayores de 130 g/L de peso seco de biomasa y una elevada productividad de la misma ($\geq 10\text{g/L}$), sin embargo el proceso no resultó económicamente rentable debido a la crisis del petróleo y al descenso de los costos de la harina de soya (Higgins, 1998).

A principios de los 80's la Compañía Petróleos Phillips se contactó con una compañía biotecnológica para el desarrollo de un sistema de expresión de genes heterólogos en *P. pastoris*, de esta manera con la existencia de metodologías de fermentación bien establecidas, junto con el aislamiento de promotores fuertes y regulados por metanol y el desarrollo de herramientas de manipulación genética para *P. pastoris* se sentaron las bases para el empleo de este organismo hospedero para la producción de proteínas heterólogas alternativo a *S. cerevisiae*. Desde 1990, Petróleos Phillips permitió el empleo de esta tecnología a universidades y organizaciones sin ánimo de lucro para su uso no comercial. Más recientemente, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, comercializó el sistema para uso exclusivo en investigación, sin embargo, se precisa de un permiso o licencia de la compañía Research Corporation Technologies (RCT) para su uso comercial. A algunos años de la disponibilidad de este sistema en un estuche comercial,, se ha podido ampliar el conocimiento de este sistema y mejorar dicha tecnología y de esta manera se han puesto en evidencia tanto ventajas como desventajas del mencionado sistema (Cregg y cols., 2000).

La producción de proteínas recombinantes en la levadura *Pichia pastoris* tiene grandes ventajas sobre otros sistemas de expresión procariotas y eucariotas: 1. Tasa de crecimiento rápido, acoplado a una fácil fermentación celular de alta densidad; 2. Altos niveles de productividad en un medio casi libre de proteínas; 3. Eliminación de la contaminación con endotoxinas y bacteriófagos; 4. Fácil manipulación genética para la caracterización de vectores de expresión de levaduras; 5. El desconocimiento de

patogenicidad humana. 6. Puede realizar diversas modificaciones postraduccionales que incluyen: plegamiento del polipéptido, glicosilación, metilación, acilación, regulación proteolítica y orientación a los espacios subcelulares; 7. La capacidad de secretar proteínas que pueden ser purificadas del medio de crecimiento sin las levaduras. (Li y cols., 2007).

1.4.1 Metabolismo de *Pichia pastoris*.

Pichia pastoris es una de aproximadamente doce especies de levaduras representadas por cuatro géneros diferentes de metabolizadores de metanol. Los otros géneros incluyen *Candida*, *Hansenula* y *Torulopsis* (Higgins, 1998).

El genoma de *P. pastoris* contiene dos copias de gen del alcohol oxidasa (AOX1 y AOX2), que permiten el crecimiento en metanol como única fuente de carbono y energía. El promotor AOX1 Regula alrededor del 85% de la actividad de la alcohol oxidasa en la célula y es el promotor utilizado para conducir la expresión de las proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* (Zhang y cols., 2000) y el gen de la alcohol oxidasa 2 (AOX2) alrededor de 10%. Existen 3 tipos de fenotipo que varían en cuanto a su capacidad de utilizar metanol como única fuente de carbono Mut⁺: metaboliza el metanol de forma rápida; Mut^s: metabolizador lento de metanol y Mut⁻: metabolizador nulo de metanol(Cos, y cols., 2006).

El primer paso en el metabolismo del metanol es la oxidación del metanol por la enzima alcohol oxidasa (AOX) a formaldehído, generando peróxido de hidrógeno en el proceso. Para evitar la toxicidad del peróxido de hidrógeno en la célula, este primer paso del metabolismo del metanol toma lugar en un orgánulo especializado llamado perixosoma, donde queda el peróxido de hidrógeno atrapado evitando la toxicidad en el resto de la célula. (Figura 1) (Sola y cols., 2007). Después la catalasa lo convierte en H₂O y O₂. Una porción del formaldehído generado por la AOX deja el peroxisoma para más tarde ser oxidado para formar formato y bióxido de carbono por dos formaldehído deshidrogenasas citoplasmáticas, reacciones que son fuente de energía para las células que crecen en metanol (Higgins, 1998). El resto del formaldehído es asimilado para

formar constituyentes celulares por medio de un ruta cíclica, que empieza con la transformación del formaldehído con la xilulosa-5-monofosfato, una reacción catalizada por una tercera enzima dihidroxiacetona sintasa (DHAS). El producto de esta reacción, glicelaldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona, deja el peroxisoma y entra a una ruta citoplasmática que genera xilulosa-5-monofosfato, por cada tres de estos ciclos se genera otra molécula de gliceraldehído 3-fosfato (Li y cols., 2007).

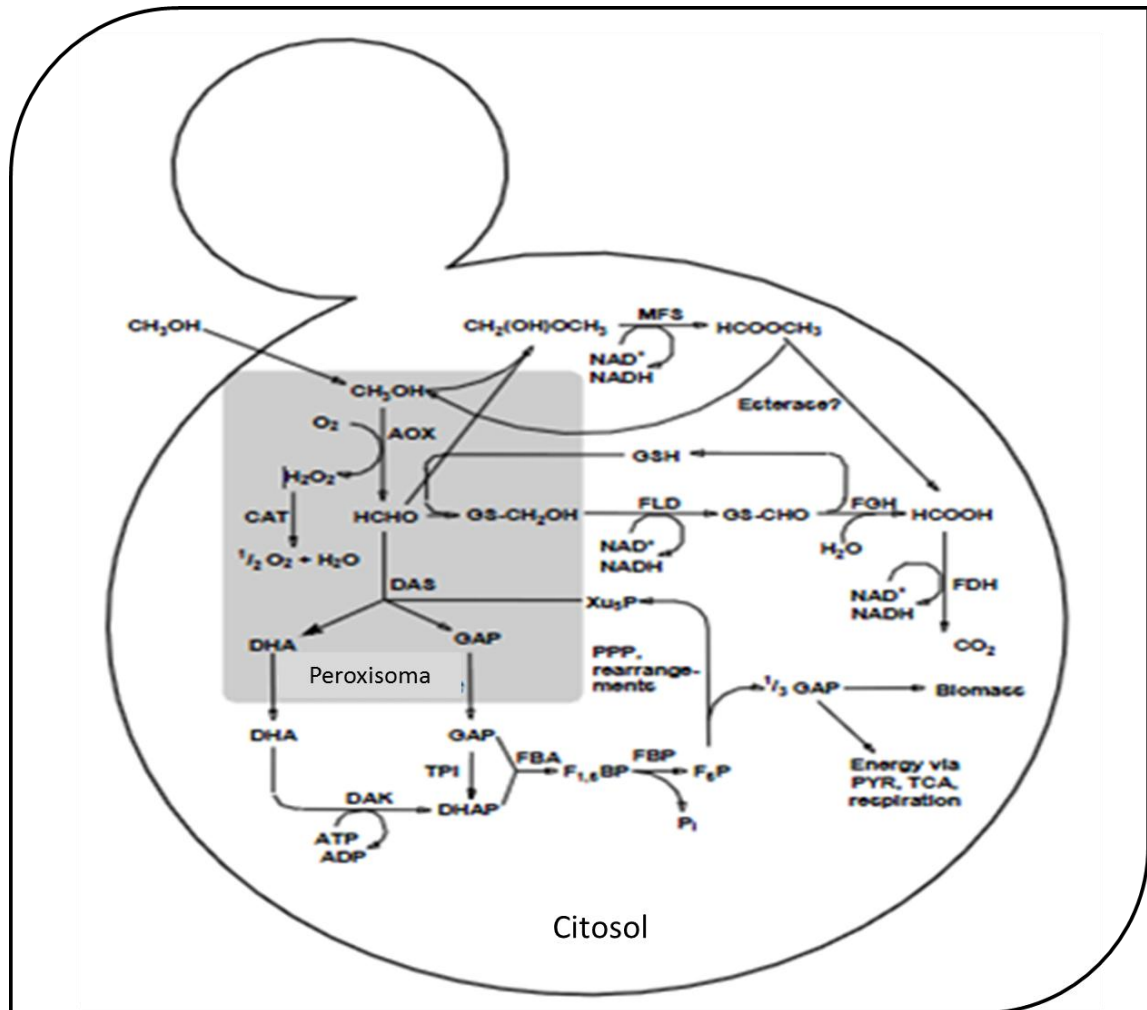


Figura 1. Ciclo metabólico del metanol en *Pichia pastoris*. La vía principal y las enzimas que intervienen en el metabolismo del metanol en las levaduras metilotróficas son las siguientes. AOX1: Alcohol oxidasa, CAT: catalasa, FLD: S-formil glutatión hidrolasa, FDH: formiato deshidrogenasa, DAS: dihidroxiacetona sintasa, TPI: triosa-fosfato isomerasa, DAK: dihidroxiacetona cinasa, FBA: fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa, FBP: fructosa, 1,6-bisfosfato, F₆P: fructosa 6-fosfato, P: fosfato, Xu₅P: xilulosa 5-fosfato, GSH: glutatión, PYR: piruvato, PPP: Vía de las pentosas fosfato, TCA: ciclo del ácido tricarbóxico. (Hartner y Glieder, 2006).

1.4.2 Vectores de expresión.

La expresión de cualquier gen foráneo en *P. pastoris* requiere tres pasos básicos:

1. Inserción del gen en el vector de expresión.
2. Introducción del vector de expresión en el genoma de *P. pastoris*.
3. Análisis del potencial de expresión de las cepas transformadas del producto del gen foráneo (Porro y cols., 2005).

Para el éxito en la expresión de proteínas recombinantes, uno de los factores principales que influyen sobre este evento son los vectores de expresión, los cuales son comercializados por Invitrogen y pueden diferir en el promotor utilizado, en el péptido señal, en los marcadores de selección y si son cepas multicopia.

1.4.3 Vector pPICZ α .

El vector de expresión pPICZ α (Figura2), es un vector de 3.6 kb el cual sirve tanto para la expresión como para la secreción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Las proteínas recombinantes se expresan como una fusión en el péptido N-terminal del factor- α , el cual es el péptido señal, de *Saccharomyces cerevisiae*. El vector permite una alta expresión inducida por metanol del gen de interés por *P. pastoris*, el vector puede usarse en cualquier cepa de *P. pastoris*: X-33, SMD1168H, KM71H. (INVITROGEN, 2010).

El vector pPICZ α contiene los siguientes elementos:

- Lado 5' contiene el promotor de AOX1 para un regulación estricta, de la expresión del gen interés inducido por metanol.
- Factor- α (péptido señal), el cual dirige la secreción de la proteína recombinante.
- Gen de resistencia a Zeocina para la selección de clonas en *E.coli* así como en *P. pastoris*.
- El péptido en el lado C-terminal contiene un epítipo de c-myc para su detección y una etiqueta de 6x-Histidinas, para la purificación de la proteína recombinante.

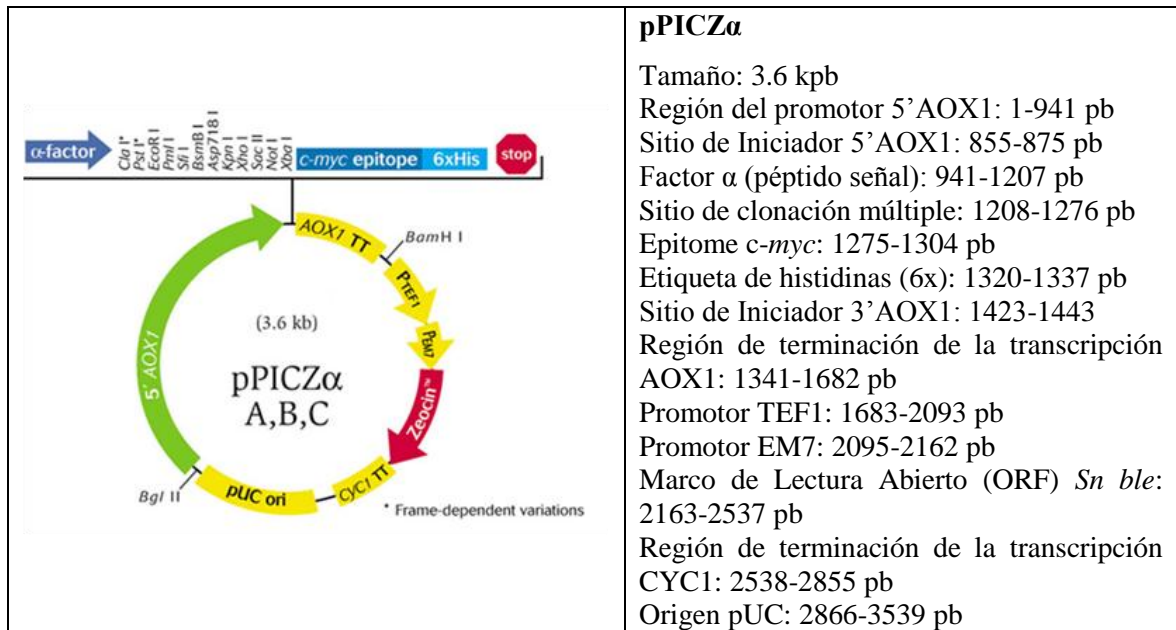


Figura 2. Partes que conforman al vector pPICZ α .

1.4.4 Recombinación e integración de pPICZ α a *Pichia pastoris*.

Los vectores desarrollados para *P. pastoris* pueden ser episomales o integrales, sin embargo, los primeros usualmente no son muy estables, por lo que se utilizan principalmente los vectores de expresión que se integran en su genoma para obtener una expresión estable de las cepas. La integración generada es estable en ausencia del marcador de presión selectiva, incluso cuando están presentes como múltiples copias (Figura 3).

Al igual que en *S. cerevisiae*, los vectores de ADN lineal pueden generar transformantes estables de *P. pastoris* a través de recombinación homóloga entre las secuencias que comparte el vector y el genoma huésped. La primera y más simple forma de integración es digerir el vector en un solo lugar con una enzima de restricción dentro de cualquier secuencia como la del marcador génico (HIS4) o la secuencia del promotor AOX1 y luego transformar el vector linealizado en el mutante auxotrófico adecuado (*his4* mutante). El ADN terminal libre, estimula al vector para que se dé la recombinación homóloga, en el corte se tiene un evento de cruce de alta frecuencia (50-80% transformantes His⁺) (Cregg y cols., 2000).

Por otra parte, ciertos vectores de expresión de *P. pastoris* se pueden digerir, de tal manera que el fragmento de ADN que contiene el casete de expresión y el marcador genético (His⁴) está flanqueado por las secuencias terminales 5'y 3' AOX1 que estimulan el reemplazo del gen AOX1, lo que lleva a la supresión del gen AOX1 y su sustitución por el casete de expresión y el gen marcador. El resultado de las cepas de reposición, constituyen aproximadamente el 10 al 20% de los transformantes, son prototróficas para (His⁺). Además, debido a la interrupción del gen AOX1, estas cepas se basan en el gen de la alcohol oxidasa 2 (AOX2) más débil para el crecimiento de metanol y en consecuencia, estas cepas tienen un fenotipo Mut^s. (Li y cols., 2007).

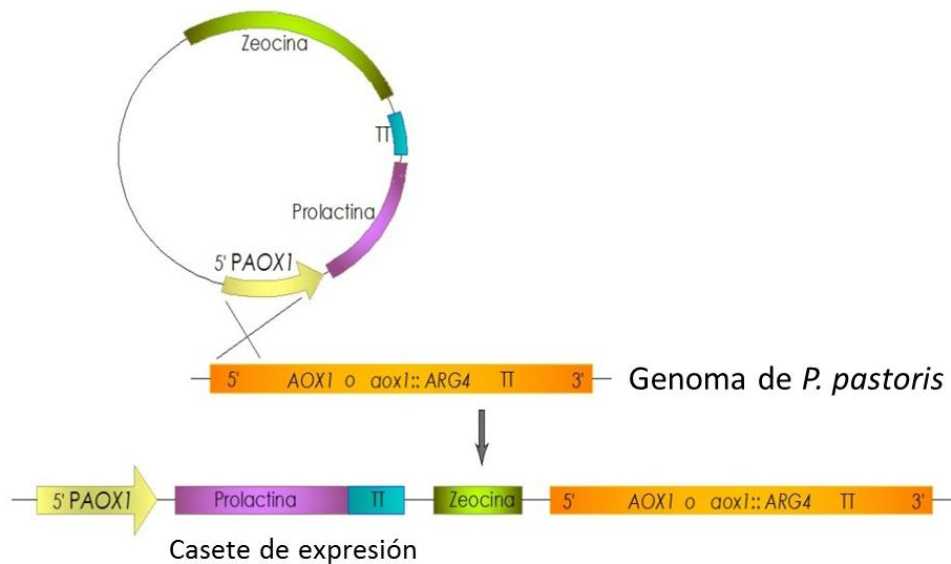


Figura 3. Proceso de la inserción del plásmido en su fragmento homólogo 3' en el locus intacto AOX1. (His⁺ mut⁺).

1.4.5 Fermentación en levaduras.

La fermentación es esencial para la secreción de proteínas porque existe una correlación elevada entre el rendimiento y la densidad celular. Ciertamente no existen condiciones que garanticen la óptima producción de una proteína, pero hay algunas pautas que permiten una importante mejora de la productividad (Cos y cols., 2006).

Para la fermentación de *P. pastoris*, se aplican dos fases generales. En la primera fase, las células crecen hasta que se agote el glicerol o bien la glucosa, para aumentar la masa celular y el promotor de AOX1 se mantiene en estado latente. En la segunda fase, la expresión génica empieza por la alimentación de metanol el cual es usado como única fuente de carbono, se activa el promotor de AOX1 y se empieza la producción de la proteína recombinante (Cereghino y cols., 2002). (Figura 4). Hasta ahora, muchas proteínas heterólogas se han expresado en *P. pastoris* porque el nivel de expresión es superior a la de *E.coli* y significativamente mayor al de *S. cerevisiae*.

Particularmente importante es que el organismo tiene la capacidad de secretar proteínas al medio de cultivo: el producto secretado puede comprender más del 80% del total de proteínas en el medio de cultivo. La expresión y secreción de estas proteínas heterólogas, no sólo dependen de la dosis génica, sino también de otros factores, como el reconocimiento y procesamiento del péptido señal, proteólisis, fermentación y glicosilación. Con respecto a la fermentación, hay varios factores que afectan el rendimiento de la producción, como la composición del medio de cultivo, el tipo de cepa y factores no-nutricionales, tales como el pH, velocidad de agitación, oxígeno disuelto, inducción del metanol y la estrategia de fermentación (Liy cols., 2007).

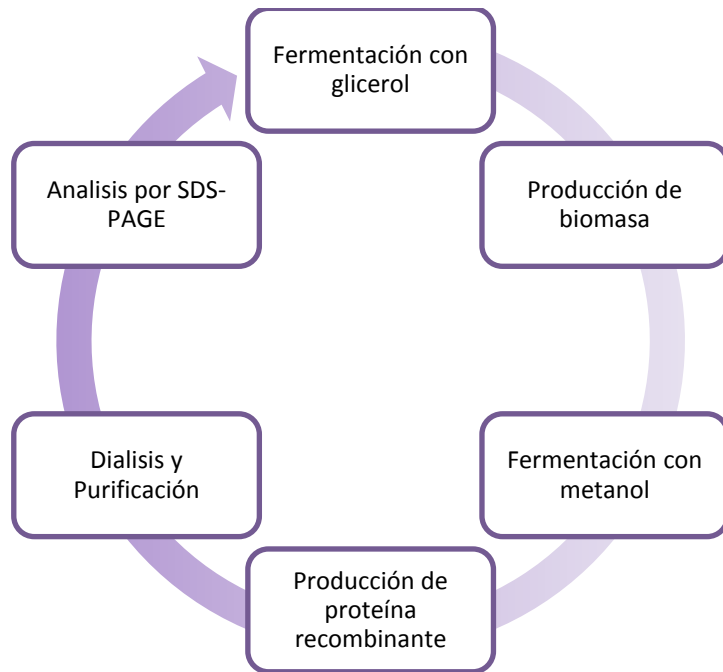


Figura 4. Etapas de la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*

1.5 *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular, perteneciente a los ascomicetos, esta especie de levadura fue la primera en ser manipulada para la expresión de la proteínas recombinantes por lo que ofrece la ventaja de ser uno de los organismos eucariotas mejor caracterizado, su genoma ha sido totalmente secuenciado y es considerado como organismo GRAS (Reconocido en general como seguro) por la FDA (administración de drogas y comida) americana. Por estos motivos muchos de los sistemas de expresión desarrollados para la producción de proteínas heterólogas están basados en *S. cerevisiae* y muchas proteínas se han producido en ella (Porro y cols., 2005).

Esta levadura es capaz de realizar el procesamiento postraduccional más básico de las células de mamíferos, sin embargo, en ocasiones no se considera un huésped óptimo para la producción de proteínas poco comunes a gran escala, sobre todo por sus características respecto a las necesidades técnicas de fermentación que requieren equipos muy sofisticados. Además, las proteínas producidas por *S. cerevisiae* suelen ser

hiperglicosiladas, debido a la retención de los productos en el espacio periplásmico. Por otra parte, se presenta una retención parcial de la proteína producida en *S. cerevisiae*, una fracción de la proteína es normalmente degradada (Balbás, 2004). Sin embargo, el uso de la ingeniería genética ha permitido modificar genéticamente las levaduras para el mejoramiento de la producción de proteínas, tal es el caso donde Chiba y cols. en 1998, introdujeron el gen de una α 1,2-manosidasa con una señal de retención del retículo endoplásmico construyendo una mutante de *S. cerevisiae* que podría interrumpir los genes de varias manosil-transferasas. Lo que dio lugar a glicoproteínas recombinantes y nativas con la estructura M5N2. Esta estructura no se encuentra en las glicoproteínas producidas por *S. cerevisiae* y es el sustrato para su posterior procesamiento para formar glicanos complejos, como en las células de mamífero (Chiba y cols., 1998).

Saccharomyces cerevisiae presenta ciertas ventajas como sistema de expresión de proteínas recombinantes sobre algunos organismos procariotas, como: 1. Es el sistema eucariota mejor caracterizado desde el punto de vista de la biología molecular y la fisiología; 2. Su genoma está totalmente secuenciado; 3. Existen vectores de expresión y cepas disponibles en el mercado; 4. Utiliza cultivos con requerimientos económicos; 5. Su manipulación es sencilla a nivel de laboratorio industrial; 6. Se producen altos niveles de la proteína recombinante; 7. Realiza modificaciones postrasduccionales; y es considerado un organismo GRAS y 8. Se ha reportado que secreta hasta 2.5 g/L. de proteína recombinante (Nevoigt, 2008).

1.5.1 Metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*.

La galactosa es utilizada por *S. cerevisiae* como en casi la mayoría de todos los organismos, por la conversión de glucosa-6-fosfato, catalizada por las enzimas de la vía Leloir (Figura5). La galactosa en forma de melibiosa está también disponible para las células de levadura después de la escisión de este disacárido catalizada por la α -galactosidasa, codificada por el gen MEL1 gen. La galactosa entra en las levaduras a través de un permeasa específica, codificada por el GAL2 después la α -D- galactosa es fosforilada mediante el enzima galactocinasa a Galatosa-1-fosfato, la cual por la acción

del enzima galactosa-1-fosfato-uridiltransferasa utilizando la UDP-Glucosa como sustrato, es transformada en Glucosa-1-fosfato y UDP-Galactosa, que a su vez, mediante la acción del enzima UDP-galactosa4-epimerasa se mantiene en equilibrio con la UDP-Glucosa. De este modo, por cada molécula de galactosa que entra en esta vía metabólica, se produce una de Glu-1-P. Estas enzimas son codificadas por GAL1 (quinasa), GAL7 (transferasa), GAL10 (epimerasa) y GAL5 (mutasa). La expresión de los genes que codifican estas enzimas (excepto GAL5) están estrechamente reguladas donde su expresión es inducida por el crecimiento en galactosa y reprimida durante el crecimiento en glucosa. El gen GAL5 (codifica para la fosfoglucomutasa) no está regulado, por lo que se expresa en todas las condiciones (Johnston, 1987).

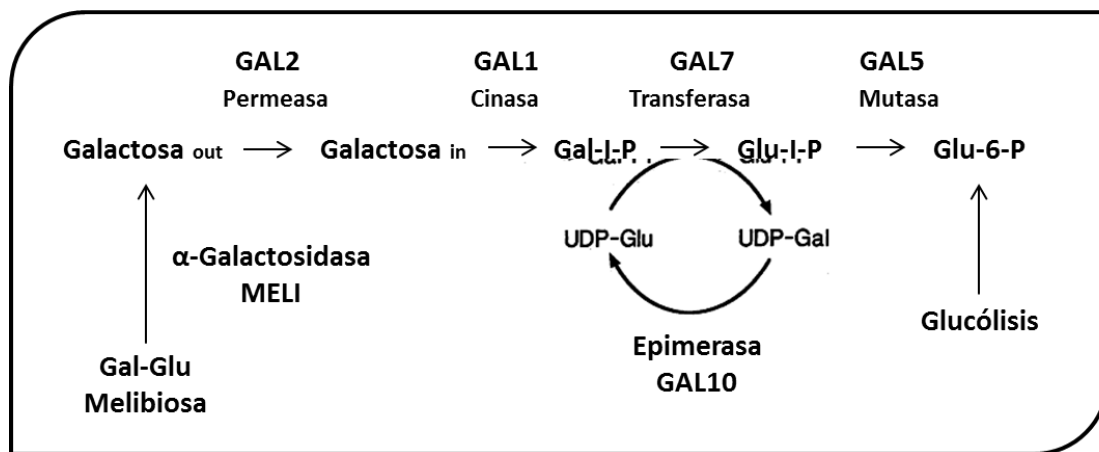


Figura 5. Vía de utilización de la galactosa.

1.5.2 Vectores de expresión.

Un amplio rango de vectores están disponibles para diferentes requerimientos como de inserción, delección, alteración y expresión de genes en las levaduras. La mayoría de los plásmidos utilizados para los estudios de la levadura son vectores de traslado que contienen secuencias que les permite ser seleccionados y propagados en *E. coli*, por lo tanto les permite la amplificación y posterior alteración *in vitro*. Los vectores de levadura más comunes se originaron a partir del plásmido pBR322 y contienen un origen

de replicación (ori), con un alto número de copias en *E. coli* y los marcadores de selección de antibióticos; el gen de β -lactamasas, bla o (Amp^R) y a veces el gen de resistencia a tetraciclina, tet o (Tet^R), que confiere resistencia, respectivamente, a la ampicilina y a la tetraciclina. Además todos los vectores de levaduras contienen marcadores que permiten la selección de levaduras transformadas. Los marcadores más comúnmente utilizados son URA3, HIS3, LEU2, TRP1 Y LYS2, los cuales son mutaciones auxotróficas específicas en las levaduras.

Los diferentes vectores de levadura son:

- YIp o plásmidos de integración a la levadura, estos no son autorreplicativos, pero se integran al genoma con baja frecuencia por recombinación homóloga, se integran como una sola copia. Los vectores con fragmentos como YFG1 y URA3 tienen un gran potencial para integrar secuencias de ADN y pueden ser analizados por PCR.
- YEp son plásmidos episomales que contienen una copia completa del plásmido de 2 μ m, incluyen el origen de replicación y el gen REP3. El ori del plásmido de 2 μ m es el responsable del alto número de copias y la alta frecuencia de transformación de los vectores YEp.
- YCp plásmidos centrómeros de levadura son de replicación autónoma y contienen la secuencia CEN y la secuencia autorreplicativa ARS. Estos vectores tienen un nivel bajo de copias y se pierden en 1-2 veces por generación si no existe una presión de selección.
- pYAC vectores cromosómicos artificiales de levadura, están basados en plásmidos lineales de levadura y contienen secuencias de ADN homólogas o heterólogas que funcionan como telómeros *in vivo*, como si tuvieran el origen de replicación ARS y segmentos de CEN (centrómeros). Su importancia es que permite la transferencia a cultivo celular o a líneas germinales de animales experimentales (Sherman, 1998).

1.5.3 Vector pYE2NT.

El plásmido pYES2/NTC (Figura 6) es un vector de 6.0kb diseñado para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*. El vector permite una alta expresión inducida por galactosa del gen de interés por *S. cerevisiae*, el vector puede usarse en la cepa *S. cerevisiae* INVSc1. Tiene las siguientes características.

- El promotor de la levadura GAL1 que permite un alto nivel de expresión de proteína en la levadura inducible por galactosa y reprimido por glucosa.
- Tiene tres marcos de lectura para facilitar su clonación con un péptido N-terminal que codifica un epítipo Xpress y una etiqueta de polihistidina (6xHis).
- Un péptido C-terminal que codifica el epítipo V5 y una etiqueta de polihistidina para la purificación y la detección de una proteína de fusión recombinante.
- Tiene el origen de 2μ para el mantenimiento y la replicación de un alto número de copias en forma episomal en la levadura.
- Un marcador URA3 auxotrófico para la selección de las levaduras transformadas de levadura.
- Gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli* (INVITROGEN 2003).

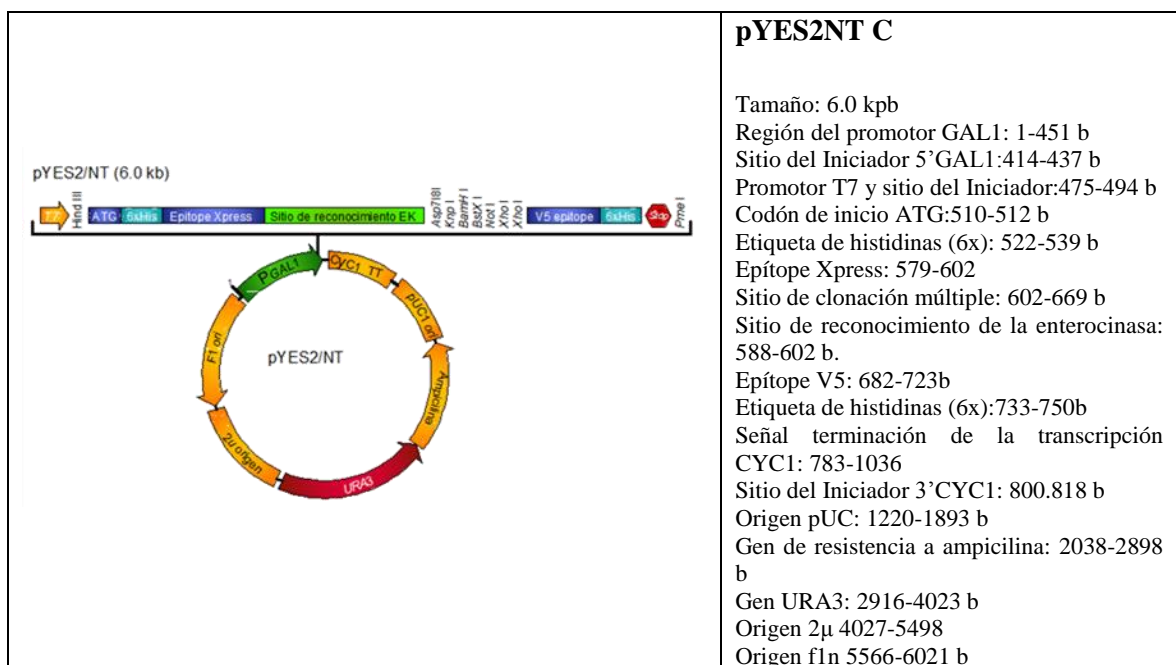


Figura 6. Partes que conforman al vector pYES2/NT C.

1.6 Purificación por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC).

Una cuarta parte de todos los fármacos nuevos que entran al mercado son proteínas recombinantes terapéuticas. Un desafío recurrente en la fabricación de proteínas, ha sido el desarrollo de un método de purificación rápido, robusto, económico de proteínas. (McCluskey y cols., 2007). En general, es difícil decidir el mejor sistema de purificación para una proteína específica de interés. Esto depende del objetivo de la proteína en sí (por ejemplo, la estabilidad, la hidrofobicidad), el sistema de expresión y la aplicación de las proteínas purificadas.

Los métodos de separación de moléculas biológicas están basados en la diferencia de carga, tamaño y afinidad. En base a estas características se han desarrollado seis estrategias principales de purificación de proteínas: precipitación diferencial, filtración en membrana, filtración en gel, intercambio iónico, cromatografía de interacciones hidrofóbicas y cromatografía de afinidad.

Un método de purificación de gran alcance implica el uso de péptidos de afinidad como etiquetas, que se fusionan a la proteína de interés y se utiliza para acelerar la purificación de proteínas a través de la cromatografía de afinidad. Un método ampliamente empleado utiliza cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) para purificar las proteínas recombinantes con una etiqueta corta de afinidad compuesta de residuos de polihistidina. IMAC se basa en las interacciones entre un ion metálico de transición (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) inmovilizado en una matriz específica y las cadenas laterales de aminoácidos (Bornhorst y Falke, 2000).

Estos sistemas de afinidad de etiquetas presentan las siguientes características: (a) purificación por adsorción en un solo paso; (B) efecto mínimo sobre la estructura terciaria y la actividad biológica; (c) el retiro fácil y específico de las etiquetas para producir la proteína nativa, (d) ensayo simple y preciso de la proteína recombinante durante la purificación y (e) aplicabilidad a un número de proteínas diferentes. (Terpe, 2003).

Purificación por afinidad de etiquetas de histidinas (Figura 7), es un método de elección para la purificación de un gran número de proteínas recombinantes expresadas en diversos sistemas de sobreexpresión. La popularidad de este método se debe en parte a sus propiedades ventajosas, como una alta afinidad de la etiqueta de Histidinas en las proteínas recombinantes en una matriz de agarosa de níquel-nitrilotriacético (Ni-NTA) y una elución fácil con tampón de imidazol (Cao y Lin, 2009). Basándose en un enlace coordinado de un ion metálico unido covalentemente a un agente quelante (Ni-NTA), con una proteína etiquetada con histidinas.

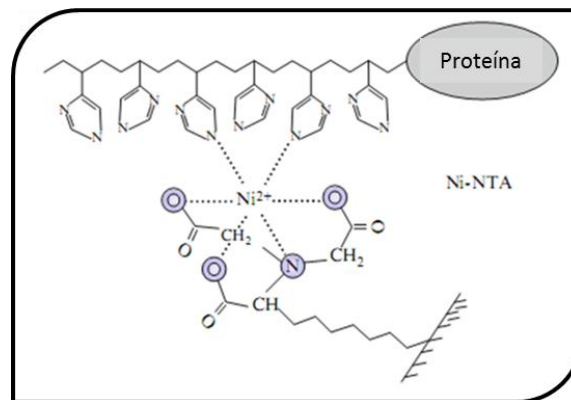


Figura 7. Modelo de interacción entre la etiqueta de histidinas y el Ni²⁺ con la proteína de interés.

1.7 Prolactina humana (PRL).

La prolactina es una hormona que es sintetizada y secretada en la adenohipófisis (glándula pituitaria anterior, la misma que se encuentra ubicada en una estructura ósea llamada silla turca y que se localiza en la base del cráneo.(Hilfiker-Kleiner y cols., 2007).La prolactina (PRL) es miembro de la familia de las hormonas del crecimiento compuesta por prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH) y lactógeno placentario (PL), proliferinas y proteínas relacionadas con proliferinas.(Forsyth y Wallis, 2002).

El gen de la prolactina tiene un tamaño de 10.0 kb y se compone de 5 exones y 4 intrones. La transcripción del gen de la prolactina es regulada por dos regiones promotoras independientes. La región proximal de 5,000pb dirige la expresión

específica en pituitaria, mientras que la región promotora río arriba es responsable de la expresión extrapituitaria. El ADNc de prolactina humana es de 914 nucleótidos y tiene un marco de lectura abierta de 681 nucleótidos que codifican a la pre-prolactina de 227 aminoácidos. El péptido señal contiene 28 aminoácidos, por lo que la prolactina madura humana se compone de 199 aminoácidos. La molécula de la prolactina está organizada en una sola cadena de aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares entre los seis residuos de cisteína (Cys4-Cys11, Cys58-Cys174, Cys191, Cys199) en los seres humanos. Estos 199 aminoácidos corresponden a una masa molecular de 23,000Da. (Freeman y cols., 2000).

La prolactina tiene varias modificaciones postraduccionales que impactan su estabilidad, vida media, la unión al receptor y la actividad biológica. Estos incluyen la polimerización, escisión proteolítica, glicosilación y fosforilación. La prolactina tiene diferentes variantes moleculares (Tabla 3) (Mendez, y cols., 2005).

Tabla 3. Variantes moleculares de la prolactina humana.

Variante o isoforma	Peso molecular (kDa)	Tejido de origen	Localización
Nativa	23.5	Hipófisis	Hipófisis, plasma
Glicosilada	25	Hipófisis	Hipófisis, plasma
Hendida	16	Hipófisis, hipotálamo	Hipófisis, cerebro glándula mamaria, próstata, plasma
Grande	46	Hipófisis	Hipófisis
Grande-grande	>100	Hipófisis	Hipófisis
Variantes linfocitarias	11 23-25 27 60	Células mononucleares periféricas (linfocitos y monocitos), timocitos	Células de origen, medio de cultivo de CMN, plasma
Otras variantes	8 22	Hipófisis	Hipófisis

La formación de la variante de 16 kDa se debe a un corte de la prolactina nativa generando un fragmento N-terminal de la prolactina llamado prolactina 16 kDa a la que se le atribuyen funciones antiangiogénicas. La dimerización y polimerización de la prolactina se da por la unión con otras proteínas como las inmunoglobulinas por uniones covalente y no covalentes resultando formas de alto peso molecular, pero con una

actividad biológica reducida. Por ejemplo la prolactina grande-grande está formada por la prolactina e IgG y se utiliza en la detección y el diagnóstico diferencial de diferentes prolactinemias de blancos primarios en estudios clínicos. La fosforilación de la prolactina ocasiona una menor actividad biológica que la prolactina no fosforilada. Sin embargo la prolactina fosforilada puede favorecer un único papel como regulador autocrino de la secreción de la prolactina ya que suprime la liberación de la prolactina no fosforilada de células GH3. Nuevos datos indican que la prolactina fosforilada actúa como antagonista de vías de señalización de la traducción e inician la proliferación por la prolactina no modificada en células Nb2 de linfoma de rata. La glicosilación de la prolactina ha sido encontrada en la glándula pituitaria de diferentes especies de mamíferos. El grado de glicosilación puede ir de 1 hasta el 60%, la unión con los carbohidratos puede ser N-glicosilación como O- glicosilación. Al igual que otras variantes, la prolactina glicosilada tienen menor actividad biológica, en la unión al receptor y en la reactividad inmunológica de la prolactina (Freeman y cols., 2000).

La prolactina es una hormona multifuncional ya que se le han descrito alrededor de 300 funciones, por lo que interviene en múltiples funciones reproductivas y metabólicas como la secreción de leche en el humano y también participa en la tumorigenicidad. Además de ser una hormona hipofisaria clásica, PRL en el ser humano se produce por muchos tejidos en todo el cuerpo, donde actúa como una citocina. (Ben-Jonathan y cols., 2008). Esta proteína también participa en la angiogénesis, Corbacho en el 2000 reportó que el gen de la prolactina se expresa en líneas de células endoteliales de bovino y de cordón umbilical humano (Corbacho y cols., 2000). Por otro lado Montes de Oca en el 2005 reportó que la prolactina estimula la adhesión mediada por integrinas de células mononucleares a células endoteliales. En el 2010 Dolinska y cols. evaluaron el uso de prolactina humana junto con la cisteína como suplementos de una solución de transporte y conservación de órganos, reportando que esta combinación tiene un efecto protector sobre hígados de cerdos (Dolinska y cols, 2010). La prolactina humana recombinante promueve la supervivencia de células beta humanas por la inhibición de las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis (Terra y cols., 2011).

1.8 Isoforma de la prolactina de 16 kDa.

Hace 15 años se describió por primera vez la prolactina de 16 kDa de rata la cual resulta de la de proteólisis *in vitro* de la prolactina de 23 kDa (PRLr), de células lisadas o extractos de tejido (por ejemplo, de la glándula mamaria de rata) en medio ácido. Posteriormente, se demostró que la PRLr 16kDa purificada, ejerce propiedades antiangiogénicas en diversos estudios *in vitro* y en modelos *in vivo*, lo cual le confiere un elevado potencial antitumoral a este polipéptido. La generación de la prolactina 16kDa *in vitro* requiere dos pasos. En primer lugar, la proteólisis eficiente requiere pH ácido ya que la proteasa involucrada es la catepsina D, la cual es una proteasa ácida. Dos sitios de corte se identificaron en PRLr, los cuales corresponden a los residuos aminoacídicos 145 y 148. Debido a que la prolactina contiene un puente disulfuro interno entre las cisteínas 56 y 172 (numeración de la secuencia de rata), el paso de la proteólisis genera una prolactina rota, la cual es una isoforma donde se generan dos fragmentos N-terminal de 16-kDa (residuos 1-145) y C-terminal de 7-kDa (residuos 149-197) permanecen unidos covalentemente. La liberación del fragmento 16-kDa por lo tanto, requiere un segundo paso, es decir, la reducción del corte de la PRL. (Piwnica y cols., 2004).

Posteriormente Clapp y colaboradores en 1991 describieron a la prolactina de 16-kDa, la cual es un fragmento NH₂-terminal predominante de la prolactina y está presente en el hipotálamo, en la hipófisis, en la glándula mamaria y el riñón en los seres humanos. La prolactina 16kDa puede ser generada por la ruptura de la PRL de 23 kDa por metalo-proteasas de la matriz de condrocitos humanos y la catepsina D en los diversos tejidos y tipos celulares (Lee y cols., 2007). Diferentes versiones de las prolactina de 16 kDa pueden ser generadas al incluir un codón de terminación en el ADNc de la prolactina humana por ejemplo secuencias que abarcan desde 1 hasta 124, de 1-139 y de 1-142 aminoácidos y todos éstos muestran las propiedades antiangiogénicas similares a lo reportado en la prolactina de rata 16 kDa en distintos bioensayos. (Piwnica y cols., 2004). En contraste con la prolactina 23kDa, que tiene efectos angiogénicos en condiciones patológicas tales como la artritis reumatoide o de cáncer mama, la prolactina de 16 kDa tiene potentes efectos antiangiogénicos y esto se demostró con la

inhibición basal del factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que estimula la proliferación de las células endoteliales. La prolactina 16k en un ensayo membrana corioalantoidea inhibió el crecimiento de nuevos capilares en un embrión de pollo y también bloqueó la neovascularización de la retina de rata. (Lee y cols., 2007).

1.9 Antecedentes del laboratorio de biotecnología.

1.9.1 Hormona del Crecimiento Humano (HGH).

En el laboratorio de biotecnología se cuenta con más de una veintena de cepas de *P. pastoris* productoras de hormonas del crecimiento de diversas especies. Entre ellas se clonó el ADNc de la hormona del crecimiento humano madura (HGH), la cual es una proteína de 191 residuos aminoacídicos, con un peso molecular de ~22kDa, sintetizada de manera natural en la glándula pituitaria y cuya versión recombinante se emplea exitosamente en el tratamiento del enanismo pituitario así como su aplicación en niños con deficiencia de la HGH y ésta se ha producido en el sistema de *Pichia pastoris* a nivel de matraz, obteniendo 76 µg/mL de rendimiento y también se ha realizado su producción a nivel de biorreactor con rendimientos de 80 mg/mL (Márquez Ipiña, 2011).

1.9.2 Purificación de la HGH.

En el laboratorio de biotecnología se han aplicado diferentes metodologías para la purificación de las diferentes proteínas producidas con anterioridad, dentro de las cuales está la cromatografía de intercambio iónico obteniendo resultados de regulares a buenos (Tabla 4). Resalta la importancia de la HGH, de la cual se han obtenido hasta 80 mg/mL y se ha logrado una pureza de 75% (Ascacio Martínez, 2004), también se ha realizado la purificación por la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados para la HGH obteniendo el 90% de pureza (Márquez Ipiña, 2011).

Tabla 4. Producción y pureza de hormonas recombinantes de diferentes especies.

Hormona	Producción mg/L	Pureza	Bioactividad
CFGH	170 mg/L	50 %	++
ECGH	100 mg/L	63%	++++
BGH	150 mg/L	56%	----
FCGH	90 mg/L	70%	++
HGH	80 mg/L	75%	++++
HPL	300 mg/L	90%	++++

La actividad biológica de las hormonas del crecimiento de diferentes especies (tabla 4), se realizó en base a la proliferación de la línea celular Nb2, tomando en cuenta su absorbancia, se tomó una medida arbitraria en forma de cruces, con un mayor número de cruces representa un bioactividad mayor y esta descende, con un menor número de cruces.

CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.

Es de interés la producción de prolactina de manera recombinante ya que se ha demostrado que tiene diversas aplicaciones de gran importancia médica, como la conservación de órganos, el desarrollo y proliferación celular, la generación de la isoforma de 16 kDa (la cual tiene un elevado potencial antiangiogénico) y otras aplicaciones en ensayos de laboratorio.

Los sistemas de expresión de levaduras (*Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*) son un modelo eucariota idóneo para la producción de proteínas simples para uso humano, como es el caso de la prolactina. Además, la fácil manipulación genética de la levadura permite incluirle una etiqueta de histidinas a las proteínas de interés facilitando su purificación.

CAPÍTULO III. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

- Producir, purificar y ensayar la actividad biológica de la prolactina humana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Diseñar y construir el sistema de expresión en levaduras de las isoformas de 23 y 16 kDa de la prolactina etiquetadas con histidinas.
- Producir a nivel de matraz dichas isoformas recombinantes.
- Purificar las prolactinas por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados.
- Realizar los ensayos de la actividad biológica de las proteínas recombinantes en modelos de líneas celulares.

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 MATERIAL.

4.1.1 Reactivos químicos y medios de cultivo.

Los iniciadores necesarios para llevar a cabo la amplificación específica de la secuencia codificante de la prolactina humana de 23 kDa así como de su isoforma de 16 kDa se mandaron sintetizar a la compañía Invitrogen (La Jolla CA, EUA).

Las enzimas de restricción de ácidos nucleicos que se utilizaron se obtuvieron de la casa comercial: New England Biolabs, Inc. (NEB, Beverly, MA. EUA), la Taq polimerasa se obtuvo de Perkin Elmer-Cetus (Alameda, CA. EUA), así como de Roche y los desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) de Promega Co. (Madison, WI. EUA).

La purificación de los productos amplificados de interés y separados por electroforesis en gel de agarosa se realizó con el kit Wizard SV gel and PCR clean up system (PROMEGA).

Los vectores utilizados en este trabajo se obtuvieron de la compañía Invitrogen (vector de clonación pCR 2.1-TOPO, vectores de expresión pPICZ α C y pYES2/NT).

El kit de purificación de proteínas empleado fue His-Bind Resin and His-Bind Amortiguador Kit, de Novagen (EMD Bioscience, Inc., Darmstadt, Germany).

Los reactivos utilizados para elaborar las soluciones (amortiguadores, soluciones salinas, medios de cultivo, geles etc.) se obtuvieron de las siguientes casas comerciales: Sigma Aldrich Chemical Company, Inc (ST. Louis, MO. EUA); Merck (Monterrey, México), Difco (Detroit, MI. EUA), CTR (Monterrey, México) e Invitrogen (La Jolla CA, EUA).

Los medios utilizados fueron LB, YPG, BMMY, SC-U (descritos en el anexo1) y cuando se requirió, estos fueron suplementados con los siguientes antibióticos: ampicilina (Amp) a una concentración final de 100 µg/mL, kanamicina (Km) a 100 µg/mL y zeocina 100 µg/mL.

4.1.2 Biológicos.

La cepa de *Escherichia coli* DH-5α utilizada para la transformación y construcción del vector de expresión, así como la cepa de levadura GS115 de *Pichia pastoris* y la cepa INVsc1 de *Saccharomyces cerevisiae* fueron utilizadas en la transformación con el “casete” de expresión de las isoformas de la prolactina de 23 y 16 kDa, se obtuvieron del cepario de la ULIEG resguardado a -80°C.

El estuche de *Pichia pastoris* así como el de *Saccharomyces cerevisiae* que se utilizaron para la construcción de los sistemas de expresión se adquirió de la compañía Invitrogen Co. (Gaithersburg, MD. EUA).

El ADNc maduro, codificante para la PRL humana, fue obtenido a partir de la cepa ATTC No. 31723 integrada en el plásmido pBR32 en *E. coli*

Se utilizó la línea celular de fibroblastos de ratón 3T3 NIH y la línea celular de células endoteliales de vena de cordón umbilical humana HUVEC, ambas proporcionadas por el MC. Oscar Fajardo del Instituto de Biotecnología del ITESM.

4.1.3 Infraestructura.

Se emplearon durante el desarrollo de este trabajo los siguientes equipos y aparatos: Horno de microondas GoldStar modelo MA-875M, Ultracongelador So-Low de Enviromental Equipment (Cincinnati, Ohio, EUA), Termociclador Eppendorf Mastercycler gradient (Barkhausenweg, Hamburgo, Alemania), Termociclador Applied Biosystems (Singapur), Bomba peristáltica dynamax, modelo RP-1 de Rainin (EUA), Ultracentrífuga Beckman-Coulter modelo J2-M (Fullerton, CA. EUA) y Microcentrífugas de la marca Eppendorf y LabNet, Sistemas de esterilización por calor

húmedo Market Forge (Sterilmatic), Autoclave de 30X30X30 in. (Guanajuato, Gto. Mx.), Incubadoras Shell Lab SL (Sheldon Manufacturing Inc.) modelos: 1535 y 1330GX y Agitador orbital (ORBIT) de Lab Line y Espectrofotómetro UV/Vis DU70.

Se usó un sistema de digitalización y análisis de imagen UVP Mini Darkroom de Bioimaging Systems e ImageJ versión 1.30P (USA), espectrofotómetro de la marca Eppendorf modelo biophotometer, balanza de la marca OHAUS modelo Analytical *Plus* AP110S, potenciómetro digital de la marca ORION modelo 420 A, unidad ultraconcentradora de 100mL (Spectrum) (EUA), concentrador al vacío CENTRIVAP de la marca LABCONCO (Kansas, City, MO. EUA), fuente de poder para electroforesis de la marca Gibco-BRL-Life Technologies Inc. (Carlsbad, CA. EUA) modelo 500, cámaras de electroforesis horizontal Thermo EasyCastTM, campana de extracción y gabinete de bioseguridad de la marca LABCONCO (Kansas City, MO. EUA), El pulso eléctrico para la transformación de bacterias y levaduras se hizo en un electroporador modelo Gene Pulser II y se utilizaron celdas de 0.2mm de la marca BIO-RAD (Hercules, CA, EUA). La electroforesis de proteínas se realizó en cámaras de electroforesis vertical Mini-Protean II de BIO-RAD y fuente de poder Labnet. La secuenciación se realizó en un secuenciador 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems.

Los programas bioinformáticos que se usaron vía internet fueron el BLAST a disposición en (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), NEBcutter 2.0 de New England Biolabs disponible en (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), así mismo se utilizó el programa en línea ClustalW Multiple Sequence Alignment program versión 1.8 (Des Higgins & Toby Gibson), accesible en (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), ImageJ Research Service Brach versión 1.43u de National Institute of Health, USA. (<http://www.rsweb.nih.gov/il>), los programas requeridos para el análisis y manipulación de secuencias nucleotídicas fueron: Amplify versión 2.53 (Bill Engels, ©1992, Madison, WI. EUA), el programa Oligo versión 4.0 (1992 Wojciech Rychlik, National Biosciencie, Inc., Plymouth, MN. EUA).

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 Estrategia general.

Con la finalidad de alcanzar los objetivos propuestos se siguieron las siguientes etapas:

- Amplificación del gen de la prolactina humana y de su isoforma de 16kDa.
- Construcción del sistema de expresión de las isoformas de la prolactina humana en *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- Producción en matraz de las prolactinas.
- Purificación de la proteína recombinante.
- Ensayo biológico de la prolactina humana.

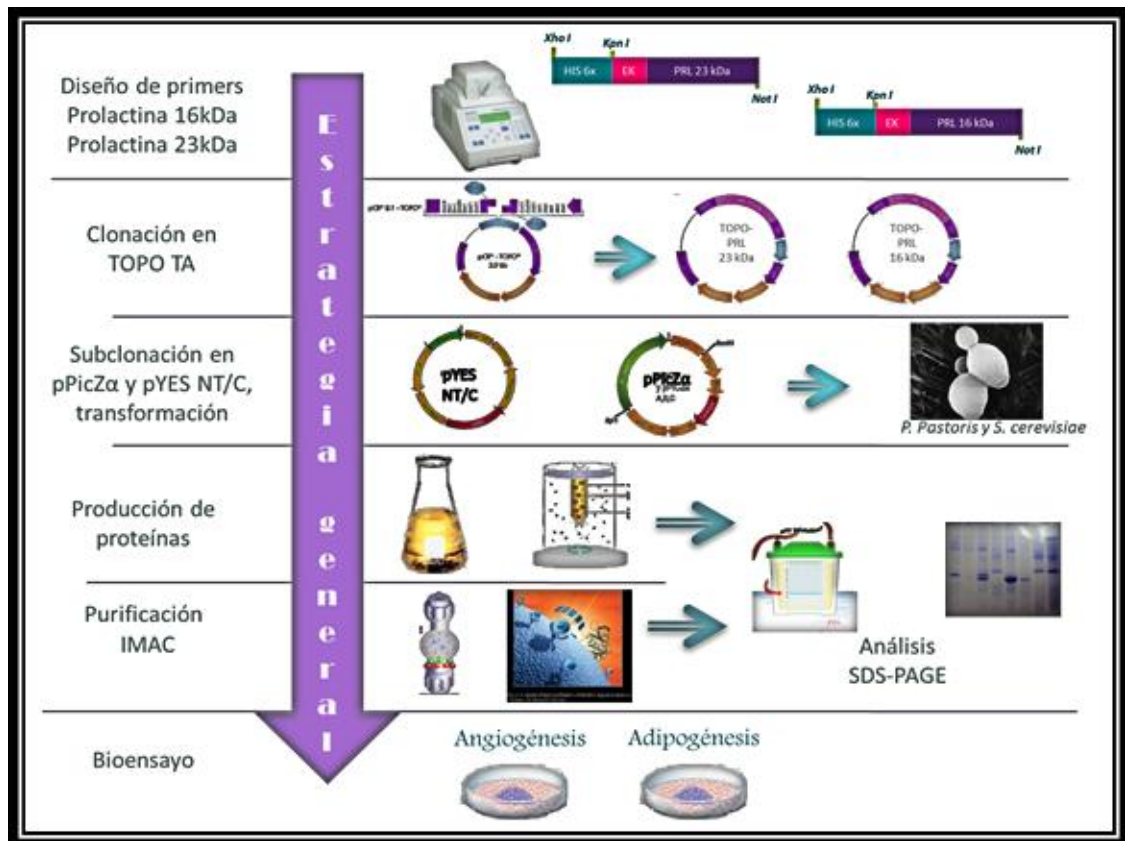


Figura 8. Esquema de la estrategia general. Se muestran los pasos que se siguieron para el diseño y construcción de las cepas productoras de prolactina, hasta el bioensayo de la hormona.

4.2.2 Amplificación de la secuencia codificante de las isoformas de la prolactina humana.

4.2.2.1 Extracción de ADN plasmídico.

Para la obtención del ADN plasmídico de la cepa ATTC No. 31723 que contiene el ADNc de la PRL humana integrado en el plásmido pBR322 se siguieron las instrucciones del fabricante para su crecimiento, una vez crecido durante 16 horas se centrifugaron 3 mL del cultivo bacteriano durante 30 seg a 13,000 rpm, se removió el sobrenadante por aspiración, manteniendo el tubo en hielo. El ADN plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989). Las células se resuspendieron en 100 μ L de solución I fría (glucosa 50mM, EDTA 10mM y Tris-HCL 25mM pH=8) empleando el vortex. Se agregaron 200 μ L de solución II (NaOH 0.2N y SDS 1%) mezclando inmediatamente por inversión e incubando en hielo por 5min. Pasado este tiempo se agregaron 150 μ L de solución III (acetato de potasio 3M, ácido acético 5M), se mezcló de inmediato por inversión y se incubó por 5min en hielo. Pasado el tiempo se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se le hizo una extracción fenol/SEVAG ($\frac{1}{2}$ volumen de fenol y $\frac{1}{2}$ volumen de SEVAG). Se centrifugó por 2 min a 13,000 rpm y el sobrenadante acuoso se transfirió a un tubo nuevo donde el ADN plasmídico se precipitó agregando 2 volúmenes de etanol al 100% frío y mezclando por inversión. Después se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm y la pastilla obtenida se lavó dos veces con 1 mL de etanol al 70% frío y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min. Finalmente se resuspendió en 50 μ L de TE 1X (pH=8) conteniendo ARNasa (20 μ g/mL).

4.2.2.2 Diseño de los iniciadores.

Para el diseño de los iniciadores se emplearon los programas Oligo versión 4.0 y Amplify versión 3.0, empleando como referencia la secuencia reportada para la PRL madura, con número de acceso NM_000948.4. Se diseñaron cuatro juegos de *iniciadores* para amplificar cada una de las isoformas de la prolactina (Tabla 5). El primer juego se diseñó para la amplificación específica de la PRL de 597 pb de longitud siendo que la hibridación se da a los extremos de la secuencia codificante de la proteína madura de 299 residuos aminoacídicos y se les incorporaron sitios de restricción *Xho I* y *Not I*, el segundo juego de iniciadores se diseñó de la misma manera para amplificar la secuencia madura de PRL y se le incorporaron sitios de restricción *Kpn I* y *Not I*, además de una secuencia codificante para un epítipo reconocido por la enzima Enterocinasa (EK). El tercer iniciador (GralHIS-23), que en combinación con el RW PRL-23-2 completan el tercer juego de iniciadores, el cual se emplea para mediante PCR adicionar la secuencia que codifica para la etiqueta de histidinas, así como el sitio *Xho I* y la recreación de KEX2, para la eliminación del factor de secreción α . Los productos de amplificación de estos tres juegos se utilizaron para la subclonación del vector de expresión pPICZ α C. El cuarto juego de iniciadores amplifica la secuencia específica de la PRL de 597 pb de longitud y se les incorporaron sitios de restricción *BamH I* y *Not I* y el producto de amplificación de este juego se utilizaron para la subclonación del vector de expresión pPYES2/NT C. Los cuatro juegos de iniciadores restantes se utilizaron para la amplificación de la isoforma de 16 kDa con las mismas características de la prolactina nativa.

Tabla 5. Lista de iniciadores utilizados.

Nombre	Secuencia	Descripción
FF PRL-23-1	5' CAT CTC GAG AAA AGA TTG CCC ATC TGT CCC G 3'	Hibrida al extremo 5' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>Xho I</i> .
FF PRL-23-2	5' CAT GGT ACC GAC GAT GAC GAT AAA TTG CCC ATC TGT CCC G 3'	Hibrida al extremo 5' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>Kpn I</i> y epítotope para EK.
FF PRL-16-1	5' CAT GGA TCC TTG CCC ATC TGT CCC G 3'	Hibrida al extremo 5' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>BamH I</i> .
GralHIS-23	5' TTA CTC GAG AAA AGA CAT CAC CAT CAC CAT CAT GGT ACC GAC GAT GAC GAT AAA 3'	Hibrida en la región EK, añade la secuencia para 6 His y un sitio de reconocimiento para <i>Xho I</i> .
RW PRL-23-1	5' AGA GCG GCC GC GCA GTT GTT GTT GTG GAT G 3'	Hibrida al extremo 3' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>Not I</i> .
RW PRL-23-3	5' AGA GC GGC CGC TTA GCA GTT GTT GTT GTG GAT G 3'	Hibrida al extremo 3' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>Not I</i> y un codón de terminación.
RW PRL-23-4	5' AGA GC GGC CGC GAC GAT GAC GAT AAA GCA GTT GTT GTT GTG GAT G 3'	Hibrida al extremo 3' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>Not I</i> y un epítotope para EK.
RW PRL-16-1	5' AGA GCG GCC GC TTA CCA GAC AGG GTA GAT CTC ATT TT 3'	Hibrida al extremo 3' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>Not I</i> y un codón de terminación.
RW PRL-16-2	5' AGA GCG GCC GC CCA GAC AGG GTA GAT CTC ATT TT 3'	Hibrida al extremo 3' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>Not I</i> .
RW PRL-16-4	5' AGA GCG GCC GC GAC GAT GAC GAT AAA CCA GAC AGG GTA GAT CTC ATT TT 3'	Hibrida al extremo 3' de la secuencia codificante. Añade un sitio de reconocimiento para <i>Not I</i> y un epítotope para EK.

4.2.2.3 Amplificación de la secuencia codificante de las isoformas de PRL por PCR.

Con los iniciadores previamente diseñados y la muestra obtenida de la cepa ATTC-31723 se amplificó mediante PCR la secuencia codificante de las isoformas de la prolactina en todas sus variantes (Figura 9). Las condiciones específicas para la mezcla de reactivos se indican en la tabla 6, estas se usaron al igual para todos los juegos de iniciadores, en tanto que el programa para el termociclador se muestra en la tabla 7.

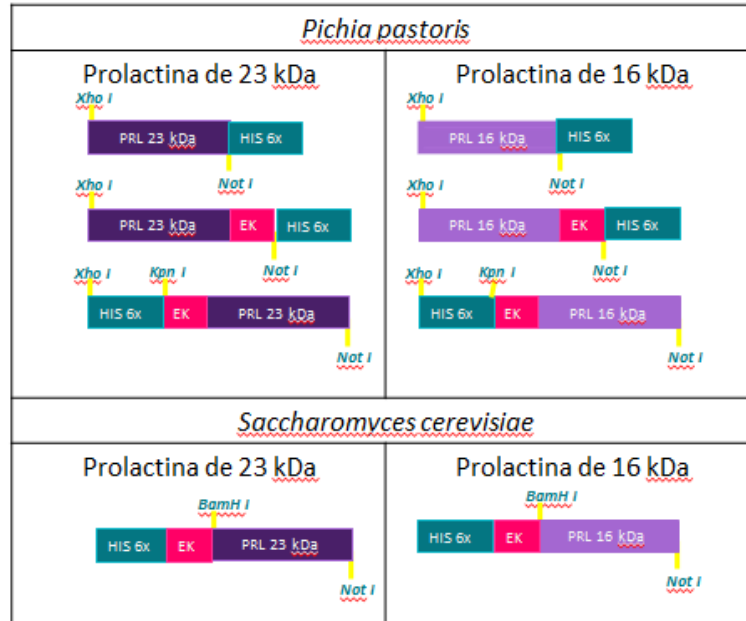


Figura 9. Variantes de las isoformas de la prolactina. Se muestran las diferentes formas de la prolactina que se expresaron en el sistema de expresión *Pichia pastoris*. En las que se considera la integración de una etiqueta de seis histidinas en el extremo amino como en el carboxilo además una secuencia de reconocimiento a una enterocinasasa en ambos extremos, para el caso de *Saccharomyces cerevisiae* solo se integra en el lado amino la etiqueta de histidinas y en el sitio de reconocimiento a enterocinasasa.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de PCR para amplificar las isoformas de la PRL.

Reactivos	Volumen	Concentración
Amortiguador 10 x	2.5 µL	1 x
MgCl ₂ 25 mM	1.5 µL	1.5 mM
dNTPs 100 mM	1 µL	25 mM
Iniciador 5' 5µM	1 µL	0.1 µg/µL
Iniciador 3' 5µM	1 µL	0.1 µg/µL
ADN 200 ng/µL	1µL	200 ng/µL
Agua ultrapura	16.8 µL	---
Taq Gold	0.2 µL	1 U
Volumen Final	25 µL	---

Tabla 7. Programa de PCR para la amplificación de las isoformas de PRL.

Programa			
		Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	5'
2	Desnaturalización	94°C	45''
3	Alineamiento	59.8°C	30''
4	Extensión	72°C	30''
5	30 ciclos de 2-4	----	----
6	Extensión final	72°C	5'

El producto obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz UV.

4.2.2.4 Adición de la secuencia para 6His por PCR.

Con el tercer juego de iniciadores diseñados y la muestra obtenida en la PCR para amplificar la secuencia codificante de PRL usando el segundo juego de iniciadores, se realizó la reacción en la que se adiciona la secuencia que codificará para 6His. Las condiciones específicas para la mezcla de reactivos se indican en la tabla 8, en tanto que el programa para el termociclador se utilizó el mostrado en la tabla 7.

Tabla 8. Condiciones de la reacción de PCR para la adición de la etiqueta de 6His.

Reactivos	Volumen	Concentración
Amortiguador 10 x	2.5 µL	1 x
MgCl₂ 25 mM	1.5 µL	1.5 mM
dNTPs 100 mM	1 µL	25 mM
Iniciador 5' 5µM	1 µL	0.1 µg/µL
Iniciador 3' 5µM	1 µL	0.1 µg/µL
Producto PCR	0.1µL	----
Agua Ultrapura	17.7 µL	----
Taq Gold	0.2 µL	1 U
Volumen Final	25 µL	

El producto obtenido se visualizó en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz UV.

4.2.3 Clonación en el plásmido pCR 2.1-TOPO.

Los productos obtenidos en la PCR en los puntos **4.2.2.3** y **4.2.2.4** se clonaron en el vector comercial pCR 2.1-TOPO de acuerdo a las indicaciones del fabricante TOPO TA Cloning Kit de Invitrogen. (Invitrogen, 2006). El empleo de la Taq ADN polimerasa provee las condiciones necesarias para que el producto de amplificación sea clonado en el vector TOPO (Shuman, 1994).

4.2.3.1 Transformación de células DH5 α electrocompetentes.

Los productos obtenidos de la clonación en TOPO se transformaron en bacterias electrocompetentes DH5 α (anexo 1) empleando 2 μ L del producto obtenido de la clonación en TOPO, los cuales fueron llevados a un volumen final de 20 μ L. Los parámetros de electroporación para transformación de las bacterias fueron: 200 Ω , 25 μ F y 2.5kV. Después del pulso se añadieron 500 μ L de medio LB, se transfirieron las bacterias a un tubo de 1.5mL y se incubaron a 37°C con agitación (500rpm) durante una hora. Posteriormente se centrifugó 3 min a 4,000 rpm se decantó y resuspendió la pastilla en el medio remanente. Dicha suspensión fue sembrada en placa de LB suplementada con kanamicina (50 μ g/mL) y se incubó a 37°C por 16 horas.

4.2.3.2 Análisis de la clonación en TOPO.

Para llevar a cabo el análisis de la clonación en el plásmido pCR 2.1-TOPO se utilizó la PCR de colonia, empleando los iniciadores M13 5' y M13 3', con lo que dependiendo del tamaño del producto obtenido se corroboró la clonación del inserto de interés (PRL y PRL-6His). Para este procedimiento se levantaron las colonias obtenidas a las 14-16

horas de la transformación y fueron resuspendidas en 20 µL de agua estéril, de los cuales 10 µL corresponderían al análisis mediante PCR y el volumen restante se inocularía en medio LB líquido suplementado con kanamicina (50 mg/mL). Las condiciones de la reacción de PCR se muestran en la tabla 9, en tanto que el programa para el termociclador se presenta en la tabla 10.

Tabla 9. Condiciones de la reacción de PCR para verificar la clonación en el vector TOPO.

Reactivos	Volumen	Concentración
Amortiguador 10 x	1.5 µL	1 x
MgCl ₂ 25 mM	0.5 µL	1.5 mM
dNTPs 100 mM	0.3 µL	25 mM
Iniciador 5' 5µM	0.6 µL	0.1 µg/µL
Iniciador 3' 5µM	0.6 µL	0.1 µg/µL
Colonia	10.0 µL	----
Agua Ultrapura	1.25 µL	
Taq Gold	0.25 µL	1 U
Volumen Final	15 µL	

Tabla 10. Programa de PCR para verificar la clonación en el vector TOPO TA.

Programa			
		Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	5'
2	Desnaturalización	94°C	1'
3	Alineamiento	55°C	1'
4	Extensión	72°C	1'
5	30 ciclos de 2 - 4		
6	Extensión final	72°C	5'

Una vez obtenidas las clonas candidatas según el tamaño del amplicon por PCR, se crecieron en medio LB con antibiótico y se extrajo el ADN plasmídico por la técnica de

extracción por lisis alcalina descrita en el punto 4.2.2.1 y se procedió a corroborar su identidad por patrones de restricción.

4.2.4 Subclonación de las secuencias de PRL y su isoforma de 16 kDa en los plásmidos pPICZ α y pYES2NT.

A fin de construir los sistemas de expresión de las isoformas de la prolactina se llevó a cabo la subclonación en los vectores pPICZ α (Figura 10) y pYE2NT (Figura 11), recuperando las secuencias previamente clonadas en el vector TOPO TA, estas construcciones serán de utilidad para la expresión en levaduras.

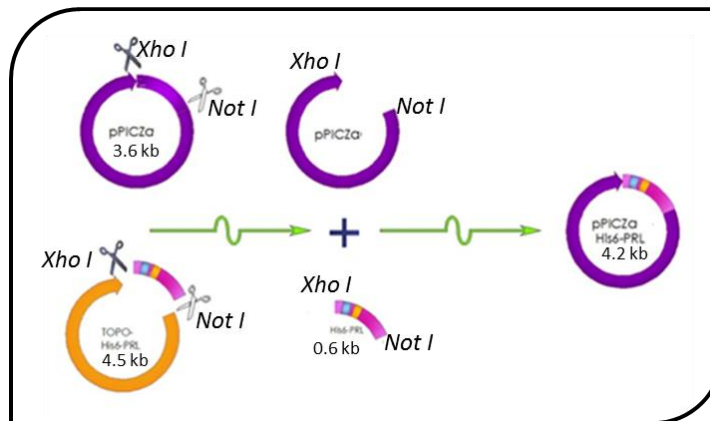


Figura 10. Esquema de la construcción del vector de expresión pPICZ α , a partir de la secuencia clonada en TOPO.

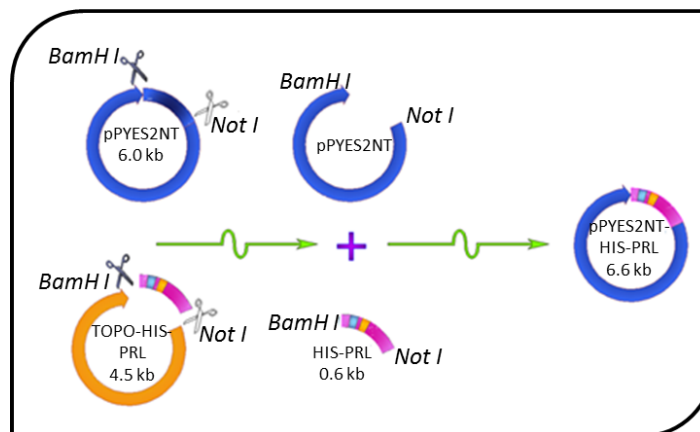


Figura 11. Esquema de la construcción del vector de expresión pPYES2NT, a partir de la secuencia clonada en TOPO.

4.2.4.1 Liberación del fragmento de la PRL a partir de TOPO.

El plásmido TOPO TA se sometió a una doble digestión con *Xho I* y *Not I* para así liberar la secuencia correspondiente a las isoformas de la prolactina, empleando los sitios adicionados mediante PCR. Las condiciones para la doble digestión se presentan en la tabla 11.

4.2.4.2 Doble digestión de pPICZ α .

De igual manera el vector de expresión pPICZ α se sometió a doble digestión con *Xho I* y *Not I* liberando un fragmento correspondiente al sitio múltiple de clonación y exponiendo los sitios para la ligación de los fragmentos de las prolactinas; para el vector pPYES2NT se sometió a doble digestión con las enzimas *BamH I* y *Not I*. En la tabla 11 se presentan las condiciones para la doble digestión.

Tabla 11. Condiciones para la doble digestión. A fin de liberar el fragmento de las isoformas de la prolactina para cada variante y abrir los vectores de expresión pPICZ α y pPYES2NT.

	TOPO-PRL16 y TOPO-PRL23 (μ l).	pPICZ α (μ l).	TOPO- PRL16 y TOPO-PRL23 (μ l).	pPYES2NT (μ l).
ADN plasmídico	40	40	40	40
BSA	6	6	6	6
Amortiguador 3	6	6	6	6
Enzima 1(<i>Xho I</i>)	3	3	-----	-----
Enzima 1(<i>BamH I</i>)	-----	-----	3	3
Enzima 2 (<i>Not I</i>)	1.5	1.5	1.5	1.5
Agua	3.5	3.5	3.5	3.5
	60	60	60	60

4.2.4.3 Purificación de un fragmento de ADN a partir de un gel de agarosa al 1%.

El producto de la doble digestión fue corrido en gel de agarosa al 1% a fin de separar los fragmentos de interés, así como los vectores de los contaminantes residuales de la digestión. Las bandas correspondientes a los productos de interés a los plásmidos fueron cortadas del gel de agarosa y procesadas de acuerdo a las indicaciones del fabricante para el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-UP System, obteniendo al final del proceso los fragmentos correspondientes a las isoformas de la prolactina y los plásmidos resuspendidos en agua libre de nucleasas.

4.2.4.4 Ligación de los fragmentos purificados.

Los fragmentos previamente purificados fueron sometidos a ligación, bajo las condiciones mostradas en la tabla 12. Incubando a 16°C por 14-16h. Es importante resaltar la proporción que debe mantenerse entre la cantidad de los insertos (fragmentos de las isoformas de la prolactinas) y los vectores (pPICZ α y pPYE2NT), debiendo mantenerse por lo menos 3:1 y los productos empleados, provenientes de la purificación, deben ser apreciables en un gel de agarosa al 1%.

Tabla 12. Condiciones de ligación. Las condiciones de ligación se siguieron para todos los fragmentos de las isoformas de la prolactina, con ambos plásmidos.

	Volumen (μ l)
Fragmentos	10
Vector	3
Amortiguador de ligasa 10 X	2
ATP 10 X	2
Ligasa	1
Agua	2
Volumen total	20

Pasado el tiempo de incubación de la ligación, una alícuota (5-10 μ L) se corrió en un gel de agarosa al 1% para verificar el éxito de la reacción, por lo cual, debe apreciarse un

aumento en el tamaño del producto obtenido, respecto a los empleados como reactivos o bien observando un patrón de escalera.

4.2.4.5 Transformación de células electrocompetentes.

Con los fragmentos clonados en los plásmidos pPICZ α y pPYES2NT como resultado de la ligación (construcciones pPICZ α -6His-EK-PRL16, pPICZ α -PRL16-6His, pPICZ α -PRL16-EK-6His, pPYES2NT-6His-EK-PRL16, pPICZ α -6His-EK-PRL23, pPICZ α -PRL23-6His, pPICZ α -PRL23-EK-6His y pPYES2NT6His-EK-PRL23) se procedió a la transformación de células electrocompetentes DH5 α de acuerdo a lo establecido en el punto **4.2.3.1**, pero en esta ocasión, el volumen empleado para la transformación fue de 5 μ L de la ligación previamente realizada y como marcador de selección se empleó zeocina (25 μ g/mL).

4.2.4.6 Análisis de la clonación en los vectores pPICZ α y pPYES2NT.

Para el análisis de las clonas obtenidas, las colonias presentes a las 14-16 horas posteriores a la siembra en placa se levantaron para su evaluación mediante PCR de colonia, de igual manera, según se describe en el punto **4.2.3.2** para esta ocasión se emplearon los iniciadores AOX1, los cuales flanquean la región en la cual se inserta el fragmento clonado dentro del sitio múltiple de clonación del vector pPICZ α , para el plásmido pPYES2NT se utilizaron los iniciadores FF-PRL16-1, RW-PR16-1 y RW-PRL23-3. Las condiciones de la reacción se muestran en la tabla 13 y el programa empleado en el termociclador en la tabla 14.

Tabla 13. Condiciones de la reacción de PCR para verificar la clonación en los vectores pPICZ α y pPYES2NT.

Reactivos	Volumen	Concentración
Amortiguador 10 x	1.5 μ L	1 x
MgCl ₂ 25 mM	0.9 μ L	1.5 mM
dNTPs 100 mM	0.3 μ L	25 mM
Iniciador 5' 5 μ M	0.6 μ L	0.1 μ g/ μ L
Iniciador 3' 5 μ M	0.6 μ L	0.1 μ g/ μ L
Colonia	10 μ L	----
Agua Ultrapura	0.8 μ L	
Taq Gold	0.2 μ L	1 U
Volumen Final	15 μ L	

Tabla 14. Programa de PCR para verificar la clonación en los vectores pPICZ α y pPYES2NT.

Programa			
		Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	5'
2	Desnaturalización	94°C	1'
3	Alineamiento	54°C	1'
4	Extensión	72°C	1'
5	30 ciclos de 2-4	----	----
6	Extensión final	72°C	7'

Los productos obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa al 1% para estimar su tamaño y determinar las clonas positivas. El volumen restante (no empleado para PCR) se inoculó en medio LB líquido conteniendo ampicilina (50mg/mL) para la posterior extracción del plásmido.

4.2.4.7 Extracción de ADN plasmídico de las construcciones de las isoformas en los vectores de expresión.

A partir del medio de cultivo inoculado con las colonias levantadas y previamente analizadas por PCR de colonia, se realizó extracción plasmídica por el método de lisis alcalina, descrito en el punto 4.2.2.1 (Sambrook y cols., 1989).

4.2.5 Caracterización de las construcciones en el plásmido pPICZ α y pPYES2NT.

Para confirmar la identidad de la secuencia clonada en los vectores de expresión pPICZ α y pPYES2NT y la correcta construcción de los plásmidos expresores (pPICZ α -6His-EK-PRL16, pPICZ α -PRL16-6His, pPICZ α -PRL16-EK-6His, pPYES2NT-6His-EK-PRL16, pPICZ α -6His-EK-PRL23, pPICZ α -PRL23-6His, pPICZ α -PRL23-EK-6His y pPYES2NT-6His-EK-PRL23) se llevó a cabo el corte con enzimas de restricción *Dra I* para las construcciones con el plásmido pPYES2NT y *Btg I* para las construcciones en el plásmido pPICZ α , los patrones obtenidos fueron comparados con los esperados por los análisis *in silico* por predicción con base en sus secuencias.

4.2.6 Transformación de la levadura.

4.2.6.1 Linearización con *Sac I*.

Los vectores de expresión contruidos en el plásmido pPICZ α fueron linearizados con la enzima de restricción *Sac I*, a fin de proceder a la transformación de las levaduras. En la tabla 15 se presentan las condiciones de la reacción de restricción. Los vectores de expresión contruidos en el plásmido pPYES2NT se utilizaron en su forma circular para la transformación en levaduras.

Tabla 15. Condiciones para la digestión con la enzima Sac I. A fin de linearizar los vectores de expresión para las isoformas de la prolactina en sus diferentes variantes.

	Reactivos (μ l).
ADN plasmídico	10
BSA	2
Amortiguador 1	2
Enzima (<i>Sac I</i>)	0.5
Agua	5.5
Volumen total	20

El resultado de la digestión fue analizado en un gel de agarosa al 1%

4.2.6.2 Electroporación de *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*.

La transformación en ambos sistemas se llevó a cabo por electroporación y las cepas utilizadas fueron GS115 para *Pichia pastoris* y INVSc1 para *Saccharomyces cerevisiae* éstas se prepararon de la misma forma como se describe en el (anexo 1) para hacerlas electrocompetentes. Para la transformación se mezclaron 80 μ L de las células previamente preparadas con 5-20 μ g de ADN linearizado y en su caso el ADN circular en 5 a 10 μ L de agua libre de nucleasas y se transfirieron a la celda de electroporación. Se incubaron durante 5 min en hielo y posteriormente se dio el pulso, con los siguientes parámetros: 400 Ω , 25 μ F y 1.5kV. Posterior al pulso se añadieron 600 μ L de sorbitol 1M a la celda y el contenido se transfirió a un tubo estéril para microcentrífuga. Se extendieron 200-600 μ L en placa de YPD con zeocina 25 μ g/mL y para *S. cerevisiae* en una placa en medio SC-U. Las cuales son incubadas a 30°C hasta la aparición de colonias (3-4 días).

Después de este tiempo se levantan colonias y se inoculan en medio YPG para su crecimiento a 30°C por 24-48 horas.

4.2.6.3 Análisis de integración al genoma de *Pichia pastoris*.

Con el fin de verificar la presencia del vector de expresión en el genoma de la levadura, ya que por recombinación homóloga éste es integrado, se extrajo ADN genómico de las

clonas obtenidas posterior a la transformación mediante la técnica TSNT según se indica en el Protocolo 1 (anexo 1). Con el ADN obtenido se realizó una PCR empleando los iniciadores AOX1, que flanquean la región en donde se insertó el gen en el vector de expresión. Además, dada la presencia del gen *aox1* de manera natural en la levadura y debido a los eventos de recombinación posibles, la información arrojada con esta PCR incluye el fenotipo presente (mut^+ o mut^s). Las condiciones de la reacción, así como el programa empleado en el termociclador se presentan en las tablas 16 y 17 respectivamente.

Tabla 16. Condiciones de la reacción de PCR para verificar la integración de la secuencia de las isoformas de la prolactina en el genoma de *Pichia pastoris*.

Reactivos	Volumen	Concentración
Amortiguador 10 x	1 μ L	1 x
ADN genómico	1 μ L	400 ng/ μ L
MgCl ₂ 25 mM	0.6 μ L	1.5 mM
dNTPs 100 mM	0.2 μ L	25 mM
Iniciador 5' 5 μ M	0.4 μ L	0.1 μ g/ μ L
Iniciador 3' 5 μ M	0.4 μ L	0.1 μ g/ μ L
Agua Ultrapura	6.2 μ L	---
Taq Gold	0.2 μ L	1 U
Volumen Final	10 μ L	---

Tabla 17. Programa de PCR para verificar la integración de la secuencia de las isoformas de la prolactina en el genoma de *Pichia pastoris*.

Programa			
		Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	5'
2	Desnaturalización	94°C	1'
3	Alineamiento	54°C	65''
4	Extensión	72°C	1'
5	30 ciclos de 2-4		
6	Extensión final	72°C	7'

4.2.6.4 Análisis de la transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

Con el fin de verificar si los vectores de expresión se integraron en la levadura, se tomó en cuenta que éstos son de carácter episomal, por lo que no fue necesario realizar la extracción del ADN genómico de la levadura. Para la identificación del casete se realizó por medio de PCR directo de colonia de levadura, tomando un décimo de ésta y se mezcló en una reacción como se describe en la tabla 18. En la tabla 19 se muestran las condiciones del programa empleado en el termociclador.

Tabla 18. Condiciones de la reacción de PCR para verificar la integración de los vectores de expresión episomales en *Saccharomyces cerevisiae*.

Reactivos	Volumen	Concentración
Amortiguador 10 x	1 µL	1 x
MgCl ₂ 25 mM	0.6 µL	1.5 mM
dNTPs 100 mM	0.2 µL	25 mM
Iniciador 5' 5µM	0.4 µL	0.1 µg/µL
Iniciador 3' 5µM	0.4 µL	0.1 µg/µL
ADN 200 ng/µL	1µL	200 ng/µL
Agua Ultrapura	6.2 µL	---
Taq Gold	0.2 µL	1 U
Volumen Final	10 µL	---

Tabla 19. Programa de PCR para verificar la integración de los vectores de expresión en *Saccharomyces cerevisiae*.

Programa			
		Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	5'
2	Desnaturalización	94°C	1'
3	Alineamiento	54°C	65''
4	Extensión	72°C	1'
5	30 ciclos de 2-4		
6	Extensión final	72°C	7'

4.2.7 Ensayos de expresión en tubo cónico de 50mL en *Pichia pastoris*.

A fin de verificar la funcionalidad del sistema construido y su consecuente producción de las isoformas de la prolactina en sus diferentes variantes fue inoculada una colonia en 15 mL de medio YPG en tubos cónicos de 50 mL. Se dejaron crecer a 30°C en agitación constante a 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} = 5$. El medio con estas condiciones fue centrifugado a 4,400 rpm por 5 min. El sobrenadante fue decantado, con el fin de eliminar cantidades residuales de glicerol, la pastilla fue resuspendida en amortiguador de fosfatos 0.1M pH=6 y nuevamente centrifugado a 4, 400 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en medio inductor BMMY conteniendo metanol a una concentración final de 0.5% y se incubó a 30°C durante 96 horas, con una adición de metanol cada 24 horas para una concentración final de 1%, manteniendo así la inducción activa. Una vez terminado el tiempo de inducción, se centrifugó a 4,400 rpm por 5 min a 4°C (a partir de este momento se trabajó en frío) y el sobrenadante fue dializado contra amortiguador Tris-HCl 20mM, pH=8.4.

4.2.8 Ensayos de expresión en tubo cónico de 50mL en *Saccharomyces cerevisiae*

Con el fin de verificar la funcionalidad del sistema construido y la consecuente producción de las isoformas de la prolactina fue inoculada una colonia en 15mL de medio SC-U con glucosa en tubos cónicos de 50mL. Se dejaron crecer a 30°C en agitación constante a 250 rpm hasta alcanzar una $DO_{600} = 0.4$. El medio con estas condiciones fue centrifugado a 4,400 rpm por 5 min. El sobrenadante fue decantado, con el fin de eliminar cantidades residuales de glucosa, la pastilla fue resuspendida en agua destilada estéril y nuevamente se centrifugó a 4,400 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en medio inductor SC-U con galactosa, a una concentración final de 2% y se incubó a 30°C durante 24 horas. Una vez terminado el tiempo de inducción, se midió la densidad óptica, posteriormente se centrifugó a 4,400 rpm por 5 min a 4°C (a partir de este momento se trabajó en frío) y la pastilla se congeló a -70°C, una vez congelada se lavó con 500 μ L de amortiguador de lisis (fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4, glicerol al 5% y PMSF), tomando en cuenta la medida de la DO

se resuspendió la pastilla en amortiguador de lisis para que quedara en una DO = 50 y se agregó un volumen igual de perlas de vidrio y se utilizó el vortex durante 30 segundos seguido de una incubación en hielo del mismo tiempo y esto se repitió por 5 veces, después se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se analizó por SDS-PAGE para visualizar las proteínas.

4.2.9 Análisis de la expresión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

4.2.9.1 Precipitación de proteínas en la muestra obtenida de las cepas de *Pichia pastoris*.

Una vez terminada la diálisis, se tomaron 500 µL de las muestras y se colocaron en un tubo de 1.5 mL para microcentrífuga, se añadieron 600 µL de metanol y se mezclaron suavemente, posteriormente se añadieron 450 µL de cloroformo, se mezcló suavemente por inversión durante 1 min, al terminar se centrifugó 5 min a 14,000 rpm. Se descartó la fase superior acuosa, cuidando de no dañar la interface, pues ahí se encuentran las proteínas. Después se volvieron a adicionar 450µL de metanol y se mezcló suavemente por inversión durante 1min y se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, se descartó el sobrenadante con una pipeta sin tocar la pastilla. Se secaron en el evaporador centrífugo al vacío (Savant) a temperatura ambiente durante 10 min.

4.2.9.2 Preparación de la muestra para SDS-PAGE.

La muestra obtenida en la precipitación se resuspendió en 15 µL de amortiguador de carga reductor para proteínas, en el caso de las muestras obtenidas de la lisis de las pastillas de *Saccharomyces cerevisiae* se tomaron 10 µL de éstas y se agregaron 5 µL de amortiguador de carga 2X posteriormente los tubos fueron calentados a 94°C por 5min,

4.2.9.3 Electroforesis de las muestras.

Se emplearon geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizante al 15%, previamente corrido únicamente con amortiguador de corrida 1X durante 20 min. Las muestras cargadas se corrieron a 80V hasta su ingreso al gel separador, una vez ahí se incrementó el voltaje a 120V. Al término de la electroforesis el gel fue teñido con azul de Coomassie G250 por un mínimo de 2h, posterior a la tinción se procedió a desteñir el gel empleando una solución decolorante hasta que las bandas fueran visibles.

4.2.9.4 Densitometría.

Las imágenes de los geles obtenidas fueron analizadas por densitometría empleando el programa ImageJ (Abramoff y cols., 2004) para calcular el rendimiento de la producción.

4.2.10 Ensayos de purificación.

4.2.10.1 Purificación a pequeña escala.

Para la purificación se aplicó el protocolo recomendado por la compañía Novagen, para la resina His-Bind empleando el His-Bind Amortiguador kit.

El protocolo para la purificación a pequeña escala se realizó en tubo de 1.5mL.

Se transfirieron 100-400 μ L de la resina en suspensión a un tubo de 1.5mL (tomando en cuenta que el volumen final de resina corresponderá al 50% del volumen empleado de la suspensión). Se lavó y equilibró la resina añadiendo el amortiguador indicado, agitando varias veces por inversión y centrifugando 3,400 rpm por 1min:

- a) 2 lavados con 2 volúmenes de agua desionizada estéril.
- b) 3 enjuagues con 2 volúmenes de amortiguador de carga.
- c) 2 lavados con 2 volúmenes de amortiguador de unión.

- d) Se añadió el extracto crudo al tubo conteniendo la resina, se mezcló suavemente por inversión varias veces e incubó por 30 min, posteriormente se centrifugó 3,400 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante.
- e) 3 enjuagues con 3 volúmenes de amortiguador de unión.
- f) 2 lavados con 3 volúmenes de amortiguador de lavado.
- g) Se eluyó en 2 ocasiones con 3 volúmenes de amortiguador de elución.
- h) La resina se regeneró con un lavado empleando amortiguador de quelación conteniendo EDTA.

Las fracciones obtenidas a partir del punto d) se almacenaron para su análisis mediante SDS-PAGE.

4.2.10.2 Precipitación de proteínas en la muestra.

Las muestras obtenidas en cada etapa del proceso de purificación en pequeña escala se precipitaron por la técnica de metanol-cloroformo descrita en el punto **4.2.9.1**.

4.2.10.3 Preparación de la muestra para SDS-PAGE.

La muestra obtenida en la precipitación se resuspendió en 15 μ L de amortiguador de carga reductora para proteínas, posteriormente se calentó a 94°C por 5 min.

4.2.10.4 Electroforesis de las muestras.

Se empleó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizante al 15%, previamente corrido únicamente con amortiguador de corrida 1X durante 20 min. Las muestras cargadas se corrieron a 80V hasta su ingreso al gel separador, una vez ahí se incrementó el voltaje a 120V. Al término de la electroforesis el gel fue teñido con azul de Coomassie G250 por un mínimo de 2 horas, al término de la tinción se procedió a desteñir empleando solución decolorante hasta que las bandas fueran visibles.

4.2.10.5 Densitometría.

Las imágenes obtenidas de los geles fueron analizadas por densitometría empleando el programa ImageJ (Abramoff y cols., 2004), para calcular la pureza, así como la recuperación de la prolactina.

4.2.11 Ensayo de la actividad biológica.

Para confirmar la actividad biológica de la hormona producida, se realizaron dos ensayos descritos a continuación. Está demostrado que las GHs de varias especies promueven la conversión adipocítica de preadipocitos de ratón (fibroblastos 3T3 de la línea celular NH). Estas células cultivadas en un medio con mínima actividad adipogénica (bajo contenido de suero), al añadir una hormona de la familia de las GH se puede determinar la actividad biológica de ésta, mediante su capacidad de diferenciar preadipocitos a adipocitos. Este proceso involucra cambios genéticos, morfológicos y bioquímicos. Los adipocitos acumulan triglicéridos en el citoplasma, los cuales pueden ser detectados al teñirse con el colorante rojo oleoso.

El segundo ensayo consistió en evaluar la capacidad de la prolactina para la formación de capilares *in vitro* ya que se ha demostrado que las células endoteliales de cordón umbilical humano tienen receptores que permiten el crecimiento y cambio en su morfología en una adecuada matriz generando un ensayo indirecto para evaluar la capacidad angiogénica de la proteína de interés, lo cual se puede detectar con el uso de la calceína-am (Invitrogen), que permite por medio de fluorescencia observar los cambios del cultivo celular.

4.2.11.1 Propagación de los pre-adipocitos.

Las células 3T3 se propagaron en medio Eagle modificado por Dulbecco-Vögt (DMEM, glucosa 4 g/L, suplementado con 5% (v/v) de suero de ternera), hasta que se alcanzó la confluencia en botellas de cultivo de 25 cm². Se cosecharon las células por tripsinización, para lo cual se agregaron 3-4 mL de solución de tripsina a la botella y se incubó a 37°C por 5 min. Se desprendieron completamente las células y se centrifugó a

3, 000 rpm por 5 min. Se retiró el líquido con una micropipeta, teniendo cuidado de no eliminar las células empastilladas. Se resuspendieron con 1-3 mL de DMEM suplementado con 10% de suero de ternera. Se sembraron las células en placas de 24 pozos, colocando 20,000 células por pozo en 0.5 mL de medio. Se incubaron las células por 2 días en una atmósfera de 5% de CO₂. Al cumplirse el segundo día de incubación, se hizo el cambio de medio a DMEM suplementado con 1.75% (v/v) de suero de gato, 0.25% (v/v) de suero de ternera, insulina a 5 µg/mL, EFG a 0.01ng/mL, biotina a 1.0µM, triyodotironina a 1x10⁻⁹ M y β-mercaptoetanol a 40 µM (0.5 mL por pozo) y 200 ng de la proteína a evaluar. El control positivo de diferenciación es el mismo medio pero adicionando 200 ng de HGH comercial. El control negativo fue el cultivo sin suplementar con alguna hormona. Se incubaron por 9 días y a los cultivos se les realizó una tinción con rojo oleoso.

4.2.11.2 Tinción con Rojo Oleoso.

Las células fueron lavadas con amortiguador de fosfatos (PBS) y fueron fijadas con formalina al 10% por 30 min. Fijadas las células, se procedió a teñirlas con la solución de rojo oleoso durante 30 min, después este tiempo las células fueron lavadas con PBS tres veces y se observaron al microscopio.

4.2.11.3 Propagación de la línea celular HUVEC.

Las células HUVEC se propagaron en medio Advanced DMEM (Ad-DMEM, glucosa 4 g/L, suplementado con 10% (v/v) de suero de fetal bovino, 1% de antibiótico, 1X de HEPES, 0.66% de glutamina, 0.01% de heparina), hasta que se alcanzó la confluencia en botellas de cultivo de 25 cm². Se cosecharon las células por tripsinización, para lo cual se agregaron 3-4 mL de solución de tripsina a la botella y se incubó a 37°C por 5 min. Se dependieron completamente las células y se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min. Se retiró el líquido con micropipeta, teniendo cuidado de no eliminar las células empastilladas. Se resuspendieron de 1-3 mL de Advanced DMEM suplementado con 1% SBF, 1% de antibiótico, 0.66 % de glutamina y 0.01% de heparina para realizar el ensayo de angiogénesis.

4.2.11.4 Ensayo de angiogénesis.

Antes de iniciar el ensayo se prepararon las placas con una capa de gelatina al 10%, la cual se solidificó a 4°C por 2 horas pasado este tiempo se incubó 1 hora a 37°C, se lavaron las placas con PBS dos veces, para posteriormente sembrar 1,000 células por pozo en 0.5 mL de medio con 200 ng de la proteína a evaluar. El control positivo de diferenciación es el mismo medio pero adicionando 2 ng de bFGF. El control negativo fue el cultivo sin suplementar con alguna hormona. Se incubaron por 36 horas, se agregó 2µM de calceína am y se incubó por 2 horas en una atmósfera de 5% de CO₂, pasado este tiempo se observó en el microscopio de fluorescencia.

CAPÍTULO V. RESULTADOS.

5.1 Amplificación de la secuencia codificante de las isoformas de la prolactina humana.

5.1.1 Extracción del ADN plasmídico de la cepa ATCC 31723.

La fuente empleada para la obtención de la secuencia codificante fue la cepa ATCC con el número 31723 que contiene el ADNc de la prolactina humana integrado en el plásmido pBR322, a partir de ésta se amplificaron tanto la prolactina de 23 kDa así como su isoforma de 16 kDa ya que ésta se forma del extremo N-terminal de la prolactina de los aminoácidos 1 al 150. (Ben-Jonathan y cols., 2008).

El ADN plasmídico se muestra en la figura 12, se ajustó a una concentración de 300 ng/ μ L para su posterior uso.

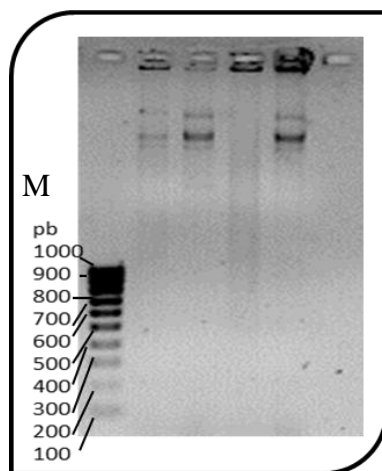


Figura 12. ADN plasmídico de la cepa ATTC 31723. Se muestra el ADN plasmídico del cual se amplificaron las isoformas de la prolactina humana. Carril 1-4 ADN plasmídico de pBR322-PRL. M: marcador de ADN comercial de 1000 pb a 100 pb. Gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio.

5.1.2 Diseño de los iniciadores para amplificar cada ADNc de la prolactina.

En la figura 13a se muestra el primer par de los iniciadores empleados para la amplificación específica de la secuencia codificante de la PRL de 23 kDa. Estos fueron diseñados con base en la secuencia reportada con el número de acceso 5617 PRL del GenBank. Su hibridación se planeó en su extremo 5' a 81 nucleótidos río abajo al ATG inicial, puesto que éstos codifican para 27 aa correspondientes al péptido señal de la hormona de manera natural. Para fines de esta construcción se tuvo en cuenta el uso del péptido señal propio del vector de expresión pPICZ α (α -MF de *Saccharomyces cerevisiae*) que guía a la proteína para ser secretada al medio de cultivo, además se incluyó el sitio de restricción para la enzima *Xho I* y se recreó una secuencia denominada KEX2, la cual es reconocida por el producto del gen *KEX2*, con lo cual se elimina el factor α -MF (Brake y cols., 1984). En el caso del iniciador para al extremo 3' de la secuencia, corresponde a la secuencia complementaria, 19 nucleótidos río arriba al codón de terminación (TAA), sin embargo, para esta construcción se utilizó el codón de terminación del vector. Se incluyó además el sitio de restricción para *Not I*.

En la figura 13b se muestra el segundo par de los iniciadores empleados para la amplificación de la secuencia codificante de la PRL-23. Para el extremo 5' se utilizó el mismo iniciador que el primer juego de iniciadores y en el caso del iniciador para al extremo 3' de la secuencia, corresponde a la secuencia complementaria y se hibrida 19 nucleótidos al codón de terminación (TAA), sin embargo, para esta construcción se utilizó el codón de terminación del vector. Se incluyó además el sitio de reconocimiento de la enterocinasa y el sitio de restricción para *Not I*.

En la figura 13c se muestra el tercer par de los iniciadores empleados para la amplificación de la secuencia codificante de la PRL-23. Para el extremo 5' se hibridó en la misma posición que el primer juego de iniciadores, pero con la diferencia que este juego añade un sitio *Kpn I* y se adicionó una secuencia que codifica para un epítipo reconocido por la enzima enterocinasa (reconoce la secuencia aminoacídica DDDK) que puede ser empleado para eliminar la etiqueta de histidinas fusionada a la prolactina y en el caso del iniciador para al extremo 3' de la secuencia, corresponde a la secuencia

complementaria y se hibrida 19 nucleótidos anteriores al codón de terminación TAA. Se incluyó además un sitio de restricción para *Not I*. Como parte de esta estrategia se diseñó un tercer iniciador con el cual se adicionó la secuencia codificante para la etiqueta (6His), el cual hibridó en la secuencia codificante para EK (adicionada con este tercer juego de iniciadores). Además se recreó la secuencia para KEX2, también se incorporó el sitio de restricción *Xho I*. Este iniciador se usó en conjunto con el RW PRL23-3, conformando de esta manera un segundo juego de iniciadores para éste. Como templado se empleó el producto obtenido mediante la PCR para la amplificación de la secuencia codificante (mostrado en la figura 13c). En la figura 13d se muestra la región en la que hibridan los iniciadores, así como las secuencias que se adicionan.

En la figura 13e se muestra el cuarto par de los iniciadores empleados para la amplificación de la secuencia codificante de la PRL-23. Para el extremo 5' se hibridó en la misma posición que el primer juego de iniciadores, pero con la diferencia que este juego añade un sitio *BamH I* y en el caso del iniciador para al extremo 3' de la secuencia, corresponde a la secuencia complementaria y se hibrida 19 nucleótidos río arriba del codón de terminación, sin embargo, para esta construcción se utilizó el codón stop del vector pYES2NT, además se incluyó el sitio de restricción para *Not I*.



Figura 13. Iniciadores empleados para la amplificación de la prolactina de 23 kDa. a). Se muestra la secuencia codificante de la PRL-23 kDa, en azul la región donde hibridan los iniciadores, en morado las secuencias que corresponden a los sitios de restricción; b). Se muestran las características anteriores y una secuencia de reconocimiento para la enterocinasas en el extremo 3'; c). Se muestra la secuencia de reconocimiento para la enterocinasas en el extremo 5'; d). Se muestra la secuencia adicionada que codifica para la etiqueta de histidinas así como sitios de restricción; e). Se muestra los iniciadores diseñados para la expresión y la subclonación en el vector pPYES2NT.

El diseño de los iniciadores para la amplificación específica de la secuencia codificante de la isoforma de la prolactina de 16 kDa se hizo en base a la secuencia reportada con el número de acceso 5617 PRL del GenBank, pero considerando 150 aminoácidos del lado N-terminal que componen a esta isoforma, para la cual se utilizó el mismo diseño de iniciadores que para la prolactina de 23 kDa como se observa en la figura 14.

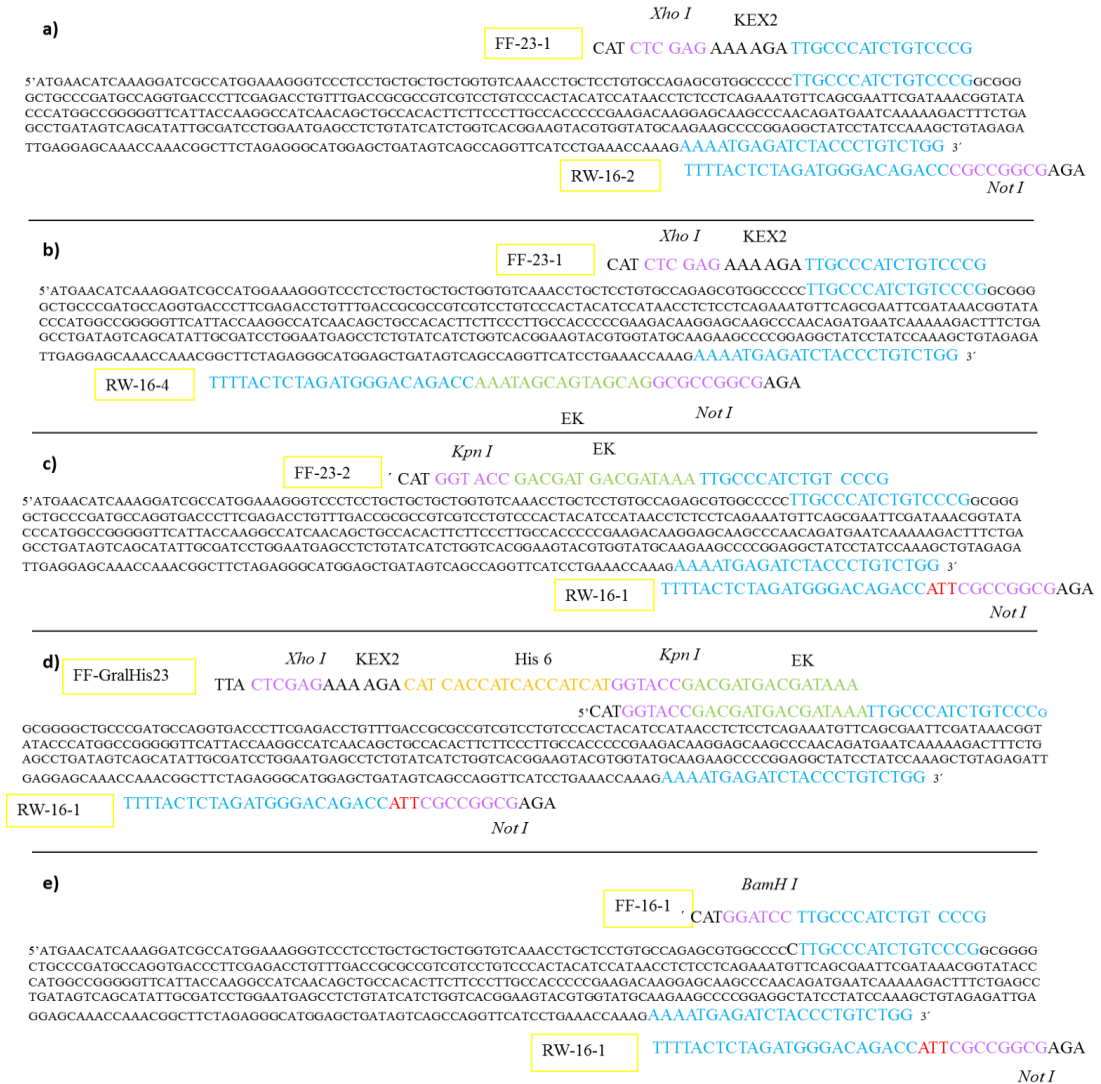


Figura 14. Iniciadores empleados para la amplificación de la prolactina de 16 kDa. a). Se muestra la secuencia codificante de la PRL-16, en azul la región donde hibridan los iniciadores, en morado, las secuencias que corresponden a los sitios de restricción; b). Se muestran las características anteriores y una secuencia de reconocimiento para la enterocinasa en el extremo 3'; c). Se muestra la secuencia de reconocimiento para enterocinasa en el extremo 5'; d). Se muestra la adición de la secuencia que codifica para la etiqueta de histidinas así como sitios de restricción; e). Se muestra los iniciadores diseñados para la expresión, la subclonación en el vector pPYES2NT.

PCR para la amplificación de la secuencia codificante.

La secuencia codificante de la PRL-23 se amplificó mediante PCR, empleando los iniciadores previamente diseñados y sintetizados. Primeramente se realizó una PCR en gradiente para determinar la temperatura óptima de amplificación (Figura 15) y se escogió 59.8°C, una vez determinada la temperatura se prosiguió a realizar las reacciones conforme a las secciones 4.2.2.3 y 4.2.2.4 de materiales y métodos. Se obtuvo una única banda de aproximadamente 630pb que corresponde a la prolactina de 23 kDa en todas sus variantes (Figura 16). También se obtuvo para la prolactina de 16 kDa una única banda de aproximadamente 470pb en sus amplificaciones correspondientes (Figura 17).

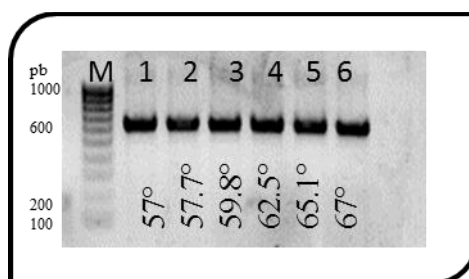


Figura 15. PCR en gradiente de la prolactina. Se observa una banda única de aproximadamente 630pb en las temperaturas de gradiente de 57°-67°C que corresponden a los carriles 1-6. M. Marcador de ADN comercial de 1000pb a 100pb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

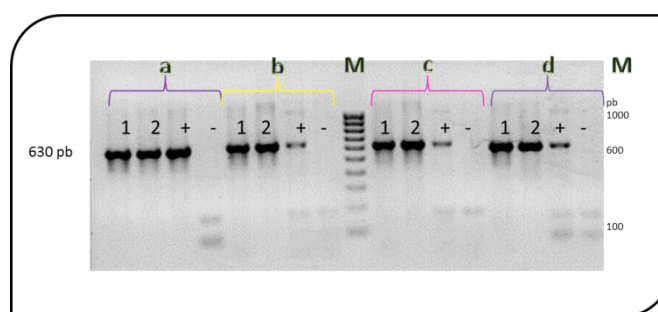


Figura 16. Amplificación de la PRL-23 kDa. a, b, c, d). Se muestra un amplicón de aproximadamente 630pb que corresponden al uso de los cuatro juegos iniciadores para amplificar la prolactina de 23 kDa en sus diferentes variantes descritas en el punto 5.1.2. 1 Amplicón de la PRL usando como muestra 200 ng de ADN, 2: Amplicón de la PRL usando como muestra 600 ng de ADN, (+) Control positivo de amplificación, (-) Control negativo de amplificación. M. Marcador de ADN comercial de 1000pb a 100pb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

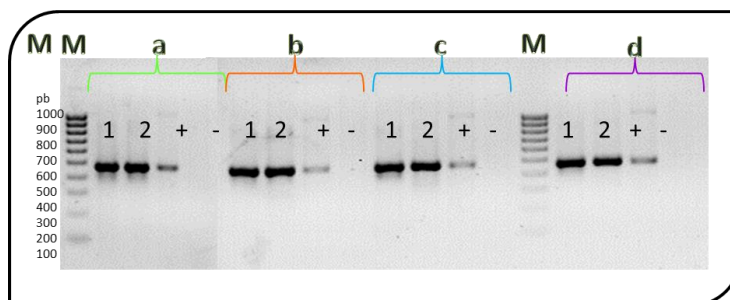


Figura 17. Amplificación de la PRL-16 kDa. . a, b, c, d). Se muestra un amplicón de aproximadamente 470pb que corresponden al uso de los cuatro juegos iniciadores para amplificar la prolactina de 16 kDa en sus diferentes variantes descritas en el punto 5.1.2. 1 Amplicón de la PRL usando como muestra 200 ng de ADN, 2: Amplicón de la PRL usando como muestra 600 ng de ADN, (+) Control positivo de amplificación, (-) Control negativo de amplificación. M. Marcador de ADN comercial de 1000pb a 100pb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.2 Clonación en el vector topo de la secuencia codificante de las isoformas de la prolactina humana.

Con el fin de tener cantidad suficiente de material genético y una manera directa de evaluar los cortes mediante enzimas de restricción con los que se subclonarían los insertos de las isoformas de la prolactina, se decidió clonar los productos de la PCR en el vector de propagación (pCR 2.1-TOPOI). La cepa empleada para la transformación y propagación fue *E. coli* DH5 α previamente preparada para su empleo en esta metodología.

5.2.1 Análisis de la clonación.

Utilizando el protocolo de clonación indicado por el fabricante del kit TOPO TA Cloning de Invitrogen se obtuvieron colonias, lo cual indicó una reacción de clonación positiva. Las colonias obtenidas fueron analizadas mediante PCR de colonia, empleando iniciadores específicos, los cuales hibridan en una región flanqueante al sitio donde se inserta el producto de PCR clonado. La condiciones de la PCR empleadas se indican en el punto 4.2.3.2. En las colonias analizadas se obtuvo una banda de 630 pb,

correspondiente a la PRL-23 y una banda de 470 que corresponde a la PRL-16. En la figura 18 se muestra el análisis de algunas colonias obtenidas.

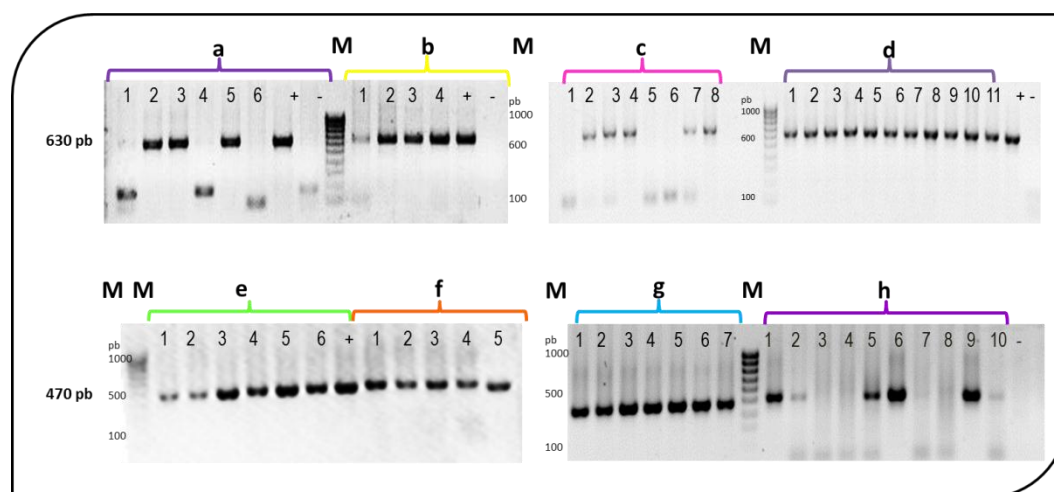


Figura 18. Análisis por PCR de la clonación de las isoformas de la prolactina en TOPO. a, b, c y d). Se observa una banda aproximadamente de 630pb que corresponde al producto de interés de las variantes de la PRL-23; **e, f, g, h).** Se observa una banda de aproximadamente de 470pb que corresponde al producto de interés de las variantes de la PRL-16. (+) Control positivo de amplificación, (-) Control negativo de amplificación. M. Marcador de ADN comercial de 1000pb a 100pb. Los números de los carriles indican diferentes clones para cada reacción. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.2.2 Extracción del ADN plasmídico.

A partir de la colonia inoculada en LB y posterior al análisis mediante PCR de colonia, con el cual se determinaron las colonias que contenían el plásmido pCR 2.1-TOPO-PRL, se realizó extracción de ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989) descrito en el punto 4.2.2.1. En la figura 19 se muestra el producto de la extracción realizada, el carril marcado (-) corresponde a un vector pCR-TOPO vacío, el cual presenta un retraso menor al presentado por aquellos que tienen el insert.

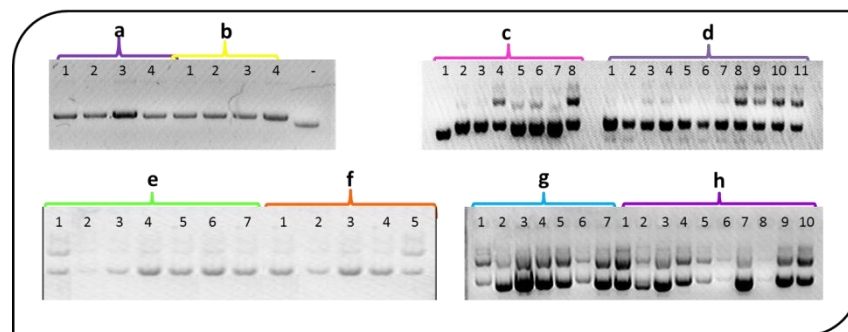


Figura 19. Extracción de los plásmidos TOPO- PRL23 y 16. a, b, c, d). Se muestra el ADN plasmídico así como la integridad de éste para las construcciones de las variantes de la prolactina de 23 kDa. **e, f, g, h).** Se muestra el ADN plasmídico así como la integridad de éste para las construcciones de las variantes de la prolactina de 16 kDa; el carril marcado (-) corresponde a un vector pCR 2.1-TOPO vacío, el cual presenta un retraso menor al presentado por aquellos que tienen inserto. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.3 Subclonación de las secuencias de PRL 23 y PRL 16 en el vector de expresión pPICZ α .

A fin de expresar las isoformas de la prolactina, las secuencias previamente clonadas en TOPO, se subclonaron en el vector de expresión pPICZ α , para su posterior expresión en levadura.

5.3.1 Liberación de los fragmentos de PRL 23 y PRL 16 y preparación pPICZ α .

A partir de los plásmidos construidos en TOPO, se liberó el fragmento de interés, correspondiente a PRL de 23 y 16 kDa, con el empleo de enzimas de restricción (*Xho* I y *Not* I), de igual manera el plásmido pPICZ α fue sometido a la doble digestión. Las condiciones de la reacción de restricción se describen en el punto 4.2.4.2. En la figura 20 se muestra el resultado obtenido del corte realizado. Los fragmentos obtenidos a partir de la doble digestión fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, se cortaron la bandas de interés y posteriormente ser purificaron siguiendo las indicaciones del fabricante para el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

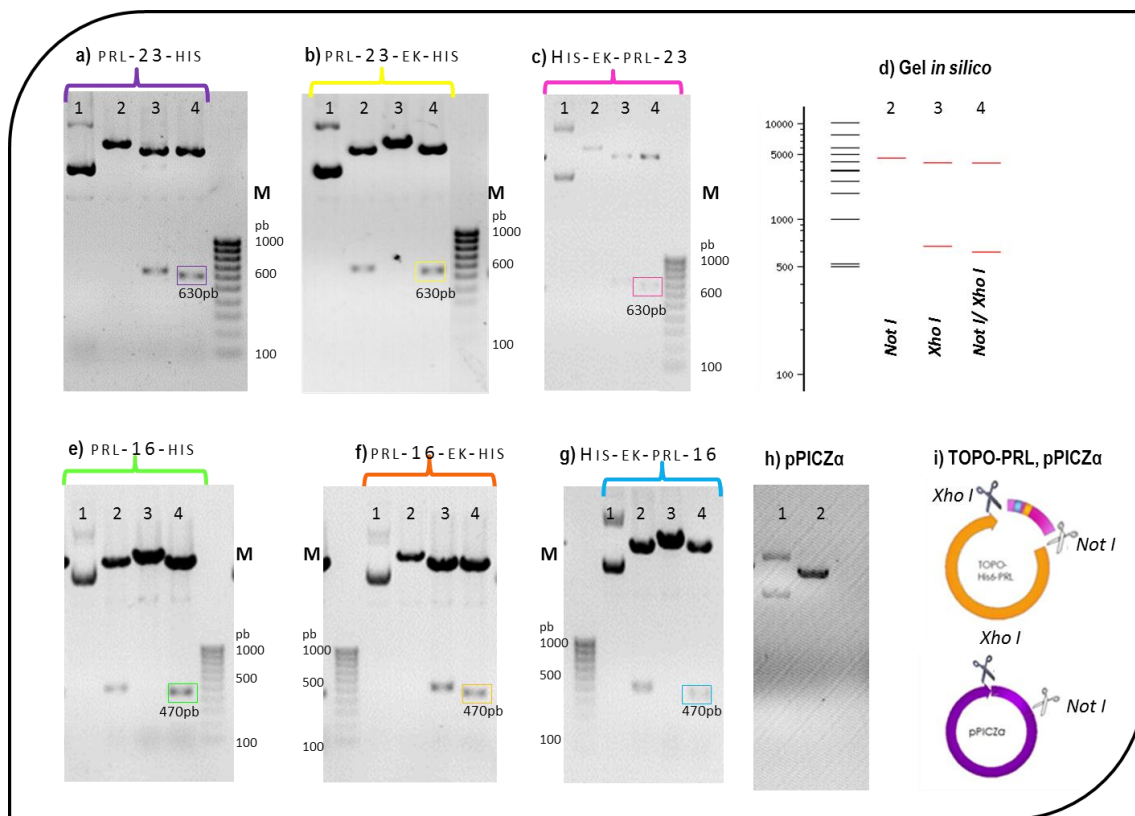


Figura 20. Doble digestión de pPICZ α y de las isoformas de la prolactina de 23 y 16 kDa. a,b,c). Son geles que corresponden a las construcciones de las variantes de la prolactina de 23 kDa, donde 1 corresponde a los plásmidos sin cortar, 2 muestra la restricción con una sola enzima *Not I*, 3 muestra la restricción con la enzima *Xho I* y 4 muestra los cortes con ambas enzimas y en el cuadro se observa el fragmento de interés liberado. **d).** Muestra la imagen de las digestiones de forma *in silico*. **e, f, g).** Se muestran los geles que corresponden a las construcciones de las variantes de la prolactina de 16 kDa, donde 1 corresponde a los plásmidos sin cortar, 2 muestra la digestión con una sola enzima *Not I*, 3 muestra la digestión con la enzima *Xho I* y 4 muestra los cortes con ambas enzimas y en el cuadro se observa el fragmento de interés liberado **h).** Muestra el plásmido pPICZ α , 1 plásmido sin cortar, 2 pPICZ α cortado con ambas enzimas. **i)** Muestra la ejemplificación de los cortes con las enzimas de restricción en el vector TOPO-PRL y pPICZ α . **M.** Marcador de ADN comercial de 1000pb a 100pb. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

5.3.2 Ligación de los fragmentos purificados.

Los productos obtenidos se purificaron con el kit de purificación de promega y bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.2.4.4, se realizó la ligación utilizando la Ligasa T4 de NEB. El resultado se muestra en la figura 21, en los carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12 se

aprecian una escalera que corresponde a los plásmidos construidos para la expresión de las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa.

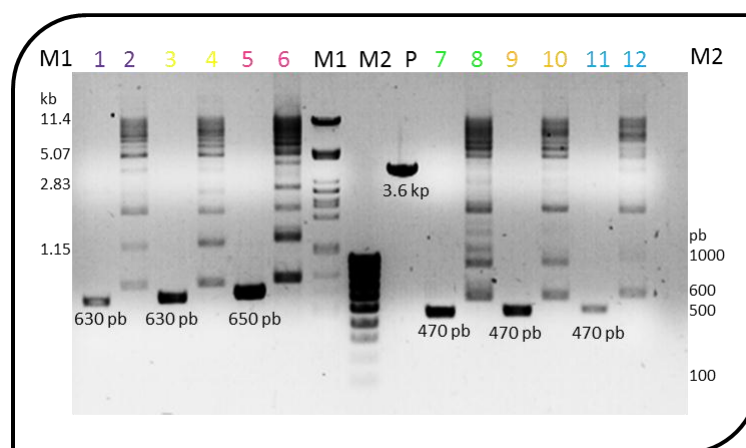


Figura 21. Ligación de vector pPICZ α y los fragmentos de las variantes de prolactina de 23 y 16 kDa. Se muestra en los carriles 1, 3, 5 los fragmentos purificados que corresponden a la prolactina de 23 kDa. En los carriles 7, 9, 11 se muestran los fragmentos que corresponden a las variantes de la prolactina de 16 kDa. En los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se observan una serie de bandas que corresponden al fragmento ligado al plásmido. **P.** pPICZ α puro. **M1.** Marcador de ADN lambda-*Pst I*. **M2.** Marcador de ADN comercial de 1000pb a 100pb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.3.3 Transformación de bacterias electrocompetentes.

Los plásmidos previamente construidos se emplearon para transformar bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5 α , con el fin de propagar el material genético (figura 22)..

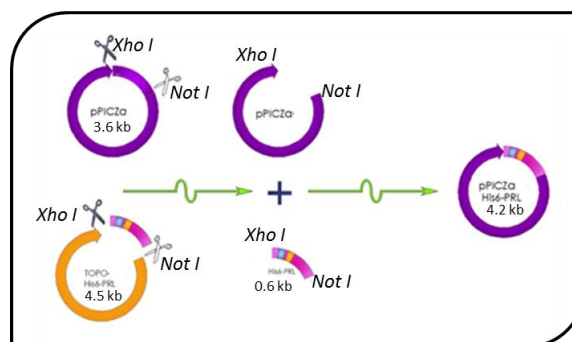


Figura 22. Esquema de la construcción del vector de expresión pPICZ α , a partir de la secuencia clonada en TOPO.

5.3.4 Análisis de las clonas obtenidas.

Las colonias obtenidas posteriores a la transformación fueron analizadas mediante PCR de colonia empleando los iniciadores AOX1, los cuales flanquean la región donde se inserta el fragmento de interés (prolactina), aportando 492pb al producto obtenido, resultando en un amplicón de aproximadamente 1150pb para las construcciones de la prolactina de 23 kDa y de aproximadamente 950 pb para las construcciones de la prolactina de 16 kDa. En la figura 23 se muestra el resultado obtenido para el análisis.

El volumen que no se utilizó para la PCR de colonia se inoculó en medio LB bajo en sal con zeocina (25mg/mL) para re-selección por la resistencia a este antibiótico.

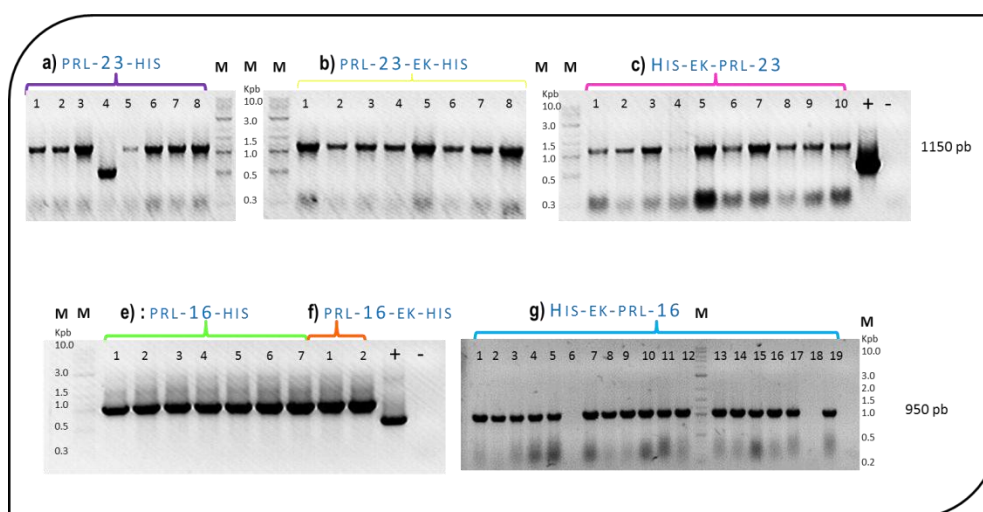


Figura 23. Análisis por PCR de la clonación en el plásmido pPICZ α de las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa. a, b y c). Se observa una banda de aproximadamente 1150pb que corresponde al producto de interés de las variantes de la PRL-23; **e, f y g).** Se observa una banda de aproximadamente 950pb que corresponde al producto de interés de las variantes de la PRL-16. **M.** Marcador de ADN comercial de 10.0Kb a 0.1Kb. (+) Amplificación de pPICZ α sin inserto, (-) Control negativo de amplificación. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.3.5 Extracción del plásmido pPICZ α - PRL 23 y 16.

A partir de las colonias crecidas en medio LB-zeocina (25mg/mL) se añadió glicerol a una alícuota, a fin de preservar la bacteria portadora del plásmido construido, mezclando 850 μ L del medio de cultivo y 150 μ L de glicerol anhidro estéril y congelando a -80°C.

Además se realizó extracción plasmídica por el método de lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989) según se indica en el punto 4.2.2.1. El producto obtenido de las construcciones de las isoformas de la prolactina se muestra en la figura 24, en la cual se puede apreciar la integridad de los plásmidos obtenidos.

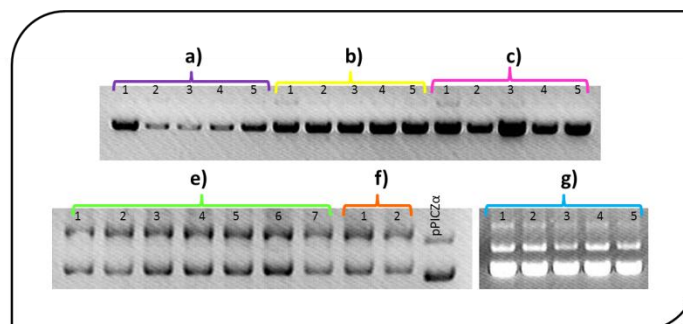


Figura 24. Extracción de los plásmidos pPICZ α -PRL23 Y 16. a, b y c). Se muestra el ADN plasmídico para las construcciones de las variantes de la prolactina de 23 kDa. **e, f y g).** Se muestra el ADN plasmídico así como su integridad para las construcciones de las variantes de la prolactina de 16 kDa; pPICZ α corresponde a un vector vacío, el cual presenta un retraso menor al presentado por aquellos que tienen inserto. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.4 Caracterización de los plásmidos pPICZ α -PRL23 y pPICZ α -PRL16.

A fin de determinar la correcta construcción de los plásmidos pPIC α -PRL-23 y pPIC α -PRL-16 en sus variantes respectivas se realizó una caracterización mediante la enzima de restricción *Btg* I, buscando que tuvieran sitios dentro del vector así como de la secuencia insertada, esperando cuatro bandas de aproximadamente 2300, 900, 300 y 91pb determinando así la presencia del inserto de interés de las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa dentro del vector pPICZ α , obteniendo en el laboratorio los patrones de restricción predichos “*in silico*”, empleando el programa en línea Ncbutter V. 2.0 de New England Biolabs (Vincze y cols., 2003); el resultado se muestra en la figura 25.

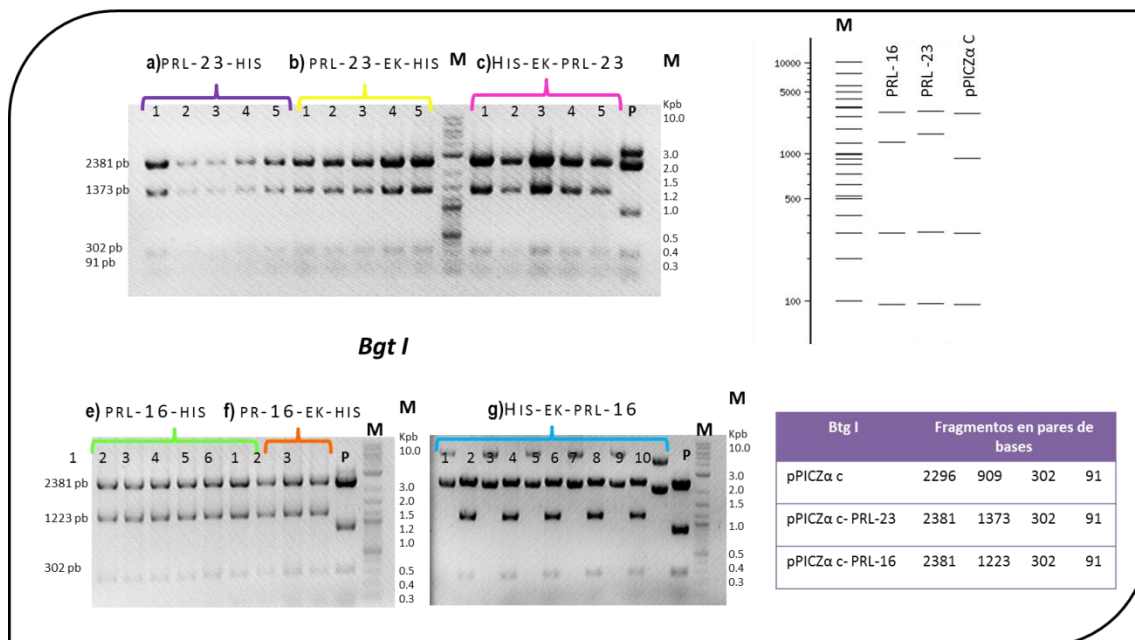


Figura 25. Análisis mediante patrones de restricción de los plásmidos pPICZα-PRL23 y pPICZα-PRL16. a, b, c). Son geles que corresponden a los patrones predichos de las variantes de la prolactina de 23 kDa, en la parte superior derecha de la figura se muestra la imagen de las digestiones de forma *in silico*. **e, f, g).** Se muestra los geles que corresponden a los patrones de restricción de las variantes de la prolactina de 16 kDa. **P.** muestra el patrón de corte de pPICZα. **M.** Marcador de ADN comercial de 10.0Kb a 0.1Kb. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

5.5 Construcción de la cepa productora de las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa.

Una vez corroborada la correcta construcción de los vectores de expresión pPICZα-PRL-23 y 16, se procedió a su incorporación al genoma de *Pichia pastoris*. Se empleó la enzima *Sac I* a fin de propiciar sitios tales que mediante recombinación homóloga el vector fuera insertado en la región 3' del gen *aox1*.

5.5.1 Linearización de los plásmidos pPICZ α -PRL23 y pPICZ α -PRL16 con *Sac I* y transformación de la levadura.

Los plásmidos pPICZ α -PRL23 y pPICZ α -PRL16 y sus variantes fueron cortados con la enzima *Sac I*, como se indica en el punto 4.2.6.1. La figura 26 muestra el corte realizado, apreciando una banda de alrededor de los 4,600pb. El producto lineal que se obtuvo se empleó para transformar la levadura *Pichia pastoris* según lo indicado en el punto 4.2.6.2. En la figura 27 se ejemplifica las colonias obtenidas así como la morfología microscópica de la levadura una vez que fue crecida en medio YPG de una de las construcciones.

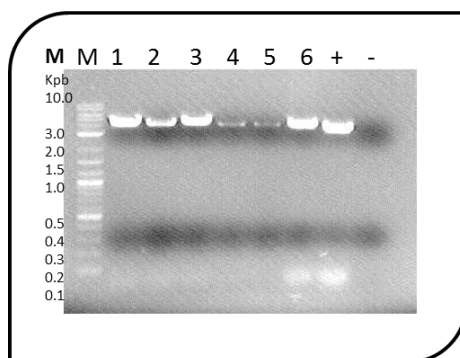


Figura 26. Linearización de pPICZ α -PRL23 y pPICZ α -PRL16 y sus variantes. Carril 1, 2,3. Muestra los plásmidos lineales para las variantes de la PRL23. Carril, 4, 5, 6. Muestra los plásmidos lineales para las variantes de la PRL16. (+) Muestra pPICZ α lineal. (-) Control negativo de corte. M. Marcador de ADN comercial de 10.0Kb a 0.1Kb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

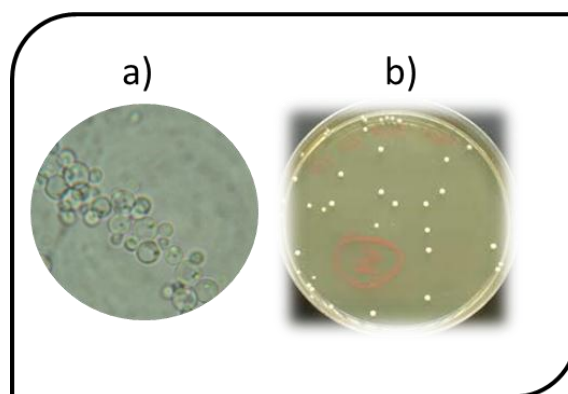


Figura 27. *Pichia pastoris* transformada. a). Morfología microscópica vista en el microscopio óptico con el objetivo de 100x. b). Colonias de *Pichia pastoris* transformada con pPICZ α -PRL23 en medio YPG.

5.5.2 Análisis de la integración al genoma de *Pichia pastoris*.

Para determinar si el vector fue integrado al genoma de la levadura se extrajo el ADN genómico (mediante la técnica TSNT según se indica en el anexo 1) y se realizó una PCR empleando los iniciadores AOX1 con lo cual además de proporcionar información sobre la integración al genoma es posible determinar el fenotipo presente (mut^+ o mut^s). Se observa la amplificación de 1,150pb correspondiente a las variantes de la prolactina de 23 kDa (Figura 28).

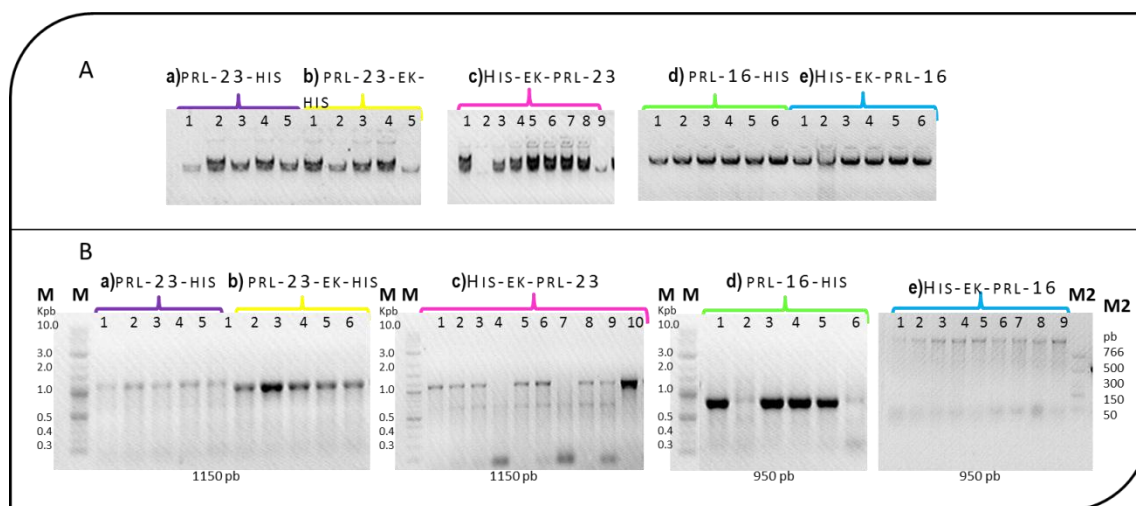


Figura 28. Análisis de la integración al genoma de *Pichia pastoris*. **A.** Muestra el ADN genómico de las variantes de las isoformas de la prolactina de 23 y 16 kDa. **B.** Se observa en los incisos a, b, y c la banda que corresponde al producto amplificado de las variantes de la prolactina de 23kDa de aproximadamente 1150 pb y en los incisos d y e la banda que corresponde al producto amplificado de las variantes de la prolactina de 16kDa de aproximadamente 950pb. **M.** Marcador de ADN comercial de 10.0Kb a 0.1Kb. **M2.** Marcador de ADN comercial de 766pb a 50 pb. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

5.6 Subclonación de la secuencia PRL-23 y 16 en el vector de expresión pPYES2NT.

A fin de expresar las isoformas de la prolactina en *Saccharomyces cerevisiae*, las secuencias previamente clonadas en el vector TOPO, se subclonaron en el vector de expresión pPYES2NT, para su posterior expresión en levadura.

5.6.1 Liberación del fragmento PRL 23 y 16 kDa y preparación de pPYES2NT.

A partir de los plásmidos construidos en TOPO, se liberó el fragmento de interés, correspondiente a PRL de 23 y 16 kDa, con el empleo de enzimas de restricción (*Xho* I y *Bam*H I), de igual manera el plásmido pPYES2NT fue sometido a la doble digestión. Las condiciones de la reacción de restricción se describen en el punto 4.2.4.2. En la figura 29 se muestra el resultado obtenido del corte realizado. Los fragmentos obtenidos a partir de la doble digestión fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, se cortaron la bandas de interés y posteriormente se purificaron siguiendo las indicaciones del fabricante para el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega.

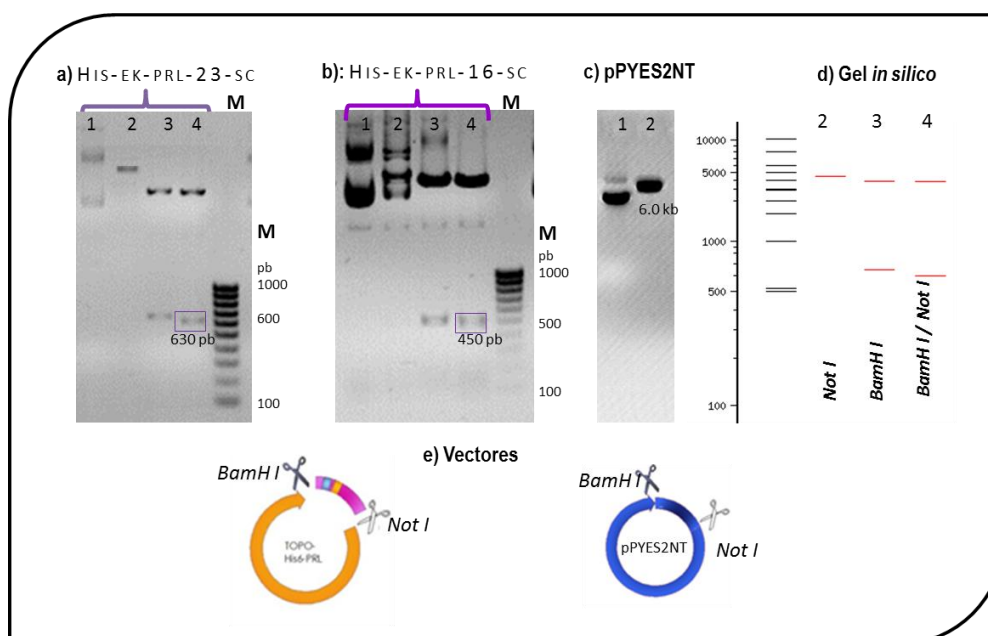


Figura 29. Doble digestión de pPYES2NT y las isoformas de la prolactina de 23 y 16 kDa.
a). Gel que corresponde a la construcción de la prolactina de 23 kDa, donde 1 corresponde al plásmido sin cortar, 2 muestra la restricción con una sola enzima *Not* I, 3 muestra la restricción con la enzima *Bam*H I y 4 muestra los cortes con ambas enzimas (*Not* I y *Bam*H I) y en el cuadro se observa el fragmento de interés liberado. **b).** Se muestra el gel que corresponde a la construcción de la prolactina de 16 kDa, donde 1 corresponde a los plásmidos sin cortar, 2 muestra la restricción con una sola enzima *Not* I, 3 muestra la restricción con la enzima *Bam*H I y 4 muestra los cortes con ambas enzimas y en el cuadro se observa el fragmento de interés liberado. **c).** muestra el plásmido pPYES2NT, 1 plásmido sin cortar, 2 pPYES2NT cortado con ambas enzimas. **d).** Muestra la imagen de las digestiones de forma *in silico*. **e)** Muestra la ejemplificación de los cortes con las enzimas de restricción en el vector TOPO-PRL y pPYES2NT **M.** Marcador de ADN comercial de 1000pb a 100pb. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

5.6.2 Ligación de los fragmentos purificados.

Con los productos obtenidos se empleó el kit de purificación de promega y las condiciones mencionadas en el punto 4.2.4.4, se realizó la ligación utilizando la Ligasa T4 de NEB. El resultado se muestra en la figura 30, en los carriles 2, 4, se aprecian una escalera que corresponde a los plásmidos construidos para la expresión de la prolactina de 23 y 16 kDa.

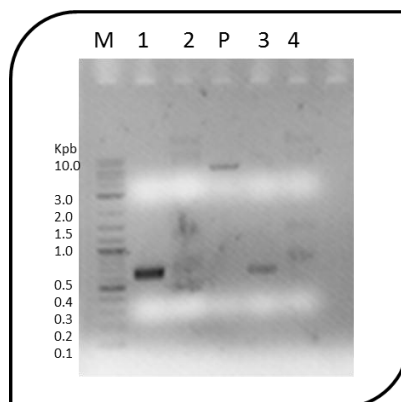


Figura 30. Ligación de vector pPYES2NT y los fragmentos de las variantes de prolactina de 23 y 16 kDa. Se muestra en los carriles 1 y 3 el ADN purificado de la prolactina de 23 y 16kDa respectivamente. En los carriles 2 y 4, se observan una serie de bandas que corresponden al fragmento ligado al plásmido. **P.** Vector pPYES2NT solo. **M.** Marcador de ADN comercial de 10.0Kb a 0.1Kb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.6.3 Transformación de bacterias electrocompetentes.

Los plásmidos previamente construidos se emplearon para transformar bacterias electrocompetentes *E. coli* DH5 α , con el fin de propagar el material genético (figura 31).

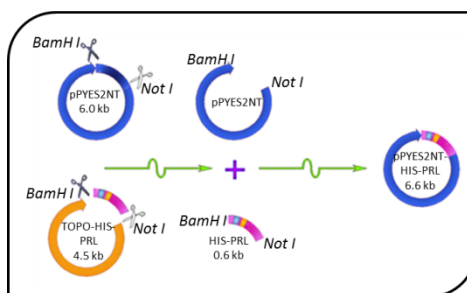


Figura 31. Esquema de la construcción del vector de expresión pPYES2NT, a partir de la secuencia clonada en TOPO.

5.6.4 Análisis de las clonas obtenidas.

Las colonias obtenidas posteriores a la transformación fueron analizadas mediante PCR de colonia empleando los iniciadores específicos, los cuales amplifican el fragmento de interés (prolactina), resultando en un amplicón de aproximadamente 630 pb para la construcción de la prolactina de 23 kDa y de aproximadamente 470 pb para la construcción de la prolactina de 16 kDa. En la figura 32 se muestra el resultado obtenido para el análisis.

El volumen que no se utilizó para la PCR de colonia se inoculó en medio LB bajo en sal con ampicilina (50 mg/mL).

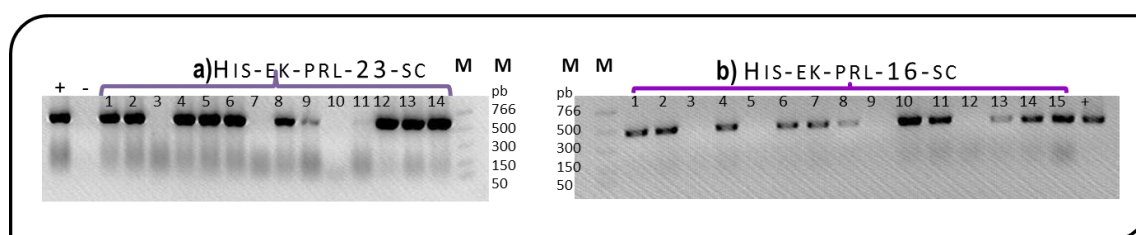


Figura 32. Análisis por PCR de la transformación en bacterias de las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa. a). Se observa una banda de aproximadamente 630pb que corresponde al producto de interés de la variante de la PRL-23; **b).** Se observa una banda de aproximadamente 450pb que corresponde al producto de interés de la variante de la PRL-16. (+) Control positivo de amplificación, (-) Control negativo de amplificación. **M.** Marcador de ADN comercial de 766pb a 50pb. Geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.6.5 Extracción del plásmido pPYES2NT.

A partir de las colonias crecidas en medio LB-ampicilina (50mg/mL) se añadió glicerina a una alícuota, a fin de preservar la bacteria portadora del plásmido construido, mezclando 850 μ L del medio de cultivo y 150 μ L de glicerol anhidro estéril y congelando a -80°C . Además se realizó extracción plasmídica por el método de lisis alcalina (Sambrook y cols., 1989) según se indica en el punto 4.2.2.1. El producto obtenido de las construcciones de las isoformas de la prolactina se muestra en la figura 32, en la cual se puede apreciar la integridad de los plásmidos obtenidos.

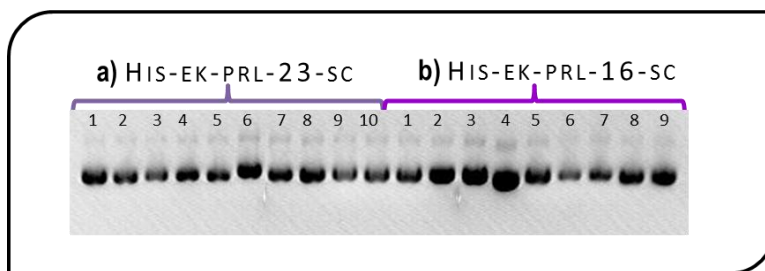


Figura 33. Extracción de los plásmidos pPYES2NT-PRL23 y 16. a). Se muestra el ADN plasmídico así como la integridad de la prolactina de 23 kDa. **b).** Se muestra el ADN plasmídico así como la integridad para la construcción de la prolactina de 16 kDa. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.7 Caracterización de los plásmidos pPYES2NT-PRL 23 y 16.

Con el fin de determinar la correcta construcción de los plásmidos pPYES2NT-PRL-23 y pPYES2NT-PRL-16, se realizó una caracterización mediante enzimas de restricción, empleando *Dra I*, buscando que tuvieran sitios dentro del vector así como de la secuencia insertada. Se determinó así la presencia del inserto de interés de la prolactina de 23 y 16 kDa dentro del vector pPYES2NT, obteniendo en el laboratorio los patrones de restricción predichos “*in silico*”, empleando el programa en línea Ncb cutter V. 2.0 de New England Biolabs (Vincze y cols., 2003); el resultado se muestra en la figura 34.

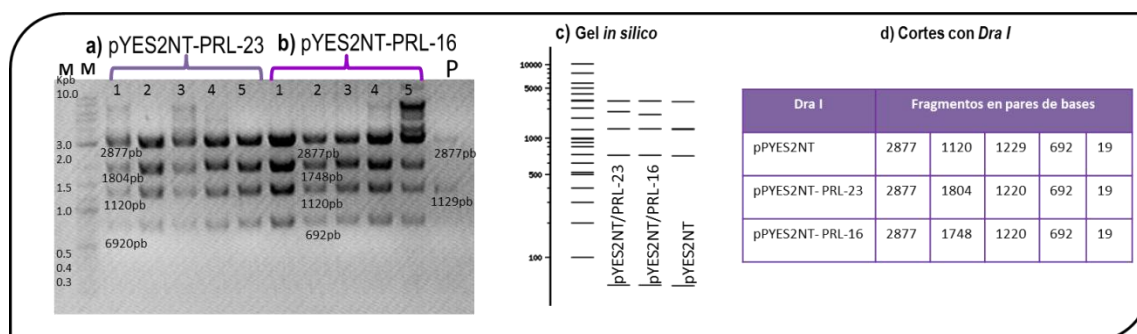


Figura 34. Análisis mediante patrones de restricción de los plásmidos pPYES2NT-PRL23 y pPYES2NT-PRL16. a). Gel que corresponde a los patrones predichos de la prolactina de 23 kDa cortados con la enzima *Dra I* **b).** Gel que corresponde a los patrones predichos de la prolactina de 16 kDa cortados con la enzima *Dra I*; **c).** Se muestra la imagen de las digestiones de forma *in silico*. **d).** Se muestra una tabla con los cortes en pares de bases para cada construcción. **P.** muestra el patrón de corte de pPYES2NT. **M.** Marcador de ADN comercial de 10.0Kb a 0.1Kb. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

5.8 Construcción de la cepa productora de la PRL-de 23 y 16 kDa.

Una vez corroborada la correcta construcción de los vectores de expresión pPYES2NT-PRL-23 y 16, se procedió a su incorporación al genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Se emplearon los plásmidos sin cortar, ya que estos vectores son de carácter episomal.

5.8.1 Transformación de la levadura.

Los plásmidos pPYES2NT-PRL23 y pPYES2NT-PRL16 fueron empleados para transformar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* según lo indicado en el punto 4.2.6.2. En la figura 35 se ejemplifica las colonias obtenidas así como la morfología microscópica de la levadura una vez que fue crecida en medio SC-U de una de las construcciones.

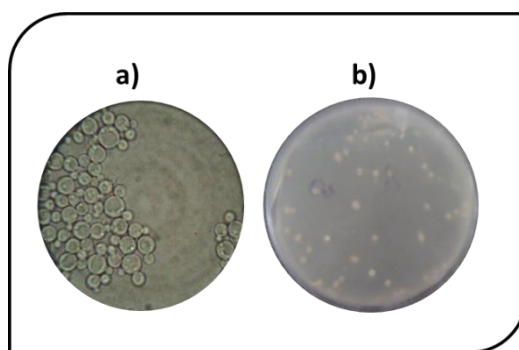


Figura 35. *Saccharomyces cerevisiae* transformada. a). Morfología microscópica visto en el microscopio óptico con el objetivo de 100X. b). Colonias de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas con pPYES2NT-PRL23.

5.8.2 Análisis de la integración al genoma de *Saccharomyces cerevisiae*.

Para determinar si el vector fue integrado en la levadura se realizó una PCR empleando los iniciadores específicos los cuales amplifican el fragmento de interés (prolactina), resultando en un amplicón de aproximadamente 630 pb para la construcción de la prolactina de 23 kDa y de aproximadamente 470 pb para la construcción de la prolactina de 16 kDa. En la figura 36 se muestra el resultado obtenido para el análisis.

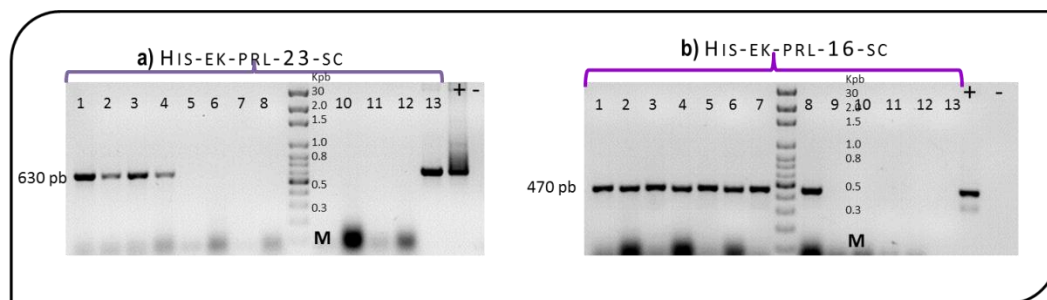


Figura 36. Análisis por PCR de la transformación de *Saccharomyces cerevisiae*. a). Se observa una banda de aproximadamente 630pb que corresponde al producto de interés de la variante de la PRL-23; b). Se observa una banda de aproximadamente 450pb que corresponde al producto de interés de la variante de la PRL-16. **M** marcador de ADN. (+) Control positivo de amplificación, (-) Control negativo de amplificación. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

5.9 Comparación en la producción de los sistemas *P. pastoris* y *S. cerevisiae*.

Como parte del objetivo de este trabajo fue comparar los dos sistemas de expresión, como se observa en la figura 37, podemos ver que para el sistema de *S. cerevisiae* no se logró una producción de las proteínas de 23 y 16 kDa, en cambio para *Pichia pastoris* para el caso de la prolactina de 23 kDa se produjo en dos variantes y para la prolactina de 16 kDa en una, que corresponde a la que contenía las histidinas en el extremo amino. Por lo que en los siguientes puntos lo que se muestra son los resultados representativos de estas proteínas.

Pichia pastoris		Saccharomyces cerevisiae	
PRL23-HIS	✓	HIS-EK-PRL23	—
PRL23-EK-HIS	—		
HIS-EK-PRL23	✓		
PRL16-HIS	—	HIS-EK-PRL16	—
PRL16-EK-HIS	—		
HIS-EK-PRL16	✓		

Figura 37. Comparación de los sistemas de expresión. Este cuadro indica si hubo o no producción para cada sistema de expresión para las variantes de la prolactina de 23 y 16 kDa.

5.10 Producción de PRL-HIS, HIS-EK-PRL23 y HIS-EK-PRL16.

La prueba que corroboraría la funcionalidad del vector de expresión construido fue la secreción al medio de cultivo de las proteínas.

5.10.1 Fermentación y análisis de la producción en el sobrenadante mediante SDS-PAGE y Western blot.

Se realizó la producción en tubos cónicos de 50mL, para lo cual la colonia seleccionada en base a los ensayos antes descritos se inoculó en medio YPG para su crecimiento hasta una $DO_{600} = 5$, posteriormente se realizó un cambio a un medio inductor, BMMY. Se siguió la producción por 94 horas, adicionando metanol a una concentración final de 1% cada 24 horas, para compensar la pérdida por evaporación y consumo por parte de las levaduras.

Posterior al tiempo de inducción, el medio de cultivo fue centrifugado a 4°C para minimizar la degradación proteica y dado que en la construcción realizada se contaba con el factor α -MF que guía a la secreción extracelular de la proteína recombinante fusionada, ésta se buscó en el sobrenadante, el cual fue dializado contra un amortiguador Tris-HCL 20mM pH=8 frio, para eliminar las sales. Las membranas empleadas para la diálisis presentaban un corte de peso molecular entre 10-14 kDa.

Una vez dializado se precipitaron 0.5 mL del sobrenadante y se corrió en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para verificar la presencia de la proteína de interés. En la figura 38 se aprecia el análisis de la producción de las proteínas obtenidas. Para PRL23-HIS los sobrenadantes producidos por las cepas 7-8 muestran una doble banda sobresaliente por arriba de los 25 kDa, estas bandas no se presentan en el sobrenadante analizado para una levadura transformada con un vector vacío (carril pPICZ α), en el cual se aprecian las proteínas propias de la levadura, que son secretadas al medio de cultivo. Para HIS-EK-PRL23, los sobrenadantes producidos por las cepas 4-7 muestran una doble banda sobresaliente alrededor de 27 kDa y que no se presenta en el sobrenadante analizado para una levadura transformada con un vector vacío (carril

pPICZ α). Dichas proteínas representan una proporción mayoritaria del total de proteínas, correspondiendo a la prolactina de 23 kDa. Para HIS-EK-PRL16, los sobrenadantes producidos por las cepas 4-9 no muestran una banda sobresaliente por lo que se prosiguió a su detección e identificación por western blot identificando la banda esperada por debajo de la prolactina de 23 kDa. Dicha proteína, que además representa una proporción mayoritaria del total de proteínas corresponde a la prolactina.

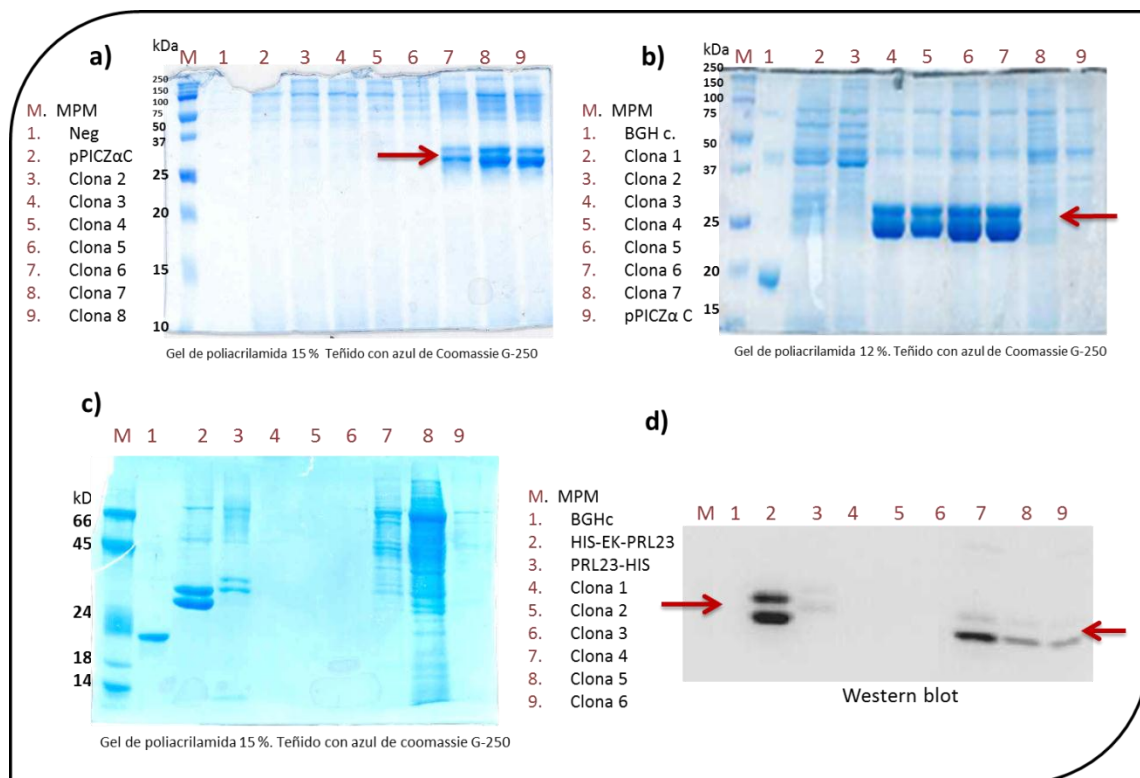


Figura 38. Análisis de la producción de proteínas secretadas al medio de cultivo. a). Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestra la producción de la prolactina de 23 kDa con una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo y en los carriles 7, 8 y 9 se observan clonas productoras. **b).** Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra la producción de la prolactina de 23 kDa con una etiqueta de histidinas en el extremo amino y en los carriles 4, 5, 6 y 7 se observan clonas productoras. **c).** Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestra la producción de la prolactina de 16 kDa con una etiqueta de histidinas en el extremo amino en los carriles 4-9. **d).** Muestra un western blot dirigido a la etiqueta de histidinas. En el carril 2 corresponde al prolactina de 23 kDa con una etiqueta de histidinas en el extremo amino, en el carril 3 muestra una doble banda que corresponde a la prolactina con una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo y en los carriles 7, 8 y 9 se identifica la prolactina de 16 kDa etiquetada con seis histidinas en el extremo amino.

Se realizó una cuantificación de las proteínas totales presentes en el sobrenadante mediante la técnica de Bradford, para lo cual se construyó una curva de calibración empleando BSA como referencia. Se obtuvo una correlación lineal $r=0.9904$ y la ecuación de la recta obtenida fue $y = 0.0023x + 0.0381$, donde “x” corresponde a la concentración de proteínas y “y” a la absorbancia a 594nm, que es la longitud de onda a la cual se lee el ensayo de Bradford. La curva construida se muestra en la Figura 39.

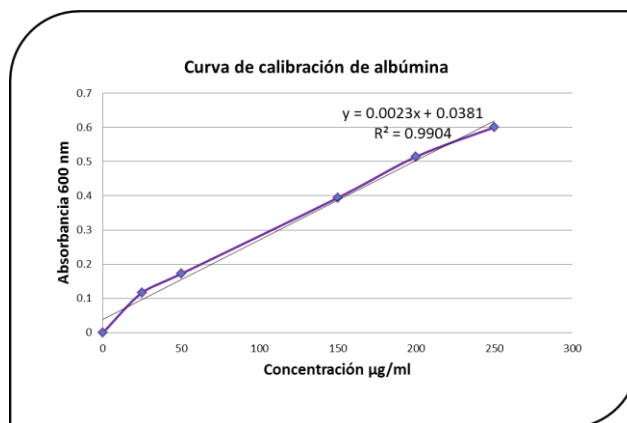


Figura 39. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas totales.

Empleando la curva construida se cuantificó la producción de proteínas totales secretadas al medio de cultivo, determinando que la mejor productora de la PRL23-HIS fue la clona 7, con una producción de proteínas totales secretadas al medio de cultivo de 112.88 µg/mL, de los cuales el 67% corresponde a PRL23-HIS, dando como resultado 75.62 µg de PRL-HIS por mL de medio de cultivo. Para la HIS-EK-PRL23, la mejor productora fue la clona 3, con una producción de proteínas totales secretadas al medio de cultivo de 128.8 µg/mL, de los cuales el 75% corresponde a HIS-EK-PRL23, dando como resultado 96.6 µg de prolactina por mL de medio de cultivo. La proporción correspondiente a HIS-EK-PRL23 se determinó mediante densitometría, empleando el programa ImageJ (Abramoff y cols., 2004). El resultado de todas las clonas se muestra en la tabla 20.

Tabla 20. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

PRL23-HIS [gel a) figura 37]		HIS-EK-PRL23 [gel b) figura 37]	
Carril 7	92.62 µg/mL	Carril 4	128.8 µg/mL
Carril 8	112.88 µg/mL	Carril 5	120.6 µg/mL
Carril 9	111.9 µg/mL	Carril 6	123.6 µg/mL
		Carril 7	123.1 µg/mL

Los densitogramas obtenidos para los sobrenadantes analizados se muestran en la figura 40. Es contrastante la presencia de un pico mayoritario en los sobrenadantes de una cepa productora respecto a su ausencia en el sobrenadante de una cepa transformada con un vector vacío.

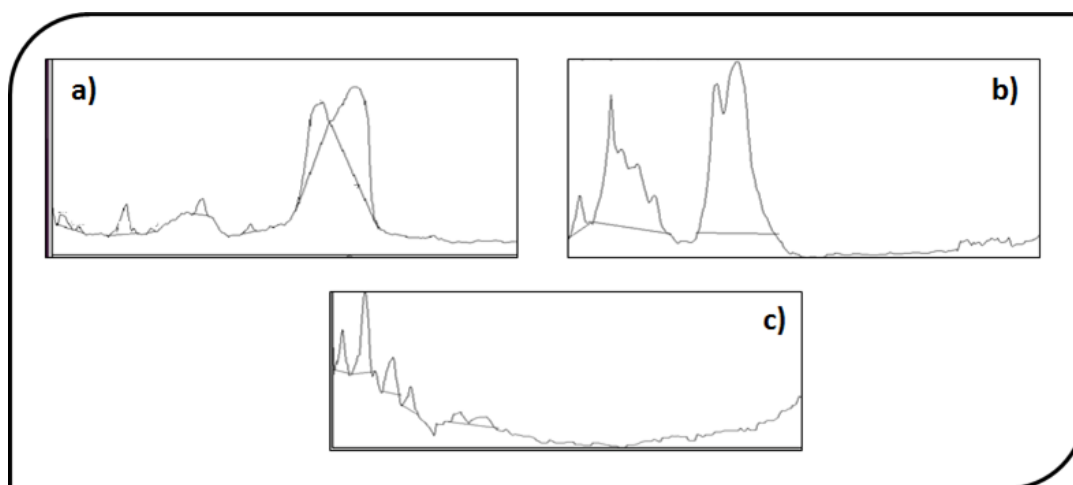


Figura 40. Densitogramas obtenidos a partir de los análisis de los sobrenadantes por SDS-PAGE. a). Sobrenadante de una cepa productora de HIS-EK-PRL23; **b).** Sobrenadante de una cepa productora de PRL23-HIS; **c).** Sobrenadante de una cepa transformada con el vector vacío. Hechos con el programa ImagenJ.

5.11 Ensayo de purificación mediante IMAC.

Se aplicó la Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados para la purificación de la HIS-EK-PRL23 producida, empleando la etiqueta de histidinas adicionada en su extremo amino terminal. La metodología empleada se describe en el punto **4.2.10.1**.

La HIS-EK-PRL23 fue eluída a concentraciones altas de imidazol, siendo recuperada desde concentraciones de 5mM y aun hasta llegar a 1M. Por otro lado, no toda la proteína cargada se unió a la resina, encontrando una cantidad residual en la fracción correspondiente a las proteínas que no se unen. Con el fin de determinar la pureza y rendimiento del proceso, se realizó un análisis densitométrico (Figura 41). Obteniendo una pureza superior al 95% y rendimiento del 75% (tabla 21).

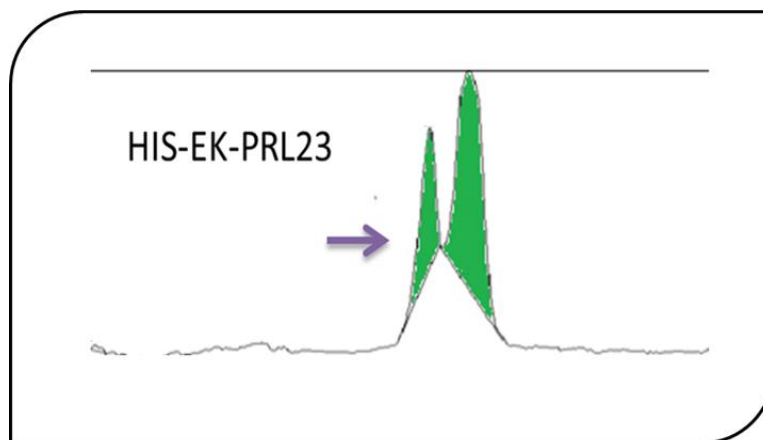


Figura 41. Densitograma obtenido para el análisis de pureza mediante IMAC. Los picos señalados corresponden a la HIS-EK-PRL23.

Tabla 21. Pureza y rendimiento obtenido por IMAC.

	Producción	Pureza	Rendimiento
HIS-EK-PRL23	123.6 µg/mL	95%	75%

5.12 Ensayo de la actividad biológica.

Con el fin de evaluar la actividad biológica de la proteína recombinante producida en *Pichia pastoris* se realizó la diferenciación de fibroblastos a adipocitos y también se evaluó la capacidad de la prolactina para la formación de capilares *in vitro* (angiogénesis), ya que se ha demostrado que las células endoteliales sirven como modelo indirecto para evaluar la capacidad angiogénica de una proteína de interés.

5.12.1 Ensayo de la actividad biológica en la línea celular HUVEC.

En este bioensayo se utilizaron células endoteliales de vena de cordón umbilical, las cuales tienen la capacidad de formar capilares *in vitro* en una matriz por el estímulo de diversos factores como el VEGF y bFGF o bien alguna proteína como la HGH o la prolactina, la cual se sometió a esta prueba resultando células más alargadas y con un mayor número al igual que los controles positivos (bFGF y HGH) esto en comparación de las células sin tratamiento (Figura 42).

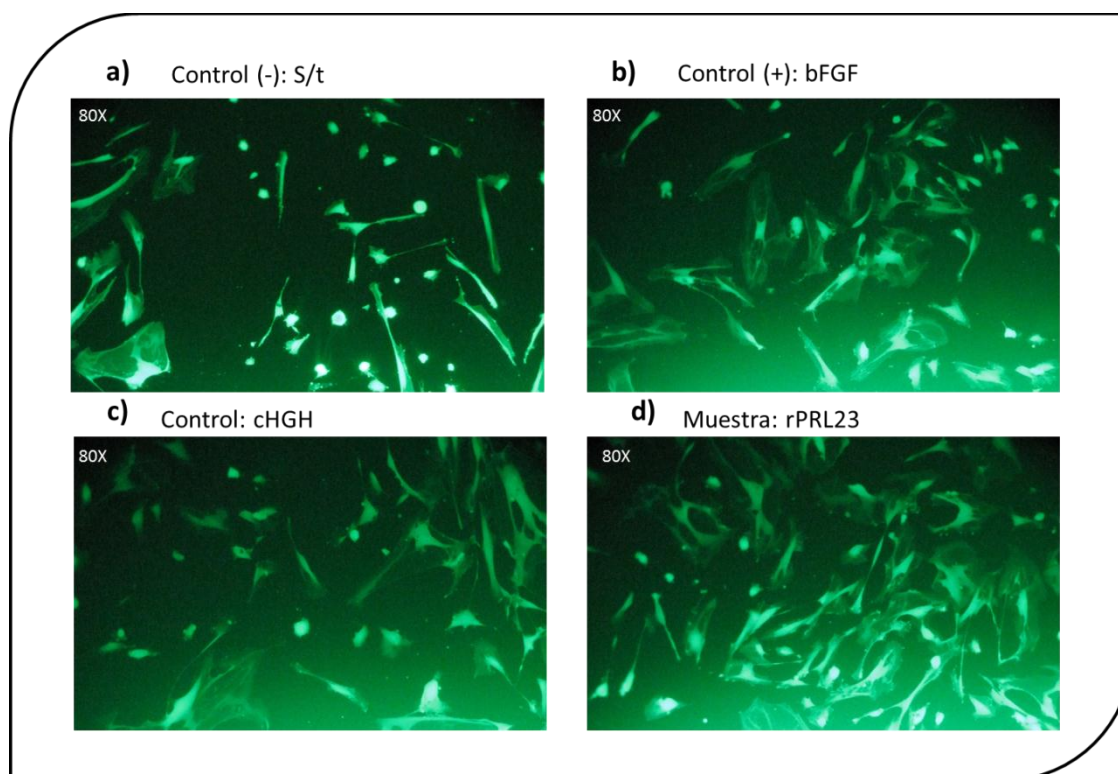


Figura 42. Ensayo de la línea celular HUVEC. a). Células sin tratamiento; b). Células tratadas con 2 ng/ μ L de bFGF; c). Células tratadas con 200 ng/ μ L de HGH comercial; d). Células tratadas con 200 ng/ μ L HIS-EK-PRL23 por 36 horas. Vista en el microscopio de fluorescencia.

5.12.2 Ensayo de la actividad biológica en la línea celular 3T3.

En este bioensayo se utilizó la línea celular 3T3 de fibroblastos de rata que permite ver la diferenciación a adipocitos con el estímulo adecuado, se usó la HGH como testigo positivo y la prolactina recombinante producida en *Pichia pastoris* mostró una diferenciación a la par que la HGH al día 6 y 9. (Figura 43).

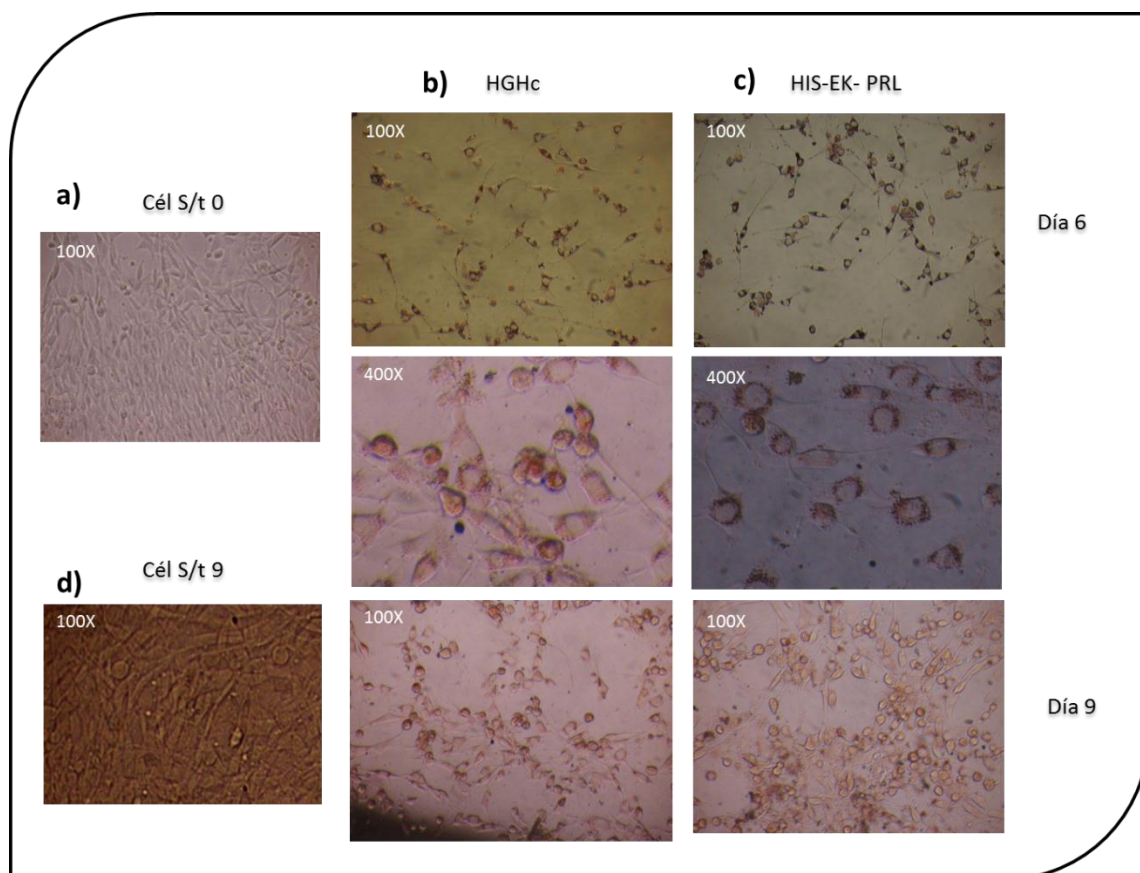


Figura 43. Diferenciación de las células 3T3 a adipocitos. **a).** Células sin tratamiento al día 0 de diferenciación, se puede apreciar su morfología que es alargada; **b).** Control positivo tratado con HGH y se puede observar el cúmulo de triglicéridos en la periferia de la célula y se inicia el cambio en su morfología, se muestran células más redondas para el día 6; **c).** Células tratadas con la prolactina de 23 kDa recombinante la cual tiene el mismo comportamiento que la HGH y para el día 9 se observa prácticamente todas las células diferenciadas. **d).** Fibroblastos sin tratamiento al día nueve aún conservan su morfología típica vistas en el microscopio óptico.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.

Con los avances en la ingeniería genética se ha hecho posible la producción de moléculas terapéuticas y vacunas para los humanos y animales en forma de proteínas recombinantes (Meena Rai y Padh, 2001). Estas son obtenidas a partir de un organismo vivo genéticamente modificado ya sea bacterias, hongos, células animales, levaduras, entre otros (Gamboa y Trujillo-Roldán, 2009). Dentro de la línea de investigación que se sigue en el laboratorio de biotecnología está la producción de las proteínas de la familia de las hormonas del crecimiento, siendo la más ensayada la hormona del crecimiento humano pues tiene importantes implicaciones terapéuticas, pero como otro miembro de esta familia de proteínas está la prolactina humana la cual es una proteína multifuncional por lo que interviene en distintas funciones: reproductivas y metabólicas como la secreción de leche en el humano, en la proliferación celular, en la angiogénesis, además en la formación de una isoforma de 16 kDa que de forma contraria tiene una actividad anti-angiogénica. (Ben-Jonathan y cols., 2008). Por lo tanto se eligió esta proteína así como a su isoforma para producirla de manera recombinante en sistemas de expresión de levaduras.

Una vez que se determinó la proteína a producir, el primer punto a considerar fue la fidelidad nucleotídica ya que la presencia de mutaciones en la secuencia traería problemas en los siguientes pasos, como el cambio de algún codón o la lectura de los codones y como consecuencia un cambio en la estructura primaria de interés e inclusive la presencia de un codón de terminación prematuro generando una proteína de menor tamaño. Por lo anterior se decidió utilizar una polimerasa de alta fidelidad (AmpliTaq Gold de Roche-Applied Biosystems) para todas las reacciones necesarias en la amplificación de la secuencia codificante de la prolactina y su isoforma de 16 kDa en todas su variantes, así como la adición de la secuencia de seis histidinas, la secuencia de

reconocimiento a la enterocinasa y las enzimas de restricción. Para contribuir a la amplificación de un solo producto de PCR, éstas se estandarizaron para lograr las mejores condiciones de amplificación.

En el laboratorio de biotecnología usualmente se trabaja con el sistema de *Pichia pastoris* y los plásmidos pPIC9, sin embargo para este trabajo se adoptó el uso del plásmido pPICZ α que a diferencia de los anteriormente utilizados posee la secuencia que codifica para una etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo lo que facilitaría su purificación, además se ha reportado que el uso de la etiqueta de histidinas de lado carboxilo como del amino logra una purificación satisfactoria en una gran número de proteínas (Terpe, 2003) por lo que se decidió incluir esta secuencia del lado N-terminal ya que en esta posición se ha reportado que su uso puede disminuir la solubilidad de la proteína a purificar (Woestenenk y cols., 2004); en el caso de la prolactina humana producida con este tipo de etiquetas no se observó una disminución en la obtención en el medio de cultivo, lo cual permite suponer que el empleo de esta etiqueta en estas posiciones no alteran su producción ni su solubilidad, además se pudo incluir un sitio de reconocimiento a enterocinasa la cual permite obtener una proteína nativa porque en algunos casos puede resultar perjudicial la presencia de la etiqueta como en la administración *in vivo* (Shahravan y cols., 2008).

Por otro lado se quiso comparar los sistemas de expresión de *Pichia pastoris* utilizando las condiciones mencionadas y el de *Saccharomyces cerevisiae* para el cual se utilizó el vector pPYES2NT que incluye la secuencia para seis histidinas en el lado amino así como la secuencia de reconocimiento para una enterocinasa, conociendo las ventajas de estas características se supuso que su expresión sería relativamente fácil, sin embargo aunque si se lograron obtener clonas candidatas pero no con una expresión sobresaliente tanto de la prolactina como de su isoforma de 16 kDa, lo que nos hace suponer primeramente que el marco de lectura se haya corrido en el plásmido, pero esto se verificaría con la secuenciación del mismo, en segundo lugar nos hace suponer que la inducción no sea la adecuada, por la presencia de restos de glucosa en el medio utilizado en el crecimiento de biomasa, debido a que este azúcar reprime la activación del

promotor Gal 1 (Sherman, 1998) bajo el cual está la producción de nuestras proteínas de interés.

En el caso de las levaduras metilotróficas, como *Pichia pastoris*, su metabolismo depende del metanol, el cual requiere la expresión de un grupo de proteínas como la alcohol oxidasa 1 (AOX1) y ésta puede llegar a representar más del 30% de las proteínas solubles cuando se crece en metanol, en cambio cuando se utiliza otras fuentes de carbono como glucosa o glicerol, la AOX1 se reprime, este hecho evidencia la fuerza del promotor en presencia de metanol, mismo que es empleado para inducir la producción de las proteínas en los vectores pPIC como el vector pPICZ α (Poutou y cols., 2005). En el caso de la prolactina humana de 23 kDa, etiquetada con las histidinas en el extremo carboxilo, alcanzó a representar el 60 % del total de proteína secretada al medio de cultivo, obteniendo una producción de aproximadamente 60 $\mu\text{g/mL}$ en el medio de cultivo; para el caso de la prolactina humana de 23 kDa, etiquetada con las histidinas en el extremo amino esta alcanzó a representar el 75 % del total de proteína secretada al medio de cultivo, obteniendo una producción de aproximadamente 80 $\mu\text{g/mL}$ en el medio de cultivo; no obstante estas producciones son factibles de ser mejoradas ya que corresponden a un producción en tubo o matraz y en de nuestro laboratorio se ha reportado el mejoramiento en la producción de proteínas mediante el escalamiento en la producción en biorreactor (Ascacio-Martínez, 2004). Para la prolactina de 16 kDa etiquetada en el extremo amino, no se observó una banda sobresaliente en un gel teñido con azul de Coomasie, sin embargo, ésta fue detectada por western blot con un anticuerpo dirigido a la etiqueta de histidinas, en comparación con lo reportado por Galfione, quién llevó a cabo la producción de esta proteína en células de insecto logrando obtener 0.28 mg de proteína pura debiendo enriquecer 40 veces la fracción retenida en la columna (Galfione y cols., 2003) y su detección fue por una tinción de plata la cual es de 100 veces más sensible que una tinción de Coomasie, esto nos hace suponer que la producción de esta proteína es difícil o bien se produce en concentraciones mínimas.

La pureza obtenida para la prolactina de 23 kDa con la etiqueta en el extremo N-terminal purificada por IMAC fue superior al 95%, esta técnica previamente había sido establecida por Márquez-Ipiña donde obtuvo una pureza del 90% para la HGH-6His, lo que nos reafirma que este método es sencillo y rápido respecto a otros cromatografías como el intercambio iónico (Márquez-Ipiña, 2011), además, el rendimiento obtenido para la prolactina fue del 75% lo que se asemeja a un proceso ideal de purificación con alta pureza y recuperación.

Los miembros de la familia de las hormonas de crecimiento como la prolactina o la hormona del crecimiento tienen efectos sobre la angiogénesis. Estas hormonas estimulan la proliferación de células endoteliales *in vitro* (Corbacho y cols., 2000). En base a este hecho se decidió evaluar la capacidad angiogénica de la prolactina producida en el sistema de *Pichia pastoris*, evaluando la formación de capilares *in vitro* en la línea celular HUVEC, resultando un comportamiento similar al de los controles, los cuales fueron el factor básico de crecimiento de fibroblastos y HGH, observando un alargamiento en las células y un mayor número con respecto al control sin tratamiento, de acuerdo a lo reportado.

Se ha descrito que la prolactina puede actuar sobre el tejido adiposo porque los receptores de esta hormona aumentan durante la diferenciación de los adipocitos y pudieran estar relacionados tanto con el desarrollo fetal, como con el metabolismo lipídico de los adipocitos maduros (Cabrera-Oliva, 2000). Por lo que se realizó otro ensayo para evidenciar la función biológica de la prolactina, se hizo la diferenciación de pre-adipocitos a adipocitos utilizando la línea celular 3T3 de fibroblastos de rata obteniendo la diferenciación al día nueve de casi todas las células sembradas, esto se observó por una tinción con rojo oleoso que tiñe en rojo los triglicéridos del adipocito. Estos experimentos nos muestran los primeros resultados preliminares de la prolactina humana de 23 kDa, sin embargo se tienen que realizar una serie de ensayos más para probar las demás funciones de la prolactina.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.

Se logró la construcción de las isoformas de prolactina de 16 y 23 kDa en los sistemas de expresión de *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El sistema de expresión de *Pichia pastoris* fue mejor productor que el de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se llevó a cabo la expresión de las isoformas de la prolactina de 23 y 16 kDa recombinantes con una etiqueta de histidinas en el extremo amino en el sistema de expresión *Pichia pastoris*.

La cepa de *Pichia pastoris* de prolactina de 23 kDa la cual incluye una etiqueta de histidinas en el extremo amino, fue la mejor productora lográndose un rendimiento de aproximadamente 80 µg/mL.

La prolactina de 23 kDa fue obtenida con una pureza mayor al 95 % por IMAC, de una manera más fácil y con menos pasos en relación con las cromatografías clásicas.

Se realizó la construcción y caracterización de las isoformas de la prolactina en el sistema de expresión de *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, no se logró identificar una banda sobresaliente.

La proteína purificada mostró actividad biológica en todos los ensayos *in vitro*.

CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., Pedersen, J., (2006). "Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins." Protein Expr Purif **48**(1): 1-13.
- Ascacio Martínez, J. A. I., (2004). "Producción en biorreactor, purificación y bioensayo de hormonas recombinantes del crecimiento." Doctor en Ciencias Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Balbás, P., Lorence, A., (2004). "Recombinant Gene Expression. Reviews and Protocols." Methods in Molecular Biology. H. Press. Totowa, New Jersey. **267**.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., LaPensee, E. W., (2008). "What can we learn from rodents about prolactin in humans?." Endocr Rev **29**(1): 1-41.
- Bornhorst, J. A., Falke, J. J., (2000). "Purification of proteins using polyhistidine affinity tags." Methods Enzymol **326**: 245-254.
- Brake, A. J., Merryweather, J. P., Coit, D. G., Heberlein, U. A., Masiarz, F. R., Mullenbach, G. T., Urdea, M. S., Valenzuela, P., Barr, P. J., (1984). "Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci USA. **81**(15): 4642-4646.
- Cao, H., Lin R., (2009). "Quantitative evaluation of His-tag purification and immunoprecipitation of tristetraprolin and its mutant proteins from transfected human cells." Biotechnol Prog **25**(2): 461-467.
- Cabrera Oliva, V. M., (2000). "Concentraciones de leptina y prolactina bioactiva e inmunorreactiva durante el ciclo menstrual normal." Rev Cub Endocrinol **11**(3):143-152.
- Cereghino, G. P., Cereghino, J. L., Ilgen, C., Cregg, J. M., (2002). "Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*." Curr Opin Biotechnol **13**(4): 329-332.
- Corbacho, A. M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., (2000). "Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms." J Endocrinol **166**(1): 53-62.

- Córdoba, R. H., Algecira, E. A., Poutoi, P. R., Barrera, A. A., (2003). "*Pichia pastoris* one alternative for human glycoprotein production of therapeutic use. Fermentation strategies." Rev. Colomb de Biotecnol. **5**(2): 1-16.
- Cos, O., R. Ramon, R., Montesinos, J. L., Valero, F., (2006). "Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review." Microb Cell Fact **5**(17): 1-20.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., Higgins, D. R., (2000). "Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*." Mol Biotechnol **16**(1): 23-52.
- Chiba, Y., Suzuki, M., Yoshida, S., Yoshida, A., Ikenaga, H., (1998). "Production of human compatible high mannose-type (Man5GlcNAc2) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **273**(41): 26298-26304.
- Dolińska, B., Ostróżka-Cieślik, A., Budziński, G., Caban, A., Oczkowicz, G., Krzysztofik, M., Cierpka, L., Ryszka, F., (2010). "Effect of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution enrichment with cysteine and prolactin on biochemical indicators in swine liver." Exp & Clinical Hepatology **6**(2): 44-48.
- Drago Serrano, M. E. Sainz Espuñes, T. R., (2006). "Sistemas de Expresión para Proteínas Terapéuticas Recombinantes." Rev Mex de Ciencias Farmacéuticas **37** (001): 38-44.
- Forsyth, I. A., Wallis M., (2002). "Growth hormone and prolactin--molecular and functional evolution." J Mammary Gland Biol Neoplasia **7**(3): 291-312.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G., (2000). "Prolactin: structure, function, and regulation of secretion." Physiol Rev **80**(4): 1523-1631.
- Galfione, M., Luo, W., Kim, J., Hawke, D., Kobayashi, R., (2003). "Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells." Protein Expr Purif **28**(2): 252-258.
- Gamboa, A. R., Trujillo-Roldán, A. T., (2009). "Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano." El Residente **IV**(3): 87-91.
- Graslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Hallberg, B. M., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, C., Hui, R., Ming, J., Dhe-Paganon, S., Park, H. W., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, C., Kim, R., Kim, S. H., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger, T. C., Kim, C. Y., Hung, L. W., Waldo, G. S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J. L., Stevens, R. C., Lesley, S. A., Wilson, I. A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M. I., Eschenfeldt, W. H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R.,

- Zhou, M., Burley, S. K., Emtage, J. S., Sauder, J. M., Thompson, D., Bain, K., Luz, J., Gheyi, T., Zhang, F., Atwell, S., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F. W., Chance, M. R., Sali, A., Acton, T. B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L. C., Hunt, J. F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, C. K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G. T., Stuart, D. I., Owens, R. J., Daenke, S., Schütz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., Büssov, K., Gunsalus, K., (2008). "Protein production and purification." Nat Methods **5**(2): 135-146.
- Hartner, F. S., Glieder A., (2006). "Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts." Microb Cell Fact **5**(39): 1-21.
- Higgins, D. R., Cregg, J. M. (1998). Introduction to *Pichia pastoris*. Methodos in Molecular Biology. Totowa, NJ, Humana Press Inc. **103**: 1-15.
- Hilfiker-Kleiner, D., Meyer, G. P., Schieffer, E., Goldmann, B., Podewski, E., (2007). "Recovery from postpartum cardiomyopathy in 2 patients by blocking prolactin release with bromocriptine." J Am Coll Cardiol **50**(24): 2354-2355.
- Iáñez-Pareja, E. (2005). "Manipulación de la Expresión." Retrieved 01-09-2010, 2010, from <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/expresion.htm>.
- INVITROGEN, (2003). pYES2/NT A, B, and C pYC2/NT A, B, and C yeast expression vectors with N-terminal tags. Carlsbad CA., Corporate Headquarters.
- INVITROGEN, (2010). "Overview of Protein Expression System Hosts." Retrieved 30 de agosto, 2010, from <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/PEIA-Misc/Expression-Hosts-and-Their-Applications.html>.
- INVITROGEN, (2010). User Manual: pPICZ α A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on ZeocinTM and purification of secreted, recombinant proteins. Carlsbad, CA Corporate Headquarters.
- Johnston, M., (1987). "A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Rev **51**(4): 458-476.
- Lee, S. H., Kunz, J., Lin, SH., Yu-Lee, L. Y., (2007). "16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway." Cancer Res **67**(22): 11045-11053.
- Li, P., Anumanthan A, Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V., (2007). "Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*." Appl Biochem Biotechnol **142**(2): 105-124.

- López Hoyos, M., Fernández Fresnedo G., (2003). "Antigenicidad de las proteínas recombinantes." Gac Med Bilbao **100**: 17-21.
- Márquez Ipiña, A. R., (2011). "Establecimiento de un método de purificación de proteínas recombinantes, basado en etiqueta de histidinas, producida en *Pichia pastoris*." Maestría en Ciencias Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León
- McCluskey, A. J., Poon, G. M., Garipey, J., (2007). "A rapid and universal tandem-purification strategy for recombinant proteins." Protein Sci **16**(12): 2726-2732.
- Meena Rai., Padh H., (2001). "Expression systems for production of heterologous proteins." CURRENT SCIENCE **80**(9): 1121-1128.
- Mendez, I., Carino, C., Diaz, L., (2005). "Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects." Rev Invest Clin **57**(3): 447-456.
- Montes de Oca, P., Macotela, Y., Nava, G., López, F., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., (2005). "Prolactin stimulates integrin-mediated adhesion of circulating mononuclear cells to endothelial cells." Lab Inv npg **85**, 633-642.
- Nevoigt, E., (2008). "Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **72**(3): 379-412.
- Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., (2004). "Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance." Mol Endocrinol **18**(10): 2522-2542.
- Porro, D., M., Sauer, M., Branduardi, P., Mattanovich, D., (2005). "Recombinant protein production in yeasts." Mol Biotechnol **31**(3): 245-259.
- Poutou, R. A., Quevedo, B. E., Córdoba, H. A., Sáenz, H., Barrera, L. A., (2005). "Influencia de la fuente de carbon sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*." NOVA, **3**(3), 75-87.
- Salazar Humberto., (2010). "Contrucción y Expresión de Genes Híbridos de la Familia GH en *Pichia pastoris*". Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nuevo León
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T., (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview, New York.
- Sánchez Cuevas, M. C., (2003). "Biotechnology: Advantages and disadvantages for agriculture." UDO Agricola **3** (1): 1-11.

- Schmidt, F. R., (2004). "Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry." Appl Microbiol Biotechnol **65**(4): 363-372.
- Shahravan, S. H., Qu, X., Chan, I. S., Shin, J.A., (2008). "Enhancing the specificity of the enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag." Protein Expr Purif **59**(2): 314-319.
- Sherman, F., (1998). "An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*." The Encyclopedia of Mol Biology and Mol Medicine. VCH publisher Weinheim, Germany. **6**: 305-325.
- Sola, A., P., Jouhten, P., Maaheimo, H., Sanchez-Ferrando, F., Szyperski, T., (2007). "Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates." Microbiol **153**(1): 281-290.
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol **60**(5): 523-533.
- Terra, L. F., Garay-Malpartida, M. H., Wailemann, R, A. M., Sogayar, M. C., Labriola, L. (2011). "Recombinant human prolactin promotes human beta cell survival via inhibition of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways." Diabet **54**:1388-1397.
- Vincze, T., Posfai, J. Roberts, R.J. (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>.
- Woestenenk, E. A., Hammarstrom, M., Van den Berg, S., Hard, T., Berglund, H., (2004). "His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors." J Struct Funct Genomics **5**(3): 217-229.
- Zhang, W., Inan, M., Meagher, M. M., (2000). "Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*." Biotechnol Bioprocess Eng **5**(4): 275-287.

ANEXOS

PROTOCOLOS

Protocolo 1. Extracción de ADN genómico de levadura por TSNT

1. Agregar 2 mL de muestra (biomasa) 1.8mL
2. Centrifugar 1 min a 12,000 rpm, eliminar sobrenadante
3. Agregar otros 2 mL de muestra (biomasa) 1.6mL
4. Centrifugar 1 min a 12, 000 rpm, eliminar sobrenadante
5. Agregar 200 μ L de TSNT, (mezclar en vortex 30 seg)
6. Agregar 200 μ L de fenol, (mezclar en vortex 30 seg), + 200 μ L de SEVAG, (mezclar en vortex 5min)
7. Agregar 300 μ L de TE 1X (mezclar en vortex 30 seg)
8. Centrifugar 7 min a 13,000 rpm
9. Transferir el sobrenadante a un tubo de 2 mL (la fase acuosa, superior)
10. Agregar 2.5 volúmenes de etanol 100%
11. Centrifugar 10 min a 13,000 rpm y decantar
12. Agregar 500 a 1000 μ L de etanol 70%
13. Centrifugar 10 min a 13,000 rpm y decantar
14. Secar en el savant
15. Agregar 30 μ L de TE 1X, (puede ser con RNAsa)

seg = segundos

TE	
EDTA	100mM
Tris-HCl	1M

TSNT	
Triton X-100	2%
SDS	1%
NaCl	100mM
Tris-HCl pH 8	10mM
EDTA pH 8	1mM

SEVAG
Cloroformo - alcohol isoamílico 24:1 (V/V)

Protocolo 2. Preparación de bacterias electrocompetentes.

1. Inocular una colonia de *E. coli* en 5 mL y dejar crecer de 5 horas a toda la noche a 37°C con agitación.

2. Inocular 2.5 mL de cultivo previo en 500 mL de LB en un matraz de 2 L. Crecer a 37°C, agitando a 300 rpm, hasta alcanzar una DO de 0.5 a 0.7 (NOTA: los mejores resultados se obtienen con DO entre 0.5 a 0.6.).
3. Enfriar las células en un baño con hielo de 10 a 15 min y transferir a un bote de centrifuga frio.
4. Centrifugar por 20 min a 4,200 rpm a 2°C (Beckman J-6M).
5. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5 mL de agua fría. Añadir 500 mL de agua fría y mezclar bien. Centrifugar 20 min a 4,200 rpm a 2°C.
6. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet agitando gentilmente en el líquido remanente.
7. Añadir otros 500 mL de agua fría, mezclar bien y centrifugar 20 min 4,200rpm a 2°C.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en el líquido remanente.
9. Añadir 40mL de glicerol 10% frio y mezclar bien. Centrifugar 10 min a 42,00rpm a 2°C.
10. Estimar el volumen del pellet y añadir un volumen igual de glicerol 10% frio para resuspender las células.
11. Alicuotar en tubos de microcentrífuga preenfriados en volúmenes de 100 µL.

Medio LB

0.5% Extracto de levadura

1% Triptona

1% NaCl

Protocolo 3. Transformación de bacterias electrocompetentes.

1. Ajustar el electroporador a 2.5KV, 25 µF y 200 a 400 ohms.
2. Añadir de 5pg a 0.5 µg de ADN plasmídico en 1 µL al tubo que contiene las células frescas o recién descongeladas. Mezclar con unos golpecitos o agitando gentilmente con la pipeta.
3. Transferir el ADN y las células a una cubeta de electroporación preenfriada 5min en hielo, agitar gentilmente para llevar las células al fondo, limpiar el hielo y agua de la cubeta. NOTA: el volumen del ADN añadido debe mantenerse pequeño, añadir un décimo del volumen de las células disminuye la eficiencia.
4. Colocar la cubeta en la cámara de descarga.
5. Aplicar el pulso eléctrico.
6. Quitar la cubeta. Anotar la duración del pulso. Inmediatamente añadir 1mL de LB y transferir a un tubo estéril. Incubar 30 a 60 min con agitación moderada a 37°C.
7. Centrifugar 3 min a 4,000 rpm, decantar el sobrenadante y resuspender en el líquido remanente.
8. Plaquear alícuotas de la transformación en placas de LB con el antibiótico apropiado.