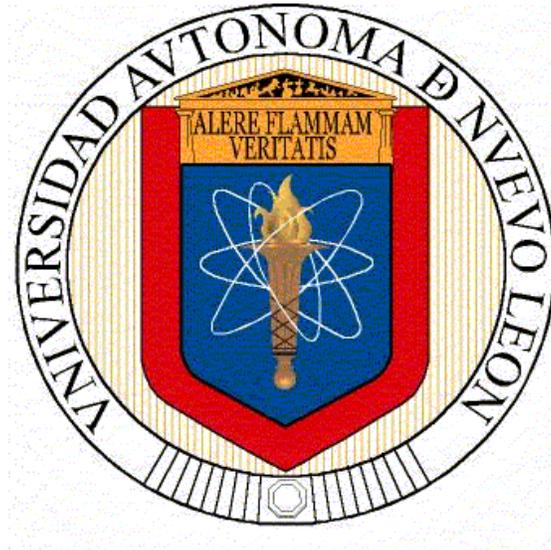


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TÍTULO DE TESIS**

**“PRODUCCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ESCALAMIENTO EN  
BIORREACTOR DE LA ISOFORMA DE 23 kDa DE LA  
PROLACTINA HUMANA.”**

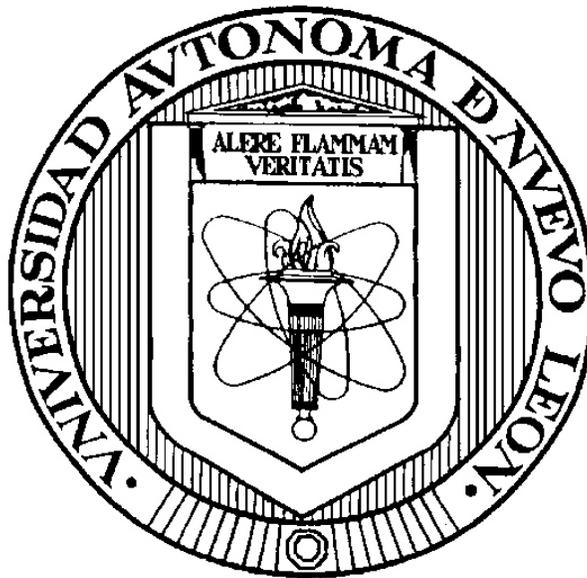
**POR**

**CARLOS MUZA BRISEÑO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**DICIEMBRE, 2014**

**Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina**



**Título de Tesis**

**“Producción, caracterización y escalamiento en biorreactor de la isoforma de 23 kDa de la prolactina humana”.**

**Por  
Q.F.B. Carlos Muza Briseño.**

**Como Requisito Parcial Para Obtener el Grado de Maestría en  
Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería  
Genética**

**Diciembre, 2014**

**Título: "Producción, caracterización y escalamiento en biorreactor de la isoforma de 23 kDa de la prolactina humana".**

**Aprobación de la tesis:**



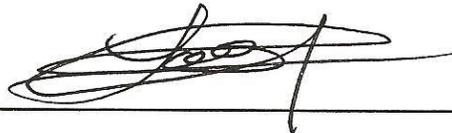
---

**Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez**  
**Director de Tesis.**



---

**Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña**  
**Co-Director de Tesis.**



---

**Dra. C. María De Lourdes Garza Rodríguez**  
**Miembro de la Comisión.**



---

**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado.**

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología del departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez, la Co-Dirección del Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña y la Dra. C. María de Lourdes Garza Rodríguez como parte de la comisión.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Principalmente, agradezco al Dr. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez por la oportunidad de realizar mi tesis de maestría bajo su tutela, por todo el conocimiento adquirido así como por su apoyo y confianza. Es usted todo un ejemplo como profesionista y como persona.

Al Dr. Hugo Barrera Saldaña por todos sus consejos y aportaciones para la realización de este trabajo.

A la Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez por su disposición, sugerencias y ayuda.

A todo el personal de bioquímica, quienes fueron como una segunda familia para mí durante mi estancia en el departamento.

A mis compañeros de generación, gracias por todos los buenos momentos y por su amistad.

A Guillermo Guerrero, a quién considero como un hermano. Al fin superamos este reto.

También agradezco a todos los chicos de servicio social y voluntarios Anahí, Edna, Estefanía, Samael, José Luis y Víctor por toda la ayuda brindada y por su amistad.

## **DEDICATORIA.**

Dedico este trabajo a mis padres Tere y Carlos por todo su apoyo, confianza y sobre todo cariño que me demuestran. Una de mis motivaciones más fuertes es hacerlos sentir orgullosos de mí. Los quiero muchísimo.

A mis hermanas Mariela, Yadira, Karla y Yéssica, que siempre me han motivado a seguir adelante.

A la mujer con quien he compartido muchos y maravillosos años de mi vida. Gracias Elidé por todo tu apoyo, paciencia y amor. Sabes que te quiero muchísimo.

Por último a toda mi demás familia y amigos que siempre me motivaron a seguir adelante.

## ÍNDICE.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN. ....	1
1.1 Biotecnología moderna.....	1
1.2 Proteínas recombinantes y biofármacos. ....	2
1.3 Sistemas de expresión recombinante. ....	4
1.3.1 Sistemas de expresión en bacterias.....	6
1.3.2 Sistemas de expresión en levaduras. ....	7
1.3.3 Sistemas de expresión en líneas celulares de mamíferos e insectos. ....	7
1.4.1 Generalidades de <i>Pichia pastoris</i> . ....	8
1.4.2 Metabolización de metanol en <i>Pichia pastoris</i> .....	9
1.4.3 Fenotipos de utilización de metanol (Mut) en <i>Pichia pastoris</i> . ....	10
1.4.4 Vectores utilizados en <i>Pichia pastoris</i> .....	11
1.4.5 Vector de expresión pPIC9. ....	12
1.4.6 Integración del vector pPIC9 al genoma de <i>Pichia pastoris</i> . ....	12
1.4.7 Fermentación de <i>Pichia pastoris</i> y expresión de las proteínas recombinantes. ....	14
1.5 Escalamiento a nivel biorreactor. ....	15
1.6 Optimización de secuencia. ....	16
1.7 Prolactina humana (hPRL).....	16
1.7.1 Vasoinhibinas (Isoformas de la hPRL).....	18
1.8 Antecedentes en el laboratorio de biotecnología. ....	18
CAPÍTULO III. OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	21
4.1 Estrategia general.....	21
4.2 Diseño y optimización de la secuencia de la prolactina humana de 23 kDa. ....	22
4.3 Propagación del plásmido pUC57-PRL23.....	22
4.3.1 Transformación de bacterias electrocompetentes con el plásmido pUC57-PRL23. ....	22
4.3.2 Caracterización de las colonias obtenidas. ....	23

4.4	Construcción del vector de expresión pPIC9-PRL23. ....	23
4.4.1	Digestión y purificación del vector e inserto. ....	23
4.4.2	Reacción de ligación de la secuencia PRL23-OPT y el vector pPIC9. ....	24
4.4.3	Caracterización de las bacterias transformadas con el vector pPIC9-PRL23 mediante PCR. ....	25
4.5	Linearizado del vector de expresión y transformación de la levadura. ....	27
4.6	Caracterización de las levaduras transformadas. ....	27
4.6.1	Caracterización por PCR empleando indicadores para AOX1. ....	28
4.7	Ensayos de expresión a nivel tubo de ensayo de 50mL. ....	28
4.7.1	Inducción de la producción de prolactina en <i>P. pastoris</i> . ....	28
4.7.2	Diálisis del medio de inducción. ....	29
4.7.3	Análisis de las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). ....	29
4.7.4	Análisis Western blot (detección de etiqueta de histidinas). ....	29
4.7.5	Cuantificación de proteínas. ....	30
4.7.6	Análisis por densitometría. ....	30
4.8	Purificación mediante la técnica de IMAC. ....	30
4.9	Escalamiento en biorreactor. ....	31
CAPÍTULO V. RESULTADOS. ....		33
5.1	Diseño de la secuencia optimizada. ....	33
5.1.1	Obtención de la secuencia codificante para la prolactina de 23 kDa (PRL23)...	33
5.1.2	Adición de elementos génicos. ....	33
5.1.3	Optimización de la secuencia diseñada. ....	34
5.2	Caracterización de la secuencia optimizada. ....	37
5.3	Ligación de la secuencia PRL23 con el plásmido pPIC9 y transformación en <i>E. coli</i> . ....	37
5.3.1	Transformación de bacterias electrocompetentes. ....	38
5.3.2	Caracterización del vector de expresión pPIC9-PRL23. ....	39
5.4	Transformación de las cepa GS115 de <i>Pichia pastoris</i> con el vector pPIC9-PRL23. ....	41
5.4.1	Caracterización de las colonias transformadas. ....	42
5.5	Ensayos de expresión en tubo de 50 mL. ....	43
5.6	Detección de la etiqueta de histidina mediante Western blot. ....	43

5.7 Cuantificación de proteínas y determinación de prolactina total.....	44
5.8 Purificación mediante la técnica de IMAC.....	46
5.9 Escalamiento a nivel biorreactor (1 litro).....	47
5.9.1 Análisis de las proteínas expresadas en biorreactor.....	49
5.9.2 Cuantificación de la prolactina producida a nivel biorreactor.....	49
5.10 Mejora del proceso de producción en el biorreactor.....	50
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....	52
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.....	55
CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57
ANEXOS.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Producción de proteínas recombinantes. ....	2
Figura 2. Estructura general de un vector de expresión. ....	4
Figura 3. Vía metabólica del metanol en <i>P. pastoris</i> . ....	10
Figura 4: Vector de expresión pPIC9. ....	12
Figuras 5A y 5B. Integración del vector pPIC9 al genoma de <i>P. pastoris</i> . ....	13
Figura 6. Gen de la prolactina de 23 kDa. ....	18
Figura 7. Esquema de la estrategia general. ....	21
Figura 8. Componentes del biorreactor. ....	32
Figura 9. Secuencia nucleotídica de la PRL de 23 kDa. ....	33
Figura 10. Elementos génicos añadidos a la secuencia de la PRL. ....	34
Figura 11. Secuencia final optimizada. ....	34
Figura 12. Índice de adaptación de codones (CAI). ....	35
Figura 13. Frecuencia óptima de codones (FOC). ....	36
Figura 14. Ajuste de contenido de CG. ....	36
Figura 15. Liberación del fragmento de PRL23. ....	37
Figura 16. Preparación del inserto y plásmido para ligación. ....	38
Figura 17. Colonias de transformantes de TOP10F. ....	38
Figura 18. ADN plasmídico de las transformantes de TOP10F. ....	39
Figura 19. Digestión enzimática de pPIC9-PRL23. ....	39
Figura 20. Caracterización enzimática de la secuencia pPIC9-PRL23. ....	40
Figura 21. Caracterización de pPIC9-PRL23 por PCR. ....	41
Figura 22. Transformación de la cepa GS115. ....	41
Figura 23. Caracterización de las colonias de GS115 transformadas con pPIC9-PRL23 por medio de PCR. ....	42

Figura 24. Ensayo de expresión de prolactina en las cepas transformadas. ....	43
Figura 25. Gemelo de SDS-PAGE y Western blot. ....	44
Figura 26. Figura 26. Curva de calibración para la cuantificación de proteína total por la técnica de Bradford.. ....	45
Figura 27. Densitogramas y porcentaje de prolactina en la proteína total. ....	45
Figura 28. Purificación de PRL23-OPT mediante la técnica de IMAC. ....	46
Figura 29. Estimación de prolactina recuperada y pureza obtenida. ....	47
Figura 30. Biomasa en el biorreactor. ....	48
Figura 31. pH del medio en el biorreactor .....	48
Figura 32. Oxígeno disuelto en el medio del biorreactor .....	48
Figura 33. Expresión de prolactina durante la inducción en biorreactor. ....	49
Figura 34. Cuantificación de proteína total y prolactina recombinante .....	50
Figura 35. Mejora de las condiciones de producción en biorreactor.....	51

## ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Ejemplos de proteínas con aplicación terapéutica producidas mediante tecnología recombinante .....	3
Cuadro 2. Factores que deben ser considerados durante la selección de un sistema de expresión. ....	5
Cuadro 3. Ventajas y desventajas de los sistemas de expresión disponibles. ....	6
Cuadro 4. Ejemplos de vectores de expresión para <i>Pichia pastoris</i> . ....	11
Cuadro 5. Reacción de digestión del plásmido pUC57-PRL23 con las enzimas <i>Xho I</i> y <i>Avr II</i> . ....	23
Cuadro 6. Reacciones de digestión para el vector e inserto. ....	24
Cuadro 7. Reacción de ligación entre el vector pPIC9 y el inserto PRL23. ....	24
Cuadro 8. Reacción de PCR y programa para caracterización por el promotor de AOX1. ....	25
Cuadro 9. Reacción de PCR y programa de amplificación para caracterización por amplificación interna. ....	26
Cuadro 10. Reacciones de digestión enzimática para la caracterización del vector pPIC9-PRL23. ....	26
Cuadro 11. Reacción de linearizado del vector pPIC9-PRL23 con <i>Sac I</i> . ....	27
Cuadro 12. Reacción y condiciones de PCR con los iniciadores de AOX1. ....	28
Cuadro 13. Parámetros monitoreados durante las 72 horas de inducción. ....	47

## **ABREVIATURAS.**

**aa.** Aminoácidos.

**ADN.** Ácido desoxirribonucleico.

**AOX1.** Alcohol oxidasa 1 (proteína).

**AOX1.** Promotor de la alcohol oxidasa 1.

**aox1.** Gen de la alcohol oxidasa 1.

**Cols.** Colaboradores.

**dO<sub>2</sub>.** Oxígeno disuelto en el medio.

**DO<sub>600</sub>.** Densidad óptica a 600 nanómetros.

**EK.** Enterocinasa.

**HisTag.** Etiqueta de histidinas.

**hPRL.** Prolactina humana.

**IMAC:** Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados.

**PRL.** Prolactina.

**PRL16.** Prolactina humana de 16 kDa.

**PRL23.** Prolactina humana de 23 kDa.

**PRL23-OPT.** Prolactina expresada de la secuencia eficientada.

**SDS-PAGE.** Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

**WB.** Western blot

## RESUMEN.

**Introducción:** Los avances en la tecnología del ADN recombinante han permitido reprogramar microorganismos y células eucarióticas en cultivo para producir una gran variedad de proteínas heterólogas de interés para la investigación, la industria y la clínica. De entre estas últimas se encuentra la prolactina humana de 23 kDa, la cual ha sido reportada como un agente que favorece la angiogénesis. Esta proteína de 199 residuos aminoacídicos es producida normalmente en la adenohipófisis, sin embargo, en este trabajo y mediante tecnología de ADN recombinante se ha logrado producirla en un sistema de expresión basado en la levadura *Pichia pastoris*, la cual como biofactoría alcanza altos niveles de producción de proteínas heterólogas las cuales son procesadas y secretadas al medio. La producción de estas está finamente regulada por el promotor de la alcohol oxidasa (AOX1).

**Objetivo:** Expresar y caracterizar la isoforma de prolactina humana de 23 kDa en cepas de *P. pastoris*.

**Metodología:** Para diseñar el plásmido recombinante la secuencia codificante para la prolactina humana fue modificada por la adición de elementos génicos (incluyendo una etiqueta de histidina) y optimizada mediante el uso de codones preferenciales. El sistema de expresión se basó en la cepa GS115 de *Pichia pastoris*, empleando el vector pPIC9 para derivar el vector de expresión. Las proteínas fueron cuantificadas mediante la técnica de Bradford y analizadas por SDS-PAGE, "Western blot" y densitometría. La prolactina obtenida fue purificada mediante la técnica de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). Además, se escaló el bioproceso a nivel biorreactor de 1 litro.

**Resultados:** Las cepas de *Pichia pastoris* transformadas con el vector pPIC9-PRL23 alcanzaron un rendimiento de 6.36 µg/mL en nivel tuvo de ensaye y 42.22 µg/mL en biorreactor. La etiqueta de histidina añadida permitió la detección de la prolactina por "Western blot", así como su purificación por IMAC, con una recuperación del 43.72% y una pureza del 84%.

**Conclusiones:** Se logró construir cepas de *Pichia pastoris* productoras de prolactina humana de 23 kDa mediante una secuencia modificada por optimización de codones. Las mejores cepas productoras para esta proteína fueron aquellas de fenotipo Mut<sup>+</sup>. Mediante la técnica de IMAC se logró obtener la prolactina humana con una pureza estimada del 84%. Finalmente, se escaló exitosamente la producción de prolactina humana a nivel de biorreactor (1 litro).

---

**Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez**  
**Director de tesis.**

## **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Biotecnología moderna.**

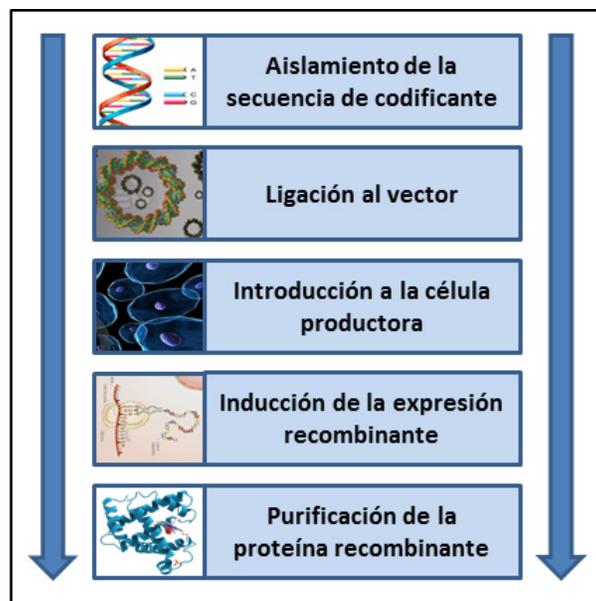
A grandes rasgos la biotecnología es definida como la modificación de las propiedades innatas de microorganismos, plantas, animales o partes de los mismos, con el fin de obtener un producto de interés que beneficie al humano directa o indirectamente. Las bases de la biotecnología datan desde hace muchos siglos, cuando se empezó a seleccionar mediante cruce selectiva las mejores especies de plantas y animales, así como la utilización de sus productos para obtener alimentos o productos medicinales. Sin embargo la biotecnología moderna hace referencia a la era de la invención de la tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética (Niazi y Riaz-ud-Din 2006).

A partir de la década de los 70s la ingeniería genética empezó a adquirir gran importancia en la investigación y se proyectaba como un parteaguas para el desarrollo de nuevas tecnologías. La manipulación del ADN y los estudios de Hamilton Smith sobre las enzimas de restricción dieron lugar a la tecnología recombinante, en la cual segmentos de ADN de distintos orígenes son insertados en plásmidos para formar moléculas de ADN recombinante capaces de una replicación autónoma (Smith y Wilcox 1970). Luego se aprendió a expresar ese inserto lo que permitió sobreproducir en forma controlada proteínas heterólogas de interés en diversos organismos, dando paso al inicio de la biotecnología moderna (Crommelin y cols, 2008).

Hoy en día la biotecnología moderna opera a nivel molecular mediante la convergencia de disciplinas como la biología celular y molecular, la microbiología, ciencias genómicas y la bioinformática. Además, abarca una amplia variedad de campos de investigación, entre los cuales se encuentran la biotecnología de la salud, agrícola, industrial y ambiental. Algunos investigadores clasifican la biotecnología en un código de colores, la biotecnología “verde” se encarga de su aplicación en el área de alimentos, mientras que la “roja” es aquella asociada al área médica, así mismo, también se refieren a la “biotecnología blanca” donde se utilizan procesos naturales como el uso de la fermentación y enzimas para obtener productos que generalmente son producidos a partir de procesos químicos artificiales. Por último, la biotecnología azul es aquella aplicada a la biología marina (Bauer, 2002; Wilson, 2010).

## 1.2 Proteínas recombinantes y biofármacos.

Las proteínas recombinantes o heterólogas son aquellas que son expresadas en células o líneas celulares que no las expresan naturalmente, sino que son el resultado de la modificación genética e inserción de un gen que será expresado por la maquinaria de dichas células (Figura 1). El proceso consiste en introducir una secuencia de ADN que codifique la proteína de interés en un vector adecuado que contenga promotores que puedan ser regulados. Posteriormente, este vector es introducido en las células heterólogas capaces de llevar a cabo la expresión dicha proteína recombinante (Niazi 2006; Ramamoorthi y Smooker, 2009).



**Figura 1. Producción de proteínas recombinantes.** Pasos generales durante el diseño de un bioproceso productor de proteína recombinante.

Debido a que estas proteínas recombinantes pueden obtenerse más fácilmente y en mayores cantidades que de la fuente original han adquirido gran importancia para las investigaciones, sobre todo aquellas de origen humano por su gran potencial terapéutico (Dingermann, 2008).

Aquellas moléculas que son obtenidas a partir de organismos (tanto eucariotas como procariontas) y que poseen una propiedad terapéutica son conocidos como “biofármacos”, de los cuales la mayoría son proteínas recombinantes (Graumann y Premstaller, 2006).

Para el año 2000 las ventas mundiales de biofármacos alcanzaron un valor de 22.7 millones de dólares y actualmente los biofármacos representan uno de los sectores con mayor crecimiento en el mercado de la farmacéutica (Bairamashvili y Ravinovich, 2007).

El primer medicamento recombinante producido en masa, en cultivos de *Escherichia coli*, fue la insulina en 1978, teniendo un gran impacto en la medicina moderna (Keen y cols., 1980). La segunda proteína recombinante producida también en *E. coli* fue la hormona de crecimiento humana, la cual es un polipéptido de 191 aminoácidos y que mostró tener una similitud casi idéntica a la original (Olson y cols., 1981). Un ejemplo más es la eritropoyetina, la cual fue expresada de manera recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) y que actualmente se comercializa para tratar anemias y otros trastornos que afectan las concentraciones de eritrocitos circulantes (Lin y cols., 1985). Las proteínas mencionadas fueron los precursores para la producción de biofármacos, hoy en día suman un sinnúmero de vacunas, medicamentos y tratamientos hormonales entre otros basados en la misma tecnología (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Ejemplos de proteínas con aplicación terapéutica producidas mediante tecnología recombinante (Graumann y Premstaller, 2006).**

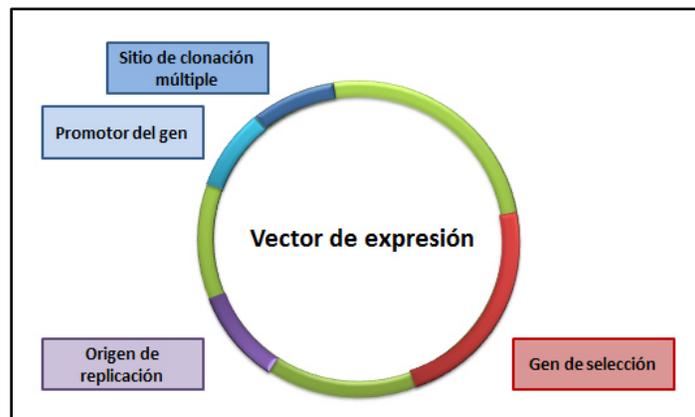
Molécula recombinante	Fabricantes
Insulina humana y análogos	Eli Lilly, Aventis, Probiomed
Hormona de crecimiento humano	Genentech, Eli Lilly, Pfizer, Novo
Interferón $\alpha$ -2a	Hoffmann-La Roche, Schering
Interferón $\beta$ -1b	Schering AG, Chiron
Interferón $\gamma$ -1b	Genentech, Intermune
Toxina de fusión de la difteria	Seragen / Ligand
Interleucina-11	Genetics Institute
Factor de necrosis TNF $\alpha$	Boehringer Ingelheim
Toxina pertussis	Chiron

### 1.3 Sistemas de expresión recombinante.

Para poder expresar proteínas recombinantes es necesario diseñar un sistema de expresión eficiente, el cual como se mencionó con anterioridad, consta de elementos tales como la secuencia codificante para la proteína de interés, el vector y la célula heteróloga.

La secuencia puede obtenerse de las diferentes bases de datos como el National Center for Biotechnology Information (NCBI), el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) o el DNA Data Bank de Japón (DDBJ). Una vez identificada la secuencia, ésta puede ser aislada del organismo fuente o sintetizarse de manera artificial. Además, estas secuencias pueden ser modificadas para añadir elementos génicos como sitios de corte para enzimas, secuencias de reconocimiento o etiquetas que faciliten su manipulación y caracterización (Singh y cols., 1996 y 2013).

Por su parte, los vectores o plásmidos son segmentos de ADN circular que actúan como un almacén génico en el que se insertará la secuencia que se desea propagar y expresar. Entre los elementos que debe contener un vector para expresión se encuentran: un origen de replicación autónomo (secuencia Shine-Dalgarno), el promotor del gen que se va a expresar, un sitio de clonación múltiple en el cual se insertará la secuencia codificante además de un gen de selección que nos permitirá obtener solo aquellas células que hayan integrado al vector como por ejemplo el gen de resistencia a ampicilina en bacterias (Figura 2). Además, se debe seleccionar el vector con el promotor más finamente regulado posible para evitar problemas de expresión basal o formación de cuerpos de inclusión que pueden afectar el plegado de la proteína (Lara, 2011).



**Figura 2. Estructura general de un vector de expresión.** Incluye un origen de replicación autónomo, un promotor regulado, un sitio de clonación múltiple y un gen de selección (marcador).

La elección de la célula heteróloga también debe ser realizada cuidadosamente, ya que deben ser células capaces de llevar a cabo una eficiente traducción del RNAm de la proteína de interés así como sus modificaciones postraduccionales lo más parecidas a las naturales para obtener una similitud y acabados idénticos a la molécula original (Cuadro 2). El origen de la proteína es un factor muy importante que se debe considerar. Se obtendrán mejores resultados al expresar una proteína eucariota compleja en una célula eucariota en vez una procariota, ya que esta última no contaría con la capacidad de procesar y modificar proteínas complejas. Además, se debe lograr un plegamiento correcto de las proteínas expresadas, sobre todo cuando se tiene un interés en aplicar la proteína recombinante como un agente terapéutico. Una correcta estructura terciaria resultaría en proteínas funcionales y capaces de llevar a cabo su actividad biológica correspondiente (Yon, 2001).

**Cuadro 2. Factores que deben ser considerados durante la selección de un sistema de expresión (Guerrero-Olazarán, 2004).**

<b>Origen de la proteína (organismo)</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Procariota.</li><li>• Eucariota .</li></ul>
<b>Secuencia nucleotídica codificante</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tamaño de la proteína codificada.</li><li>• Uso de codones preferenciales.</li><li>• Modificaciones postraduccionales.</li></ul>
<b>Propiedades de la proteína</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Propiedades químicas (pH, punto isoeléctrico, solubilidad).</li><li>• Estabilidad y resistencia a proteólisis .</li><li>• Destino celular (extracelular o intracelular).</li><li>• Pureza con la que se obtiene (endotoxinas bacterianas, subproductos).</li></ul>
<b>Aplicación para el recombinante</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Biomedicina (agente terapéutico, vacunas, diagnóstico).</li><li>• Industria alimenticia .</li><li>• Procesos industriales (química de la transformación).</li><li>• Reactivo de laboratorio (enzimas, estándares, pruebas biológicas).</li><li>• Biotecnología ambiental .</li></ul>
<b>Tipo de bioproceso para su producción</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Condiciones de cultivo.</li><li>• Escalamiento .</li><li>• Rendimiento.</li><li>• Costo.</li><li>• Sustentabilidad.</li></ul>

Dentro de los principales sistemas de expresión recombinante se encuentran las bacterias, levaduras y líneas celulares de mamíferos, insectos y plantas. Cada una de

estos sistemas ofrece diversas ventajas y desventajas, es por eso que como se mencionó con anterioridad se deben tomar en cuenta las características de la proteína que se desea producir para seleccionar el sistema más adecuado (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Ventajas y desventajas de los sistemas de expresión disponibles (Demain y Vaishnav, 2009).**

	Ventajas	Desventajas
Bacterias	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ampliamente estudiadas y fácil manipulación genética</li> <li>• Gran variedad de de cepas y vectores</li> <li>• Cultivos celulares sencillos y baratos</li> <li>• Expresión moderada de proteínas recombinantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sin modificaciones postraduccionales</li> <li>• Formación de cuerpos de inclusión</li> <li>• Producen endotoxinas que dificultan el uso de las proteínas recombinantes</li> <li>• Alta proteólisis</li> </ul>
Levaduras	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cultivos celulares sencillos y baratos</li> <li>• Realizan modificaciones postraduccionales sencillas</li> <li>• Capacidad de secretar las proteínas recombinantes (como <i>P. pastoris</i>)</li> <li>• Libres de endotoxinas</li> <li>• Alta expresión recombinante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción de biomasa más lenta que en bacterias</li> <li>• Pueden producir hiperglicosilación</li> </ul>
Células de mamífero e insectos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizan las mejores modificaciones postraduccionales</li> <li>• Mejor plegamiento de proteínas</li> <li>• Las proteínas recombinantes tienen funcionalidad completa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medios de cultivo muy costosos</li> <li>• Fácil contaminación de los cultivos y proteínas</li> <li>• Tienen un rendimiento de producción muy bajo</li> </ul>

### 1.3.1 Sistemas de expresión en bacterias.

Los sistemas bacterianos han sido ampliamente utilizados desde los inicios de la tecnología recombinante e incluso hoy en día siguen siendo una de las principales opciones e incluso diversas cepas han sido aceptadas como organismos generalmente considerados como seguros (*GRAS*, por sus siglas en inglés) por la FDA (*Food and Drug Administration*). Dentro de los más utilizados se encuentran aquellas de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* y *Escherichia* (Ferrer-Miralles y Villaverde, 2013).

*Escherichia coli*, es una de las bacterias más ampliamente usada como sistema de expresión en la investigación e industria ya que tiene un crecimiento rápido en medios de cultivo sencillos y de bajo costo, lo que permite escalar su producción a niveles mayores (Lara, 2001; Menzella, 2011). Sin embargo, *E. coli* es incapaz de realizar modificaciones postraduccionales y posee una muy limitada capacidad de secreción lo que podría resultar en la generación de cuerpos de inclusión y proteínas no solubles e inactivas (Sahdev y cols., 2008).

### **1.3.2 Sistemas de expresión en levaduras.**

Por su parte, los sistemas de expresión basados en levaduras también han demostrado ser bastante eficientes en la producción de proteínas recombinantes y, dado que también son organismos eucariotas, pueden incluso expresar exitosamente proteínas de origen animal o humano. Las levaduras comparten algunas de las ventajas de las bacterias como la rápida producción de biomasa en cultivo sencillos, pero además, las levaduras cuentan con otras características como generar un mejor plegamiento de las proteínas y el poder llevar a cabo modificaciones postraduccionales simples (Eckart y Bussineau, 1996) Además, las proteínas sintetizadas son libres de endotoxinas (a diferencia de la expresión en bacterias) lo que es de gran importancia si su aplicación está orientada a algún uso terapéutico. Otra ventaja es que algunas levaduras como *Pichia pastoris* pueden secretar al medio de cultivo las proteínas recombinantes, lo que facilita la recuperación de dichas proteínas (Drago, 2006; Daly y Hearn, 2005).

### **1.3.3 Sistemas de expresión en líneas celulares de mamíferos e insectos.**

Si bien las levaduras sintetizan proteínas más complejas, las mejores modificaciones postraduccionales se obtienen en células de eucariotas superiores. Los cultivos de células de insectos emplean vectores de baculovirus (Galfione y cols., 2003). Estos sistemas de expresión pueden llevar a cabo modificaciones postraduccionales más complejas como la fosforilación y glicosilación (O- y N-) entre otras. Algunas de sus desventajas son que los medios de cultivo son complejos y que se obtiene una menor producción en comparación con las bacterias y levaduras. (Demain y Vaishnav, 2009).

Actualmente alrededor del 60-70% de los biofármacos recombinantes son producidos en líneas celulares de mamífero (como las Baby Hamster Kidney “BHK”, Human Embryonic Kidney “HEK293” y una de las más empleadas, la Chinese Hamster Ovary “CHO”). Además de un plegado y glicosilación más similar al de las proteínas nativas, este tipo de células puede también añadir cadenas de ácidos grasos y realizar procesos de fosforilación (Wurm, 2004). Sin embargo, al igual que los cultivos de células de insecto, son complicados, susceptibles a contaminación y con un bajo rendimiento de expresión. Además, las líneas celulares derivadas de células tumorales pueden estar contaminadas con retrovirus, sin mencionar que los medios de cultivo empleados (como el suero fetal) pueden estar contaminados con otros virus, priones o micoplasmas (Drago, 2006).

#### **1.4 La levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión.**

Como se ha descrito anteriormente, las levaduras poseen una combinación de ventajas sobre los sistemas bacterianos y los cultivos de células de mamífero. *Pichia pastoris* es una de las levaduras más empleadas en la producción de proteínas recombinantes y su aplicación va desde el área académica hasta la industrial.

Durante la década de 1970 la “Phillips Petroleum Company” desarrolló diversos métodos de cultivo para *Pichia pastoris* empleando metanol como fuente de carbono, con la intención de comercializarla como un alimento para animales rico en proteína. Sin embargo, durante esa misma época el costo del metanol se elevó drásticamente debido a la crisis energética, haciendo estos procesos poco sustentables (Cregg y Cereghino, 2000). Posteriormente en la década de 1980, la Phillips Petroleum Company junto con el “Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc.” convirtieron a *P. pastoris* en un sistema de expresión para proteínas heterólogas aislando el gen de la alcohol oxidasa (AOX1) y su promotor, con lo que fueron capaces de desarrollar vectores, cepas y métodos para manipular genéticamente a esta levadura (Ellis y cols., 1985).

##### **1.4.1 Generalidades de *Pichia pastoris*.**

*Pichia pastoris* pertenece a un pequeño grupo de levaduras metilotróficas, es decir son capaces de utilizar el metanol como fuente única de carbono y energía. Tiene una

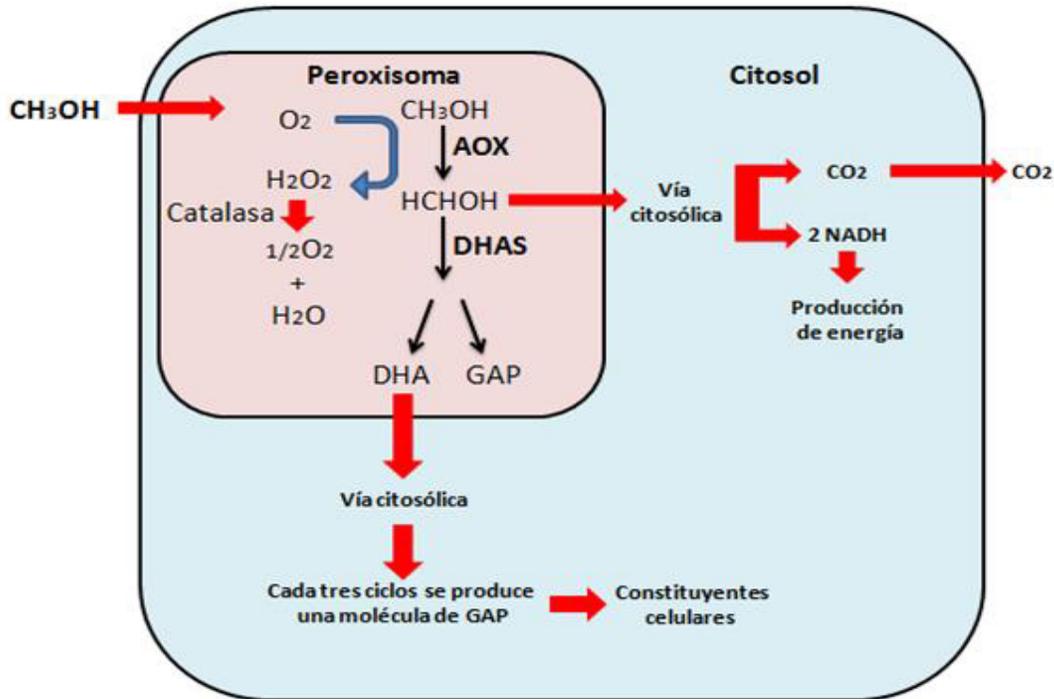
reproducción sexual con producción de ascosporas (1 a 4 ascas). En placas de cultivo sólido forma colonias no filamentosas de color blanco o crema, al microscopio tiene una morfología esférica u ovalada y se pueden observar varias yemas (Poutou y cols., 2005).

Como sistema de expresión todas las cepas empleadas son derivadas de la cepa nativa Y-11430. La mayoría de las cepas empleadas para expresión recombinante poseen una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4), debido a que los vectores de transformación poseen el gen HIS4 y permite el crecimiento y selección de solo aquellas que los hayan integrado. Una de las cepas más utilizadas es la GS115 (*his4*) la cual posee los genes *aox1* y *aox2*, lo que le permite crecer en metanol al mismo ritmo que la cepa nativa (Higgins y Cregg, 1998).

La cepa GS115 de *Pichia pastoris* cuenta con las mismas ventajas mencionadas para las levaduras, sin embargo es importante resaltar que el promotor del gen AOX1 es finamente regulado y sólo es activado cuando el metanol se encuentra como única fuente de carbono, lo que permite una buena generación de biomasa en presencia de otras fuentes de carbono antes de la inducción del promotor, evitando la expresión basal de la proteína recombinante (Macauley-Patrick y cols., 2005). Además, esta levadura posee la capacidad de secretar las proteínas recombinantes ya procesadas al medio de cultivo, mientras que no secreta niveles altos de proteínas nativas durante la inducción, facilitando así los procesos posteriores de purificación (Sarramegna y cols., 2005).

#### **1.4.2 Metabolización de metanol en *Pichia pastoris*.**

La actividad metilotrófica de *P. pastoris* se debe a la enzima alcohol oxidasa (AOX). La AOX alcanza niveles altos cuando la levadura crece en presencia de metanol como fuente de carbono. Sin embargo, su nivel de expresión no es detectable cuando es cultivada en glucosa o etanol (Cregg y cols., 1985). La AOX oxida el metanol para producir formaldehído y peróxido de hidrogeno (Figura 3). Posteriormente, el formaldehído forma dióxido de carbono por la acción de deshidrogenasas citoplasmáticas, mientras que la catalasa degrada el peróxido lo cual a su vez provee energía a la célula para crecer. El peróxido de hidrogeno por su parte es degradado por la catalasa a oxígeno y agua (Higgins, 2000).



**Figura 3. Vía metabólica del metanol en *P. pastoris*.** El metanol entra hasta el peroxisoma donde es oxidado por la alcohol oxidasa (AOX) produciendo formaldehído y peróxido de hidrógeno. El formaldehído pasa a Gliceraldehído 3-fosfato (GAP) y Dihidroxiacetona (DHA) por acción de la Dihidroxiacetona sintasa (DHAS). La DHA posteriormente entra en un ciclo citosólico que produce GAP cada tres ciclos. Otra parte del formaldehído entra a otra vía citosólica que termina en  $\text{CO}_2$  y dos moléculas de  $\text{NADH}^+$  reducido (Cregg et al., 2000).

### 1.4.3 Fenotipos de utilización de metanol (Mut) en *Pichia pastoris*.

La levadura *P. pastoris* cuenta con dos genes que codifican para las alcohol oxidasas tipo I y II, denominadas AOX1 y AOX2 respectivamente, siendo *aox1* el responsable de la mayor actividad de AOX en la célula. El gen *aox1* posee un promotor altamente regulado el cual ha sido empleado en plásmidos para inducir la expresión de genes heterólogos (Balamurugan y cols. 2007). Por otra parte, el gen *aox2* no induce un crecimiento celular tan eficientemente como *aox1* a pesar de su alta homología, lo que llevó al aislamiento y clasificación de las cepas en tres fenotipos  $\text{Mut}^+$ ,  $\text{Mut}^s$  y  $\text{Mut}^-$ . El fenotipo  $\text{Mut}^+$  (*Methanol utilization plus*) se refiere a las cepas que emplean más eficientemente el metanol como única fuente de carbono. Las cepas  $\text{Mut}^s$  (*Methanol utilization slow*) son aquellas que metabolizan el metanol a una velocidad lenta, ya que únicamente cuentan con el gen

*aox2* y por lo tanto tienen una menor velocidad de crecimiento. Las cepas Mut<sup>-</sup> (*Methanol utilization minus*) son aquellas que no pueden metabolizar el metanol debido a que carecen de ambos genes, *aox1* y *aox2* (Daly y Hearn, 2005; Li y cols., 2007).

#### 1.4.4 Vectores utilizados en *Pichia pastoris*.

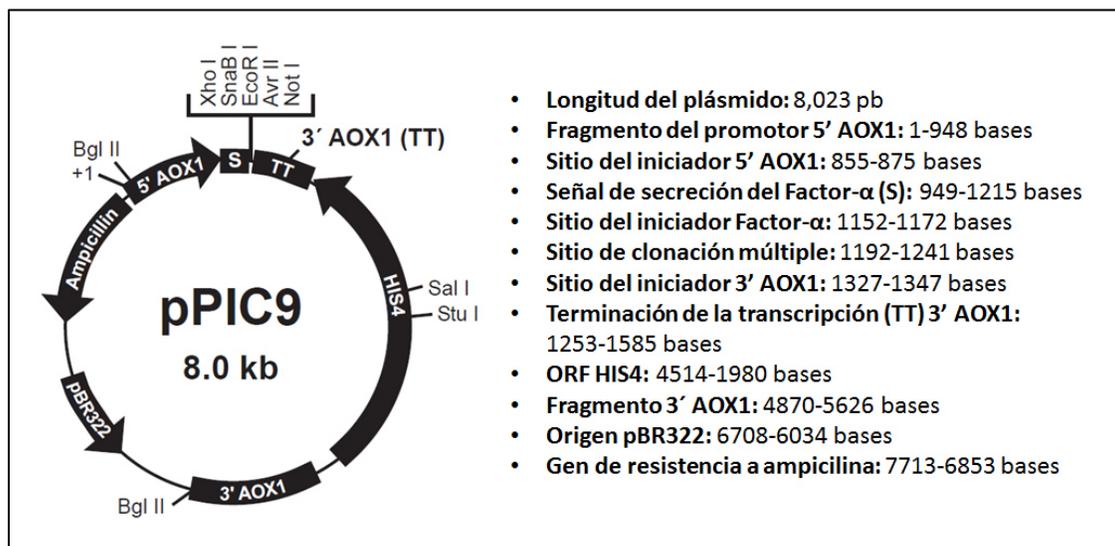
Los vectores diseñados para *Pichia pastoris* cuentan con características similares y pueden ser episomales o de integración. Poseen el promotor AOX1 seguido por un sitio de clonación múltiple que contiene diversos sitios de corte para enzimas de restricción en donde se inserta la secuencia que codifica la proteína de interés y posteriormente se encuentra la secuencia de terminación de AOX1, el cual dirige el procesamiento y poliadenilación del ARN mensajero. Además, muchos poseen el gen de selección HIS4, el cual permite la selección de las cepas mutantes transformadas. Estos vectores también poseen los elementos necesarios para su replicación en bacterias como *E. coli* (como un origen de replicación y genes de resistencia a antibióticos). El destino de la proteína puede variar según el vector (Cuadro 4), ya que algunos permiten la secreción de la proteína mientras que otros la producen de manera intracelular (Cregg y cols. 2000).

**Cuadro 4. Ejemplos de vectores de expresión para *Pichia pastoris* (Cregg y cols., 2000).**

Vector	Destino de la proteína	Marcador de selección	Características
pPIC9	Secretada	HIS4	Potencial para fusión con etiquetas de histidina. Resistencia a ampicilina para propagación en bacterias.
pPICZ $\alpha$	Secretada	Resistencia a zeocina	pAOX1 fusionado a la Señal de secreción $\alpha$ -MF prepo. Potencial para fusión con etiquetas de histidina y el epítipo <i>myc</i> .
pPICZ	Intracelular	Resistencia a zeocina	Potencial para fusión con etiquetas de histidina y el epítipo <i>myc</i>
pPIC3K	Intracelular	HIS4 y resistencia a kanamicina	Selección por G418 para cepas multicopia

#### 1.4.5 Vector de expresión pPIC9.

El vector pPIC9 es un vector de integración que consta de 8,023 pb empleado para las cepas GS115 y KM71 de *Pichia pastoris*. Este vector permite la expresión de las proteínas recombinantes así como su secreción ya que la secuencia codificante se fusiona a la señal de secreción del factor- $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*. Este vector contiene el promotor AOX1 por lo que la expresión se induce en presencia de metanol. La selección de cepas se lleva a cabo mediante el marcador HIS4 (INVITROGEN, Pichia Expression Kit, 2010). Además el vector pPIC9 contiene sitios únicos de corte con las enzimas *Xho* I, *Sna*B I, *Eco*R I, *Avr* II y *Not* I (Figura 3).



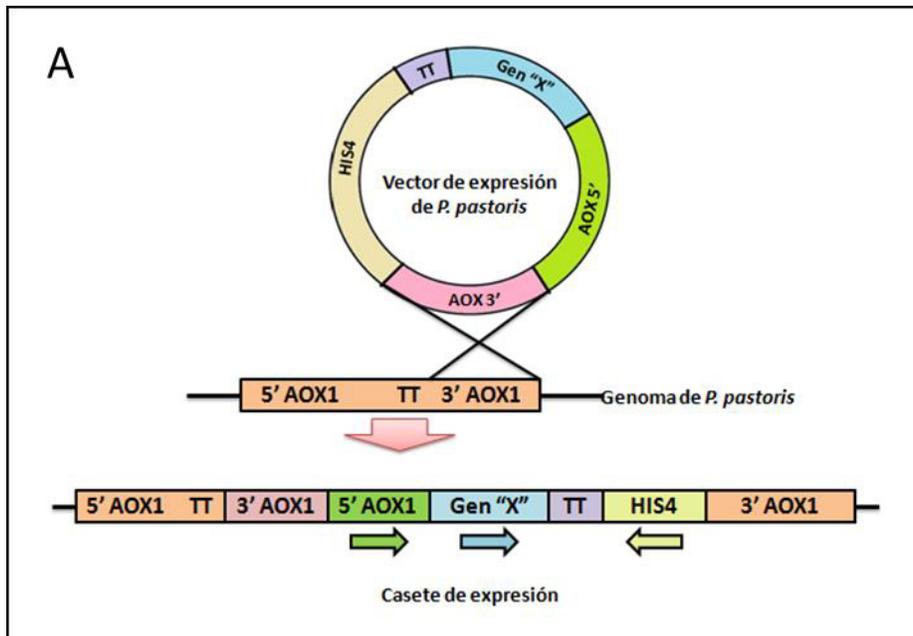
**Figura 4: Vector de expresión pPIC9.** Se detalla cada uno de los componentes del vector de expresión, así como las enzimas de restricción y el número de cortes que estas realizan dentro del mismo.

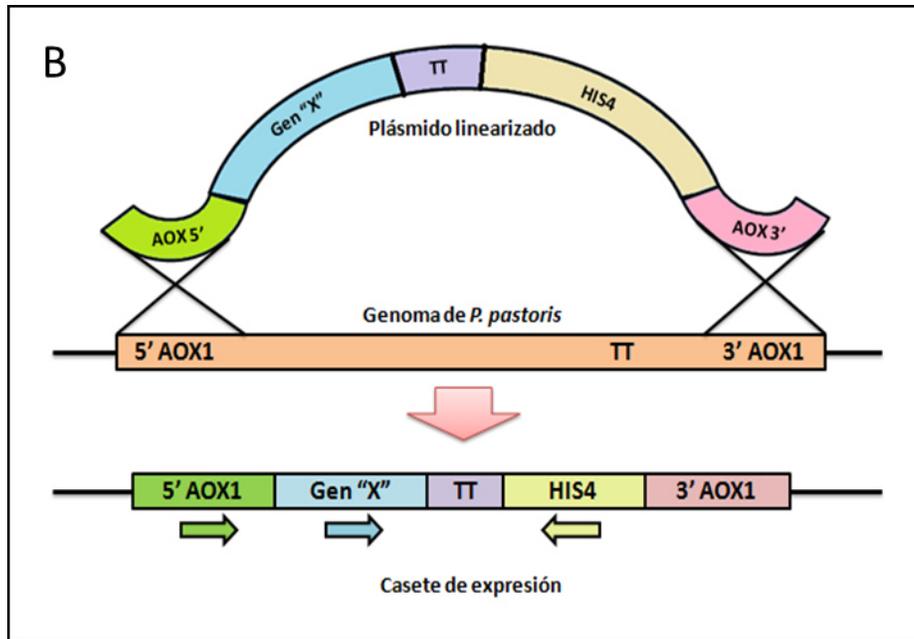
#### 1.4.6 Integración del vector pPIC9 al genoma de *Pichia pastoris*.

Existen dos posibles maneras de integrar los vectores de expresión al genoma de *P. pastoris*, ya sea por inserción génica o por reemplazamiento génico (Figuras 5A y 5B). En la primera, la integración se lleva a cabo mediante un entrecruzamiento simple en el locus AOX1 del genoma y cualquiera de las regiones de AOX1 del vector (3' AOX1, 5' AOX1, TT) o también mediante el entrecruzamiento simple entre el locus *his4* del cromosoma y el

gen HIS4 en el vector. Ya que en ambos casos el locus AOX1 se mantiene intacto los fenotipos resultantes son Mut<sup>+</sup>. En el reemplazamiento génico por su parte ocurre a través de un entrecruzamiento doble entre el promotor AOX1 del genoma y las regiones 3'AOX1 y 5'AOX del vector, lo cual resulta en una completa eliminación de la región que codifica AOX1 y por lo tanto se obtiene un fenotipo Mut<sup>S</sup> (Balamurugan y cols., 2007).

Para ser insertado en el gen AOX1 en las cepas GS115 y KM71, el vector pPIC9 puede ser linearizado con *Sac* I, lo cual genera cepas Mut<sup>+</sup> / His<sup>+</sup> en GS115 y Mut<sup>S</sup> / His<sup>+</sup> en KM71. Por otra parte, cuando el vector se desea insertar en HIS4 en cepas GS115 y KM71, el linearizado con *Sal* I o *Stu* I generará cepas Mut<sup>+</sup> / His<sup>+</sup> en GS115 y Mut<sup>S</sup> / His<sup>+</sup> en KM71 respectivamente. Finalmente, cuando se desea reemplazar el gen AOX1 de la cepa GS115 para obtener cepas Mut<sup>S</sup> / His<sup>+</sup> el linearizado del vector debe llevarse a cabo con *Bgl* II (INVITROGEN, Pichia Expression Kit,2010).





**Figura 5. A. Integración del vector por inserción génica en AOX 3'.** La integración se lleva a cabo por un entrecruzamiento simple, el cual también puede darse en *HIS4*. Al conservarse el locus *AOX1* en ambos casos las cepas resultantes son del fenotipo  $Mut^+$ . **B. Integración del vector por reemplazamiento génico.** Este se lleva a cabo por un doble entrecruzamiento entre el promotor *AOX1* del genoma y las regiones *AOX 5'* y *AOX 3'* del vector. Al perderse el locus *AOX1* se obtienen cepas de fenotipo  $Mut^S$ .

#### 1.4.7 Fermentación de *Pichia pastoris* y expresión de las proteínas recombinantes.

Tras haber logrado la transformación de las levaduras con el vector construido y haber determinado el fenotipo de utilización de metanol, se puede continuar al siguiente paso que es la producción de la proteína recombinante. Este proceso consiste en una primera etapa donde se debe generar biomasa en un medio que contenga una fuente de carbono, como glicerol o dextrosa, que reprima el promotor *AOX1* y evite la expresión heteróloga. Una vez que se ha producido suficiente biomasa la siguiente etapa es cambiar la fuente de carbono por el metanol y así iniciar la expresión del recombinante (Celik y cols., 2009). Cuando se emplean cepas  $Mut^+$  es recomendable iniciar la inducción con menor cantidad de biomasa debido a que estas pueden metabolizar el metanol de manera acelerada, mientras que para las cepas  $Mut^S$  se recomienda una mayor biomasa (INVITROGEN, *Pichia Expression Kit*, 2010).

Las condiciones de cultivo pueden variar para mejorar la producción por parte de la levadura. Entre los parámetros que pueden ajustarse se encuentra la cantidad de metanol

empleada para la inducción, así como etapas de adaptación al mismo. Zhang y cols. (2000) han desarrollado procesos en donde las levaduras pasan por una etapa de adaptación antes de la pasar a la transición de metanol, lo cual genera una mejor activación del promotor *AOX1*, ya que otros metabolitos como el acetato y el etanol son consumidos durante esta fase de adaptación (Zhang y cols., 2000).

Otros parámetros que deben tenerse en cuenta son la temperatura y el pH. La temperatura óptima de expresión para *Pichia pastoris* va de 28-30 °C, mientras que los mejores valores de pH van de 6-7 (Gonçalves y cols., 2013). Sin embargo, no se puede establecer un estándar de condiciones óptimas, ya que diversos autores han reportado que ciertas variaciones en estos parámetros han tenido efectos positivos durante la producción, por lo que cada proceso para una u otra proteína podría ser diferente.

### **1.5 Escalamiento a nivel biorreactor.**

Las condiciones de producción a nivel biorreactor son muy parecidas a las de pequeña escala. Sin embargo, se deben tener algunas consideraciones extras. Por ejemplo, cuando se trabaja con cepas de *Pichia pastoris* Mut<sup>+</sup> en un biorreactor, la oxigenación del sistema se vuelve un punto crítico, ya que estas cepas tienen un metabolismo más acelerado y al alcanzar altas densidades celulares la demanda de oxígeno se incrementa (Cos y cols., 2006). Además, las cepas Mut<sup>+</sup> requieren una mayor concentración de metanol, el cual puede tener efectos citotóxicos cuando se exceden los valores límites (4%) y por otra parte en producciones a gran escala constituyen un riesgo industrial debido a que se trata de un compuesto inflamable (Valero, 2013).

Otro aspecto que debe ser cuidadosamente monitoreado es la temperatura, ya que en bioprocesos a gran escala la temperatura tiene a incrementarse por encima de los valores óptimos, afectando así la productividad y calidad de las proteínas recombinantes (Jungo y cols., 2007). Un parámetro extra es el estrés que son sometidas las levaduras debido a condiciones de bajo pH y temperatura, así como estrés físico, lo cual puede afectar la calidad de las proteínas (Mattanovich y cols., 2004).

## **1.6 Optimización de secuencia.**

Uno de los principales problemas de expresar proteínas recombinantes es que los codones en la secuencia codificante no son los óptimos para la célula heteróloga, lo que disminuye la expresión de la proteína. Sin embargo, para solucionar este tipo de problemas se ha desarrollado la técnica de adaptación de codones, la cual consiste en modificar la secuencia recombinante eliminando codones que sean raros o de baja frecuencia de uso para la célula heteróloga. Al emplear codones con mayor frecuencia de uso se evita una disminución en la transcripción debida a una falta de las especies raras de ARN de transferencia (ARN-t) (Novy y cols., 2001).

Otro factor que puede ser mejorado con la optimización de secuencia es la reducción de islas CG, sitios desestabilizantes y de regiones ricas AT las cuales pueden conducir a una terminación prematura en levaduras (Boettner y cols., 2007).

En el caso de *Pichia pastoris*, se han reportado numerosos casos donde la expresión, calidad y funcionalidad de proteínas recombinantes de diversos orígenes ha sido mejorada mediante la optimización de codones (Bai y cols., 2011; Hu y cols., 2013).

## **1.7 Prolactina humana (hPRL).**

Como ya se mencionó, las proteínas recombinantes han tenido un gran impacto en la industria farmacéutica, ya que a partir de ellas se pueden producir biofármacos (aquellos producidos por organismos genéticamente modificados), los cuales se pueden obtener en mayor cantidad y con mayor pureza que de su fuente original (Steinberg y cols., 1998). Esto ha impulsado a la comunidad científica a identificar nuevas proteínas con propiedades terapéuticas y que puedan ser producidas a gran escala para tratar enfermedades como el cáncer.

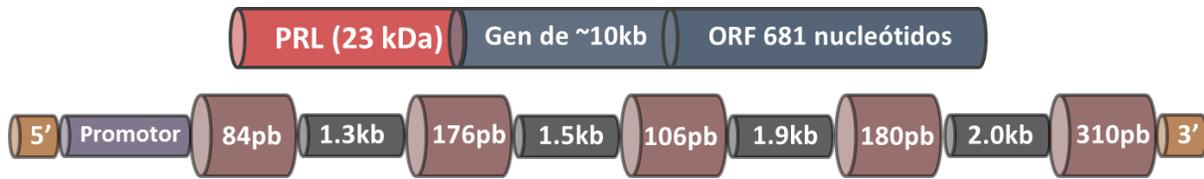
Una de estas proteínas es la prolactina (PRL), la cual en humanos tiene gran potencial para regular la angiogénesis (Galfione y cols., 2003). La prolactina es una proteína secretada principalmente por la glándula pituitaria anterior pero también por otros tejidos que puede actuar sobre tejidos distantes, por lo que participa en diferentes funciones como el desarrollo de las glándulas mamarias, actuando como hormona calciotrópica

(reguladora de los niveles de calcio en sangre y hueso), como factor de crecimiento, neurotransmisor e inmunoregulador (Muthuswamy, 2012; Haglund y cols., 2012).

El gen de la prolactina humana (hPRL) se encuentra localizado en el cromosoma 6, tiene una longitud de ~10 kpb y está compuesto por cinco exones y cuatro intrones (Figura 6) (Truong y cols., 1984). El ADNc está compuesto por 914 nucleótidos y contiene un marco de lectura abierto (ORF) de 681 nucleótidos, el cual codifica la pre-hormona de 227 aa que incluye el péptido señal de 28 aa. Por lo tanto, la hPRL madura constará de 199 aa y de un peso molecular de ~23 kDa (Bole-Feysot y cols., 1998). La molécula de hPRL está dispuesta en una sola cadena de amino ácidos con tres uniones disulfuro entre seis de sus residuos de cisteína (Cys4-Cys11; Cys58-Cys174; Cys191-Cys199). La hPRL también puede presentar variantes debido a “splicing” alternativo del transcrito primario, escisión proteolítica y otras modificaciones postraduccionales de la cadena de amino ácidos como dimerización, fosforilación y glicosilación (Freeman y cols., 2000).

Actualmente se cree que la PRL de 23 kDa además de tener una gran variedad de funciones hormonales en el organismo, también participa en procesos que favorecen el desarrollo de cáncer de mama y que posee propiedades que favorecen la angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) al estimular la liberación de factores pro-angiogénicos en linfocitos y células endoteliales (Corbacho y cols., 2000; Reuwer y cols., 2012).

Hasta la fecha, se han realizado diferentes estudios donde se busca producir prolactina recombinante. Paris y cols. (1990) lograron sintetizar la hPRL en *E. coli* mediante el plásmido recombinante pT7L, sus pruebas de bioactividad mostraron una gran similitud con la hPRL derivada de la glándula pituitaria. Por su parte, Leibovich y cols. (2001) llevaron a gran escala la producción de PRL ovina en *E. coli* obteniendo buenos resultados en la calidad del recombinante. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre producción de hPRL en levaduras, las cuales al ser organismos eucariotas podrían producir una proteína completamente funcional y con un mayor rendimiento.



**Figura 6. Gen de la prolactina de 23 kDa.** El gen tiene una longitud de aproximadamente 10 kpb con un marco de lectura abierto (ORF) de 681 nucleótidos, posee 5 exones y cuatro intrones.

### 1.7.1 Vasoinhibinas (Isoformas de la hPRL).

Se ha identificado que la hPRL de 23 kDa puede ser glicosilada, fosforilada o escindida para dar formas alternativas de la proteína. A partir de la escisión de la hPRL se pueden formar fragmentos amino-terminales de 14 a 18 kDa, los cuales son conocidos como vasoinhibinas ya que poseen actividad antiangiogénica (Ferraris y cols., 2011). La PRL de 16 kDa ha adquirido una gran importancia gracias a esta propiedad ya que tanto en estudios “in vivo” como “in vitro” ha demostrado participar en la activación de la apoptosis en células endoteliales (Clapp y cols., 1991; Struman y cols., 2000). De acuerdo a Piwnica y cols. (2004), la escisión de esta proteína in vivo podría darse gracias a la acción de la catepsina D, la cual actuaría como una proteasa en la pituitaria que corta la hPRL entre los amino ácidos 150 y 151. Sin embargo, aún no se sabe exactamente el mecanismo de escisión de la proteína.

### 1.8 Antecedentes en el laboratorio de biotecnología.

Anteriormente, en el laboratorio de biotecnología se había logrado exitosamente producir exitosamente diferentes proteínas recombinantes de la familia de las hormonas de crecimiento empleando sistemas de expresión basados en *Pichia pastoris* (Ascacio Martinez, 2004; Márquez Ipiña, 2011). Una de estas proteínas fue la prolactina humana en su forma nativa, la cual se logró producir en cultivos a nivel tubo de ensaye. Sin embargo, aún no han sido esclarecidos el efecto que podría tener la optimización de secuencia sobre esta proteína, así como el desempeño del bioproceso al migrarlo a nivel biorreactor.

## **CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN.**

La isoforma de prolactina humana de 23 kDa es de gran interés para el área biomédica por sus efectos hormonales y sobre la angiogénesis, por lo que es importante conocer los mecanismos mediante los cuales actúa. Para facilitar estos estudios, es importante proporcionar una fuente abundante de prolactina bioactiva.

Así, se propone aprovechar las plataformas biotecnológicas disponibles para diseñar un sistema de expresión eficiente a nivel de biorreactor que permita la obtención de esta proteína para su futuro estudio y posible aplicación.

## **CAPÍTULO III. OBJETIVOS.**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

- ❖ Expresar, caracterizar y escalar la producción de la isoforma de prolactina humana de 23 kDa en cepas de *Pichia pastoris* a partir de una secuencia optimizada.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

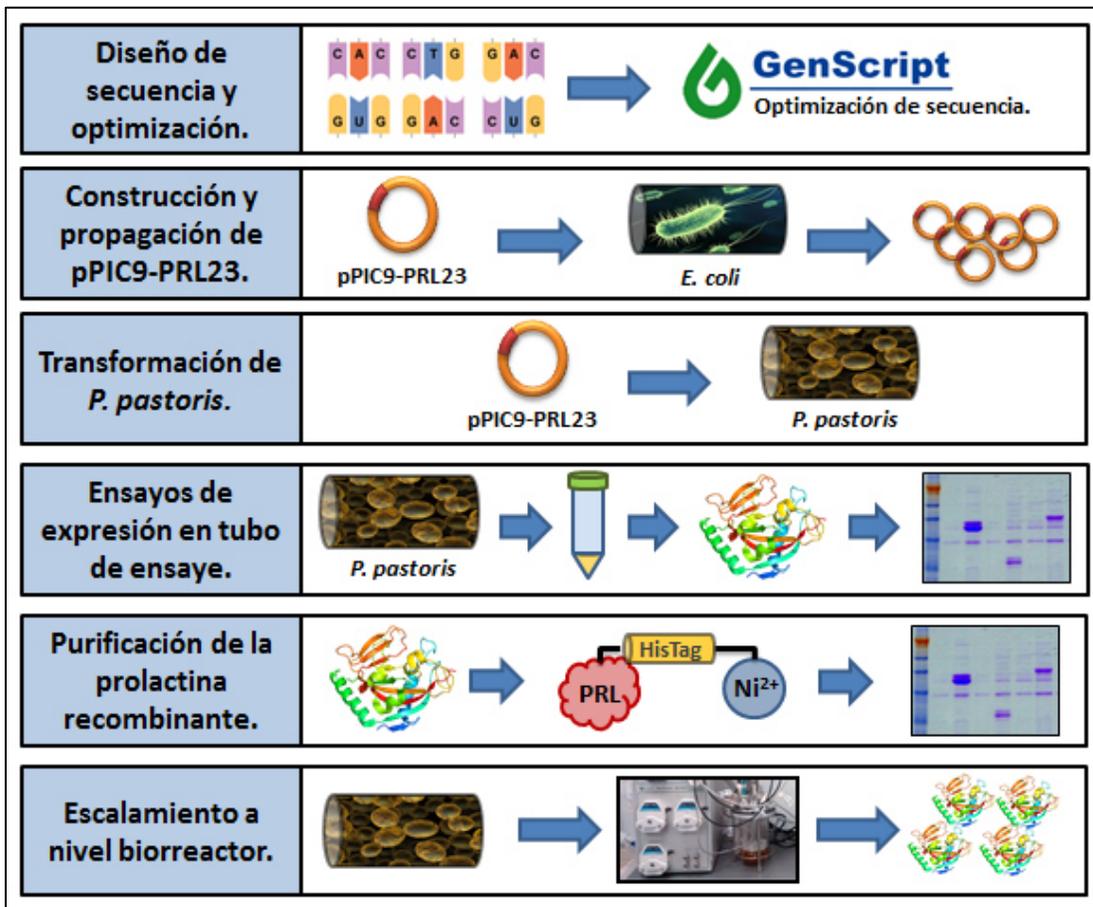
- Construir cepas de *P. pastoris* productoras de la isoforma de PRL de 23 kDa empleando una secuencia optimizada.
- Realizar ensayos de expresión a pequeña escala para seleccionar las mejores clonas productoras de *Pichia pastoris* para escalar en biorreactores de 1 litro.
- Ensayar la purificación de la PRL-HisTag recombinante mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC).

## CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 Estrategia general.

El presente trabajo fue desarrollado en base a las siguientes etapas:

1. Diseño y optimización de la secuencia codificante para prolactina humana de 23 kDa.
2. Construcción del vector pPIC9-PRL23 y propagación en *E. coli*.
3. Transformación de *Pichia pastoris* con el vector de expresión.
4. Expresión a nivel tubo de ensaye.
5. Ensayos de purificación de la prolactina humana recombinante.
6. Escalamiento de producción a nivel biorreactor de 1 litro.



**Figura 7. Esquema de la estrategia general.** La estrategia general abarca desde el diseño de la secuencia, ensayos de expresión, purificación hasta el escalamiento en biorreactor.

## **4.2 Diseño y optimización de la secuencia de la prolactina humana de 23 kDa.**

La secuencia de ADNc original que codifica para la prolactina humana de 23 kDa fue obtenida del GeneBank del NCBI con la clave de acceso “NM\_000948.5” (*Homo sapiens* prolactin, transcript variant 1, mRNA). La secuencia codificante para la forma de la prolactina madura (199 aminoácidos) abarca del nucleótido 604 al 1200, además del codón de terminación TAA. A esta secuencia se le añadió un sitio de corte para la enzima *Xho* I en el extremo 5' y un sitio de corte para la enzima *Avr* II en el extremo 3'. Además en seguida del sitio de corte para *Xho* I se incluyó la secuencia de KEX2 para remover al factor de secreción  $\alpha$ . En seguida, se incluyó una etiqueta de 6 histidinas (extremo amino terminal de la proteína codificada) y un sitio de corte para la enzima enterocinasa (EK) que permite eliminar los elementos génicos mencionados y obtener una forma nativa de la proteína.

La optimización de la secuencia se llevó a cabo mediante GeneScrip Inc., el proceso de optimización consistió en incrementar el porcentaje de codones preferenciales para *P. pastoris* y un ajuste en el contenido de citosina y guanina. La secuencia se recibió integrada en el plásmido pUC57 (pUC57-PRL23).

## **4.3 Propagación del plásmido pUC57-PRL23.**

### **4.3.1 Transformación de bacterias electrocompetentes con el plásmido pUC57-PRL23.**

Para la propagación del plásmido pUC57-PRL23 se empleó la cepa “TOP10F” de *E. coli* mediante la técnica de electroporación. Se añadió 100 ng de ADN plasmídico en alícuotas de 80 $\mu$ L de bacterias electrocompetentes (Aexo 3) y se transfirió la mezcla a celdas de electroporación frías. El pulso eléctrico se dio ajustando el electroporador con los siguientes parámetros: 200 $\Omega$ , 25 $\mu$ F y 2.5kV. Tras el pulso, se añadieron 500 $\mu$ L de medio LB (Luria-Bertani) y se transfirió la mezcla a tubos de 1.5mL y se incubaron por 30 minutos, a 37°C con una agitación de 300 rpm en termomixer (Thermomixer compact, Eppendorf). Posteriormente los tubos fueron centrifugados por 1 minuto a 4000 rpm, se desecharon 200 $\mu$ L del medio sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en el medio remanente. Dicha suspensión fue sembrada mediante dispersión con un rodillo en

placas de agar LB suplementado con ampicilina (50µg/mL) las cuales se incubaron a 37°C por 16 horas.

#### 4.3.2 Caracterización de las colonias obtenidas.

Para verificar que las bacterias transformadas portaran el vector pUC57-PRL23 se realizó la extracción plasmídica de las mismas (Anexo 3) y una posterior digestión empleando las enzimas de restricción *Xho* I y *Avr* II, las cuales liberan el fragmento de 651pb correspondiente a la PRL. Las digestiones fueron analizadas en geles de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio.

**Cuadro 5. Reacción de digestión del plásmido pUC57-PRL23 con las enzimas *Xho* I y *Avr* II.** Se ajustó la concentración de los reactivos para un volumen final de 10 µL. La digestión se incubó a 37°C por 5 horas.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
pUC57-PRL	300 ng/µL	150 ng/µL
Amortiguador CutSmart	10x	1x
BSA	10x	1x
<i>Xho</i> I	20,000 u/mL	2 u/µL
<i>Avr</i> II	5,000 u/mL	0.5 u/µL
Agua libre de nucleasas	---	---

#### 4.4 Construcción del vector de expresión pPIC9-PRL23.

##### 4.4.1 Digestión y purificación del vector e inserto.

Tanto la secuencia codificante de PRL23 como el vector pPIC9 fueron digeridos con las enzimas *Xho* I y *Avr* II, para generar extremos cohesivos. Posteriormente, ambos fueron purificados mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA, WI, EUA).

**Cuadro 6. Reacciones de digestión para el vector e inserto.** Ambas reacciones de digestión se ajustaron a un volumen de 30  $\mu$ L y se incubaron a 37°C por 5 horas.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
pPIC9	300 ng/ $\mu$ L	150 ng/ $\mu$ L	Secuencia PRL23-OPT	300 ng/ $\mu$ L	150 ng/ $\mu$ L
Amortiguador CutSmart	10x	1x	Amortiguador CutSmart	10x	1x
BSA	10x	1x	BSA	10x	1x
<i>Xho</i> I	20,000 u/mL	2 u/ $\mu$ L	<i>Xho</i> I	20,000 u/mL	2 u/ $\mu$ L
<i>Avr</i> II	5,000 u/mL	0.5 u/ $\mu$ L	<i>Avr</i> II	5,000 u/mL	0.5 u/ $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	---	---	Agua libre de nucleasas	---	---

#### 4.4.2 Reacción de ligación de la secuencia PRL23-OPT y el vector pPIC9.

La ligación se realizó empleando la ligasa Quick-Stick Ligase de BIOLINE (Londres, Reino Unido). La proporción vector-inserto fue de 1:3. La reacción de ligación se llevó a cabo a temperatura ambiente por un periodo de 15 minutos, mezclando el mix cada 5 minutos. Una vez realizada la ligación se tomaron 5  $\mu$ L y se realizó la transformación de las bacterias electrocompetentes como se describió anteriormente. Se incluyeron un control negativo (agua) y un control positivo (pPIC9 vacío).

**Cuadro 7. Reacción de ligación entre el vector pPIC9 y el inserto PRL23.** Se ajustó la reacción a un volumen de 20  $\mu$ L según el protocolo del fabricante y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos.

Reactivo	Concentración final
pPIC9	25 ng
Secuencia PRL23 optimizada	75 ng
Ligasa Quick-Stick	1000 u/ $\mu$ L
“Quick-Stick Buffer”	1x
Agua libre de nucleasas	---

#### 4.4.3 Caracterización de las bacterias transformadas con el vector pPIC9-PRL23 mediante PCR.

Las colonias de transformantes fueron reinoculadas en tubos de ensaye con 4 mL de medio LB líquido para realizar extracción plasmídica y proceder a la caracterización por PCR (Termociclador 110V THERM-1000-1, Axygen). Se utilizaron iniciadores que flanquean la secuencia del promotor AOX1. La amplificación de aproximadamente 1,100pb corresponde al vector pPIC9-PRL23, mientras que un amplicón de 492pb corresponde al casete vacío pPIC9. Se incluyeron controles de amplificación. La reacción de PCR fue realizada empleando un master mix comercial (GoTaq Colorless Master Mix, PROMEGA).

**Cuadro 8. Reacción de PCR y programa para caracterización por el promotor de AOX1.** Se llevó a cabo la PCR con los iniciadores para el promotor aox1 del ADN genómico de *P. pastoris* para caracterizar el vector según la longitud del amplicón. Se ajustó el volumen de la PCR a 10 µL.

Reactivo	Concentración final	Programa de amplificación			
		Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	
pPIC9-PRL23-OPT	20 ng/µL	1	Desnaturalización inicial	96	5
Master mix	5 µL (1x)	2	Desnaturalización	94	1
Iniciador 5' AOX1	5µM	3	Alineamiento	55	1
Iniciador 3' AOX1	5µM	4	Extensión	72	1
Agua libre de nucleasas	---	5	Extensión final	72	5
Se repitieron 30 ciclos de los pasos 2 al 4					

Además, para confirmar la presencia de la secuencia codificante de prolactina, se realizó una PCR empleando un juego de iniciadores que hibridan directamente sobre la secuencia de la prolactina (iniciadores PRL16) y amplifican de manera semi-anidada la secuencia correspondiente a la prolactina de 16 kDa amplificando hasta el codón 147 (Sentido: 5' AGACTCGAGAAAAGACAC 3' / Antisentido: 5' GGACCTAGGTTAATAGATCTCGTTT 3').

**Cuadro 9. Reacción de PCR y programa de amplificación para caracterización por amplificación interna.** Para comprobar la integración de la secuencia al vector se emplearon iniciadores que hibridan directamente sobre el gen de la PRL23-OPT. Se ajustó el volumen de la PCR a 10  $\mu$ L.

Reactivo	Concentración final	Programa de amplificación			
		Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	
pPIC9-PRL23-OPT	20 ng/ $\mu$ L	1	Desnaturalización inicial	96	5
Master mix	5 $\mu$ L (1x)	2	Desnaturalización	94	1
Iniciador 5' PRL16	5 $\mu$ M	3	Alineamiento	52	1
Iniciador 3' PRL16	5 $\mu$ M	4	Extensión	72	1
Agua libre de nucleasas	---	5	Extensión final	72	5
Se repitieron 30 ciclos de los pasos 2 al 4					

Por otra parte, la construcción también fue caracterizada mediante el uso de enzimas de restricción. Se emplearon las enzimas *Xho* I y *Avr* II para liberar el fragmento de 651 pb correspondientes a la prolactina. Posteriormente, el fragmento de PRL23 fue también digerido para verificar su secuencia. Se utilizó el servidor de NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) para identificar enzimas con sitios de corte único en la secuencia de PRL23. Se decidió utilizar las enzimas *Btg* I y *Nco* I, las cuales tienen el mismo sitio de corte en la posición nucleotídica 180 (5'-3').

**Cuadro 10. Reacciones de digestión enzimática para la caracterización del vector pPIC9-PRL23.** Se liberó la secuencia de PRL23-OPT del plásmido pPIC9-PRL23 mediante la digestión con *Xho* I y *Avr* II y a su vez la secuencia fue digerida con *Btg* I y *Nco* I.

Reactivo	Concentración final	Reactivo	Concentración final	Reactivo	Concentración final
pPIC9-PRL23	150 ng/ $\mu$ L	Secuencia PRL23-OPT	150 ng/ $\mu$ L	Secuencia PRL23-OPT	150 ng/ $\mu$ L
Amortiguador CutSmart	1x	Amortiguador CutSmart	1x	Amortiguador CutSmart	1x
BSA	1x	BSA	1x	BSA	1x
<i>Xho</i> I	2 u/ $\mu$ L	<i>Btg</i> I	1 u/ $\mu$ L	<i>Nco</i> I	1 u/ $\mu$ L
<i>Avr</i> II	0.5 u/ $\mu$ L	Agua libre de nucleasas	---	Agua libre de nucleasas	---
Agua libre de nucleasas	---				

#### 4.5 Linearizado del vector de expresión y transformación de la levadura.

Una vez que se caracterizó el vector de expresión pPIC9-PRL23 se procedió a linearizarlo mediante la digestión por 8 horas con la enzima *Sac I*. Al finalizar el periodo de digestión se tomaron 2  $\mu\text{L}$  y se analizaron mediante geles de agarosa al 1%.

**Cuadro 11. Linearizado del vector pPIC9-PRL23 con *Sac I*.** El vector de expresión construido fue linearizado con la enzima *Sac I*. La digestión se incubó a 37° por 5 horas.

Reactivo	Concentración final
pPIC9-PR23	150 ng/ $\mu\text{L}$
Amortiguador CutSmart	1x
BSA	1x
<i>Sac I</i>	2 u/ $\mu\text{L}$
Agua libre de nucleasas	---

Para la transformación se añadieron 5  $\mu\text{g}$  de plásmido linearizado a alícuotas de 80  $\mu\text{L}$  de levaduras electrocompetentes de la cepa GS115 de *P. pastoris*. También se incluyó un control negativo (transformación con agua) y un control positivo (pPIC9 vacío). Los parámetros de electroporación fueron: 400  $\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$  y 1.5k V. Tras el pulso, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de sorbitol 1M frío y se transfirió la mezcla a tubos de 1.5 mL y se incubaron por 30 minutos, a 30°C con una agitación de 700 rpm en termomixer (Thermomixer compact, Eppendorf). Posteriormente los tubos fueron centrifugados por 1 minuto a 4000 rpm, se desecharon 200  $\mu\text{L}$  del medio sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en el medio remanente. Dicha suspensión fue sembrada mediante dispersión con un rodillo en placas de agar MD (Minimal Dextrose) las cuales se incubaron a 30°C por 3 a 4 días.

#### 4.6 Caracterización de las levaduras transformadas.

Las colonias obtenidas en el medio selectivo MD fueron inoculadas en 4 mL medio YPD e incubadas por 24 horas a 30°C con una agitación de 200 rpm. Posteriormente se realizó una extracción de ADN genómico mediante la técnica de TSNT (Anexo 3) y el ADN se empleó para la caracterización por PCR.

#### 4.6.1 Caracterización por PCR empleando indicadores para AOX1.

Se utilizaron los iniciadores del promotor AOX1 para determinar que colonias habían integrado el vector pPIC9-PRL a su genoma. Además, mediante este análisis se pudo conocer el fenotipo de utilización de metanol para cada colonia. Una patrón de banda alrededor de 2.2 kpb seguida de una banda de 1 kpb representa el fenotipo Mut<sup>+</sup>; una sola banda de 1 kpb corresponde a las levaduras Mut<sup>S</sup>, mientras que una banda única de aproximadamente 500 pb corresponde a aquellas transformadas con el vector vacío pPIC9.

**Cuadro 12. Reacción y condiciones de PCR con los iniciadores de AOX1.**

Reactivo	Concentración final	Programa de amplificación			
			Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
pPIC9-PRL23-OPT	20 ng/μL	1	Desnaturalización inicial	96	5
Master mix	5 μL (1x)	2	Desnaturalización	94	1
Iniciador 5' AOX1	5 μM	3	Alineamiento	55	1
Iniciador 3' AOX1	5 μM	4	Extensión	72	1
Agua libre de nucleasas	---	5	Extensión final	72	5
Se repitieron 30 ciclos de los pasos 2 al 4					

#### 4.7 Ensayos de expresión a nivel tubo de ensayo de 50mL.

##### 4.7.1 Inducción de la producción de prolactina en *P. pastoris*.

Para la realización de estos ensayos se prepararon tubos tipo de ensayo de 50 mL con 10 mL de medio YPD estéril. Los tubos fueron inoculados con las colonias seleccionadas e incubados por 24 horas a 30°C con una agitación de 200 rpm. Una vez que se produjo suficiente biomasa, el cultivo fue centrifugado por 5 minutos a 4000 rpm. Se decantó el medio y se lavó la pastilla celular con 10mL de agua destilada estéril y fría. Se repitió el proceso y posteriormente la pastilla fue resuspendida en 10 mL de medio BMMY con 0.5 de metanol (Buffered Methanol-Complex Medium) y se incubaron los tubos por 72 horas a 30°C con una agitación de 200 rpm añadiendo el 1% de metanol cada 12 horas.

#### **4.7.2 Diálisis del medio de inducción.**

Al finalizar el periodo de inducción se recuperó el medio de cultivo por centrifugación (5 min. / 4000 rpm) y se desechó la pastilla celular. El medio fue dializado en membranas de un corte de poro de 12-14 kDa y un diámetro de 140mm (Spectra/Por® Membrane Dialysis). La diálisis se llevó a cabo con agua destilada fría y agitación por 24 horas, cambiando el agua cada 2, 4 y 8 horas. El medio dializado fue almacenado a -20 °C hasta su análisis proteico.

#### **4.7.3 Análisis de las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).**

Mediante la técnica de metanol-cloroformo (Anexo 3) se precipitaron las proteínas contenidas en 500 µL de medio dializado. Las proteínas fueron resuspendidas en 20 µL de amortiguador de carga de proteínas y desnaturalizadas por 12 minutos a 95°C. Posteriormente las muestras fueron corridas en geles de poliacrilamida al 12% en una cámara de electroforesis a 80v por aproximadamente 2 horas (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, BIORAD; CA, EUA). Los geles fueron teñidos por 12 horas con azul de Coomassie G250 y desteñidos con una solución de metanol (50%) y ácido acético (10%).

#### **4.7.4 Análisis Western blot (detección de etiqueta de histidinas).**

Para el análisis por western blot (ANEXO) se corrieron dos geles gemelos de SDS-PAGE con las proteínas dializadas. Uno fue teñido con azul de Coomassie mientras que el otro fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. Se empleó un anticuerpo primario de ratón anti-HisTag y un anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa (*Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.*). El gel fue revelado mediante una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en presencia de peróxido (HRP Color Development Reagent, BIORAD).

#### **4.7.5 Cuantificación de proteínas.**

Para la cuantificación de proteínas se empleó la técnica de Bradford empleando un reactivo de Bradford comercial (Sigma-Aldrich B6916) y estándares de albumina sérica bovina (BSA) que van desde 0 a 1 mg. Las lecturas se realizaron a 595nm en celdillas añadiendo 750  $\mu$ L de reactivo de Bradford y 25  $\mu$ L de muestra. Se realizó una curva de calibración con los valores obtenidos (absorbancia contra concentración de BSA) en la cual se interpolaron los valores obtenidos de las muestras analizadas.

#### **4.7.6 Análisis por densitometría.**

Este análisis se realizó mediante el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Mediante este software se obtuvieron los densitogramas de las muestras cuantificadas y se pudo estimar el porcentaje y concentración de la prolactina total de en las muestras (Abramoff, 2004).

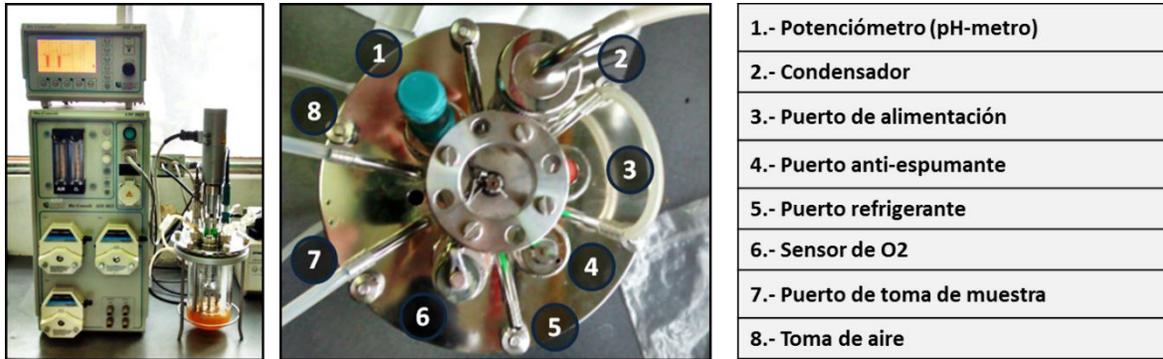
#### **4.8 Purificación mediante la técnica de IMAC.**

Se utilizó la resina Ni Sepharose 6 Fast Flow de General Electric Healthcare para la purificación de la prolactina recombinante. Se prepararon las siguientes soluciones: Solución de resuspensión (Tris 10mM, NaHPO<sub>4</sub> 100mM, Urea 8M, pH 8), solución de lavado (Tris 10 mM, NaHPO<sub>4</sub> 100 mM, Urea 8M, pH 6.3) y una solución de elución (Tris 10 mM, NaHPO<sub>4</sub> 100 mM, Urea 8M, pH 4), además de una solución 300 mM de imidazol. Se precipitaron las proteínas en 1 mL de medio dializado y se resuspendieron en 400  $\mu$ L de solución pH 8. De estos se tomaron 200  $\mu$ L y se almacenaron como la fracción "F" (proteínas totales), los otros 200  $\mu$ L fueron transferidos a un tubo de 1.5 mL incubados con 50  $\mu$ L de resina de níquel por 30 minutos y con agitación constante. Después de la incubación se centrifugó la mezcla 10 segundos a 13,000 rpm, el sobrenadante fue almacenado como fracción "0" (proteínas no unidas a la resina). Posteriormente se realizaron dos lavados con solución pH 6.3 y se almacenaron los sobrenadantes como fracción "L". Para liberar la proteína recombinante se realizaron eluciones con solución pH 4. Al final se realizó una elución más con la solución 300 mM de imidazol. Las proteínas

en cada fracción fueron precipitadas y analizadas mediante SDS-PAGE y por el densitometría (ImageJ).

#### **4.9 Escalamiento en biorreactor.**

Para el escalamiento se emplearon biorreactores de 1 litro marca APPLIKON (Schiedam, Países Bajos) y consolas modelo BioBundles ADI1025 (Figura 8). El biorreactor fue preparado con 250 mL de medio BMMY y armado en esterilidad. Además, se le añadieron 100 µL de antiespumante (Antifoam, Sigma-Aldrich) y se le incorporó un sistema de aireación constante. La preparación de la semilla se llevó a cabo de la siguiente manera. Se inoculó la cepa productora de prolactina en 20mL de medio YPD y se incubó a 30°C con una agitación de 200 rpm por 24 horas. La pastilla fue lavada dos veces con 25 mL de agua destilada estéril y fría. La pastilla celular fue resuspendida en 10mL de agua estéril fría y se adicionó al biorreactor en condiciones de esterilidad. La inducción se llevó a cabo durante 72 horas, tomando muestras del medio a las 0, 24, 36, 48, 60 y 72 horas. Se mantuvo la temperatura entre 23-30°C y el nivel de oxígeno disuelto en el medio superior al 20%. La agitación inicial fue de 200 rpm y se incrementó conforme la producción de biomasa. Al finalizar el periodo de inducción se separó el medio de cultivo por centrifugación y se dializó al igual que las muestras tomadas. Las proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot. Además se cuantificó la proteína y se realizó el densitograma correspondiente para determinar la concentración de prolactina recombinante total.



**Figura 8. Componentes del biorreactor.** Mediante estos elementos se pueden monitorear los parámetros críticos para la fermentación como el pH, temperatura, oxígeno disuelto y revoluciones por minuto.

## CAPÍTULO V. RESULTADOS.

### 5.1 Diseño de la secuencia optimizada.

#### 5.1.1 Obtención de la secuencia codificante para la prolactina de 23 kDa (PRL23).

La secuencia codificante para la prolactina humana se obtuvo del Gene Bank del NCBI con la clave NM\_000948.5 (*Homo sapiens* prolactin (PRL), transcript variant 1, mRNA). A la secuencia codificante completa (227 aminoácidos) se le retiraron los primeros 28 codones correspondientes al péptido señal, dejando así sólo aquellos codones que codifican la forma madura de la prolactina de 199 aminoácidos y el codón de terminación "TAA" (Figura 9).

```
» (ATGAACATCAAAGGATCGCCATGGAAAGGGTCCCTCCTGCTGCTGCTGGTGTCAAACCTGCTCCTGTGCCA
GAGCGTGGCCCC) TTGCCCATCTGTCCCGGGGGGCTGCCCGATGCCAGGTGACCCTTCGAGACCTGTTTGA
CCGCGCCGTCGTCCTGTCCACTACATCCATAACCTCTCCTCAGAAATGTTTCAGCGAATTCGATAAACGGTAT
ACCCATGGCCGGGGGTTTATTACCAAGGCCATCAACAGCTGCCACACTTCTTCCCTTGCCACCCCGAAGACA
AGGAGCAAGCCCAACAGATGAATCAAAAAGACTTTCTGAGCCTGATAGTCAGCATATTGCGATCCTGGAATGA
GCCTCTGTATCATCTGGTCACGGAAGTACGTGGTATGCAAGAAGCCCCGGAGGCTATCCTATCCAAAGCTGTA
GAGATTGAGGAGCAAACCAACGGCTTCTAGAGGGCATGGAGCTGATAGTCAGCCAGGTTTCATCCTGAAACCA
AAGAAAATGAGATCTACCCTGTCTGGTCGGGACTTCCATCCCTGCAGATGGCTGATGAAGAGTCTCGCCTTTC
TGCTTATTATAACCTGCTCCACTGCCTACGCAGGGATTACATAAAAATCGACAATTATCTCAAGCTCCTGAAG
TGCCGAATCATCCACAACAACAACACTGC (TAA) *
```

Péptido señal: (»)  
Secuencia hPRL: (   )  
Codón de terminación: (\*)

**Figura 9. Secuencia de la PRL de 23 kDa.** Secuencia de la PRL donde se eliminó el péptido señal dejando únicamente la secuencia que codifica la forma madura de la proteína.

#### 5.1.2 Adición de elementos génicos.

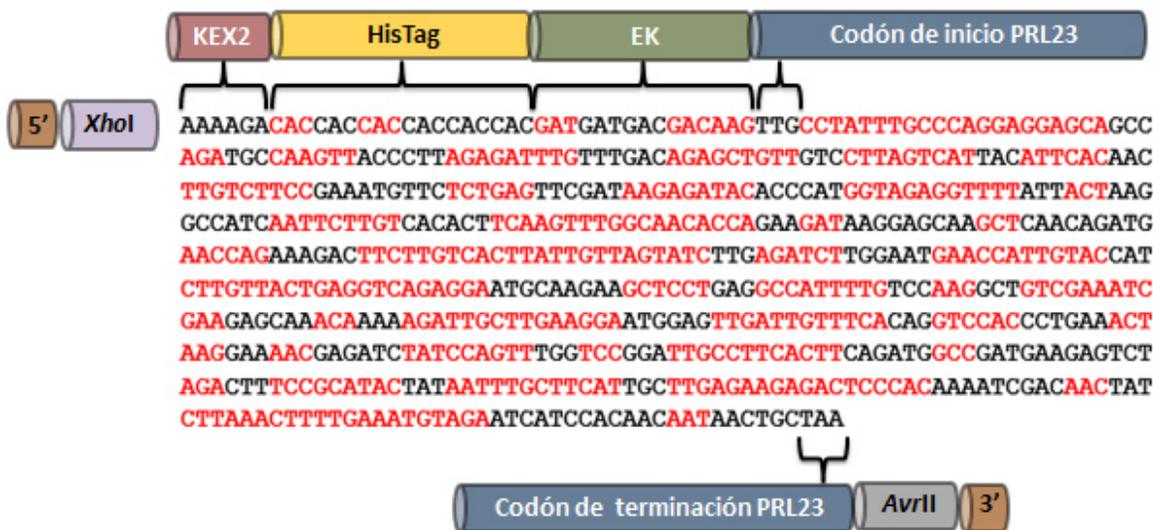
Posteriormente, a la secuencia codificante se le añadieron los elementos génicos que permiten su manipulación, así como una etiqueta de histidinas. El diseño final consta de 651 pb, los elementos génicos añadidos se muestran en la figura 10.



**Figura 10. Elementos génicos añadidos a la secuencia de la PRL.** Se añadieron sitios de corte que flanquean la secuencia (Xho I y Avr II), además de una etiqueta de histidinas (HisTag), la secuencia KEX2 (sitio de corte para liberar el péptido señal) y un sitio de corte para la enterocinasa (EK).

### 5.1.3 Optimización de la secuencia diseñada.

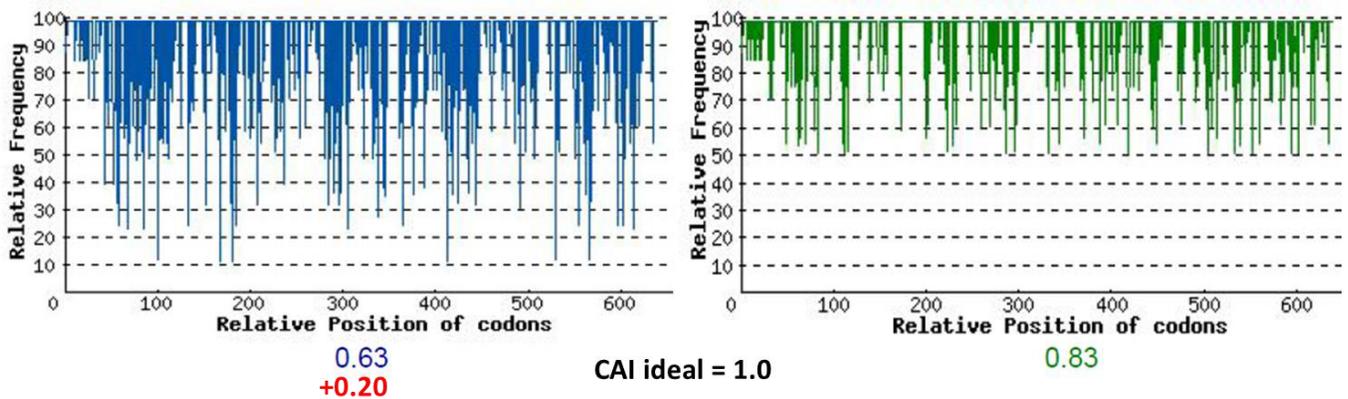
Una vez se definió el diseño de la secuencia, ésta fue optimizada y sintetizada mediante el servicio de la compañía GeneScrip USA, Inc. La optimización de la secuencia permitió incrementar el uso de codones preferenciales para *Pichia pastoris*, así como reducir aquellos codones poco frecuentes que pudieran afectar la transcripción de la prolactina (Figura 11).



**Figura 11. Secuencia final optimizada.** La longitud final de la secuencia fue de 651 pb. En rojo están indicados los codones sustituidos por aquellos preferenciales para *Pichia pastoris*.

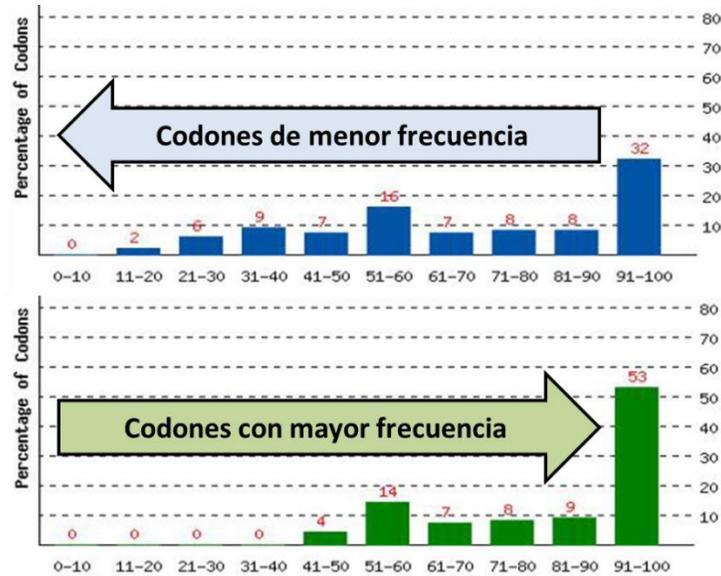
El índice de adaptación de codones (CAI por sus siglas en inglés), es una medida que permite medir la tendencia de uso de los codones en cada organismo (Carbone y cols., 2003), permitiendo seleccionar aquellos codones que pueda utilizar más fácilmente la célula hospedera durante la expresión de secuencias de otros organismos. Se ha establecido que el valor óptimo de CAI es de 1.0, mientras que aquellos con un valor cercano a 0.8 son considerados buenos.

En la figura 12 se muestra como la el CAI de nuestra secuencia de PRL23 mejora de 0.63 a 0.83 mediante la sustitución de codones con una mayor frecuencia de uso relativa en *Pichia pastoris*.



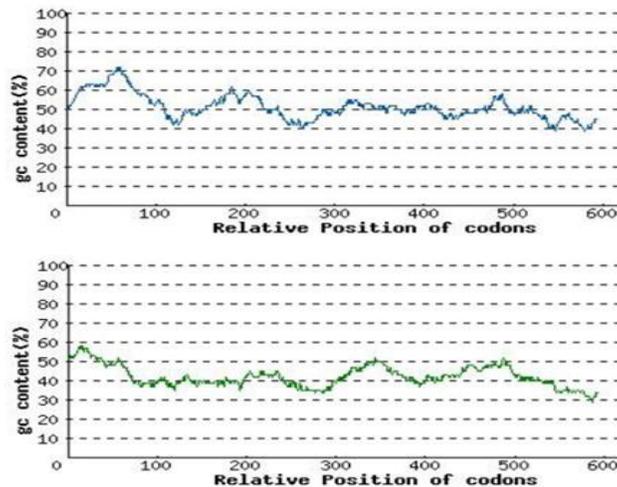
**Figura 12. Índice de adaptación de codones (CAI).** En la gráfica de la izquierda (azul) se muestran los valores de frecuencia de uso relativa (eje Y) para los codones de la secuencia no optimizada de PRL23 en *Pichia pastoris*, así como un valor de CAI = 0.63. Mientras que en la gráfica de la derecha (verde), se muestran los valores para la secuencia optimizada, donde la frecuencia de uso se desplaza hacia valores mayores y el CAI incrementa hasta 0.83.

Además, el análisis de GeneScrip da rangos de valores de 0 a 100 que representan las frecuencias óptimas de codones; es decir, aquellos con los que la transcripción se puede realizar con mayor eficiencia en la célula hospedera (Sharp y Wen-Hsiung, 1987) (Figura 13).



**Figura 13. Frecuencia óptima de codones (FOC).** En la gráfica superior (azul) se observa que los codones están distribuidos en intervalos de frecuencia menores (eje X) donde solo el 32% de los codones están en el intervalo óptimo (91-100). Mientras que en la gráfica de inferior (verde) los codones se desplazan a rangos de frecuencias mayores, obteniendo un 53% de los codones el intervalo de mayor valor (91-100).

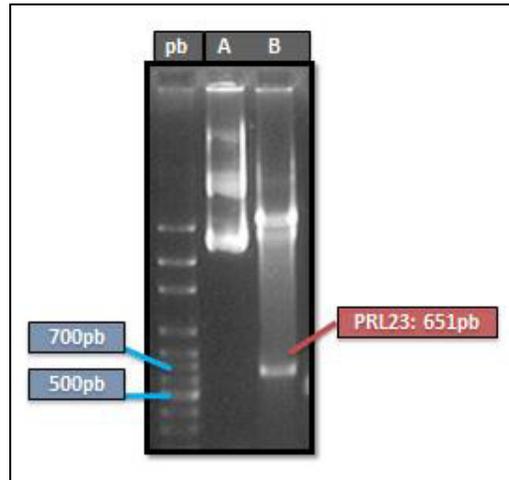
Otro aspecto mejorado durante la optimización de la secuencia codificante fue la reducción del contenido de citosina y guanina (Gráfica 3), ya que altos contenidos pueden afectar la calidad del ARNm (Boettner y cols., 2007).



**Figura 14. Ajuste del contenido de CG.** La gráfica superior muestra el contenido de CG previo a la optimización de secuencia, los valores rondaban cerca del 70% el cual es el límite recomendado. La gráfica inferior muestra como el contenido de CG fue ajustado hasta un intervalo de 30-60%.

## 5.2 Caracterización de la secuencia optimizada.

La secuencia optimizada fue recibida en el plásmido pUC57-PRL23 (3.3 kb) por lo que para liberar la secuencia se realizó la digestión con las enzimas *Xho* I y *Avr* II, cuyos sitios de corte flanquean la secuencia (Figura 12).

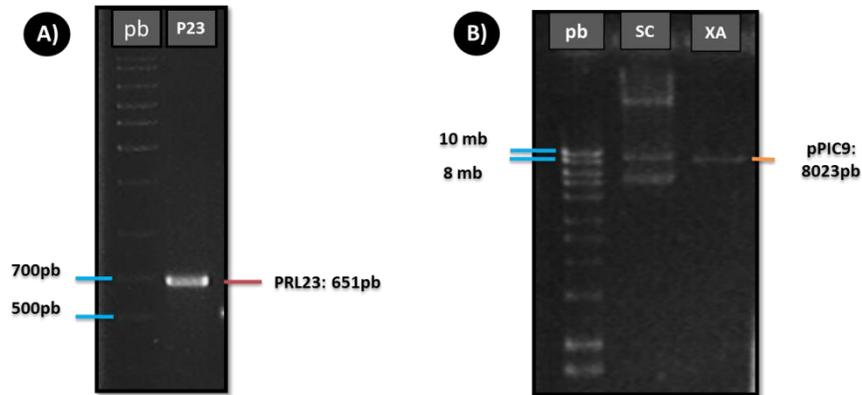


**Figura 15. Liberación del fragmento de PRL23.** pb) Marcador de pares de base, A) pUC57-PRL23 sin digerir (3.3 kb), B) Digestión del plásmido con las enzimas *Xho* I y *Avr* II. El fragmento liberado corresponde a la longitud de pares de bases de la secuencia codificante para PRL23. Gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio.

## 5.3 Ligación de la secuencia PRL23 con el plásmido pPIC9 y transformación en *E. coli*.

El plásmido pUC57-PRL3 fue propagado en *E. coli* (TOP10F). Se realizó una extracción de ADN plasmídico de cultivos de bacterias transformadas y se procedió a liberar el fragmento de 651pb mediante digestión enzimática. Posteriormente el fragmento fue purificado mediante el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA) y fue almacenado a -80 °C. El plásmido pPIC9, también fue propagado, doblemente digerido con las enzimas *Xho* I y *Avr* II y purificado de la misma manera (Figuras 13 A y 13 B).

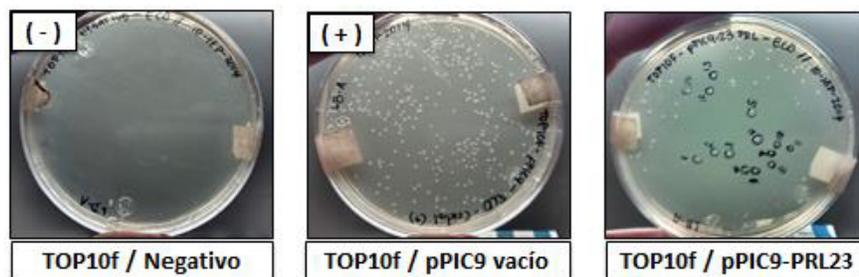
Posteriormente, el inserto de 651 pb de bases se ligó al plásmido pPIC9 para formar el vector de expresión pPIC9-PRL23.



**Figuras 16 A y 16 B. Preparación del inserto y plásmido para ligación.** Figura A: **pb)** marcador de pares de bases, **P23)** Secuencia de PR23 digerida y purificada. Figura B: **pb)** marcador de pares de bases, **SC)** Plásmido pPIC9 sin digerir, **XA)** Plásmido pPIC9 digerido y purificado. Gel de agarosa al 1 y 3 % respectivamente con tinción de bromuro de etidio.

### 5.3.1 Transformación de bacterias electrocompetentes.

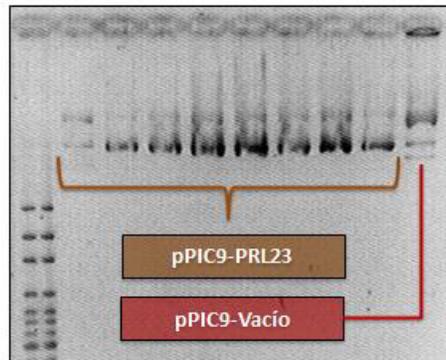
Inmediatamente después de la ligación se llevó a cabo la transformación de las bacterias electrocompetentes. Se añadieron controles negativos y positivos (pPIC9 vacío) a la transformación. Las colonias transformadas fueron sembradas en medio LB-Ampicilina para la selección de las transformantes (Figura 14).



**Figura 17. Colonias de transformantes de TOP10F.** Se muestra el control negativo (-) donde no crecen colonias debido a que no poseen resistencia a ampicilina conferida por el vector pPIC9. El control positivo (+) contiene colonias que aceptaron el vector vacío pPIC9 y determinan la eficiencia de las bacterias electrocompetentes. Por último se muestran las colonias que contienen el vector pPIC9-PRL23.

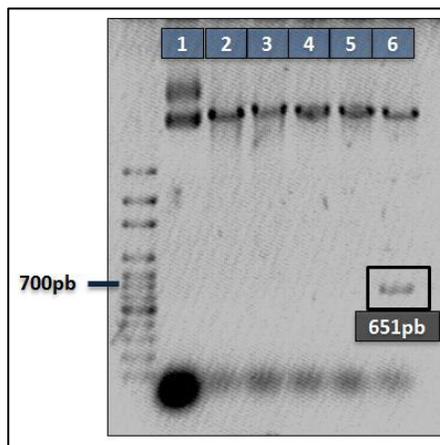
### 5.3.2 Caracterización del vector de expresión pPIC9-PRL23.

Una vez seleccionadas aquellas clonas que poseen el vector pPIC9-PRL23, fueron inoculadas para propagar el plásmido y realizar extracción plasmídica (Figura 15).



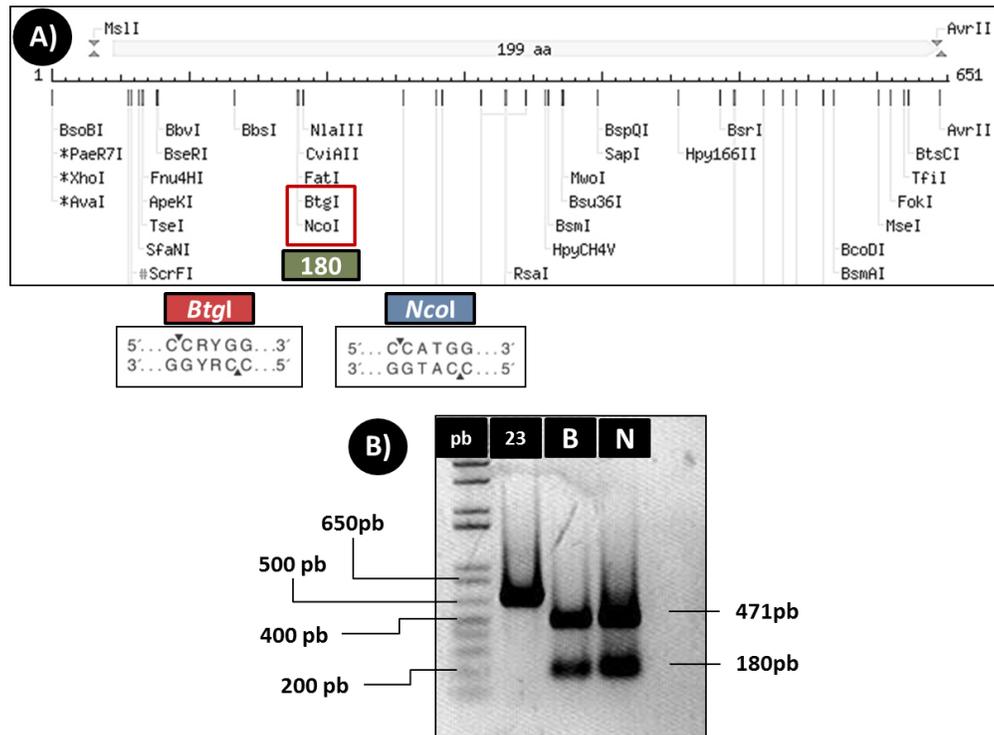
**Figura 18. ADN plasmídico de las transformantes de TOP10F.** Se observa un cambio en el patrón de retraso en pPIC9-PRL23 comparado con el plásmido pPIC9 vacío Gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio.

La digestión enzimática también fue otra manera de comprobar que el vector construido portara la secuencia de PRL23. El ADN plasmídico extraído de las transformantes fue digerido con las enzimas Xho I y Avr II, las cuales permiten la liberación de la secuencia de interés (Figura16).



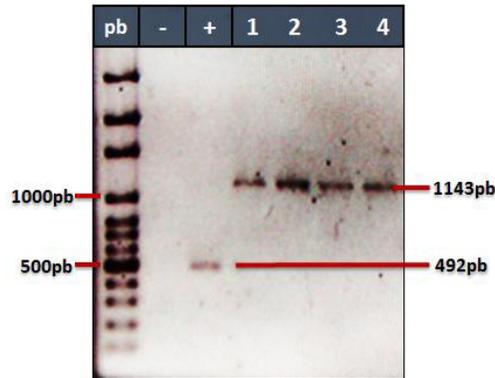
**Figura 19. Digestión enzimática de pPIC9-PRL23.** 1) pPIC9-PRL23 sin digerir, 2 y 3) Linearizado de pPIC9 con la enzima Sac I, 4) Linearizado de pPIC9-PRL23 con Xho I, 5) Linearizado de pPIC9-PRL23 con Avr II, 6) Liberación del fragmento de 651 pb correspondiente a la secuencia de PRL23. Gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio.

Además, se buscaron sitios de corte mediante el software NEBCutter para caracterizar internamente la secuencia de interés. Las enzimas seleccionadas fueron *Btg* I y *Nco* I, ambas cortando a la altura del nucleótido 180 de la secuencia, generando un fragmento de 180 pb y otro de 471 pb (Figura 17).



**Figura 20. Caracterización enzimática de la secuencia pPIC9-PRL23. Figura A).** Selección de las enzimas de corte único mediante NEBCutter (*Btg* I y *Nco* I) **Figura B).** **pb)** Marcador de pares de bases, **23)** pPIC9-PRL23 sin digerir, **B)** pPIC9-PRL23 digerido con *Btg* I, **N)** pPIC9-PRL23 digerido con *Nco* I. Gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio.

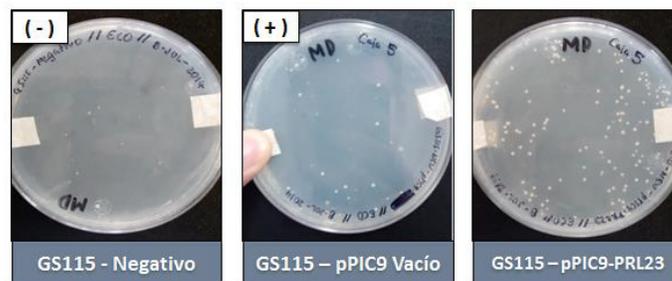
Por otra parte, se caracterizó la construcción mediante PCR empleando un juego de iniciadores para el promotor AOX1. Los ampliaciones para un casete vacío tuvieron una longitud de 492 pb lo cual representa el promotor AOX1 del vector pPIC9. Mientras que la construcción pPIC9-PRL23 generó un amplicón de 1143 pb de bases debido a que representan la suma de los 492 pb de AOX1 y los 651 pb de la secuencia de PRL23 (Figura 18).



**Figura 21. Caracterización de pPIC9-PRL23 por PCR.** pb) Marcador de pares de bases, ( - ) Control negativo de amplificación, ( + ) Control positivo de amplificación (casete vacío de pPIC9, 492 pb), **Carriles 1-4** ) Amplificación con iniciadores AOX1 de la construcción pPIC9-PRL23 (1143 pb). Gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio.

#### 5.4 Transformación de las cepa GS115 de *Pichia pastoris* con el vector pPIC9-PRL23.

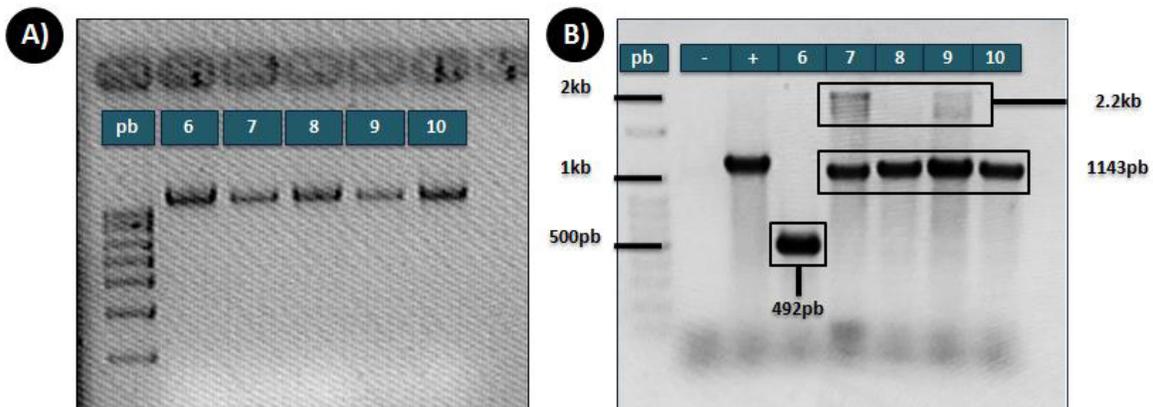
Una vez caracterizado el vector pPIC9-PRL23 se procedió a linearizarlo empleando la enzima *Sac* I, la cual genera en su mayoría cepas con el fenotipo Mut<sup>+</sup> en la cepa GS115. Las levaduras fueron transformadas mediante electroporación e inoculadas en placas de medio MD (carente de histidina) para su selección mediante el marcador HIS4 (Figura 19).



**Figura 22. Transformación de la cepa GS115.** En el control negativo no aparecen colonias debido a que las colonias no integran el marcador de auxotrofía que porta pPIC9. El control positivo presenta colonias de GS115-pPIC9 o “mock”, mientras que aquellas con el vector pPIC9-PRL23 son las productoras de la proteína recombinante ya que tienen el casete incorporado a su genoma de *P. pastoris*.

#### 5.4.1 Caracterización de las colonias transformadas.

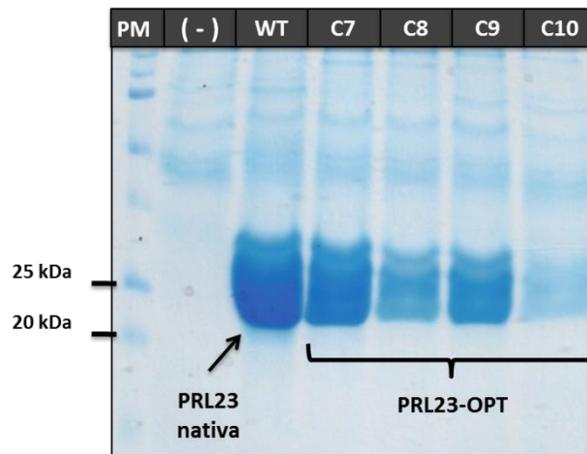
Posterior a la transformación de las levaduras se llevó a cabo una extracción de ADN genómico para poder caracterizar las levaduras transformadas mediante PCR con los iniciadores para AOX1 (Figura 19). Las cepas que presentan una banda de 492 pb son aquellas que fueron transformadas con un casete vacío (solo pPIC9). Aquellas que presentan una banda de 1143 pb son las que integraron el vector pPIC9-PRL23 pero perdieron el promotor AOX1 propio de la levadura durante la recombinación, es decir tienen un fenotipo Mut<sup>S</sup>. Por último, aquellas cepas que presentan una banda de 2.2 kb y otra de 1143 pb tienen un fenotipo Mut<sup>+</sup>, ya que poseen el promotor AOX1 del vector de expresión pPIC9-PRL sin perder el promotor *aox1* de su genoma.



**Figura 23. Caracterización de las colonias de GS115 transformadas con pPIC9-PRL23 por medio de PCR. A) Extracción genómica de las transformantes.** El primer carril corresponde al marcador de pares de bases, mientras que los carriles 6 al 10 corresponden al ADN genómico de colonias transformadas. **B) Caracterización del fenotipo de utilización de metanol. pb)** Marcador de pares de bases, ( - ) Control negativo de amplificación, ( + ) Control positivo de amplificación con iniciadores AOX, **6)** Colonia transformada con el vector pPIC9 vacío, **7 y 9)** Colonias de fenotipo Mut<sup>+</sup>, **8 y 10)** Colonias de fenotipo Mut<sup>S</sup>. Gel de agarosa al 1% con tinción de bromuro de etidio.

### 5.5 Ensayos de expresión en tubo de 50 mL.

Una vez identificadas las clonas portadoras de la secuencia de PRL23 y habiendo caracterizado su fenotipo de utilización de metanol, se procedió a llevar a cabo la expresión de la prolactina recombinante. Las proteínas producidas por las transformantes fueron analizadas en geles de SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de Coomassie (Figura 20). Se pudieron observar bandas intensas entre los 20 y 25 kDa que coinciden con el peso molecular de la prolactina. Además, se observan algunas bandas que podrían corresponder a formas glicosiladas de la misma prolactina. Las cepas con modificación de codones que tuvieron una mayor producción fueron las de fenotipo Mut<sup>+</sup>, sin embargo y sorpresivamente, estas no alcanzaron igualar la producción de la clona que contenía la secuencia nativa de PRL.

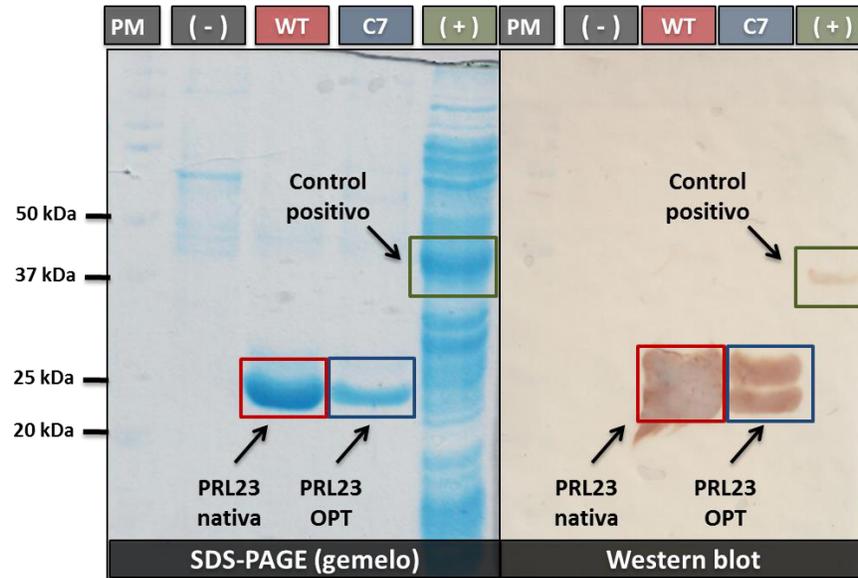


**Figura 24. Ensayo de expresión de prolactina en las cepas transformadas.** Se indujo la expresión de PRL en cepas construidas con modificación de codones así como de las cepas con PRL nativa. **PM)** Marcador de peso molecular (kDa), **( - )** Control negativo de expresión pPIC9 vacío, **WT)** Prolactina nativa, **C7 y C9)** Prolactina optimizada expresada en cepas Mut<sup>+</sup>, **C8 y C10)** Prolactina optimizada expresada en cepas Mut<sup>S</sup>. Gel de poliacrilamida al 12%, tinción con azul de Coomassie.

### 5.6 Detección de la etiqueta de histidina mediante Western blot.

Se empleó la prolactina producida por la colonia número 7 (Mut<sup>+</sup>) para ser analizada mediante western blot en comparación con la prolactina no optimizada. Como control negativo se utilizó el medio obtenido de una inducción de una cepa “mock” (pPIC9 vacío).

Además, se utilizó un control de alrededor de 40 kDa con etiqueta de histidina. El patrón observado en el gemelo de SDS-PAGE coincide con las bandas detectadas con mayor intensidad en el western blot (Figura 21).



**Figura 25. Gemelo de SDS-PAGE y Western blot.** PM) Marcador de peso molecular (kDa), ( - ) Control negativo “mock”, WT) Prolactina no optimizada, C7) Prolactina optimizada, ( + ) Control positivo de etiqueta de histidinas. Gel de poliacrilamida al 12%; Membrana de nitrocelulosa revelada con DAB.

### 5.7 Cuantificación de proteínas y determinación de prolactina total.

Se cuantificó la proteína total en el medio dializado de inducciones de 72 horas en tubos de 50mL, tanto para las cepas productoras de prolactina optimizada como para las cepas de PRL nativa. La curva de calibración para cuantificar mediante la técnica de Bradford va de 0  $\mu\text{g}$  hasta 1000  $\mu\text{g}$  (Gráfica 4). La lectura de las muestras se tomó a 595nm y se calculó la concentración de acuerdo a la absorbancia registrada. También se estimó la concentración total de prolactina mediante un análisis de densitograma. Los porcentajes de proteína total en las muestras fueron similares para la prolactina optimizada y para la nativa (alrededor del 75%). Sin embargo, la concentración de prolactina nativa fue mayor que la optimizada.

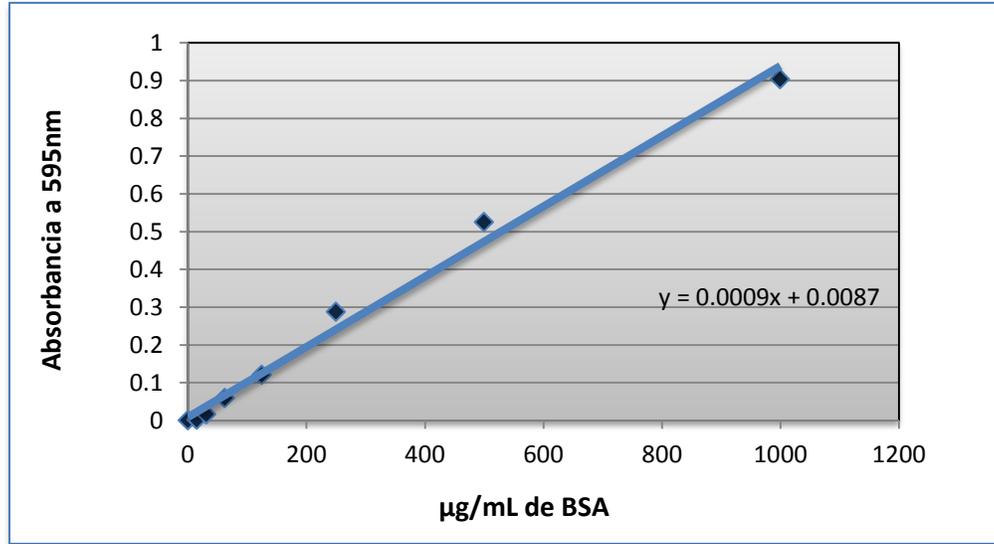


Figura 26. Curva de calibración para la cuantificación de proteína total por la técnica de Bradford. La curva va de 0 – 1000 µg usando BSA como estándar.

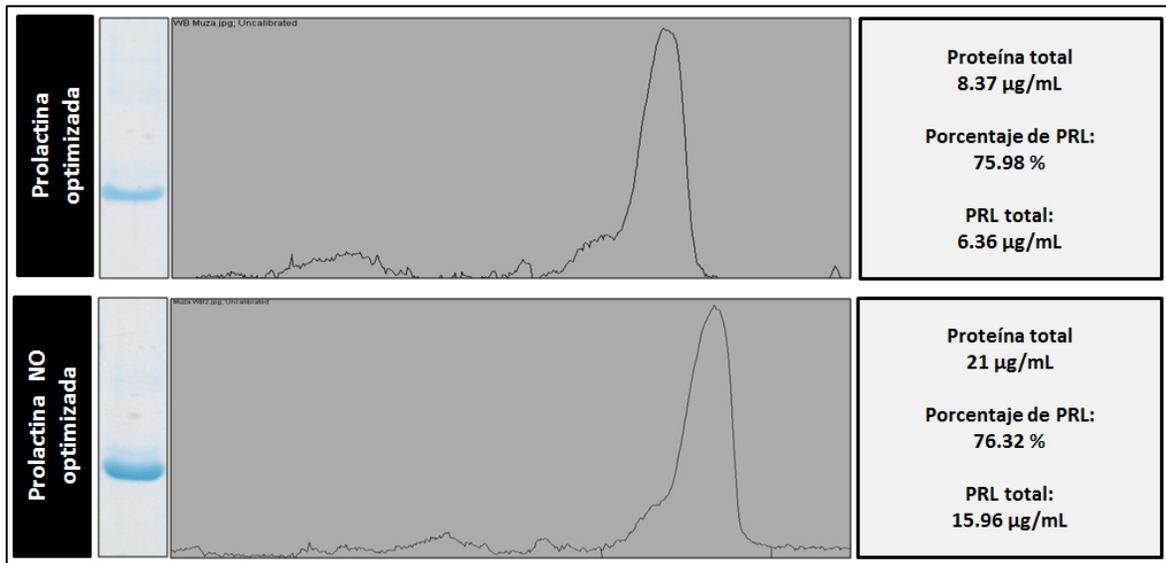
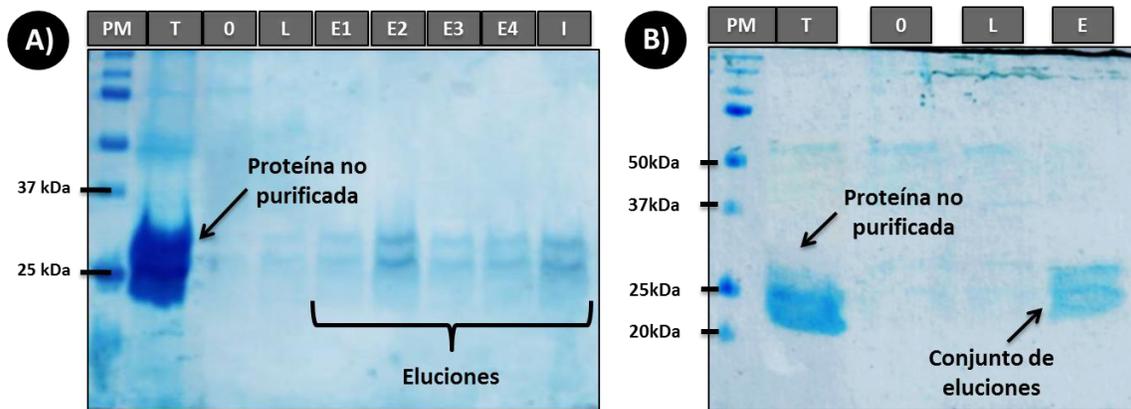


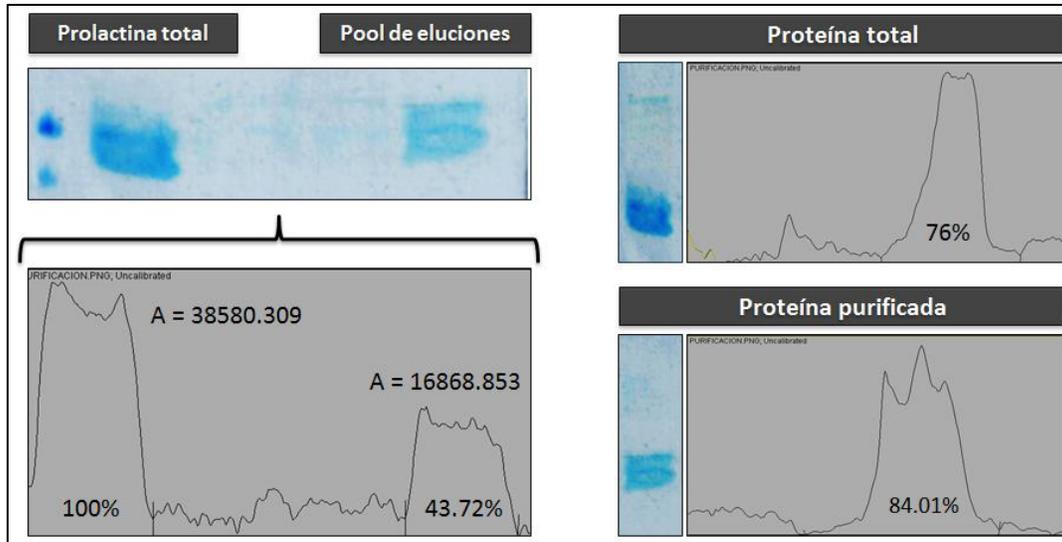
Figura 27. Densitogramas y porcentaje de prolactina en la proteína total. Mediante el densitograma se logró calcular la fracción de prolactina en la muestra dializada. La proporción proteína total – prolactina fue similar en ambos casos. La concentración por otra parte fue mayor en la prolactina nativa. Los picos de mayor intensidad representan las bandas correspondientes a la PRL mientras que los picos más pequeños representan las proteínas de fondo propias de *P. pastoris*.

### 5.8 Purificación mediante la técnica de IMAC.

Se realizó la purificación de la PRL obtenida a partir de la colonia número 7. En la figura 22 A se realizaron cinco eluciones con pH 4 y una elución final con imidazol 300mM, las cuales fueron corridas en carriles separados en SDS-PAGE. Mientras que en la 22 B todas las eluciones fueron reunidas en un pool. A partir de la 22 B se estimó por densitometría que el porcentaje de prolactina recuperada fue de 43.72%, en relación con la prolactina en la muestra inicial (Figura 23). También se logró estimar el porcentaje de pureza obtenido tras la purificación, incrementando de un 76% a un 84%.



**Figura 28. Purificación de PRL23-OPT mediante la técnica de IMAC. (A): PM)** Marcador de peso molecular (kDa), **T)** Proteína total, **O)** Fracción no unida a la resina, **L)** Fracción correspondiente a lavados con pH 6.3, **E1-E4)** Eluciones con pH 4, **I)** Elución final con imidazol 300mM. **(B): PM:** Marcador de peso molecular (kDa), **T)** Proteína total, **O)** Fracción no unida a la resina, **L)** Fracción correspondiente a lavados con pH 6.3, **E)** Pool de eluciones (proteína total recuperada). Geles de poliacrilamida al 12% con tinción de azul de Coomassie.



**Figura 29. Estimación de prolactina recuperada y pureza obtenida.** Según el densitograma se obtuvo una recuperación del 43.72% de prolactina. La pureza estimada pasó de 76% a 84.01%.

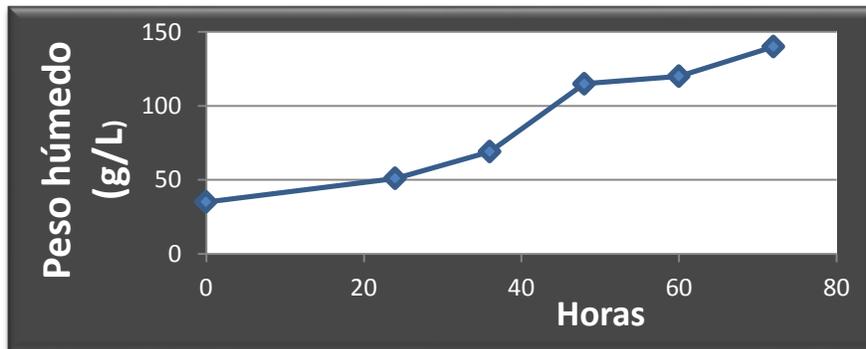
### 5.9 Escalamiento a nivel biorreactor (1 litro).

Para el escalamiento a nivel biorreactor se empleó la cepa número 7 productora de prolactina optimizada. El incremento de biomasa se mantuvo constante hasta alcanzar un peso húmedo de 140 g/L a las 72 horas de inducción (Cuadro 13). Además, tanto la oxigenación como el pH disminuyeron durante la etapa de mayor producción durante la fermentación, lo que indica una buena metabolización del metanol por parte de las levaduras (Gráficas 5, 6 y 7).

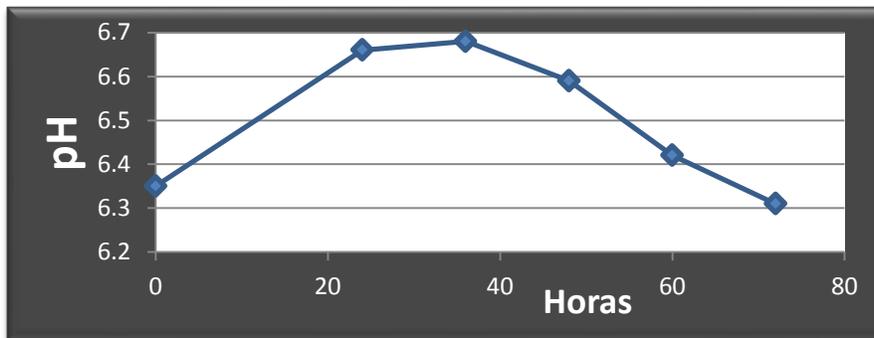
**Cuadro 13. Parámetros monitoreados durante la inducción.** Se tomó lectura de cada parámetro al tiempo 0 y posteriormente cada 12 horas hasta que concluyó el proceso de inducción en el biorreactor.

Horas	dO <sub>2</sub> (%)	pH	RPM	Temperatura (°C)	Peso húmedo (g/L)
0	95	6.35	200	21.5	13
24	52.5	6.66	300	26.2	51
36	67.5	6.68	400	22.8	69
48	75	6.59	400	24.5	115
60	55	6.42	600	23.4	120
72	23.5	6.31	600	24	140

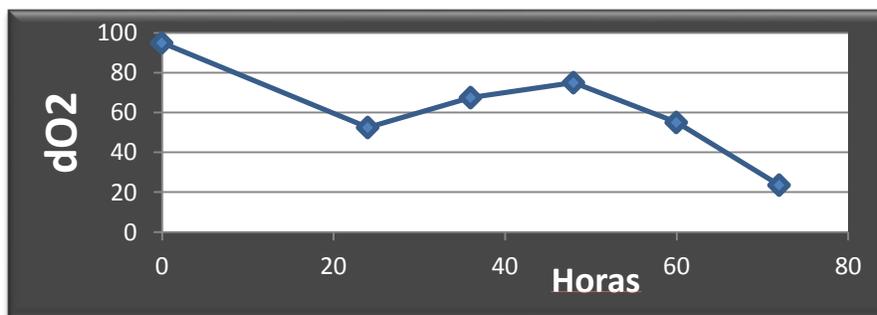
**Figura 30. Biomasa en el biorreactor.** El incremento de biomasa fue continuo a lo largo de la inducción, lo que permitió una mayor producción de prolactina recombinante.



**Figura 31. pH del medio en el biorreactor.** La disminución de pH coincide con la etapa de mayor producción de prolactina a las 72 horas. Esto se debe a que durante la fermentación *P. pastoris* tiende a acidificar el medio.

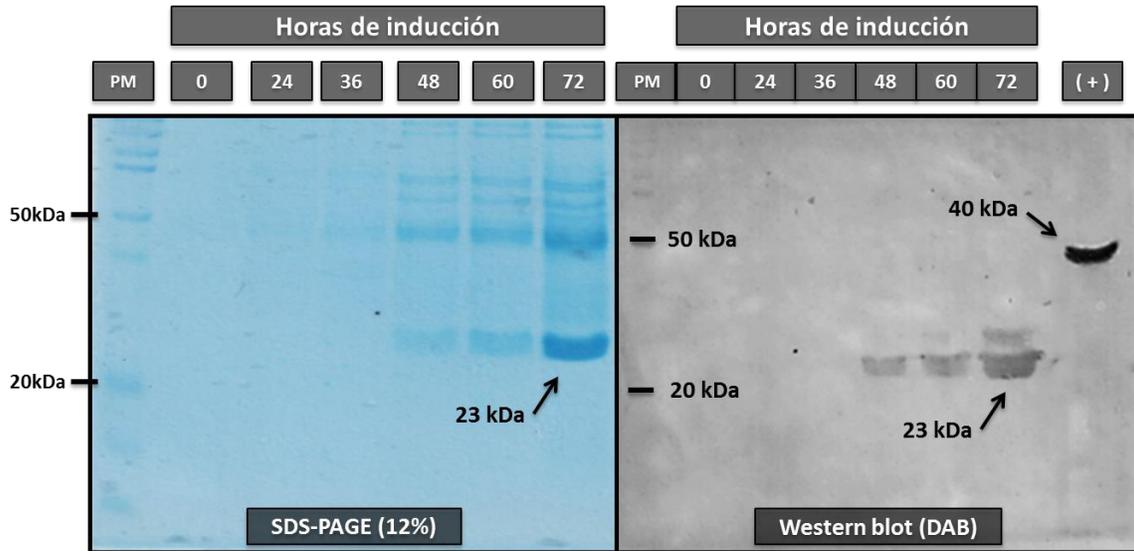


**Figura 32. Oxígeno disuelto en el medio del biorreactor.** El oxígeno disuelto (dO<sub>2</sub>) disminuyó durante la etapa de mayor producción, lo cual indica una metabolización eficaz de metanol por parte de *P. pastoris*.



### 5.9.1 Análisis de las proteínas expresadas en biorreactor.

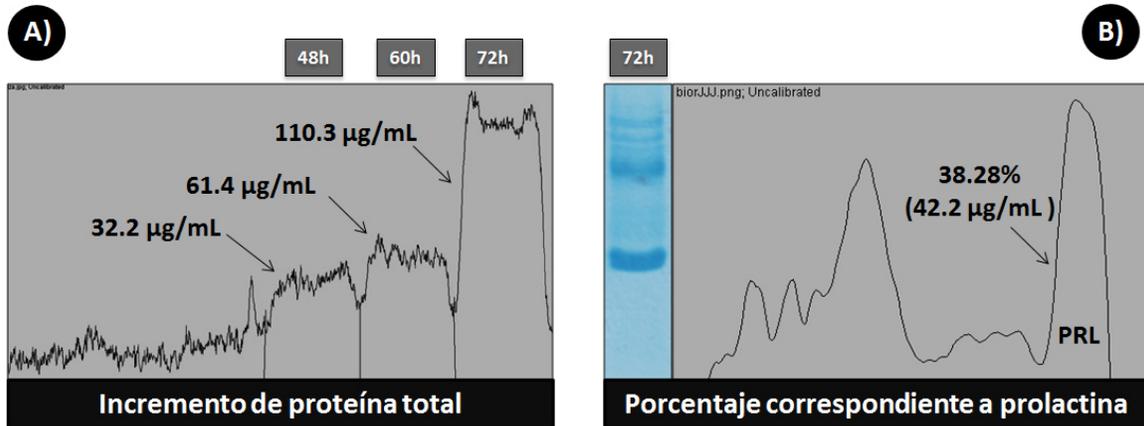
Las muestras tomadas a los tiempos establecidos durante la inducción fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot. La aparición de bandas comienza a ser notoria a partir de las 48 horas (Figura 25).



**Figura 33. Expresión de prolactina durante la inducción en biorreactor.** En esta imagen se muestra el incremento de prolactina recombinante (23 kDa) a lo largo de la inducción en biorreactor así como la detección de la etiqueta de histidinas mediante Western blot. **PM)** Marcador de peso molecular (kDa), **( + )** Control positivo de etiquetas de histidina. Gel de poliacrilamida al 12% con tinción de azul de Coomassie. Membrana de nitrocelulosa revelada con DAB.

### 5.9.2 Cuantificación de la prolactina producida a nivel biorreactor.

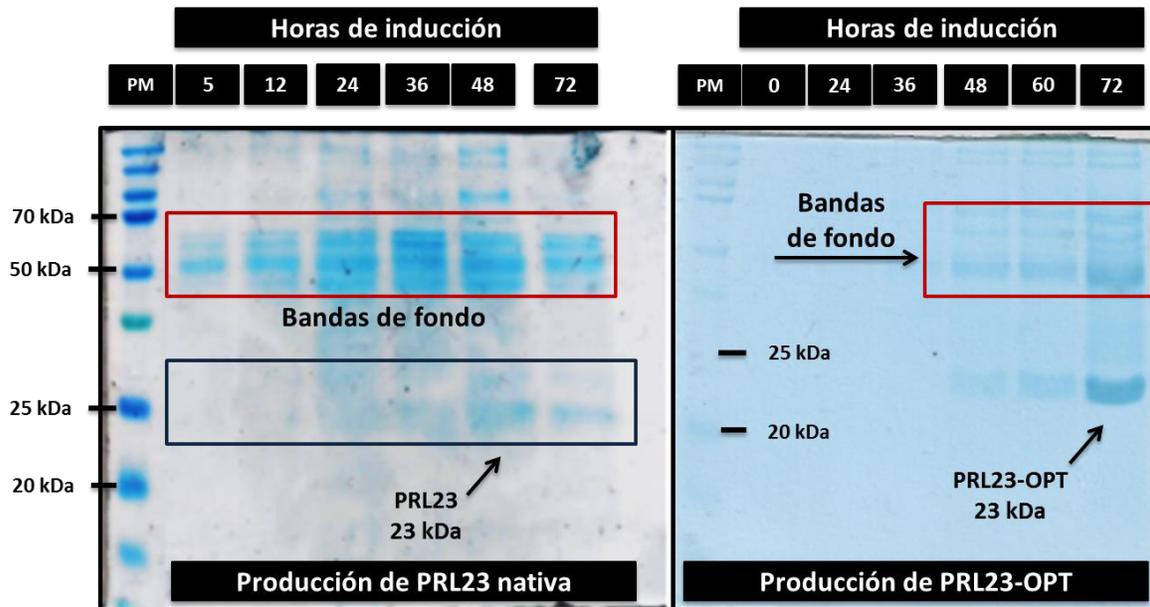
A partir de las muestras tomadas a las 48, 60 y 72 horas, se cuantificó la proteína total mediante la técnica de Bradford y se obtuvieron los densitogramas correspondientes en los cuales se observa un incremento gradual del área de los picos de la proteína total. La mayor concentración de proteína total se logró a las 72 horas y fue de 110 µg/mL, de los cuales se determinó que el 38.28% correspondía a la prolactina, lo que equivale a 44.22 µg/mL de prolactina recombinante (Figura 26).



**Figura 34. Cuantificación de proteína total y prolactina recombinante.** A) Incremento de proteína total. La proteína duplicó aproximadamente su concentración a partir de las 48 horas alcanzando un máximo de 110.3 µg/mL a las 72 horas. B) De esta concentración de proteína total se estimó que el 38.28% (pico derecho del densitograma) equivalente a 42.2 µg/mL representaba la prolactina recombinante total.

### 5.10 Mejora del proceso de producción en el biorreactor.

Por último, cabe señalar que la optimización de condiciones en el biorreactor fue incrementada en comparación con las primeras inducciones. Anteriormente y como parte de este trabajo, se había llevado a cabo el escalamiento de la prolactina nativa para estandarizar el proceso de fermentación en biorreactor. Sin embargo en esas primeras ocasiones se obtuvo una muy baja producción de prolactina, un incremento en las bandas de fondo y una posible mayor liberación de proteasas debido a la lisis celular. Mediante el sistema de oxigenación se pudo mejorar el proceso logrando una mayor producción de la proteína recombinante (Figura 26).



**Figura 35. Mejora de las condiciones de producción en biorreactor.** Durante el escalamiento de la prolactina nativa se obtuvo un patrón de bandas de fondo mayor desde las 5 horas de inducción que van de los 50 a 70 kDa (recuadro superior), lo que indica una lisis celular en el sistema y una consiguiente liberación de proteasas, lo que disminuye el nivel de prolactina (recuadro inferior). Mientras que en la fermentación de las cepas productoras de PRL23-OPT se mejoró la oxigenación del sistema, lo que permitió una mayor productividad de prolactina con un mínimo de proteínas de fondo. Geles de poliacrilamida al 12 % con tinción de azul de Coomassie.

## **CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.**

### **Producción de prolactina recombinante en *Pichia pastoris*.**

El interés académico e industrial en las proteínas recombinantes demanda el diseño de sistemas de expresión de alto rendimiento que además, sean capaces de producir proteínas con una correcta conformación y funcionalidad. El sistema de expresión basado en la levadura *Pichia pastoris* empleado para este trabajo fue capaz de producir exitosamente la isoforma de 23 kDa de la prolactina. Hoy en día, las propiedades y mecanismos moleculares de esta proteína sobre la angiogénesis siguen siendo estudiados, por lo que la estrategia que hemos desarrollado para su producción podría ser una eficiente fuente de obtención tanto de la isoforma de 23 kDa, como para otras isoformas como la de 16 kDa.

Durante la producción de prolactina, pudimos hacer constancia de las ventajas mencionadas de *P. pastoris*. Esta levadura permitió generar rápidamente la biomasa necesaria tanto en nivel tubo de ensaye como en biorreactor. Además, el uso del plásmido pPIC9 en conjunto de la cepa GS115 facilitan la selección de las clonas recombinantes en medios sencillos y de bajo costo. El promotor AOX1 de pPIC9 resultó ideal para nuestros estudios ya que esta finamente regulado y evita fenómenos como una “fuga” basal de expresión. Además, el uso de metanol como agente inductor y fuente de carbono cumplió la función extra de evitar la contaminación de los cultivos debido a que resulta tóxico para la gran mayoría de los microorganismos.

En nuestro caso, las mejores cepas productoras fueron aquellas de tipo Mut<sup>+</sup>, aunque según se ha reportado, la productividad de las cepas Mut<sup>+</sup> y Mut<sup>S</sup> puede variar en referencia al tipo de vector y condiciones de cultivo (Cos y cols., 2005).

### **Optimización de secuencia.**

A pesar de que en varios estudios la optimización de secuencias incrementa la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*, en nuestro caso la prolactina optimizada no superó la producción de la prolactina nativa con las cepas analizadas. Por lo tanto, es necesario seguir analizando cepas transformadas ya que la producción puede variar de una a otra. Por otra parte, la optimización de secuencia también puede favorecer la

calidad de la proteína debido a que al reducirse la cantidad de codones raros la traducción se lleva a cabo con un ritmo continuo, permitiendo así un correcto plegado de la proteína y por ende una mejor funcionalidad (Marin, 2008). Es por eso que en nuestro caso será necesario comparar la actividad biológica de la prolactina producida a partir de la secuencia nativa y de la optimizada.

### **Etiqueta de histidina en la prolactina.**

La adición de la etiqueta de histidina resultó ser de gran utilidad durante la realización de este trabajo, debido a que permitió la detección de la prolactina recombinante mediante ensayos de Western blot, empleando un solo juego de anticuerpos que pueden ser empleados para el estudio de otras proteínas que posean dicha etiqueta sin tener una reacción cruzada con las proteínas propias de *P. pastoris*. Sin embargo, la mayor ventaja obtenida de esta etiqueta, de histidinas fue durante la purificación de la prolactina mediante la técnica de IMAC. La retención de las proteínas etiquetadas en la resina de níquel permite una rápida y fácil separación del resto de las proteínas. Se decidió que la adición de esta etiqueta se realizara en el extremo amino terminal (N-terminal) para evitar afectar la solubilidad de la proteína (Woestenenk y cols., 2004). Es por eso que además, se consideró añadir un sitio de corte para la enterocinasa (EK) entre la etiqueta de histidinas y el inicio de la secuencia que codifica la prolactina, de esta manera la proteína puede ser expresada, purificada y después tratada para eliminar la etiqueta y obtener una completa identidad con respecto a la original.

### **Escalamiento a biorreactor.**

Durante la fermentación en biorreactor uno de los factores más cruciales fue la oxigenación. En los ensayos de escalamiento realizados previamente con la cepa nativa se obtuvo una producción inferior y un alto contenido de bandas de fondo debido a que no se contaba con un sistema de oxigenación correcto. Dado que *P. pastoris* secreta sólo un mínimo de proteínas propias al medio, la presencia de bandas extra de mayor intensidad pueden significar un incremento de la lisis celular en el cultivo, lo que puede tener como consecuencia la liberación de proteasas y la degradación de nuestra proteína recombinante. Durante los ensayos en biorreactor empleando nuestra cepa optimizada,

se adaptó al biorreactor un nuevo sistema de oxigenación más eficiente, lo que se reflejó en una mejor producción de prolactina (44.22 µg/mL) y una disminución de las bandas de fondo. Es importante resaltar el desarrollo de un bioproceso puede llegar a ser muy complicado, ya que depende de diversos factores como el tipo de proteína que se desea expresar, el tipo de biorreactor (batch, fed-batch o continuo), la oxigenación y la concentración de metanol en el medio (en este caso el nutriente y agente inductor para *P. pastoris*). Dado que es la primera vez que se utilizan en el laboratorio de biotecnología el modelo de biorreactor BioBundles ADI1025 de APPLIKON es necesario considerar como una perspectiva optimizar el proceso de producción para futuros proyectos.

## **CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES.**

Se construyó un vector de expresión para la prolactina humana prolactina de 23 kDa optimizada.

Se logró la producción a nivel tubo de ensaye de la prolactina humana de 23 kDa en cepas de *Pichia pastoris* GS115.

Las mejores cepas productoras para esta proteína fueron aquellas de fenotipo Mut<sup>+</sup>.

Se escaló la producción de prolactina de 23 kDa a nivel biorreactor de 1 litro obteniendo un rendimiento aproximado de 44.22 µg/mL.

Al purificar la proteína mediante la técnica de IMAC se logró una recuperación de aproximadamente 43% y una pureza estimada en 84%.

## **CAPÍTULO VIII. PERSPECTIVAS.**

Desarrollar y llevar a cabo ensayos de actividad biológica para la prolactina humana recombinante de 23 kDa producida.

Buscar cepas de *P. pastoris* con una mayor producción de prolactina humana optimizada.

Optimizar la producción en biorreactor.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abramoff MD. (2004) "Image processing with ImageJ". Biophotonics Internattional.
- Ascacio Martines J.A.I., (2004) "Producción en biorreactor, purificación y bioensayo de hormonas recombinantes de crecimiento". Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Bai J., Swartz D., Protasevich I., Brouillette C., Harrell P., Hildebrandt E., Gasser B., Mattanovich D., Ward A., Chang G., Urbatsch I. (2011) "A Gene Optimization Strategy that Enhances Production of Fully Functional P-Glycoprotein in *Pichia pastoris*." PLoS ONE 6(8): e22577, DOI: 10.1371/journal.pone.0022577
- Bairamashvili D., Rabinovich M. (2007) "Russia through the prism of the world biopharmaceutical market." Biotechnology Journal. 2(7):801-17, DOI: 10.1002/biot.200700091
- Balamurugan V., Reddy G.R., Suryanarayana V.V.S. (2007) "*Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins— Vaccines. Indian Journal of Biotechnology Vol 6, pp 175-186
- Bauer M. (2002) "Controversial medical and agri-food biotechnology: a cultivation analysis." Public Understand of Science. 11(2): 93-111, DOI: 10.1177/096366202774003762
- Boettner M., Steffens C., von Mering C., Bork P., Stahl U., Lang C. (2007) "Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*--A comparative view on 79 human genes." Biotechnology Journal. 130(1): 1-10, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.02.019
- Carbone A., Zinovyev A., Képès F. (2003) "Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias." Bioinformatics 19(16): 2005–2015, DOI: 10.1093/bioinformatics/btg272
- Cos o., Ramón R., Montesinos J., Valero F. (2006) "Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review." Microbial Cell Factories 5: 1-20, DOI: 10.1186/1475-2859-5-17
- Cregg J., Barringer K., Hessler A., Madden K. (1985) "*Pichia pastoris* as a host system for transformations." Molecular and Cell Biology. 5(12):3376-85, DOI: 10.1128/MCB.5.12.3376

- Crommelin D., Sindelar R., Meibohm B. (2008) “Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications” Informa, 3th Edition
- Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*. 2005; 18: 119–138 DOI:10.1002/jmr.687
- Demain ., Vaishnav P. (2009) “Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms.” *Biotechnology Advances* 27: 297–306, DOI:10.1016/j.biotechadv.2009.01.008
- Dingermann T. (2008) “Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges.” *Biotechnology Journal*. 3(1): 90-7, DOI: 10.1002/biot.200700214
- Drago M.E., (2006) “Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes” *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, Volumen 37 • No. 1, 38-44
- Eckart M., Bussineau C. (1996) “Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast.” *Current Opinion in Biotechnology*. 7(5): 525-30, DOI:10.1016/S0958-1669(96)80056-5
- Ellis S.B., (1985) “Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*”. *Molecular and Cell Biology*. 5, 1111-1121.
- Ferrer-Miralles N., Villaverde A. (2013) “Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue.” *Microbial Cell Factories* 12:113, DOI:10.1186/1475-2859-12-113
- 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 Expression and Purification* 28(2):252-258
- Gonçalves, A., Pedro A., Maia C., Sousa F., Queiroz J., Passarinha L. (2013) “*Pichia pastoris*: A Recombinant Microfactory for Antibodies and Human Membrane Proteins” *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(5): 587–601, DOI: 10.4014/jmb.1210.10063
- Graumann K., Premstaller A. (2006) “Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems.” *Biotechnology Journal*. 1(2): 164-86, DOI: 10.1002/biot.200500051
- Guerrero-Olazarán M., Cab-Barrera E., Galán-Wong L., Viader-Salvadó J. (2004) “Bioteología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura” Instituto de Bioteología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, 425

- Higgins D., Cregg J. (1998) “*Pichia* Protocols (Methods in Molecular Biology)” Humana Press, 1<sup>st</sup> Edition
- Hou H., Atlihan N., Lu Z. (2014) “New biotechnology enhances the application of cisgenesis in plant breeding.” *Frontiers in Plant* 5(389), DOI: 10.3389/fpls.2014.00389
- Hu H., Gao J., He J., Yu B., Zheng P., Huang Z., Mao X., Yu J., Han G., Chen D. (2013) “Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of a Keratinase Gene in *Pichia pastoris*.” *PLoS ONE* 8(3): e58393, DOI:10.1371/journal.pone.0058393
- Jungo C., Marison I., von Stockar U. (2007) “Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures.” *Journal of Biotechnology*. 128(4): 824-37, DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.12.024
- Keen H., Glynn A., Pickup J., Viberti G., Bilous R., Jarrett R., Marsden R. (1980) “Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycaemic potency in healthy men.” *Lancet* 2(8191): 398-401, DOI: 10.1016/S0140-6736(80)90443-2
- Lara A. (2011) “Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*.” *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10(2): 209-223
- Lin F., Suggs S., Lin C., Browne J., Smalling R., Egrie J., Chen K., Fox G., Martin F., Stabinsky Z., Badrawi S., Lai P., Goldwassert E. (1985) “Cloning and expression of the human erythropoietin gene.” *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 82(22): 7580-4, DOI: 10.1073/pnas.82.22.7580
- Luevano De La Cruz A., (2011) “Producción, purificación y bioensayo de prolactinas recombinantes”. Tesis de maestría en ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Macauley-Patrick S., Fazenda M., McNeil B., Harvey L. (2005) “Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system.” *Yeast* 22: 249–270, DOI: 10.1002/yea.1208
- Marin M., (2008) “Folding at the rhythm of the raro codon beat”. *Biotechnology Journal*. Vol. 3, Issue8, pp 1047-1057
- Mattanovich D., Gasser B., Hohenblum H., Sauer M. (2004) “Stress in recombinant protein producing yeasts.” *Journal of Biotechnology*. 113(1-3): 121-35, DOI:10.1016/j.jbiotec.2004.04.035

- Marquez Ipiña A.R. (2011) “Establecimiento de un método de purificación de proteínas recombinantes basado en etiquetas de histidina, producidas en *P. pastoris*.” Tesis de Maestría en ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Menzella H.G., (2011) Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 10:15.
- Niazi G., Riaz-ud-Din S. (2006) “Biotechnology and Genomics in Medicine - A Review” *World Journal of Medical Sciences* 1(2): 72-81
- Novy R., Drott D., Yaeger K., Mierendorf R. (2001) “Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression” *inNovations* 12: 1–3
- Olson K., Fenno J., Lin N., Harkins R., Snider C., Kohr W., Ross M., Fodge D., Prender G., Stebbing N. (1981) “Purified human growth hormone from *E. coli* is biologically active.” *Nature* 293(5831): 408-11, DOI: 10.1038/293408a0
- Palomares L., Estrada-Mondaca S., Ramírez O. (2004) “Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions (Methods in Molecular Biology)” Humana Press, 2<sup>nd</sup> Edition
- Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V, (2004) “Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance”. *Molecular Endocrinology*.;18(10):2522-42
- Poutou R., Quevedo B., Córdoba H., Sáenz H., Barrera L. (2005) “Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*” *Nova* 3(3): 1-120
- Ramamorthi J., Smooker P.M., (2009) “So you need a protein- A guide to the production of recombinant proteins”. *The Open Veterinary Science Journal*, 3, 28-34
- Sahdev S., Khattar S., Saini K. (2008) “Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies.” *Molecular and Cell Biochemistry*. 307(1-2): 249-64, DOI 10.1007/s11010-007-9603-6
- Sarramegna V., Muller I., Mousseau G., Froment C., Monsarrat B., Milon A., Talmont F. (2005) “Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human mu-opioid receptor expressed in *Pichia pastoris*.” *Protein Expression and Purification*. 43(2): 85-93, DOI: 10.1016/j.pep.2005.05.007

- Sharp P., Li W. (1987) "The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications." *Nucleic Acids Research*. 15(3): 1281-95, DOI:10.1093/nar/15.3.1281
- Singh M., Jain V. (2013) "Tagging the Expressed Protein with 6 Histidines: Rapid Cloning of an Amplicon with Three Options." *PLoS ONE* 8(5): e63922, DOI:10.1371/journal.pone.0063922
- Singh P., Sarangi B., Tuli R. (1996) "A facile method for the construction of synthetic genes." *Journal of Biosciences*. 21(6): 735-741
- Smith H., Wilcox K. (1970) "A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*: I. Purification and general properties." *Journal of Molecular Biology*. 51(2): 379-91, DOI:10.1016/0022-2836(70)90149-X
- Stryjewska A., Kiepusa K., Librowski T., Lochyński S. (2013) "Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part II. Monoclonal antibodies, modern vaccines and gene therapy." *Pharmacological Reports*. 65(5): 1086-101, DOI: 10.1016/s1734-1140(13)71467-1
- Valero F. (2013) "Bioprocess Engineering of *Pichia pastoris*, an Exciting Host Eukaryotic Cell Expression System" *InTech*, DOI: 10.5772/56407
- Wilson K. (2010) "Biotechnology and Genetic Engineering (Global Issues)" *Infobase Publishing*. ISBN 978-0-8160-7784-7
- Woestenenk E.A., Hammarström M., van den Berg S., Härd T., Berglund H., (2004) "His tag effect on solubility of human proteins produced in *Escherichia coli*: a comparison between four expression vectors". *Journal of Structural and Functional Genomics*. 5 (3) : 217-29.
- Wurm F. (2004) "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." *Nature Biotechnology*. 22(11): 1393-8, DOI:10.1038/nbt1026
- Yon J. (2001) "Protein folding: a perspective for biology, medicine and biotechnology." *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34(4): 419-35, DOI:10.1590/S0100-879X2001000400001
- Zhang W., Bevins M., Plantz B., Smith L., Meagher M. (2000) "Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A." *Biotechnology and Bioengineering*. 70(1): 1-8, DOI: 10.1002/1097-0290(20001005)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y

- Çelik E., Çalık P., Oliver S. (2009) “Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol.” *Yeast* 26: 473–484, DOI: 10.1002/yea.1679

## **ANEXOS.**

### **ANEXO1. ESPECIFICACIONES DE LOS MATERIALES EMPLEADOS.**

#### **REACTIVOS.**

Los reactivos empleados para esta tesis fueron adquiridos de las siguientes casas comerciales: Sigma-Aldrich Chemical Company, Inc. (St. Louis, MO, EUA), Merck, (Monterrey, México), CTR (Monterrey, México), Invitrogen (La Jolla CA, EUA). Bionline Inc. (EUA).

La purificación de ADN se realizó empleando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA.

La purificación de proteínas se llevó a cabo empleando la resina Ni Sepharose 6 Fast Flow de General Electric Healthcare (EUA).

#### **REACTIVOS BIOLÓGICOS.**

La secuencia optimizada fue sintetizada por la compañía GeneScript USA Inc. Los iniciadores empleados fueron sintetizados mediante el servicio de la compañía PROMEGA. Las amplificaciones de PCR se llevaron a cabo utilizando el master mix GoTaq Colorless Master Mix de PROMEGA. El vector de expresión pPIC9 fue obtenido de la compañía Invitrogen, así como las cepas mutantes empleadas de *E. coli* "TOP10F" y *Pichia pastoris* "GS115" (Pichia Expression Kit, Invitrogen). Las enzimas *Xho* I, *Avr* II, *Btg* I y *Nco* I fueron adquiridas de la casa comercial New England BioLabs, Inc., así como sus respectivos amortiguadores. Se empleó el kit de ligación Quick-Stick Ligase de BIOLINE. Anticuerpos para western blot de la casa comercial Jackson Immuno Research, Laboratories, Inc.

#### **INFRAESTRUCTURA.**

Biorreactor de 1 litro marca APPLIKON, modelo BioBundles ADI1025. Cámara de electroforesis de ácidos nucleicos Thermo EasyCast. Cámara de electroforesis para

proteínas de BIORAD Mini-Protean II. Celdas de electroporación de BIORAD. Electroporador de BIORAD Gene Pulse II. Espectrofotómetro Eppendorf, BioPhotometer. Micro centrifuga Eppendorf 5415D Benchtop. Potenciómetro digital ORION 420A. Termociclador 110V THERM-1000-1, Axygen. Termomixer Eppendorf (Thermomixer compact).

## **SOFTWARES.**

Obtención de secuencias de la base de datos GeneBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Diseño de iniciadores mediante el software OLIGO 7. Analizador de imágenes ImageJ. Análisis de corte enzimático in silico mediante el servidor de NEBcutter (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

## **ANEXO 2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO**

**Medio LB (100mL).** Extracto de levadura 0.5g, Peptona 1g, Cloruro de sodio 1g. Para prepararlo en placa añadir el 2.2% de agar. Esterilizar en autoclave.

**Medio YPD (100mL).** Extracto de levadura 1g, Peptona 2g, Dextrosa 2g. Para prepararlo en placa añadir el 2.2% de agar. Esterilizar en autoclave.

**Medio MD (200mL).** Agua 160mL, YNB 20mL, Dextrosa 20mL, Biotina (0.02%) 0.4mL, Agar 4.4%. Esterilizar el YNB y la biotina por filtración.

**Medio BMMY (100mL).** Esterilizar 80mL de agua con 1g de extracto de levadura, 2g de peptona y 10mL de amortiguador de fosfatos pH 6. Esterilizar los siguientes reactivos por filtración y añadir la cantidad indicada: YNB (10X) 10mL, Biotina (0.02%) 170µL. Al final añadir el 0.5% de metanol.

### **ANEXO 3. PROTOCOLOS.**

#### **Preparación de bacterias / levaduras electrocompetentes.**

Inocular la bacteria / levadura en 2mL de medio correspondiente (LB/YPD respectivamente). Y dejar incubando toda la noche en las condiciones óptimas. Tomar 200 $\mu$ L del medio inoculado y reinocular un matraz con 200mL del medio correspondiente. Incubar en condiciones óptimas hasta una OD600: de 0.4 para bacterias y 0.7 para levaduras.

Enfriar el cultivo en baño de hielo por 10 minutos y dividir el contenido en tubos de ensaye de 50mL. Centrifugar por 10 minutos a 4,500 rpm y 4°C. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 5mL de agua destilada estéril y fría. Aforar a 50mL. Repetir el lavado y decantar. Realizar 2 lavados con 10mL glicerol al 10% frío y estéril para bacterias o con sorbitol 1M para levaduras. Centrifugar y decantar. Resuspender en 1mL de glicerol al 10% frío y esteril para bacterias y en sorbitol 1M para levaduras. Alicuotar en tubos de 0.6mL (100 $\mu$ L/tubo). Almacenar a -80°C.

#### **Transformación de bacterias / levaduras electrocompetentes.**

Añadir 0.1 $\mu$ g de ADN plasmídico para bacterias o 1-5  $\mu$ g para levaduras a una alícuota de bacterias / levaduras electrocompetentes y mezclar. Transferir el mix a una cubeta de electroporación fría y seca. Colocar la cubeta en la cámara de descarga. Aplicar el pulso con los siguientes parámetros: 200 $\Omega$ , 25 $\mu$ F y 2.5kV para bacterias y 400 $\Omega$ , 25 $\mu$ F y 1.5kV para levaduras. Para las bacterias, añadir a la cubeta 500mL del medio LB, mezclar y transferir a un tubo de 1.5mL estéril. Incubar en agitación en las condiciones óptimas por 30 minutos. Centrifugar 1 minuto a 4,000 rpm y retirar 200 $\mu$ L de medio sobrenadante. Resuspender el remanente y sembrar por extensión en el medio selectivo.

#### **Extracción plasmídica de bacterias.**

Inocular colonias de bacterias transformadas en 4 mL medio LB con el antibiótico correspondiente. Incubar por 16 horas / 37°C con agitación. Tomar 2mL del medio incubado y transferir a tubo Eppendorf de 2mL. Centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.

Decantar el medio y añadir 100µL de solución I (50mM glucosa, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8). Resuspender e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Agregar 200µL de solución II (1M NaOH, 1% SDS) preparada en el momento; mezclar por inversión e incubar por 5 minutos en hielo. Agregar 150µL de solución III (Acetato de sodio 3M) y mezclar por inversión; incubar 10 minutos en hielo. Centrifugar por 6 minutos a 13,000 rpm y transferir el sobrenadante a tubos de 2mL. Añadir ½ volumen de fenol y ½ volumen de cloroformo. Mezclar con vortex por 30 segundos. Centrifugar 4 minutos a 13,000 rpm y transferir la fase acuosa a tubos de 1.5mL. Añadir 2 volúmenes de etanol (100%) frío, mezclar por inversión e incubar por 30 minutos a -20°C. Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm y decantar sin perder la pastilla de ADN. Realizar un lavado con 600µL de etanol al 70% frío. Secar la pastilla a 50°C y resuspender en 50-100µL de agua libre de nucleasas.

#### **Extracción de ADN genómico de levaduras.**

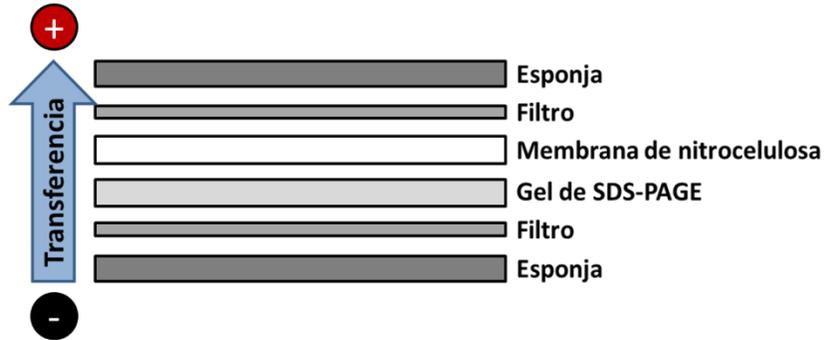
Agregar 2mL de biomasa a un tubo de 2mL. Centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm y decantar el sobrenadante. Agregar 200µL de TSNT y mezclar en vortex por 30 segundos. Agregar 200µL de fenol y 200µL de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 v/v). Agregar 300µL de TE1x (EDTA 100mM, Tris-HCl 1M) y mezclar por 30 segundos en vortex. Centrifugar por 7 minutos a 13,000 rpm. Transferir el sobrenadante a un tubo de 2mL y agregar 2.5 volúmenes de etanol al 100% frío y mezclar. Centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm y decantar el sobrenadante. Agregar 500µL de etanol al 70% frío y mezclar. Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm y decantar. Secar la pastilla y resuspender en agua libre de nucleasas.

#### **Precipitación de proteínas mediante la técnica de metanol-cloroformo.**

En un tubo de 2mL añadir 500µL de muestra, 600µL de metanol y 450µL de cloroformo. Mezclar por inversión y centrifugar 2 minutos a 13,000 rpm. Desechar el sobrenadante sin tocar la interface. Añadir 600µL de metanol y agitar por inversión. Centrifugar por 5 minutos a 13,000 rpm. Decantar sin perder la pastilla. Secar la pastilla a 50°C o en SAVANT.

### Protocolo de western blot.

Después de correr las muestras en un gel de poliacrilamida, se debe armar un “sándwich” para transferir la muestra como se muestra a continuación:



La transferencia se llevó a cabo por 2 horas a 100v. Después de la transferencia lavar la membrana con PBS por 5 minutos y colocar la membrana en solución de bloqueo al menos 2 horas. Lavar 2 veces por 10 minutos la membrana con solución de PBS-Tween 20 (1:1000). Incubar la membrana con el anticuerpo primario con agitación (4°C / 2 horas). Repetir el lavado con PBS-Tween20 e incubar con el anticuerpo secundario (4°C / 2 horas). Repetir el doble lavado con PBS-Tween 20 y añadir uno más con PBS solo. Revelar mediante el método correspondiente.