

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



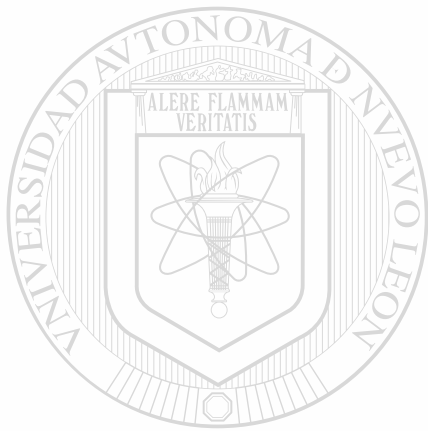
Producción de tripsina de camarón blanco del Pacífico  
(*Litopenaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*

Por

M.C. Luis Lauro Escamilla Treviño

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

ABRIL DEL 2002



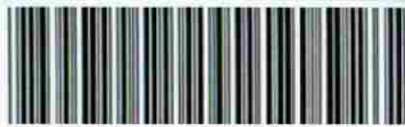
UNANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

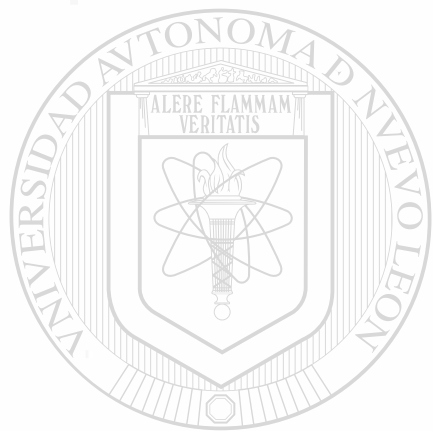
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD  
QP609  
.T7  
E7  
2002  
c.1



1080124450



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Ciencias Biológicas**



**Producción de tripsina de camarón blanco del pacífico**

***(Litopenaeus vannamei) en Pichia pastoris***

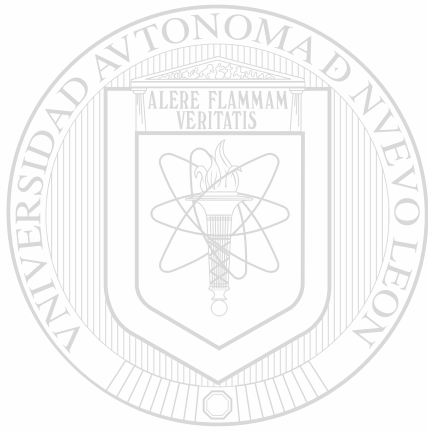
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**M.C. Luis Lauro Escamilla Treviño**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología**

TD  
QP609  
.T7  
E7  
2002



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Producción de tripsina de camarón blanco del pacífico  
(*Litopenaeus vannamei*) en *Pichia pastoris***

**Aprobación de tesis:**



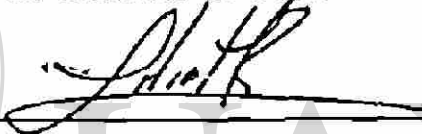
---

**Dra. Martha Guerrero Olazarán**  
Director de Tesis



---

**Dr. José María Viader Salvadó**  
Co-Director de Tesis



---

**Dra. Lilia H. Morales Ramos**  
Co-Director de Tesis



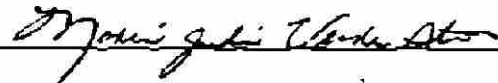
---

**Dra. Katuska Arévalo Niño**  
Comisión de Tesis



---

**Dr. Luis Galán Wong**  
Comisión de Tesis



---

**Dra. María Julia Verde Star**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Martha Guerrero Olazarán por su valiosa asesoría.
  - Al Dr. José María Viader por su invaluable contribución en la resolución de problemas.
  - A la Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos y a la Dra. Katuska Arévalo Niño por su disponibilidad.
  - Al Dr. Luis Galán Wong por haberme aceptado en el programa de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología el cual coordina.
  - Al Dr. Rolando Tijerina Menchaca por permitir el uso de las diversas instalaciones del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.
  - Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por su valiosa colaboración en la culminación de este proyecto.
  - A la Dra. Elizabeth Cruz Suárez por permitir el uso de equipo del laboratorio de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.
  - A la Dra. Laura Elia Martínez por permitir el uso del equipo de la Unidad de Genética y Defectos Congénitos de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.
  - A la Dra. Ma. del Socorro Flores por facilitarme diversos equipos indispensables en el desarrollo del proyecto.
- 
- A los estudiantes de licenciatura por su ayuda: Lidia, Adriana, Elda, Othonyel y especialmente a Víctor y Félix quienes soportaron arduas jornadas de trabajo.
  - A aquellas personas que me brindaron ayuda de manera desinteresada: Martín, Carmen, Agustina, Eddy, Marta O., Flor, Carlos, Angelitos etc.
  - Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.
  - Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) por el apoyo económico brindado para financiar este proyecto.

## **DEDICATORIA**

**A ti Brenda por tu amor y enorme comprensión.**

**Discúlpame por el tiempo que te he quitado durante esta etapa.**

**A Luis Osvaldo y Valeria por que son el principal motivo de mi esfuerzo.**

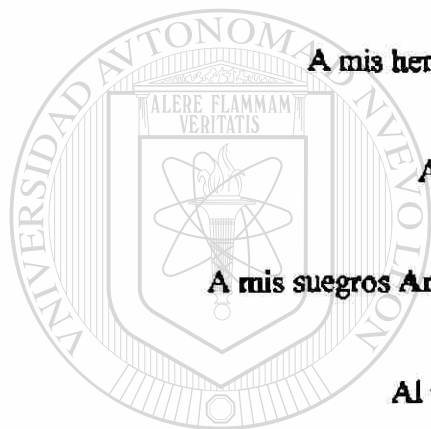
**A mis padres Carnea y Luis Lauro gracias por su ejemplo,  
por su amor y por su apoyo incondicional.**

**A mis hermanos Iza y Alán por su amistad.**

**Al resto de mis familiares.**

**A mis suegros Amparo y Osvaldo por su apoyo y amistad.**

**Al resto de mi familia política.**



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





## ÁREA DE TRABAJO

**El presente trabajo se llevó a cabo principalmente en el Laboratorio de Química Biomolecular y otros Laboratorios del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Martha Guerrero Olazarán y la Co-dirección del Dr. José Ma. Viader Salvadó y la Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos.**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## T A B L A D E C O N T E N I D O

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1	Biotecnología de proteínas	1
1.2	Tecnología del ADN recombinante	1
1.3	Selección del sistema de expresión	3
1.4	Sistema de expresión de <i>Pichia pastoris</i>	5
1.5	Tripsina	10
1.5.1	Tripsina de camarón	11
1.6	Producción de tripsina	13
1.7	Importancia del proyecto	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
2.1	Objetivo General	15
2.1.1	Objetivos específicos	15
2.1.2	Objetivos adicionales	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
3.1	Area de trabajo, reactivos, y material biológico	16
3.2	Equipo	16
3.3	Metodología	18
3.3.1	Estrategia General	18
3.3.2	Construcción de Vectores	18
3.3.2.1	Diseño de iniciadores	20
3.3.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
3.3.2.3	Clonación de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno en pPIC9	24
3.3.3	Transformación de <i>Pichia pastoris</i> GS115	26
3.3.3.1	Crecimiento celular	27

3.3.3.2	Formación de esferoplastos	27
3.3.3.3	Transformación	28
3.3.3.4	Selección de recombinantes	29
3.3.4	Caracterización de genotipos y fenotipos de las cepas recombinantes	29
3.3.4.1	Verificación de la integración del vector de expresión	30
3.3.4.1.1	Aislamiento de ADN genómico de <i>Pichia pastoris</i>	30
3.3.4.1.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
3.3.4.2	Inducción de la expresión de los ADNc's de tripsina y Tripsinógeno	32
3.3.4.3	Análisis de proteínas	33
3.3.5	Determinación de los posibles factores que afectan la producción de las proteínas de interés	35
3.3.5.1	Cinéticas de crecimiento en medio BMM	35
3.3.5.2	Determinación enzimática de la actividad de alcohol oxidasa y catalasa en medio BMM	39
3.3.5.3	Análisis de ultraestructura por Microscopía Electrónica	43
3.3.5.4	Cinéticas de crecimiento en medio BMG	44
3.3.5.5	Cinéticas de crecimiento en medio BMM suplementado con sorbitol	45
3.3.6	Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinantes	45
3.3.6.1	Detección de transcritos por la técnica de RT-PCR	46
3.3.6.1.1	Aislamiento de ARN	47
3.3.6.1.2	Tratamiento con DNAsa I	48
3.3.6.1.3	Reacción de Retrotranscripción	49
3.3.6.1.4	PCR de la RT	50
3.3.6.2	Análisis de proteínas de fermentaciones a altas densidades Celulares	51

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

	pPIC9Tg	92
5.3	Caracterización de genotipos y fenotipos de cepas recombinantes	92
5.3.1	Verificación de la integración de los vectores de expresión	92
5.3.2	Inducción de la expresión de los ADNc's heterólogos	93
5.4	Factores que afectan la producción de las proteínas de interés	94
5.4.1	Cinéticas de crecimiento en medio BMG	94
5.4.2	Determinación enzimática de alcohol oxidasa y catalasa	95
5.4.3	Análisis de ultraestructura por Microscopia Electrónica	96
5.4.4	Cinéticas de crecimiento en medio BMG	97
5.4.5	Cinéticas de crecimiento en medio BMM + S	97
5.5	Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinantes	98
5.5.1	Detección de transcritos por RT-PCR	98
5.5.2	Análisis de proteínas de fermentaciones a altas densidades celulares	99
6	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>101</b>
7	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>103</b>
8.	<b>ANEXO</b>	<b>107</b>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Algunas proteínas recombinantes producidas industrialmente empleando organismos modificados por técnicas de Ingeniería Genética.	2
II. Comparación de los diferentes hospederos empleados para la producción de proteínas heterólogas.	4
III. Niveles de producción de proteínas recombinantes sintetizadas en <i>Pichia pastoris</i> .	10
IV. Comparación de porcentajes de similitud entre tripsinas maduras de diferentes especies.	12
V. Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con <i>Taq</i> DNA polimerasa para la amplificación de productos a subclonar.	23
VI. Mezcla de reacción de ligación.	25
VII. Tamaño de los fragmentos teóricos obtenidos al digerir cada uno de los plásmidos con la endonucleasa <i>Pst</i> I.	26
VIII. Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR para comprobar la integración de los vectores construidos al genoma de <i>P. pastoris</i> .	32
IX. Curva de calibración para la determinación de proteínas de soluciones de lisados por el método de Bradford.	42
X. Mezcla de reacción para llevar a cabo el tratamiento con <i>RQ1</i> <i>DNAasa</i> libre de <i>RNAasa</i> .	48
XI. Mezcla de reacción para llevar a cabo la síntesis de ADN complementario mediante retrotranscripción empleando la enzima <i>M-MLv</i> .	49
XII. Mezcla de reacción realizada para la PCR de la RT.	50

XIII.	Resultados obtenidos de la cuantificación de ADN de diferentes cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> .	63
XIV.	Valores de logaritmos naturales de $DO_{600}$ corregidos ( $LnDO_c$ ) para cada cepa y a cada tiempo.	69
XV.	Valores de logaritmos naturales de UFC/mL corregidos ( $LnV_c$ ) para cada cepa y a cada tiempo.	70
XVI.	Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMM.	72
XVII.	Valores de actividad de alcohol oxidasa de extractos celulares de cepas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> cosechadas a diferentes tiempos de inducción en medio BMM.	74
XVIII.	Valores de actividad de catalasa de extractos celulares de cepas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> cosechadas a diferentes tiempos de inducción en medio BMM.	76
XIX.	Valores de $LnDO_c$ y de $LnV_c$ para cada tiempo obtenidos durante la cinética de crecimiento en medio BMG.	81
XX.	Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMG.	82
XXI.	Valores de logaritmos naturales de $DO_{600}$ corregidos ( $LnDO_c$ ) de los tres ensayos realizados para cada cepa y a cada tiempo.	83
XXII.	Valores de logaritmos naturales de UFC/mL corregidos ( $LnV_c$ ) de los tres ensayos realizados para cada cepa y a cada tiempo.	83
XXIII.	Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMM + S.	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Vector de integración típico empleado para la producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i> .	7
2. Inserción génica del cassette de expresión en el locus <i>his4</i> .	8
3. Representación esquemática de la estrategia general.	19
4. Estrategia empleada para la construcción de los vectores pPIC9Tr (tripsina) y pPIC9Tg (tripsinógeno).	20
5. Representación esquemática de la estrategia de diseño del oligonucleótido 5' para la amplificación de las secuencias nucleotídicas de tripsina y tripsinógeno de camarón.	21
6. Representación esquemática de los ensayos de fermentación llevados a cabo para obtener las cinéticas de crecimiento en medio BMM.	36
7. Representación esquemática de las tomas de muestras y análisis realizados durante la cinética de crecimiento en medio BMM.	37
8. Esquema general del procedimiento realizado para obtener los valores de DO <sub>600</sub> y UFC/mL a cada tiempo.	38
<hr/>	
9. Representación esquemática de los ensayos de fermentación llevados a cabo para obtener las cinéticas de crecimiento en medio BMG.	44
10. Representación esquemática de los ensayos de fermentación a altas densidades celulares.	47
11. Secuencia de los iniciadores diseñados.	54
12. Simulación de la PCR empleando el programa Amplify 1.0 alimentado con los iniciadores diseñados para amplificar el ADNc de tripsina de 738 pb.	55
13. Simulación de la PCR empleando el programa Amplify 1.0 alimentado con los iniciadores diseñados para amplificar el	



ADNc de tripsinógeno de 780 pb.	55
14. Apareamiento de la secuencia molde con cada uno de los iniciadores empleados para la clonación.	56
15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de productos amplificados para clonación.	57
16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE para verificar la digestión de pPIC9hGH22K con las endonucleasas <i>Xho</i> I y <i>Avr</i> II.	58
17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de los plásmidos pPIC9Tg, pPIC9Tr y pPIC9hGH22K digeridos con la endonucleasa <i>Pst</i> I.	60
18. Estructura de los vectores de expresión pPIC9Tr y pPIC9Tg.	61
19. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de digestiones preparativas previas a la transformación de <i>Pichia pastoris</i> .	62
20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de ADN's genómicos de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> y estándares de fago.	63
21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de productos amplificados, cepa GS115-Tg.	64
22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de productos amplificados, cepa GS115-Tr.	65
23. Electroforesis SDS-PAGE al 12% e inmunodetección por la técnica de Western blot de proteínas extracelulares de cepas de GS115-Tr bajo condiciones de inducción.	66
24. Electroforesis SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de la fracción de proteínas intracelulares solubles de cepas GS115-Tr bajo condiciones de inducción.	67
25. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de proteínas extracelulares de las cepas GS115-Tg y una cepa control (GS115-22K), bajo condiciones de inducción.	68

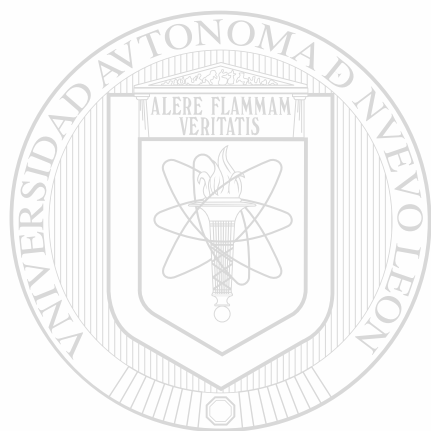
26.	Cinéticas de crecimiento de cepas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> bajo condiciones de inducción en medio BMM (gráficas promedio).	71
27.	Actividad específica de la enzima AOX de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos.	75
28.	Actividad específica de la enzima catalasa de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos.	77
29.	Micrografías electrónicas 7000X de cepas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> cosechadas a las 0 h de inducción es decir durante su crecimiento en BMG.	79
30.	Micrografías electrónicas 7000X de cepas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> cosechadas a las 14 h de inducción en medio BMM.	80
31.	Cinéticas de crecimiento de cepas recombinantes de <i>Pichia pastoris</i> en medio BMM suplementado con sorbitol.	84
32.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de las RT-PCR's de diferentes cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> a las 6 h de inducción en medio BMM.	86
33.	Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de las RT-PCR's de diferentes cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> bajo condiciones de inducción en medio BMM suplementado con sorbitol	87
34.	Electroforesis SDS-PAGE al 15% de proteínas extracelulares de fermentaciones con la cepa GS115-22K.	88
35.	Electroforesis SDS-PAGE al 12% de proteínas extracelulares de fermentaciones de diferentes cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> .	89
36.	Western blot de medios de cultivo libre de células de fermentaciones a altas densidades celulares con la cepa GS115-Tg y GS115-Tr a las 48 h de inducción en medio BMM + S	90

## NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
<i>AOX1</i>	Gen de la alcohol oxidasa 1
<i>AOX2</i>	Gen de la alcohol oxidasa 2
<i>AOX TT</i>	Terminador de la transcripción del gen <i>AOX1</i>
BMG	Medio de cultivo amortiguado y con glicerol
BMM	Medio de cultivo amortiguado y con metanol
BMMY	Medio de cultivo amortiguado y con metanol, peptona y extracto de levadura
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
°C	Grados Celsius
cm	Centimetro
<i>ColE1ori</i>	Origen de replicación de <i>ColE1</i>
Depto	Departamento
<hr/>	<hr/>
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
g	Gravedad
h	Horas
HBsAg	Antígeno de superficie del virus de hepatitis B
<i>HIS4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
<i>his4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa defectuoso o mutado
kDa	Kilodaltones

L	Litros
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Ln	Logaritmo natural
M	Molar
MD	Medio de cultivo mínimo con dextrosa
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar
Mut <sup>+</sup>	Cepa recombinante que posee el gen <i>AOX1</i>
Mut <sup>s</sup>	Cepa recombinante que no posee el gen <i>AOX1</i>
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos con solución salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SP	especies
TBE	Amortiguador Tris-Boratos-EDTA
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Unidades

UV	Ultravioleta
V	Voltio
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Luis Lauro Escamilla Treviño  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Biológicas

Fecha de Graduación: Abril 2002

Título del Estudio: PRODUCCIÓN DE TRIPSINA DE CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO  
(*Litopenaeus vannamei*) EN *Pichia pastoris*

Número de páginas: 108

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con  
especialidad en Biotecnología

Área de Estudio: Biotecnología

**Propósito y Método de Estudio:** La importancia de la tripsina en muchos procesos biológicos y aplicaciones industriales, han hecho de esta enzima objeto de intenso estudio en vertebrados e invertebrados. Actualmente la principal forma de producción de tripsina es mediante su obtención a partir de tejido pancreático de animales en sacrificio, sin embargo las preparaciones de tripsina obtenidas contienen actividades trazas de otras enzimas proteolíticas que son indeseables en algunos procesos industriales o de laboratorio. Adicionalmente lineamientos de organismos internacionales han conducido a la necesidad de uso de tripsina pura de origen recombinante. El presente trabajo tubo como objetivo el de llevar a cabo la producción de tripsina de camarón empleando un sistema de expresión que tiene como hospedero la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Mediante el empleo de técnicas estándar de biología molecular se construyeron vectores de expresión portando los ADNc's que codifican para la tripsina y tripsinógeno de camarón, los cuales se emplearon para transformar la cepa GS115 de *P. pastoris*. La integración de los vectores en el genoma de la levadura fue verificada mediante PCR. Las cepas recombinantes construidas se cultivaron bajo condiciones de inducción y se realizaron análisis de proteínas extracelulares e intracelulares. Al no detectar los productos recombinantes bajo condiciones habituales de inducción, se llevaron a cabo estudios para determinar los posibles factores que afectan la producción de las proteínas de interés y se realizó una búsqueda de condiciones de fermentación que favoreciera la biosíntesis de los productos recombinantes.

**Contribuciones y Conclusiones:** Los vectores recombinantes construidos conteniendo la secuencia completa de tripsina y tripsinógeno de camarón fueron caracterizados satisfactoriamente mediante un análisis de restricción. A pesar de que las cepas transformadas integraron en su genoma los vectores recombinantes construidos, no se detectó tripsina y tripsinógeno de camarón. Al realizar la búsqueda de los factores que afectaban la producción de tripsina o tripsinógeno se encontraron importantes diferencias (velocidad específica de crecimiento, actividad de enzimas peroxisomales y proliferación peroxisomal) entre las cepas construidas (GS115-Tr y GS115-Tg) y las cepas control (GS115-22K y GS115-pPIC9K). Los resultados obtenidos sugieren que el gen de AOX de la cepa GS115-Tr pudo haber sido afectado durante la integración, lo cual pudo haber ocurrido por un evento de integración poco habitual. Por otro lado se concluye que las alteraciones encontradas de la cepa GS115-Tg bajo condiciones de inducción son provocadas por el producto heterólogo. Estos resultados son comparables con los encontrados recientemente en la literatura donde se menciona de las dificultades encontradas al tratar de producir tripsina, tales como actividad proteolítica contra proteínas endógenas del hospedero, inestabilidad de la proteína, autodigestión de tripsina, etc. A pesar de las dificultades encontradas fue posible llevar a cabo la biosíntesis de tripsinógeno de camarón en *Pichia pastoris* en inducciones de altas densidades celulares y empleando sorbitol como fuente de carbono y energía adicional al metanol. Por otro lado los resultados obtenidos con el suplemento de sorbitol, sugieren que éste podría ser empleado en fermentaciones que utilicen este sistema de expresión, para mejorar el aumento de biomasa sin reprimir el promotor de AOX durante la fase de inducción.

FIRMA DEL ASESOR: \_\_\_\_\_

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Biotecnología de proteínas

La Biotecnología de Proteínas es una disciplina que se refiere a la producción comercial y aislamiento de proteínas específicas de fuente animal vegetal o microbiana y/o el subsecuente empleo de éstas, para llevar a cabo un evento biológico previamente definido. Una amplia variedad de proteínas como enzimas, anticuerpos, hormonas, factores sanguíneos, factores de crecimiento y factores regulatorios, son empleados como agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y en la manufactura de una amplia variedad de productos de interés industrial. Diversas tecnologías tanto antiguas como recientes se han entrelazado para formar lo que actualmente se denomina Biotecnología de Proteínas, tales como fermentaciones y disciplinas aliadas, técnicas inmunológicas, técnicas de purificación, estabilización de proteínas y sin duda una disciplina que también juega un papel muy importante en la Biotecnología de Proteínas es la Tecnología del ADN Recombinante o Ingeniería Genética, la que facilita la producción de virtualmente cualquier proteína, incluso proteínas rediseñadas que no existen en la naturaleza (1).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

#### 1.2 Tecnología del ADN recombinante

Esta disciplina también denominada Ingeniería Genética a fomentado y estimulado más que cualquier otra la rápida expansión de la industria de Biotecnología de Proteínas.

A finales de la década de los 70's e inicio de los 80's la insulina (hormona empleada en el padecimiento de diabetes tipo I), era exclusivamente producida a partir de tejido pancreático de animales en sacrificio, mientras algunas proteínas sanguíneas eran obtenidas exclusivamente de la sangre. Para producir la mayoría de estas proteínas era necesario procesar grandes cantidades de material o tejido y al final se obtenían cantidades apenas apreciables del producto o proteína de interés. Por ejemplo durante los ensayos iniciales de

purificación y estudios de caracterización de la hormona liberadora de tirotrófina (factor hipotalámico), se inició con el procesamiento de 4 toneladas de tejido hipotalámico del que se obtuvieron solamente 1 mg de la hormona pura. Este ejemplo muestra la dificultad existente en aquella época al tratar de producir proteínas que en su ambiente natural son muy escasas. La mayoría de estas dificultades han sido resueltas con la llegada de la Ingeniería Genética, gracias a ella hoy es posible aislar el gen o ADNc que codifica para cierta proteína y éste puede ser introducido mediante un vector a un hospedero adecuado (usualmente un microorganismo). Mediante fermentaciones a gran escala de tal organismo recombinante pueden producirse cantidades apreciables de prácticamente cualquier proteína (1). Actualmente una gran variedad de proteínas producidas bajo el empleo de éstas metodologías están comercialmente disponibles, algunas de las cuales se muestran en la tabla I (1).

**Tabla I.** Algunas proteínas recombinantes producidas industrialmente empleando organismos modificados por técnicas de Ingeniería Genética (1).

Proteína	Aplicación
Insulina	Tratamiento de diabetes
Interleucinas	Anticancerígeno
Interferones	Antiviral, anticancerígeno
$\alpha_1$ -Antitripsina	Prevención del riesgo de efisema
Antígeno de superficie de hepatitis B	Vacuna contra la hepatitis B
Hormona del crecimiento	Inducción del crecimiento
Quimosina	Manufactura de queso
Fitasa	Liberación del grupo fosfato del ácido fítico

Desde la segunda mitad de la década de los 80's hasta ahora, el conocimiento en el área de expresión genética a aumentado considerablemente por lo que se han originado nuevos desarrollos en la tecnología de los sistemas de expresión. Actualmente existe una gran variedad de sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes. Un sistema de expresión está constituido de un vector el que contiene un promotor adecuado, secuencias de control y un marcador de selección; y un hospedero que puede ser: una cepa de bacteria, o de levadura, o bien células en cultivo de mamíferos o de insectos, incluso una planta o un animal



transgénico. El resultado es una amplia gama de sistemas de expresión disponibles para que los investigadores puedan llevar a cabo sus objetivos específicos: desde sutiles niveles de expresión para estudiar la función de la proteína en cuestión hasta altos niveles de expresión de proteínas recombinantes por producción a gran escala (2).

### 1.3 Selección del sistema de expresión

Para llevar a cabo la producción de una proteína heteróloga es necesario seleccionar un sistema de expresión que como se mencionó anteriormente está compuesto de un vector y un hospedero.

Cuando se lleva a cabo la selección de un sistema de expresión para producir una proteína heteróloga es necesario tomar en cuenta diversas consideraciones entre las que se incluyen: intención de uso, tiempo disponible para desarrollar la tecnología de producción, disponibilidad de recursos y las características del producto recombinante. La intención de uso puede ser para la producción a gran escala de la proteína heteróloga o bien el estudio de la función en una célula u organismo. Si el objetivo es la producción a gran escala, entonces una levadura tal como *Pichia pastoris* o un sistema que emplee un animal transgénico podrían ser las opciones recomendables. En ambos sistemas se pueden llevar a cabo altos niveles de producción de la proteína recombinante pero difieren en una serie de características a considerar para su selección. Si el tiempo y costo es importante, las levaduras ofrecen las ventajas de rápido crecimiento en un medio simple y económico, además las técnicas de manipulación son sencillas. Por el contrario un sistema transgénico involucra altos costos y el tiempo necesario para desarrollar el animal transgénico es extenso, sin embargo este sistema tiene la capacidad de producir proteínas correctamente procesadas y podría ser de esta manera la mejor elección cuando la proteína recombinante requiere modificaciones postraduccionales que las levaduras no pueden realizar (3).

Si el objetivo del usuario es estudiar la función de la proteína recombinante, existen numerosos sistemas para expresión estable o transitoria y para expresión regulada o constitutiva. En este caso la elección dependerá de una serie de factores como: necesidad de procesamiento postraduccionales para obtener actividad biológica del producto, toxicidad del

producto recombinante sobre el hospedero, la cantidad de proteína que se necesita y el tiempo disponible para el estudio. Si la proteína es tóxica o inhibe el crecimiento del hospedero se recomendaría el empleo de un sistema de expresión transitoria o bien un sistema que use un promotor inducible (3).

En la tabla II se muestran los diferentes hospederos empleados en los sistemas de expresión y sus características.

**Tabla II.** Comparación de los diferentes hospederos empleados para la producción de proteínas heterólogas (3).

Característica	Hospederos en sistemas de expresión			
	Bacteria	Levadura	Células de insecto	Células de mamífero
<b>Crecimiento</b>	Rápido	Rápido	Lento	Lento
<b>Complejidad del medio de cultivo</b>	Mínimo	Mínimo	Complejo	Complejo
<b>Costo del medio de cultivo</b>	Bajo	Bajo	Alto	Alto
<b>Producción extracelular</b>	Secreción al periplasma	Secreción al medio	Secreción al medio	Secreción al medio
<b>Modificaciones postraduccionales</b>				
<b>Plegado de proteínas</b>	Replegamiento usualmente requerido	Replegamiento podría ser requerido	Plegamiento apropiado	Plegamiento apropiado
<b>N-Glicosilación</b>	Ninguna	Alto en manosa	Simple sin ácido siálico	Compleja
<b>O-Glicosilación</b>	No	Sí	Sí	Sí
<b>Fosforilación</b>	No	Sí	Sí	Sí
<b>Acetilación</b>	No	Sí	Sí	Sí
<b>Acilación</b>	No	Sí	Sí	Sí
<b><math>\gamma</math>-Carboxilación</b>	No	No	No	Sí

A pesar de todo el conocimiento sobre los sistemas de expresión disponibles es indispensable tomar en cuenta que podrán haber algunos elementos impredecibles en el comportamiento de una cierta proteína sobre el sistema de expresión seleccionado y más aún no existe un sistema de expresión totalmente predecible, por lo que el único camino seguro para saber si un sistema de expresión trabaja bien con cierta proteína es experimentar con él (3).

La bacteria más ampliamente utilizada para la producción de proteínas recombinantes ha sido *Escherichia coli*, aunque también se han utilizado *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, entre otras. La primera levadura empleada para la producción de proteínas recombinantes fue *Saccharomyces cerevisiae*, debido a que por su larga historia en la industria de purificación y de bebidas alcohólicas se le conocía por ser segura, además la experiencia de fermentaciones a escala industrial facilitaba el escalamiento de la producción (4). Recientemente se ha incrementado notablemente el empleo de la levadura *Pichia pastoris* gracias a una serie de características favorables que posee. También han sido empleadas otras levaduras como: *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha*, *Trichoderma reesei*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, etc. (5).

#### 1.4 Sistema de expresión de *Pichia pastoris*

Las levaduras al igual que los sistemas bacterianos de expresión, permiten una fácil manipulación y rápido crecimiento en medios de cultivo simples y económicos, además de que se conocen las herramientas para su manipulación genética. Además por su organización celular eucariótica, las levaduras proveen un ambiente adecuado para el procesamiento postraduccional, característico de células animales y vegetales y es posible llevar a cabo la secreción de las proteínas recombinantes al medio de cultivo con relativa facilidad. Las proteínas heterólogas pueden ser dirigidas por la ruta de secreción fusionando sus formas maduras a la secuencia prepro del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* y de esta manera el plegamiento, la formación de puentes disulfuro y la glicosilación toma lugar durante la secreción. (4).

Los sistemas de expresión que emplean a *S. cerevisiae* son usualmente limitados por sus bajos niveles de producción. La levadura *Pichia pastoris* retiene todas las ventajas de *S. cerevisiae* pero además cuenta con las herramientas necesarias para llevar a cabo niveles de producción de 10 a 100 veces mayores (6).

*Pichia pastoris* tiene la capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono, por lo que se considera metilotrófica. La habilidad de las levaduras para utilizar metanol como única fuente de carbono para el crecimiento ha sido determinada en varios géneros tales como *Hansenula*, *Candida*, *Torulopsis* y *Pichia*. La ruta metabólica para la conversión de metanol a

dióxido de carbono y agua involucra a las enzimas alcohol oxidasa, catalasa, formaldehído deshidrogenasa, S-formil-glutatión hidrolasa y formiato deshidrogenasa (7). En la primera etapa del metabolismo del metanol, éste se oxida a formaldehído empleando la enzima alcohol oxidasa y oxígeno molecular como donador de electrones, generándose peróxido de hidrógeno. La enzima alcohol oxidasa tiene poca afinidad por el O<sub>2</sub>, lo cual es compensado con la síntesis de grandes cantidades de esta enzima, llegando a representar el 35% de la proteína total celular (8). Existen dos genes en *P. pastoris* que codifican para la alcohol oxidasa, los genes *AOX1* y *AOX2*. Las proteínas producto de ambos tienen una similitud del 97% y poseen aproximadamente la misma actividad específica. Sin embargo, la gran mayoría de los transcritos provienen del gen *AOX1*; por lo tanto la alcohol oxidasa que es responsable de casi toda la degradación del metanol es la codificada por *AOX1* (6).

La expresión del gen *AOX1* está apagada en medios de cultivo que tienen como fuente de carbono etanol, glicerol, o glucosa pero su expresión es estimulada cuando la fuente de carbono es metanol, debido a la activación del promotor de dicho gen por el metanol (6), siendo este último el elemento regulatorio más empleado para dirigir la biosíntesis de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*.

En base a las características de este proceso metabólico, la compañía The Phillips Petroleum Company desarrolló un sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes, el cual consiste de vectores de integración que portan el gen heterólogo de interés bajo el control del promotor del gen *AOX1* y cepas mutantes auxotróficas de *Pichia pastoris*. Los vectores de integración poseen secuencias nucleotídicas que permiten la integración sitio dirigida de éste al genoma de la levadura, siendo posible inducir la expresión del gen heterólogo al añadir el metanol como única fuente de carbono.

Los elementos de un vector característico de este sistema (Fig.1) son los siguientes: Promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5'*AOX1* y 3'*AOX1* TT, respectivamente), región 3' del mismo (3'*AOX1*), gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) también de *P. pastoris* el cual sirve como marcador de selección en cepas de *P. pastoris* mutadas en este gen (*his4*). Además para la secreción de la proteína al medio de cultivo se utilizan vectores que poseen una secuencia señal tal como la del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* o la secuencia señal de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* (*PHO1*). Finalmente los vectores también contienen secuencias necesarias tanto para su propagación en

de *his4*. Aun así del 5 al 30% de las clonas son verdaderos remplazamientos ( $Mut^S$ ), mientras que las restantes tienen integraciones en *AOXI* o *HIS4* y son  $Mut^+$ . Finalmente del 1 al 10% de los clones  $Mut^S$  tienen más de 30 copias integradas (9).

Las fermentaciones de *P. pastoris* recombinante se llevan a cabo en dos fases. En la primera fase, se busca el aumento de masa celular empleando un medio de cultivo mínimo, siendo la fuente de carbono glicerol o glucosa. En esta etapa se encuentra reprimida la producción de la proteína recombinante debido a que el promotor del gen *AOXI* que dirige la síntesis se encuentra apagado. En la segunda fase, este promotor se activa al agregar metanol al medio y convertirse en la única fuente de carbono disponible, siendo en esta etapa cuando se produce la proteína recombinante.

El sistema de expresión de *P. pastoris* ha sido exitosamente utilizado para producir numerosas proteínas heterólogas (Tab. III) con una variedad de esquemas de fermentación (6). En la producción intracelular del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) con una cepa  $Mut^S$  de *Pichia pastoris*, a nivel matraz, se obtuvieron concentraciones de 2.3 mg/L. En este sistema se empleó un medio definido con 2% de glicerol hasta que el cultivo alcanzó una densidad de  $5 \times 10^7$  células/mL, en seguida se cambió el medio por uno similar pero en el que metanol al 0.5% reemplazó al glicerol como única fuente de carbono, manteniéndolo durante 200 h a una densidad de  $1 \times 10^8$  células/mL por dilución periódica con medio fresco. Utilizando un sistema similar pero a altas densidades celulares y en fermentadores, se obtuvieron concentraciones de 0.4 g/L de HBsAg (Tab. III) lo cual representa una concentración 200 veces más alta que la obtenida en matraz (10). En fermentaciones de lote alimentado, la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) con una cepa  $Mut^S$  de *Pichia pastoris* con múltiples copias del cassette de expresión integrado al genoma alcanzó concentraciones finales de hasta 10 g/L de medio (Tab. III). En cultivos continuos se observó una productividad volumétrica de 0.108 g/L-h (11). Con una cepa  $Mut^+$  de copia sencilla y llevando a cabo fermentaciones de lote alimentado se llegaron a obtener concentraciones de lisozima c2 de 0.58 g/L. Al cambiar de lote alimentado a una etapa de cultivo continuo durante aproximadamente 1 semana, se obtuvieron concentraciones promedio de 0.35 g/L y productividades volumétricas de  $13 \pm 2$  mg/L-h (12). Para la producción del fragmento C de la

toxina tetánica se utilizó una cepa Mut<sup>s</sup> conteniendo 14 copias del cassette de expresión, y en fermentaciones de lote alimentado se alcanzó una producción de 12 g/L (13).

**Tabla III.** Niveles de producción de proteínas recombinantes sintetizadas en *Pichia pastoris*.(6).

Proteína	Producción (g/L)
Frag. C de toxina tetánica	12.0
Factor de necrosis tumoral	10.0
Interleucina humana 2	4.0
Albúmina sérica humana	4.0
Invertasa	2.5
Inhibidor de proteasas Kunitz	1.0
Análogo de la apoproteína	0.8
Lisozima c2	0.58
Factor de crecimiento epidérmico murino	0.45
Ag de superficie de Hepatitis B	0.4

La mayor ventaja de expresar proteínas heterólogas en *P. pastoris* mediante secreción es que esta levadura secreta niveles muy bajos de proteínas nativas. Esto significa que la mayor parte del medio de cultivo comprenderá a la proteína de interés y esto sirve como un primer paso en la purificación de dicha proteína (6).

### 1.5 Tripsina

La tripsina es una endopeptidasa digestiva, miembro de la familia de las serin-proteasas, la cual se caracteriza por un mecanismo catalítico común que involucra la presencia de una triada catalítica compuesta por residuos de serina, histidina y ácido aspártico. Esta enzima proteolítica en los mamíferos es sintetizada en el páncreas y secretada en el intestino delgado como un precursor inactivo (zimógeno) llamado tripsinógeno, el cual mediante la pérdida de los primeros siete aminoácidos por corte proteolítico origina la tripsina activa de 24 kDa. La

tripsina hidroliza los enlaces peptídicos selectivamente en el extremo carboxilo de residuos lisina o arginina (14).

La importancia de la tripsina en muchos procesos biológicos y aplicaciones industriales tales como digestión, evolución, adaptación de dietas, y procesamiento de alimentos, han hecho de esta enzima objeto de intenso estudio en especies de vertebrados (15, 16) e invertebrados (17, 18, 19).

La tripsina ha sido tradicionalmente usada en el proceso de curtido de pieles para proporcionar suavidad y plegabilidad. Junto con la colagenasa, se utiliza para eliminar los tejidos muertos de heridas, quemaduras, úlceras. Además, estas limpian efectivamente heridas abiertas mediante remoción de material externo y tejido muerto, permitiendo una rápida cicatrización de la herida. También se ha empleado para acelerar el crecimiento de nuevos tejidos e injertos de piel así como para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos contaminantes (20). La tripsina se ha utilizado con éxito para solubilizar las proteínas del suero de quesería desnaturalizadas por calor, recuperando éstas antes de que se complete la reacción con un adsorbente de afinidad ligado a celulosa (21).

### 1.5.1 Tripsina de camarón

La tripsina de camarón fue primeramente detectada en la glándula digestiva de *Litopenaeus setiferus* (22) y más tarde aislada y caracterizada de otras especies del género *Litopenaeus* (23, 24). En la glándula digestiva de *Litopenaeus japonicus*, la tripsina representa aproximadamente el 6 % del total de proteínas solubles, por lo que resulta una de las proteasas más importantes en este organismo (25).

El mecanismo de activación para enzimas digestivas por rompimiento proteolítico específico ha sido extensamente estudiado en especies de mamíferos; sin embargo, no existen datos suficientes para confirmar la presencia de zimógenos en tripsinas de crustáceos, aunque la caracterización del ADNc de *Penaeus vannamei* recientemente renombrado *Litopenaeus vannamei* provee la primera descripción de una probable secuencia de un zimógeno en especies de crustáceos (26).





## 1.6 Producción de tripsina

Actualmente la principal forma de producción de tripsina que se encuentra en el mercado para cualquiera de los usos antes mencionados, es mediante su obtención a partir de tejido pancreático de animales en sacrificio ya sea bovino o porcino, sin embargo a pesar de que se emplean varios procesos unitarios para su purificación, las preparaciones de tripsina obtenidas contienen actividades trazas de otras enzimas proteolíticas pancreáticas que son indeseables en algunos procesos industriales o de laboratorio (29). Adicionalmente los estrictos lineamientos y regulaciones de la FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos y otros organismos internacionales han conducido a la necesidad de uso de tripsina pura de origen recombinante sobre todo en el procesamiento de proteínas para uso farmacéutico y en investigación (29).

Por lo tanto muchos investigadores se han enfocado a la tarea de producir tripsina en forma recombinante con el fin de contar con una fuente pura y homogénea de tripsina sin otras actividades traza y por supuesto tratar de mejorar el proceso, aumentando productividad y disminuyendo costos. Sin embargo en el caso específico de la tripsina ha sido difícil su producción en forma recombinante y en la mayoría de los casos se ha encontrado una producción muy baja (30).

Higaki y cols. empleando *Escherichia coli* observaron una producción de 0.03 mg/L de tripsina de rata. A pesar de que la proteína era producida en forma inactiva como proteína de fusión, cuando ésta era secretada al periplasma había ruptura del péptido señal activándose la tripsina. La observación de lisis celular durante el crecimiento en conjunto con la expresión génica sugirió que la causa fue la actividad proteolítica de la tripsina sobre proteínas celulares. Otras posibles causas responsables de la baja producción incluyen: autodigestión de tripsina, inadecuada formación de los seis puentes disulfuro o incluso degradación del producto recombinante por proteasa endógenas periplásmicas (31). Yee y Blanch emplearon el mismo sistema de Higaki y cols. para producir tripsina de rata en fermentador empleando tecnologías de altas densidades celulares en una fermentación de lote alimentado. La producción volumétrica de tripsina de rata fue de 56 mg/L alcanzando una densidad celular de 92 g de peso seco de biomasa/L de medio de cultivo, cifra más alta alcanzada para una cepa recombinante de *Escherichia coli* hasta ese momento. Esto se logró cuando se inició la

inducción en la fase logarítmica tardía. Sin embargo, cuando el cultivo fue inducido en la fase logarítmica temprana la producción de tripsina fue de 13 mg/L y la densidad celular final fue de 14 g de peso seco de biomasa/L de medio de cultivo (32). Woldike y cols. en 1999 describieron la producción de tripsinógeno humano y porcino en hongos filamentosos del género *Aspergillus* sin presentar los niveles de producción obtenidos (30).

Recientemente se llevó a cabo la producción de análogos de tripsinógeno bovino en *Pichia pastoris*, entre otros hospederos, usando ADNc's modificados en su secuencia del péptido líder. Estas modificaciones consistieron en sustituir la secuencia del péptido líder natural por 2 a 6 aminoácidos diferentes de arginina o lisina. De esta manera el precursor de tripsina producido fue inactivo y bastante estable a diferencia del precursor natural (el tripsinógeno) por lo que no causaba problemas a la cepa hospedero. Posteriormente el precursor inactivo producido fue tratado con una aminopeptidasa para activarlo (29).

Distintos reportes mencionan las dificultades encontradas al tratar de producir tripsina en forma recombinante, siendo los problemas más comunes: actividad proteolítica contra proteínas endógenas del hospedero, inestabilidad de la proteína, autodigestión de tripsina, inadecuado plegamiento y degradación del producto recombinante por proteasa endógenas. Es por ello que se han empleado estrategias como el uso de precursores inactivos naturales o modificados y sistemas con promotores inducibles para poder realizar fermentaciones de alta densidad celular antes de inducir la producción de tripsina.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

## 1.7 Importancia del proyecto

Con estos antecedentes se planteó la necesidad de llevar a cabo la producción de tripsina de camarón en un sistema recombinante y así contar con una fuente pura y homogénea de dicha enzima para su posterior aplicación.

En el presente proyecto se decidió usar el sistema de *Pichia pastoris* debido a que este sistema cuenta con un promotor finamente regulable, el que se puede inducir hasta tener una densidad celular deseada, lo que puede ser útil si la proteína heteróloga es tóxica, se han producido y secretado algunas proteasas entre ellas la enterokinasa bovina la cual es una serin-proteasa y ha demostrado ser un eficiente sistema de expresión.

## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS

#### 2.1 Objetivo general

Construir cepas recombinantes de *Pichia pastoris* portadoras del ADNc de tripsina o tripsinógeno de camarón (*Litopenaeus vannamei*), que sean capaces de producir y secretar dichas proteínas.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

1. Construir dos vectores de integración, uno portador del ADNc que codifica para la tripsina y otro portador del ADNc que codifica para el tripsinógeno de camarón (*Penaeus vannamei*).
2. Transformar la cepa GS115 de *Pichia pastoris* con los vectores construidos cada uno por separado.
3. Llevar a cabo fermentaciones a nivel matraz.
4. Realizar una caracterización biológica y fisicoquímica del producto recombinante producido.

#### 2.1.2 Objetivos específicos adicionales

1. Determinar los posibles factores que afectan la producción de la proteína de interés.
2. Búsqueda condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinantes.

## CAPÍTULO 3

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Area de Trabajo, Reactivos y Material Biológico

El trabajo experimental se desarrolló principalmente en el laboratorio de Química Biomolecular y otros laboratorios pertenecientes al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Bioquímica de la U.A.N.L.

Las enzimas de restricción utilizadas y otras enzimas para uso en Biología Molecular fueron adquiridas de Lakeside (*México D.F.*), Promega Corporation (*Madison WI EUA*), Bethesda Research Laboratories (*Gaithersburg MD, EUA*) y Stratagene (*La Jolla CA*). Otras enzimas tal como la catalasa, peroxidasa, alcohol oxidasa y tripsina provienen de Sigma Chemical Co. (*St Louis Mo, EUA*).

Los reactivos para las diferentes soluciones provienen de Sigma Chemical Co. (*St Louis Mo, EUA*), Merck de México (*Monterrey, N.L.*) y Productos Químicos *Monterrey (Monterrey, N.L. Méx.)*. Los medios de cultivo provienen de Difco (*Detroit, MI, EUA*) y Becton Dickinson de México, S.A. de C.V. (*Edo. de México, Méx.*). El estuche de "Geneclean" se adquirió de Bio-101 (*La Jolla Ca, EUA*). El sistema de expresión de *Pichia pastoris* se adquirió de Invitrogen Corporation (*San Diego Ca, EUA*). El plásmido portador del ADNc de tripsina fue donado por el grupo de investigación del Dr. Alain Van Wormhoudt (*Marine Biology Laboratory, College de France, Concarneau, Cedex, Francia*).

#### 3.2 Equipo

Los equipos empleados para el desarrollo de este trabajo fueron: Una Estufa FELISA mod. 131, un horno de microondas GoldStar modelo MA-857M (*Seul, Corea*), microcentrifugas Eppendorf modelo 5415 y Hermle modelo Z180 M (*National Labnet Co.*), una fuente de poder Biorad 200/2.0 (*Nebraska, EUA*), un agitador de tubos Barntead/Termolyne modelo Maxi Mix (*Iowa, EUA*), una balanza granataria digital marca Sartorius modelo PT600 (*Camibh Göttingen Germany*), balanza analítica Mettler modelo AE163 (*New Jersey EUA*), un Liofilizador marca Labonco Corporation modelo 78100-00 (*Missouri, EUA*), un

Termociclador Hybaid PCR Sprint (*Hybaid UK*), una Centrifuga Servall SS4 rotor SS34 (*Connecticut, EUA*), un bloque de calentamiento Thermolyne tipo 17600 modelo DB17615 (*Iowa, EUA*), un ultramicrotomo LKB Ultratome, un microscopio electrónico Zeiss modelo EM109, un transiluminador de luz ultravioleta Vilber Lourmat (*Cedex Francia*), espectrofotómetros Sequoia Turner modelo 340 (*Taiwan*), Beckman DU-70 y Spectronic Genesys 2.

El procesamiento de datos se realizó en una computadora Compaq Presario 2253. Se utilizó el procesador de texto Microsoft Word for Office 97, procesadores de gráficos Microsoft Power Point for Office 97 y hoja de cálculo Microsoft Excel for Office 97 (© 1983-1997 Microsoft Corporation). La toma de imágenes de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se realizó con una cámara Kodak DC40 (*New York, EUA*). Para la captura de imágenes de geles de proteínas o Western blot se empleó un equipo HP ScanJet 3200C. El análisis de imágenes se realizó con el programa computacional Kodak Digital Science 1D versión 2.0.2. (*New Haven CT, EUA*).

Los programas computacionales de Biología Molecular fueron: *Amplify* versión 1.0 (©1992 University of Wisconsin Genetics M, Madison, Wi, EUA), *DNA Strider*™ 1.1 (©1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *Oligo* versión 4.0 (© 1992, Plymouth, Mn, EUA).

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.3 Metodología

#### 3.3.1 Estrategia General

La estrategia general fue realizada de acuerdo a las siguientes etapas: a) Construcción de los vectores pPIC9Tr (portador del ADNc de tripsina de camarón) y pPIC9Tg (portador del ADNc de tripsinógeno de camarón) mediante amplificación de los ADNc's y clonación de los mismos en un vector de expresión, b) Análisis de los vectores construidos mediante caracterización enzimática, c) Transformación de *P. pastoris* GS115 con los vectores construidos pPIC9Tr y pPIC9Tg, d) Caracterización de los genotipos y fenotipos de las cepas recombinantes obtenidas, e) Determinación de posibles factores que afecten la producción de las proteínas heterólogas y f) Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de las proteínas heterólogas. Una representación esquemática de la estrategia general y sus etapas se muestra en la figura 3.

#### 3.3.2 Construcción de vectores

El vector conteniendo el ADNc completo codificante para tripsinógeno de camarón (*Litopenaeus vannamei*) obtenido por el grupo de Alain Van Wormhoudt (28) fue enviado a nuestro laboratorio, en donde se propagó de la siguiente manera: se realizó una transformación de una cepa de *E. coli* TOP10F' con el plásmido donado, posteriormente una de las clonas transformadas se cultivo en 100 mL de medio LB y se realizó aislamiento de ADN plasmídico a mediana escala de acuerdo al método descrito por Morelle (33). La estrategia de construcción de los vectores de expresión (Fig. 4) consistió en amplificar por PCR tanto el ADNc de la tripsina como el del tripsinógeno empleando como templado el vector donado. Los productos amplificados contaban con los sitios de restricción *Xho* I y *Avr* II que fueron previamente introducidos deliberadamente en los iniciadores empleados. De esta manera los ADNc tanto de tripsina como de tripsinógeno se introdujeron en los sitios *Xho* I y *Avr* II del vector de expresión pPIC9hGH22K sustituyendo de esta manera el fragmento hGH22K (Fig. 4).

Además para realizar el diseño de los iniciadores se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- A) Que los iniciadores contaran con los sitios de restricción apropiados para su clonación, es decir que el iniciador 5' poseyera el sitio *Xho* I mientras que el iniciador 3' contara con el sitio *Avr* II.
- B) Que los iniciadores contaran con 3 nucleótidos adicionales posteriores al sitio de restricción
- C) Que al alimentar el programa Amplify versión 1.0 con la secuencia de los oligonucleótidos y la secuencia molde, la simulación de la PCR resulte positivo y sin bandas inespecíficas.

Las temperaturas de fusión de los oligonucleótidos ( $T_m$ ) calculadas con el programa computacional Oligo 4.0, fueron útiles para calcular la temperatura de apareamiento óptima teórica ( $T_{ap}$ ), esta última calculada empleando el programa Microsoft Excel for Office 97 mediante la siguiente ecuación (34):

$$T_{ap} = 0.3 T_{mp} + 0.7 T_{mf} - 14.9$$

donde  $T_{mp}$  es la temperatura de fusión más baja de los oligonucleótidos y  $T_{mf}$  es la temperatura de fusión del fragmento amplificado. Para calcular la temperatura de fusión del fragmento amplificado se usó la siguiente ecuación (35).

$$T_{mf} = 16.6 \log (X^+) + 0.41 \%GC - 675/L + 81.5$$

donde ( $X^+$ ) es la concentración molar de  $K^+$  en el ensayo de PCR (0.5 mM), %GC es el porcentaje de G + C en el fragmento amplificado y L es la longitud de dicho fragmento antes calculados con el programa Amplify 1.0.

### 3.3.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa se emplearon los iniciadores previamente diseñados y mandados a sintetizar (Biosynthesis Inc): B251-3 (5' tripsina), B251-1 (5' tripsinógeno) y B251-2 (3' tanto para tripsina como para tripsinógeno). El ADN molde fue el plásmido donado por Van Wormhoudt y propagado en el laboratorio (28) conteniendo el ADNc de tripsinógeno de camarón. El primer paso fue llevar a cabo la estandarización de la PCR empleando la enzima *Taq* DNA polimerasa (Promega Co.), se varió principalmente la concentración de ADN molde, temperatura de apareamiento y número de ciclos. La mezcla de reactivos para la PCR estandarizada fue la indicada en la Tabla V.

**Tabla V. Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con *Taq* DNA polimerasa para la amplificación de productos a clonar.**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Buffer 10X de PCR	2.5	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Primer 5' (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
Primer 3' (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5	1.5 mM
<i>Taq</i> polimerasa (5 u/ $\mu\text{L}$ )	0.2	0.04 u/ $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	13.3	-
ADN molde (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	2	4 ng/ $\mu\text{L}$
Volumen final	25	-

El programa llevado a cabo para la amplificación del ADNc de tripsina fue el siguiente: 1 ciclo 94°C (2 min), 30 ciclos 94°C (1 min) 60°C (1 min) 72°C (1 min), 1 ciclo 72°C (7 min). Para la amplificación del ADNc de tripsinógeno se empleó la misma programación de temperaturas y tiempos que en el caso del ADN de tripsina a excepción de la temperatura de apareamiento que en lugar de 60°C fue de 63°C. El producto de la PCR se analizó (5  $\mu\text{L}$ ) por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE.



Posteriormente se emplearon esas mismas condiciones estandarizadas pero empleando 1.25 unidades totales por reacción de la enzima *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene) en lugar de *Taq* DNA polimerasa y además el buffer para la enzima *Pfu* DNA polimerasa ya incluía el cloruro de magnesio. Se empleo esta enzima debido a que incorpora un numero menor de de nucleótidos erroneos al producto amplificado que la *Taq* DNA polimerasa.

El producto amplificado obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE y posteriormente se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio 2 µg/mL en TBE.

### 3.3.2.3 Clonación de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno en pPIC9

Los productos amplificados así como el plásmido pPIC9hGH22K (Escamilla 2000) fueron digeridos con las enzimas *Xho* I y *Avr* II siguiendo las indicaciones de la casa comercial y posteriormente fueron sujetos a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en TBE. Empleando un bisturí se recortó del gel de agarosa las bandas del ADNc de tripsina del ADNc de tripsinógeno y el vector digerido, se sometieron a una purificación empleando la técnica de "GeneClean" (The GeneClean II Kit Bio 101, Inc.). Posteriormente, se llevaron a cabo las reacciones de ligación empleando los fragmentos purificados: el fragmento de tripsina (726 pb) con el vector digerido (7984 pb) para generar el plásmido pPIC9Tr y el fragmento de tripsinógeno (768 pb) con el vector digerido (7984 pb) para generar el plásmido pPIC9Tg. La reacción de ligación se llevó a cabo en una proporción molar aproximada de 1:10 (vector: fragmento de tripsina o tripsinógeno), siendo aproximadamente el vector con un peso molecular 10 veces mayor a los fragmentos, la proporción molar 1:10 se obtenía cuando se agregaba a la reacción de ligación las mismas cantidades en ng tanto de vector como de fragmento. La mezcla de reactivos de la reacción de ligación se muestra en la Tabla VI.

Tabla VI. Mezcla de reacción de ligación.

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Fragmento de tripsina o tripsinógeno (80 ng/ $\mu\text{L}$ )	3
Vector (80 ng/ $\mu\text{L}$ )	3
Buffer de ligasa 5 X	4
T4 DNA Ligasa 40 U/ $\mu\text{L}$ (Gibco BRL)	1
H <sub>2</sub> O Milli-Q	9
Volumen total	20

Después de realizar esta mezcla se incubó durante una hora a 37 °C y se corroboró la ligación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, para visualizar la ausencia de los fragmentos de ligación y la presencia de bandas de mayor peso molecular. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* TOP 10F' con una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  de producto de ligación usando bacterias calcio-competentes preparadas de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook 1989 (36).

De las colonias obtenidas de la transformación (resistentes a ampicilina) se levantaron 20 de cada transformación (con pPIC9Tr y con pPIC9Tg) y se inocularon individualmente en tubos con 4 mL de caldo LB (1% p/v de triptona, 0.5% p/v de extracto de levadura y 1% p/v de NaCl) con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se incubaron a 37°C y a 250 rpm durante 18 h. Posteriormente se tomaron 2 mL de cada cultivo y se realizó aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala de acuerdo al método descrito por Morelle (33). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los ADN's plasmídicos aislados se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron empleando un transiluminador de luz UV. Los ADN's plasmídicos que presentaban bandas de mayor tamaño se sometieron a digestión con la enzima *Pst* I siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se realizó el análisis de los fragmentos obtenidos por electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE. Los fragmentos teóricos según el análisis computacional empleando el programa DNA Strider alimentado con la secuencia de pPIC9Tr, pPIC9Tg o pPIC9hGH22K se muestra en la tabla VII.

**Tabla VII.** Tamaño de los fragmentos teóricos obtenidos al digerir cada uno de los plásmidos con la endonucleasa *Pst* I

Plásmido	Tamaño de fragmentos (pb)
pPIC9Tr	6217, 1827 y 668
pPIC9Tg	6217, 1827 y 710
pPIC9hGH22K	6217, 1827 y 365

Las clonas de *E. coli* que contenían los vectores ya caracterizados pPIC9Tr (tripsina) y pPIC9Tg (tripsinógeno), se cultivaron en 100 mL de medio LB durante 18 h a 37°C y agitación constante de 250 rpm, se obtuvo el paquete celular y se realizó aislamiento de ADN plasmídico a mediana escala (33). Los ADN's plasmídicos obtenidos se utilizaron para la transformación de células de *Pichia pastoris*.

### 3.3.3 Transformación de *Pichia pastoris* GS115

Para llevar a cabo la transformación de células de *Pichia pastoris* se recomienda usar vectores linearizados, que expongan las regiones susceptibles a recombinación, por lo tanto los vectores pPIC9Tr y pPIC9Tg fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sac* I o *Sal* I siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. La linearización de los plásmidos fue corroborada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE. El plásmido linearizado con *Sac* I favorece la inserción génica en el locus *AOX1* y el plásmido linearizado con *Sal* I favorece la inserción génica en el locus *his4* (9). Las células de *Pichia pastoris* GS115 fueron transformadas por la técnica de formación de esferoplastos (37), la cual consistió en eliminar la pared celular mediante acción de la enzima líticasa (Sigma Co.) y poner en contacto el ADN plasmídico lineal con las células sin pared celular (esferoplastos) en presencia de polietilenglicol para facilitar la entrada del ADN. La preparación se inoculó en un medio de recuperación. Se incubó a 30°C y las colonias aparecieron de 3 a 6 días.

### 3.3.3.1 Crecimiento celular

Células de *Pichia pastoris* cepa GS115 se inocularon por estrías en placas con YPD para aislar colonias sencillas y posteriormente crecerlas de forma individual. La placa se incubó a 30°C por dos días. Se transfirió una colonia de *Pichia pastoris* cepa GS115 a un matraz de 100 mL, conteniendo 10 mL de YPD caldo y se dejó crecer durante toda la noche con agitación a 250 rpm a 30°C. Posteriormente, se inocularon tres matraces diferentes de 500 mL cada uno, conteniendo 200 mL de medio YPD caldo, con 5, 10 y 20  $\mu$ L de células del cultivo de toda la noche. Los matraces se incubaron nuevamente durante toda la noche a 30°C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente se midió la DO<sub>600</sub> de cada uno de los tres cultivos, las células que alcanzaron una DO<sub>600</sub> entre 0.2 y 0.3 se cosecharon por centrifugación a temperatura ambiente durante 10 min a 1500 g. La pastilla de células se resuspendió en 20 mL de agua estéril y se cosechó nuevamente por centrifugación a 1500 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, y la pastilla de células se utilizó para preparar los esferoplastos (37).

### 3.3.3.2 Formación de esferoplastos

Primero se lavó la pastilla con 20 mL de SED (19 mL de SE [1M sorbitol, 25 mM de EDTA, pH 8] y 1 mL de DTT 1M) preparado en fresco, y se centrifugó a 1500 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 20 mL de sorbitol 1 M, se centrifugó a 1500 g, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron finalmente en 20 mL del amortiguador SCE (1 M sorbitol, 1 mM de EDTA y 10 mM de amortiguador de citrato de sodio, pH 5.8) por agitación suave. La suspensión se dividió en dos tubos falcon de 50 mL, uno de ellos se mantuvo en hielo (tubo A), mientras que el otro (tubo B) se utilizó para monitorear la formación de esferoplastos mediante el tratamiento con líticasa (Sigma Chemical Co.). La líticasa es una enzima que digiere pared celular y hace extremadamente frágiles las células por lo que se deben manejar con cuidado. La digestión de la pared celular empieza al momento de la adición de la líticasa. Se ajustó el espectrofotómetro a cero de absorbancia utilizando como blanco 800  $\mu$ L de SDS al 5% y 200

$\mu\text{L}$  de SCE (Sorbitol 1 M, EDTA 1 mM y amortiguador de citrato de sodio 10 mM, pH 5.8). Se preparó un juego de 9 tubos de microcentrifuga estériles y marcados como: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, y 50, a los cuales se les agregó 800  $\mu\text{L}$  de SDS al 5%. Se retiraron 200  $\mu\text{L}$  de células contenidas en el tubo B y se añadieron al tubo marcado como "0". Esta muestra se utilizó como tiempo cero. Al resto de la suspensión de células del tubo B se le añadió 7.5  $\mu\text{L}$  (3 mg/mL) de liticasa, se mezcló perfectamente y se incubó las células a 30°C. La formación de esferoplastos se monitoreó de la siguiente manera: Se retiraron 200  $\mu\text{L}$  de células a los cinco minutos de tiempo (tubo B + liticasa) y se añadieron al tubo marcado "5" (con 800  $\mu\text{L}$  de SDS al 5%). Esto mismo se repitió para cada uno de los diferentes tiempos;  $t = 10, 15, 20, 25, 30, 40, \text{ y } 50$ . A cada una de las muestras se determinó la  $\text{DO}_{800}$ . Finalmente, se calculó el porcentaje de esferoplastos para cada tiempo utilizando la ecuación:

$$\% \text{ de esferoplastos} = [1 - (\text{DO}_{800} \text{ al tiempo } t / \text{DO}_{800} \text{ al tiempo } 0) \times 100]$$

Una vez determinado el tiempo mínimo de incubación donde se formaron el 70% de esferoplastos se procedió al tratamiento con liticasa del tubo remanente (tubo A en hielo). Se agregaron 7.5  $\mu\text{L}$  de liticasa (3 mg/mL) al tubo A y se incubó a 30°C durante el tiempo establecido para la formación de un 70% de esferoplastos. Los esferoplastos fueron cosechados por centrifugación a 750 g durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y los esferoplastos se lavaron con 10 mL de sorbitol 1 M (mezclando suavemente). Se centrifugó como se menciona anteriormente y los esferoplastos se resuspendieron en 0.6 mL de CaS (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ ). Esta preparación fue utilizada inmediatamente (hasta 30 min) para su transformación (37).

### 3.3.3.3 Transformación

Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  del preparado de esferoplastos en tubos falcon de 15 mL y se agregaron 10  $\mu\text{g}$  de DNA (tanto de pPIC9Tr, como de pPIC9Tg en otro tubo, ambos cortados con *Sal* I y *Sac* I,) (volumen entre 10 y 20  $\mu\text{L}$  incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 mL de solución de PEG/CaT preparada en fresco

(mezcla 1:1 de polietilenglicol al 40% y CaT [ 20 mM Tris, pH 7.5 y 20 mM CaCl<sub>2</sub> ]), se mezcló por inversión, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se obtuvieron los esferoplastos por centrifugación a 750 g durante 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y los esferoplastos se resuspendieron en 150 µL de medio SOS (1 M sorbitol, 0.3X YPD, y 10 mM CaCl<sub>2</sub> ) y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se les agregó 850 µL de sorbitol 1 M y se procedió a sembrar en la placa (37).

#### 3.3.3.4 Selección de recombinantes

Se mezclaron 200 µL de cada una de las soluciones de esferoplastos-DNA preparadas con 10 mL de agarosa fundida y se vaciaron en placas con RDB-agar (sin histidina, solo las transformantes crecen en este medio). Una vez solidificada la agarosa, las placas se invirtieron e incubaron a 30°C. La aparición de transformantes se observó de 4 a 6 días. Además se realizó una prueba de viabilidad celular, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera: Se mezclaron 100 µL de esferoplastos (sin ADN) con 900 µL de sorbitol 1 M. Posteriormente se mezclaron solamente 100 µL de esta dilución con 10 mL de agarosa fundida, esta mezcla se vertió en placas con RDHB-agar (con histidina). Una vez solidificada la agarosa, las placas se invirtieron e incubaron a 30°C. La aparición de colonias se observó de 4 a 6 días. Este método proporciona una selección inicial de transformantes HIS4<sup>+</sup>, ya que solamente las células que integraron en su genoma el vector de integración (conteniendo el cassette de expresión), podrán crecer en medio carente de histidina (37).

#### 3.3.4 Caracterización de genotipos y fenotipos de las clonas recombinantes

La caracterización genotípica se realizó verificando la integración del vector de expresión en el genoma de cuatro cepas que contenían el ADNc de tripsina (GS115-Tr) y cuatro cepas que contenían el ADNc de tripsinógeno (GS115-Tg) mediante ensayos de PCR. La caracterización

fenotípica se realizó mediante la inducción del gen clonado y la caracterización de su producto recombinante en éstas mismas cepas.

### 3.3.4.1 Verificación de la integración del vector de expresión

#### 3.3.4.1.1 Aislamiento de ADN genómico de *Pichia pastoris*

Para la extracción de ADN genómico de *P. pastoris*, se empleó una modificación a la técnica de TSNT (38): Las levaduras se crecieron en 4 mL de caldo YPD durante 24–48 h, se cosechó el paquete celular por centrifugación durante 5 min a 16,000 g y se lavó con 500 µL de agua Milli-Q. Al paquete celular se resuspendió en 300 µL de solución TSNT (Tritón X-100 al 2 %, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM, pH=8), se dejó reposar a 37°C durante 1 h, posteriormente se agitó en vortex a máxima velocidad durante 2 min, se agregó 650 µL de fenol saturado y se mezcló en vortex durante 1 min. Posteriormente se agregaron 650 µL de Sevag (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) y se agitó en vortex durante 1 min y 5 min más por inversión. Una vez concluida la agitación, se añadieron a la mezcla 300 µL de TE pH=8 y se procedió a centrifugar por 10 min a 16000 g. Se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrifuga de 2 mL y se precipitó el ADN agregando 1.3 mL de etanol al 100%. Se centrifugó por 10 min a 16000 g y se decantó el sobrenadante. La pastilla de ADN se resuspendió en 500 µL de TE, se le agregaron 6 µL de una solución de RNAsa (1 mg/mL) y se incubó 15 min a 37°C. Se realizaron dos extracciones cada una con 500 µL de fenol-sevag, se separó la fase acuosa por centrifugación durante 5 min y 16,000 g, se transfirió a un tubo nuevo al que se le añadieron 10 µL de acetato de amonio 7.5 M y 1.3 mL de etanol al 100% para precipitación del ADN, se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 min a 16000 g para decantar el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con etanol al 70 % y se resuspendió en 50 µL de TE.

El ADN genómico obtenido fue sometido a una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en TBE junto con estándares de fago λ para la construcción de una curva de calibración y de esta manera realizar la cuantificación del ADN genómico aislado por densitometría de los geles, con la ayuda del programa computacional Kodak Digital Science 1D versión 2.0.2.

### 3.3.4.1.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los ADN's genómicos de cuatro cepas recombinantes portadoras del ADNc de tripsina y cuatro cepas recombinantes portadoras del ADNc de tripsinógeno fueron analizados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para corroborar la integración del plásmido pPIC9Tr y pPIC9Tg, respectivamente, en el genoma de las cepas GS115 de *P. pastoris*. El iniciador 57 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') se aparea en la región 5' *AOXI* (nucleótido 855-875) del plásmido pPIC9, el iniciador 58 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') se aparea en la región 3' *AOXI TT* (nucleótido 1327-1347) del mismo. Ya que en la PCR del plásmido pPIC9 resulta un producto amplificado de 493 pb y el sitio de policlonación de pPIC9 se encuentra entre las dos regiones de apareamiento de los iniciadores, el fragmento clonado causa un aumento del tamaño del producto amplificado y a su vez se le resta el pequeño fragmento que se pierde con el corte *Xho* I + *Avr* II. Por lo tanto, el análisis teórico de la amplificación con el plásmido pPIC9Tr genera un producto amplificado de 1183 pb (493 del vector, 726 del fragmento amplificado y digerido con *Xho* I - *Avr* II restandole 36 nucleótidos liberados al cortar el plásmido pPIC9 con *Xho* I - *Avr* II ) de mientras que el del plásmido pPIC9Tg genera un producto amplificado de 1229 pb (493 + 768 - 36). El análisis teórico de la PCR del ADN genómico de *P. pastoris* no recombinante da por resultado un producto de 2105 pb proveniente de la amplificación del gen *AOXI*. La PCR de ADN genómico de cepas recombinante que conservan el gen *AOXI* (Mut<sup>+</sup>), da por resultado el productos del gen *AOXI* (2105) y el producto que proviene del vector recombinante 1183 pb para cepas GS115-Tr y de 1225 para cepas GS115-Tg correspondientes. Los volúmenes de los diferentes reactivos empleados en la PCR se muestran en la tabla VIII.



**Tabla VIII Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR para comprobar la integración de los vectores construidos al genoma de *P. pastoris*.**

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Buffer 10X de PCR	2.5	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.2 mM
Primer 5' (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
Primer 3' (5 $\mu\text{M}$ )	2.5	0.5 $\mu\text{M}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5	1.5 mM
Taq polimerasa (5 u/ $\mu\text{L}$ )	0.2	0.04 u/ $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	13.3	-
ADN molde (50 ng/ $\mu\text{L}$ )	2	4 ng/ $\mu\text{L}$
Volumen final	25	-

Se empleó un termociclador Hybaid PCR Sprint (Hybaid UK), con la siguiente programación de tiempos y temperaturas: 1 ciclo 94°C (2 min), 30 ciclos 94°C (1 min) 60°C (1 min) 72°C (2 min), 1 ciclo 72°C (10 min). El producto de la PCR se analizó (5  $\mu\text{L}$ ) por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 3.3.4.2 Inducción de la expresión de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno

Cuatro cepas recombinantes GS115-pPIC9KTr (tripsina) y cuatro cepas recombinantes GS115-pPIC9KTg (tripsinógeno) se inocularon en 25 mL de BMG (Fosfato de potasio 100 mM, pH 6, base nitrogenada para levaduras [YNB] 1.34 % p/v, biotina 0.4 mg/L y glicerol 1 % v/v) con cultivos con 100-200  $\mu\text{L}$  de YPD almacenados en refrigeración por no más de tres semanas, se incubaron a 30°C con agitación constante a 250 rpm hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 3 a 5, se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. (centrífuga Servall SS4 rotor SS34) y se resuspendió en BMM (Fosfato de potasio 100 mM, pH 6, base nitrogenada para levaduras [YNB] 1.34 % p/v, biotina 0.4 mg/L y metanol 0.75 % v/v) de esta manera se inició la inducción. La incubación se continuó a las mismas condiciones

durante 150 h, añadiendo 187.5  $\mu\text{L}$  de metanol al 100% (concentración final en el cultivo 0.75% de metanol) cada 24 h. Se tomaron muestras al final de la inducción para el análisis de tripsina y tripsinógeno de camarón del medio de cultivo libre de células por SDS-PAGE e inmunodetección por la técnica de Western blot.

### 3.3.4.2.1 Análisis de proteínas

Los plásmidos fueron diseñados y contruidos de tal manera que el producto fuera secretado al medio de cultivo, sin embargo se realizó tanto el análisis de proteínas extracelulares como intracelulares, en caso de que se presentara una secreción deficiente.

Se tomaron 2 mL de las fermentaciones anteriormente descritas se centrifugaron a 16,000 g por 2 min y se separó el paquete celular del medio de cultivo. El medio de cultivo libre de células fue dializado contra agua destilada. Las bolsas de diálisis con un máximo de 15 mL de medio permanecieron en un vaso de precipitados con 4 L de agua fría durante 3-4 h con agitación moderada y se realizaron tres cambios más de agua destilada. El medio se llevó a sequedad mediante una liofilización en un Liofilizador Labconco Mod. 78100-00 (Labconco Co.) y se resuspendió en 1/20-1/50 de su volumen original en buffer SDS-PAGE, se calentó durante 10 min a temperatura de ebullición, se realizó un pulso de centrifugación para sedimentar el líquido evaporado y condensado en las paredes del tubo y se aplicaron de 10 a 20  $\mu\text{L}$  en gel de poliacrilamida con la ayuda de una jeringa Hamilton.

Para realizar la electroforesis de proteínas intracelulares fue necesario lisar las levaduras empleando la siguiente procedimiento: El paquete celular fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (fosfato de sodio 50 mM pH=7.4, PMSF 1 mM, EDTA 1 mM, glicerol 5%), a la suspensión celular se le agregó un volumen igual de perlas de vidrio de 0.5 mm y se sometió a diez ciclos de agitación en vortex por 30 seg. y enfriamiento en hielo por 30 seg. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 14,000 rpm y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se mezclaron en otro tubo con 20  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra. Posteriormente se calentó dicha mezcla durante 10 min a temperatura de ebullición, se realizó un pulso de centrifugación para sedimentar el líquido evaporado y

condensado en las paredes del tubo y se aplicaron de 10 a 20  $\mu$ L para el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida.

La separación de proteínas tanto para proteínas intracelulares como extracelulares se realizó por electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida (gel separador al 12% y un gel concentrador de acrilamida al 4%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se aplicó una corriente inicial de 10 mA, cuando el colorante penetró en el gel separador se incrementó la corriente a 15 mA, así se mantuvo la electroforesis hasta que el colorante salió del gel. Se desensamblaron los vidrios que contenían el gel y éste se colocó en un contenedor con solución fijadora (metanol 50%v/v, ácido acético 10%v/v en agua destilada) para luego someterlo a agitación alrededor de 50 rpm durante 1 hora. Después se retiró la solución fijadora y se añadió la solución colorante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie 0.05% p/v, metanol 50%v/v, ácido acético 10%v/v, en agua destilada) y se agitó a 50 rpm durante 25 minutos, se retiró la solución colorante y se añadió solución decolorante (metanol 5%v/v, ácido acético 7%v/v, en agua desionizada) agitando a 50 rpm durante 1 hora. El gel se continuó decolorando con cambios periódicos de la solución decolorante, hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel.

Se realizó la técnica de inmunodetección por "western blot" con el propósito de detectar tanto tripsina como tripsinógeno de camarón empleando anticuerpos anti-tripsina de camarón. Se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) bajo las mismas condiciones anteriormente descritas en este mismo apartado. Posteriormente se llevó a cabo una electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa (0.45  $\mu$ m HAHY Millipore) por 45 min. a una corriente de 250 mA, ésta se incubó con agitación por 1 h a 40 rpm en solución de bloqueo [Leche descremada 1.5% p/v en PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.46 mM)] con el propósito bloquear en la membrana las áreas libres de proteína. La membrana se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con el primer anticuerpo, un antisuero anti-tripsina desarrollado en cobayo (donado por Van Wormouth) en una dilución 1:100 en solución de bloqueo, se le hicieron 3 lavados con PBS con agitación moderada durante 15 min cada uno. Una vez descartado el PBS del último lavado, la membrana se incubó 1 h a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo, un anti-IgG de cobayo desarrollado en conejo y conjugado con peroxidasa (Sigma Co.) en una dilución 1:1000-1:2000 en solución de bloqueo. Se realizaron 3 lavados con PBS con agitación moderada durante 15 min cada uno. Para el

revelado, la membrana de nitrocelulosa se colocó en la solución reveladora (Diaminobencidina 1 mg/mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.03% en agua destilada) preparada justo antes de usarse, hasta la aparición de las bandas de interés (~10 min). Posteriormente se lavó con abundante agua de la llave y se almacenó en la oscuridad.

### **3.3.5 Determinación de los posibles factores que afectan la producción de las proteínas de interés**

El estudio de los posibles factores que afectan la producción se realizó en una cepa recombinante portadora del ADNc de tripsina (GS115-Tr), otra portadora del ADNc de tripsinógeno (GS115-Tg) y dos cepas control: una con el vector integrado pero sin inserto recombinante (GS115-pPIC9K) (39) y otra productora de una proteína heteróloga de 22 kDa (GS115-22K) (40). El estudio detallado consistió en lo siguiente:

- a) Cinéticas de crecimiento para determinar la velocidad específica de crecimiento, tiempo de duplicación y viabilidad de las cepas a diferentes tiempos además se determinaron los tiempos de las diferentes fases del cultivo.
- b) Determinación de la actividad de las enzimas alcohol oxidasa y catalasa en la fracción soluble de lisados celulares a diferentes tiempos de cultivo.
- c) Análisis de ultraestructura por microscopía electrónica para determinar las características morfológicas de las células recombinantes a diferentes tiempos y a las condiciones de cultivo estudiadas.

#### **3.3.5.1 Cinéticas de crecimiento en medio BMM**

Para realizar las cinéticas de crecimiento en medio BMM (condiciones de inducción) fueron inoculados 4 tubos cónicos de 50 mL conteniendo 10 mL de medio YPD con varias colonias de cada una de las cepas anteriormente descritas (GS115-Tr, GS115-Tg, GS115-pPIC9K, GS115-22K), se incubaron a 30°C en agitación constante de 250 rpm durante 16-20 h. Estos cultivos se utilizaron para inocular matraces con 25 mL de medio BMG los cuales se

Para obtener las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ) se construyeron gráficas semilogarítmicas de  $\text{LnDO}_c$  vs tiempo y  $\text{LnV}_c$  vs Tiempo, se calculó la pendiente de dichas curva de crecimiento en la fase exponencial mediante el método de mínimos cuadrados. La pendiente resultante es igual las velocidades específicas de crecimiento en  $\text{h}^{-1}$ . Para calcular los tiempos de duplicación ( $t_d$ ) se aplicó la siguiente ecuación:

$$t_d = \text{Ln } 2/\mu$$

El procesamiento de datos para el cálculo de logaritmos naturales, valores corregidos de  $\text{Ln}$  velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación así como la construcción de las gráficas de las cinéticas de crecimiento se realizaron mediante la ayuda del programa Microsoft Excel for Office 97.

Cada una de las cinéticas de crecimiento se realizaron por triplicado para cada cepa, los tres valores de velocidades específicas de crecimiento y tiempos de duplicación para cada cinética se promediaron y se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación. También se construyeron gráficas promedio de cada una de las cinéticas de cada cepa tomando el valor promedio de  $\text{DO}_{600}$  y UFC/mL a cada uno de los tiempos de los tres ensayos y graficando el  $\text{Ln}$  corregido de estos valores contra tiempo. Todo este tipo de procesamiento de datos se realizaron mediante la ayuda del programa *Microsoft Excel for office 97*. Los valores de velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación entre las diferentes cepas, se compararon realizando un análisis de varianza (ANOVA) con comparaciones múltiples de Tukey con la ayuda del programa SPSS 8.0.

### 3.3.5.2 Determinación de la actividad enzimática de alcohol oxidasa y catalasa en medio BMM

Durante el crecimiento en metanol como única fuente de carbono, las enzimas alcohol oxidasa y catalasa están activas en la levadura *Pichia pastoris* (7). La alcohol oxidasa cataliza el primer paso en la degradación del metanol mientras que la catalasa se encarga de la eliminación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que se genera por el propio metabolismo del metanol. Debido a la

importancia que estas enzimas poseen durante el proceso de inducción se decidió determinar su actividad específica en las cepas descritas en el apartado anterior cultivadas en BMM.

Para la determinación de estas enzimas se tomaron muestras a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 h de un cultivo en medio BMM bajo las mismas condiciones descritas en el punto anterior. Las muestras de 1 mL de medio se centrifugaron a 16,000 g por 2 min para separar el paquete celular del medio de cultivo. El paquete celular fue lisado empleando el siguiente procedimiento: Se resuspendió en 100  $\mu$ L de buffer de lisis ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM pH=7.4, DTT 0.5 mM, PMSF 1 mM), a la suspensión celular se le agregó 0.1 g de perlas de vidrio de 0.5 mm y se sometió a diez ciclos de agitación en vortex por 30 seg. y enfriamiento en hielo por 30 seg. Posteriormente, se centrifugó durante 5 minutos a 16,000 g y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, se realizó un lavado de las perlas de vidrio y restos celulares con 300  $\mu$ L de buffer de lisis agitando vigorosamente en el vortex, se repitió el paso de centrifugación y el sobrenadante se transfirió al mismo tubo y este se llevó a un volumen final de 500  $\mu$ L de buffer de lisis. Dicha solución fue empleada para las determinaciones enzimáticas y para la determinación de proteínas totales.

La determinación enzimática de alcohol oxidasa se realizó empleando el método descrito por Janssen y Ruelius (42), que se basa en la medición de la formación del radical catiónico del compuesto 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) de amonio (ABTS). Este radical catiónico se forma debido a la acción del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el ABTS, reacción que es catalizada por una peroxidasa, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es producido por la oxidación del metanol, reacción que es catalizada por la AOX (42).

La reacción enzimática se realizó de la siguiente manera: En una celda de plástico se agregaron 1.4 mL de ABTS 2 mM y 5  $\mu$ L de peroxidasa de rábano (Sigma) 250 U/mL, se mezcló por inversión, se ajustó a cero de absorbancia a 405 nm (Espectrofotómetro Beckman DU-70), se agregaron 50  $\mu$ L de AOX 0.1 U/mL y 5  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.003%, se mezcló por inversión inmediatamente y se registró el incremento de absorbancia a 405 nm durante 5 min, también se corrió un blanco de la reacción enzimática, la cual se realizó como se mencionó anteriormente, pero en lugar de agregar 50  $\mu$ L de AOX 0.1 U/mL se agregaron 50  $\mu$ L de buffer de fosfatos 100 mM.

Se calculó el incremento de absorbancia ( $\Delta A$ ) por min. a 405 nm mediante la pendiente de la curva de absorbancia vs tiempo utilizando el método de mínimos cuadrados tanto del

ensayo blanco como del ensayo a evaluar. Se calcularon las U/mL de la AOX con la siguiente ecuación:

$$U/mL = (\Delta A_{405}/\text{minAOX} - \Delta A_{405}/\text{minAOX blanco})(1.51)(FD)/(36.8)(0.05)$$

donde FD es el factor de dilución, 1.51 es el volumen total del ensayo en mililitros, 36.8 es el coeficiente de absorción milimolar del ABTS a 405 nm y 0.05 es el volumen de muestra usado en mililitros.

Para la medición de la actividad enzimática de catalasa se empleó el método de Aebi (43), el cual se basa en la medición de la disminución de la absorbancia a 240 nm del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debido a la disminución de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la acción de la catalasa sobre este compuesto. Se mezclaron 950 µL de buffer de fosfato de potasio 50 mM pH=7.0 con 40 µL de una solución de catalasa (Sigma Chemical Co.) 14,500 U/mL, con esta mezcla se ajustó a cero de absorbancia (espectrofotómetro Spectronic Genesys 2) a 240 nm, por último se agregaron 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6%, se mezcló por inversión y se registró la absorbancia cada min. durante 5 min. a una temperatura de 25°C. Se calculó el incremento de absorbancia (ΔA) por min mediante la pendiente de la curva de absorbancia vs tiempo utilizando el método de mínimos cuadrados. Las U/mL se calcularon con la siguiente ecuación:

$$U/mL = \Delta A_{240}/\text{min} \times 692.5$$

donde 692.5 es el factor obtenido en base al coeficiente de absorción molar del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el factor de dilución de la muestra en la reacción.

También se determinó la concentración total de proteínas en cada muestra para poder calcular la actividad específica de alcohol oxidasa y catalasa (U/mg) empleando la ecuación que se muestra a continuación:

$$U/mg = (U/mL)/PT$$

donde PT es Proteínas totales (mg/mL)

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (44), empleando alícuotas de 10 a 20  $\mu\text{L}$  de la solución del lisado. Se midió la absorbancia a 595 nm que se presenta por la unión del azul brillante de Coomassie a las proteínas en un espectrofotómetro (Sequoia Turner). Se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino (ASB), en un intervalo de concentración de 1 a 9  $\mu\text{g/mL}$  (Tab. IX). Tanto las muestras como los estándares fueron preparados por triplicado.

**Tabla IX.** Curva de calibración para la determinación de proteínas de soluciones de lisados por el método de Bradford

Estándar	ASB 0.5 mg/mL ( $\mu\text{L}$ )	NaCl 0.15M ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo de Coomassie (mL)	Conc. final ASB( $\mu\text{g/mL}$ )
1	6	394	1.6	1.5
2	12	388	1.6	3.0
3	18	382	1.6	4.5
4	24	376	1.6	6.0
6	36	364	1.6	9.0
blanco	0	400	1.6	0.0

Las muestras se prepararon agregando 20  $\mu\text{L}$  de la solución de lisado, 380  $\mu\text{L}$  de una solución de NaCl 0.15 M y 1.6 mL de solución de azul brillante de Coomassie. Posteriormente fueron obtenidas las lecturas de absorbancia a 595 nm tanto de los estándares como de las muestras. Con las lecturas de los estándares se construyó una curva de calibración la que fue estimada por el método de mínimos cuadrados. En base a la curva construida, se determinó la concentración de las muestras empleando la ecuación de la recta.

El procesamiento de datos, los cálculos y la realización de las gráficas U/mL vs Tiempo (h) y U/mg vs Tiempo (h) se realizaron con la ayuda del programa Microsoft Excel for Office 97.



### 3.3.5.3 Análisis de ultraestructura por microscopía electrónica

Para realizar el análisis de ultraestructura se tomaron muestras de 0.5 mL a las 0, 3, 6, 14 y 150 h de un cultivo en medio BMM empleando las mismas condiciones descritas (3.3.5.1 pag.36) para la cinética de crecimiento en medio BMM. Las muestras fueron centrifugadas a 16,000 g durante 2 min. y se desechó el sobrenadante. Se lavó el paquete celular con 500 µL de agua Milli-Q, se resuspendió en 200 µL de  $\text{KMnO}_4$  al 1.5% y se dejó reposando a temperatura ambiente durante 45 min., se centrifugó a 16,000 g durante 2 min., se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con 500 µL de agua Milli-Q. Se resuspendió el paquete celular en 200 µL de acetato de uranilo al 1%, se centrifugó a 16,000 g durante 5 min., se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente o bien en refrigeración hasta el siguiente día. Posteriormente se realizó la deshidratación con lavados a concentraciones crecientes de etanol: a) etanol al 50% 15 min., b) etanol 70% 15 min., c) etanol 96% 15 min., d) etanol 100% 15 min., e) etanol 100% 15 min., en cada paso de deshidratación con la solución de etanol se agitó en el vortex, se dejó a temperatura ambiente el tiempo indicado, se centrifugó a 16,000 g durante 2 min. y el sobrenadante se desechó. Posterior a la deshidratación se agregaron 500 µL de óxido de propileno al 100% se dejó reposar durante 15 min., se centrifugó y se eliminó el sobrenadante (2 veces). Se realizó una preinclusión con 500 µL de epón óxido de propileno 1:1 durante 1.5 h a temperatura ambiente, posteriormente 500 µL epón óxido de propileno 3:1 durante una hora a temperatura ambiente (3 veces) o bien por toda la noche. Posteriormente 500 µL de epón puro durante 30 min. (tres veces), al agregar el epón, el paquete celular se agitó con un aplicador de madera, se dejó a temperatura ambiente el tiempo indicado, se centrifugó y se desechó el sobrenadante cada vez. Se colocan los tubos en la estufa por toda la noche a 60°C, se desprendieron los bloques de epón de los tubos y se realizaron cortes finos en el ultramicrotomo, se montaron las rejillas y se contrastaron con acetato de uranilo. Posteriormente se observaron a el Microscopio Electrónico de Trasmisión y se obtuvieron micrografías electrónicas para observar la ultraestructura de la célula. Los cortes finos, la toma, revelado e impresión de las micrografías electrónicas (7000X y 12000X) se realizaron en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

promediaron y se calculó la desviación estándar. También se construyeron gráficas promedio de cada una de las cinéticas de cada cepa tomando el valor promedio de  $DO_{600}$  y UFC/mL a cada uno de los tiempos de los tres ensayos y graficando el Ln corregido de estos valores contra tiempo. Todo este tipo de procesamiento de datos se realizaron mediante la ayuda del programa Microsoft Excel for Office 97. Los valores de velocidad específica de crecimiento y tiempos de duplicación entre las diferentes cepas, se compararon realizando un análisis de varianza (ANOVA) con comparaciones múltiples de Tukey con la ayuda del programa SPSS 8.0.

### **3.3.5.5 Cinéticas de crecimiento en medio BMM suplementado con sorbitol**

El sorbitol es una fuente de carbono que no reprime al promotor del gen de *AOX1* (45), por lo tanto se decidió realizar cinéticas de crecimiento en el medio BMM + S (BMM suplementado con sorbitol 2% p/v) para observar el comportamiento del crecimiento de las cepas GS115-Tr y GS115-Tg con esta fuente de carbono y energía adicional.

Para realizar estas cinéticas de crecimiento se emplearon las cepas GS115-Tr, GS115-Tg y una cepa control GS115-pPIC9K. Se realizó exactamente el mismo procedimiento para las cinéticas en medio BMM (sección 3.3.5.1 pag.36) con excepción de que las tomas de muestras se realizaron a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 h. Cada una de las cinéticas de crecimiento se realizaron por triplicado y se realizaron los mismos cálculos y procesamiento de datos anteriormente descritos (sección 3.3.5.1 pag.35).

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

Para cumplir con este objetivo las cepas recombinantes antes mencionadas GS115-Tr, GS115-Tg, GS115-pPIC9K, GS115-22K fueron cultivadas bajo condiciones de inducción partiendo de inóculos con altas densidades celulares con  $DO_{600}$  de ~60 ( $\sim 2 \times 10^9$  células/mL) en los

medios BMM, BMM + S (BMM suplementado con sorbitol 2% p/v) y BMMY (BMM suplementado con 2% p/v de peptona y 1% p/v de extracto de levadura).

Para obtener el inóculo, las cepas se cultivaron en tubos falcon de 50 mL con 10 mL de medio YPD a 30°C durante 24 h, 0.5 mL de estos cultivos se emplearon para inocular en 100 mL de BMG, estos se incubaron a 30°C con agitación constante a 250 rpm hasta obtener una  $DO_{600}$  de 15, en ese momento se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. (centrifuga Servall SS4 rotor SS34) y se resuspendió en 25 mL de uno de los medios inductores (BMM, BMMY o BMM+S) y de esta manera se inició la inducción (El paquete celular proveniente de los 100 mL de BMG y resuspendido en 25 mL de medio inductor tenía una  $DO_{600}$  de 60 aproximadamente). Se continuó la incubación a 30°C y agitación constante a 250 rpm durante 48 h, se le agregó metanol absoluto a las 24 h a una concentración final de 0.75%. Se realizó la técnica de RT-PCR para detectar transcritos específicos de tripsina en la cepa GS115-Tr y de tripsinógeno en la cepa GS115-Tg. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y una inmunodetección por la técnica de "Western blot" del medio de cultivo libre de células de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito (sección 3.3.4.4 pag. 34). También se determinó actividad de tripsina por el método descrito por Bergmeyer 1974 (46), tanto de medios de cultivo libres de células como del paquete celular. En la figura 10 se esquematiza el procedimiento de fermentación a altas densidades celulares, también se esquematizan las tomas de muestras para los diferentes estudios.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.3.6.1 Detección de transcritos por la técnica de RT-PCR

Se llevó a cabo la detección de transcritos de muestras tomadas a las 3 y 6 h de inducción de fermentaciones de alta densidad celular ( $DO_{600}$  de 15). Para ello primeramente se realizó aislamiento de ARN total, éste se trató con la enzima *DNAasa I* para eliminar el ADN que pudiera estar contaminando al ARN, posteriormente se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción y PCR (RT-PCR).

min. y se eliminó el sobrenadante. El paquete de RNA se lavó 2 veces con 1 mL de etanol al 75% con agitación y subsecuente centrifugación a 7,500 g durante 5 min. Los tubos se dejaron boca abajo en un papel absorbente durante 1 h, posteriormente se resuspendieron en 30  $\mu$ L de agua DEPC.

### 3.3.6.1.2 Tratamiento con *DNAasa I*

El ARN obtenido se trató con la enzima RQ1 *DNAasa* libre de *RNAasa* (*Promega Co.*) para eliminar la posible contaminación con ADN, que en pasos subsecuentes pudiera generar resultados falsos. Para llevar a cabo el tratamiento con la enzima *DNAasa I* antes mencionada se realizó la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla X.

**Tabla X. Mezcla de reacción para llevar a cabo el tratamiento con RQ1 *DNAasa* libre de *RNAasa* (*Promega Co.*).**

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Solución de ARN	24
Buffer de RQ1 <i>DNAasa</i> 10X	3
RQ1 <i>DNAasa</i> (1 u/ $\mu$ L)	3
Total	30

Se incubó durante 1 h a 37°C, posteriormente se agregó 1  $\mu$ L de la solución "Stop" de la RQ1 *DNasa* libre de *RNasa* y se incubó a 65°C durante 10 min. para inactivar la enzima *DNasa*. La solución obtenida fue la que se empleó para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción (RT).

### 3.3.6.1.3 Reacción de retrotranscripción

La reacción de retrotranscripción se realizó para llevar a cabo la síntesis del ADN complementario de los transcritos específicos y heterólogos de las cepas recombinantes. En la reacción de RT se empleó la enzima retrotranscriptasa *M-MLV* (*Promega Co*) y el iniciador 58 3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') que se aparea en la región 3' *AOXI TT* (nucleótido 1327-1347) del plásmido pPIC9. Para llevar a cabo la retrotranscripción se realizó la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla XI.

Primeramente se mezcló la solución de ARN con el agua DEPC, se calentó la mezcla durante 5 min. a 95°C e inmediatamente se puso en hielo, se agregó el resto de los reactivos y se incubó a 37°C durante 1 h, tiempo durante el que se realizó la síntesis del ADN complementario. Esta solución se empleó para realizar la PCR con los mismos iniciadores específicos para amplificar el ADN complementario sintetizado a partir de los transcritos.

Tabla XI. Mezcla de reacción para llevar a cabo la síntesis de ADN complementario mediante retrotranscripción empleando la enzima *M-MLV* (*Promega Co.*).

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Solución de ARN*	3
Agua DEPC	15.5
Buffer para la enzima <i>M-MLV</i> 5X	6
Iniciador 3' (5 $\mu\text{M}$ )	1
DTT (0.1 M)	1
dNTP's (10 mM)	1.5
Enzima <i>M-MLV</i> (200 u/ $\mu\text{L}$ )	2
Total	30

\* Después del tratamiento con *DNasa I*

### 3.3.6.1.4 PCR de la RT

Se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar el ADN complementario sintetizado a partir de los transcritos. Los iniciadores 57 y 58 descritos anteriormente (sección 3.3.4.1.2 pag. 32) fueron empleados para llevar a cabo la PCR. La mezcla de reacción para realizar la PCR se muestra en la Tabla XII.

La PCR tuvo las siguientes condiciones: Buffer de PCR (Promega) 1 X, reacción de RT 3  $\mu\text{L}$  en 25 de reacción, dNTP's 200  $\mu\text{M}$ , iniciador 5'AOX1 0.5  $\mu\text{M}$ , iniciador 3'AOX1 0.5  $\mu\text{M}$ , agua estéril y 2 unidades de Taq DNA polimerasa en 25  $\mu\text{L}$  de reacción. Se empleó un termociclador un Termociclador Hybaid PCR Sprint (*Hybaid UK*), el programa llevado a cabo fue el siguiente: 1 ciclo 94°C (2 min.), 30 ciclos 94°C (1 min.) 60°C (1 min.) 72°C (2 min.), 1 ciclo 72°C (10 min.). Se realizó el análisis de 5  $\mu\text{L}$  del producto de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE.

Tabla XII Mezcla de reacción realizada para PCR de la RT

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Buffer de PCR 10X	2.5
dNTP's (10 mM)	0.5
Iniciador 5' (5 $\mu\text{M}$ )	2.5
Iniciador 3' (5 $\mu\text{M}$ )	2.5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.5
H <sub>2</sub> O milliQ	12.1
Taq DNA pol. (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0.4
Reacción de RT	3
Total	25

### 3.3.6.2 Análisis de proteínas de fermentaciones a altas densidades celulares

Se tomaron muestras de 2 mL de fermentaciones a altas densidades celulares ( $DO_{600} \sim 60$ ) de los diferentes medios de cultivo (BMM, BMMY y BMM + S) a las 24 y 48 h de inducción descritas anteriormente (sección 3.3.6 pag. 45) y se realizaron análisis de SDS-PAGE e inmunodetección de tripsina y tripsinógeno de camarón por la técnica de Western blot del medio de cultivo libre de células, siguiendo los protocolos descritos anteriormente (sección 3.3.4.4 pag. 34).

### 3.4 Determinación de la actividad de tripsina

La actividad de tripsina se determinó en muestras de 24 h de inducción de fermentaciones y altas densidades celulares ( $\sim 60$ ) de los medios de cultivo BMM y BMM + Sorbitol. La actividad de tripsina midió en el medio de cultivo libre de células empleando como controles positivos, extracto de hepatopáncreas y tripsina de páncreas bovino (Sigma T4665) y se realizó para los casos siguientes: a) Medio BMM, dializado contra  $H_2O$ , b) Medio BMM dializado y concentrado 20 veces, c) Medio BMM + Sorbitol directo, d) Medio BMM + Sorbitol, dializado y concentrado por ultrafiltración y lavado con HCl 1 mM, e) Medio BMM + Sorbitol, dializado y concentrado por ultrafiltración y lavado con amortiguador de acetatos pH = 4.

La actividad de tripsina se realizó por el método descrito por Bergmeyer 1974 (46). Este ensayo enzimático se basa en la medición de la hidrólisis del BAEE (N- $\alpha$ -bezoil-L-arginina etil éster) por la tripsina. Los productos de hidrólisis son: N- $\alpha$ -bezoil-L-arginina y etanol generándose un aumento en la lectura a 253 nm, lo que se traduce en unidades por mL de enzima (U/mL). La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: en una celda de cuarzo, de 3.5 mL se agregó 3 mL de BAEE 25 mM, se determinó la absorbancia a 253 nm hasta que permaneciera constante (1 minuto aproximadamente) y se calibró a cero de absorbancia. Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ L de la solución problema o bien de los controles positivos (extracto de hepatopáncreas de camarón o tripsina bovina), se mezcló por inversión e inmediatamente se registró el incremento de absorbancia a 253 nm durante 5 min. También se analizó un blanco de la reacción enzimática, la cual se realizó como se mencionó

anteriormente, pero en lugar de agregar los 200  $\mu\text{L}$  de la solución problema, se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de HCl 1 mM.

Se calculó el incremento de absorbancia ( $\Delta A$ ) por min a 253 nm del blanco, problemas y controles positivos mediante el método de mínimos cuadrados y se calcularon las U/mL de tripsina con la siguiente formula:

$$\text{U/mL} = (\Delta A_{253}/\text{min problema} - \Delta A_{253}/\text{min blanco}) (\text{FD}) / (0.001)(0.20)$$

donde FD es el factor de dilución, 0.001 es el cambio de  $A_{253}/\text{min}$  por unidad de tripsina a pH 7.6, 25°C en un volumen de reacción de 3.2 mL y 0.20 es el volumen en mL del problema o la enzima usada.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1 Construcción de los vectores

##### 4.1.1 Diseño de Oligonucleótidos

La secuencia nucleotídica de 854 pb obtenida del Genbank correspondiente al RNAm de la tripsina de camarón (*Litopenaeus vannamei*) con el número de acceso X86369 (Klein 96) se muestra en el Anexo. Esta secuencia tiene las siguientes regiones: los nucleótidos 3, 4, y 5 corresponden al codón de iniciación (ATG), los nucleótidos del 3 al 41 codifican para el péptido señal, los nucleótidos del 42 al 803 codifican para el tripsinógeno y dentro de ésta, los nucleótidos del 90 al 803 codifican para la tripsina activa de camarón (Klein 96). Del nucleótido 3 al 803 corresponden a la secuencia codificante (tripsinógeno y su secuencia señal). Los nucleótidos no mencionados corresponden a secuencias no traducibles.

La secuencia de los iniciadores diseñados y las diferentes porciones de éstos, tales como los sitios de restricción, secuencia correspondiente al sitio de corte proteolítico del factor *KEX2*, porción correspondiente a parte de la secuencia señal del factor  $\alpha$ , inicio de la secuencia madura, codón de terminación así como secuencia no traducible se muestran en la figura 11.

La verificación del diseño de los oligonucleótidos mediante la simulación del PCR en el programa Amplify 1.0 teniendo como secuencia molde la obtenida del Genbank de 854 pb, se muestra en la figura 12 y 13. Empleando los oligonucleótidos B251-1 y B251-2 en la simulación, se obtuvo el producto amplificado esperado de 780 pb correspondiente al ADNc de tripsinógeno (756 pb) con 15 nucleótidos adicionales en el extremo 5' y 9 nucleótidos en el extremo 3', mientras que empleando los oligonucleótidos B251-3 y B251-2 se obtuvo el producto amplificado de 738 pb correspondiente al ADNc de tripsina (714 pb) con los mismos nucleótidos adicionales. En la figura 14 se muestra el apareamiento de los iniciadores con la secuencia molde obtenido con el programa Amplify 1.0.

4.1.2 Clonación de los ADNc de tripsinógeno y tripsina en pPCR

#### 4.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La digestión del plásmido pPCRαGH22K (Invitrogen 2000) con las enzimas *Dpn* I y *Dpn* II

Al realizar la PCR con la enzima *Pfu* DNA polimerasa y el vector donado como molde (Klein 96) se obtuvo el producto amplificado esperado de 738 pb cuando se emplearon los iniciadores B251-3 y B251-2, mientras que cuando se emplearon los iniciadores B251-1 y B251-2 se obtuvo un producto amplificado esperado de 780 pb tal como se muestra en el análisis de electroforesis en gel de agarosa (Fig. 15).

Fig. 15. Análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

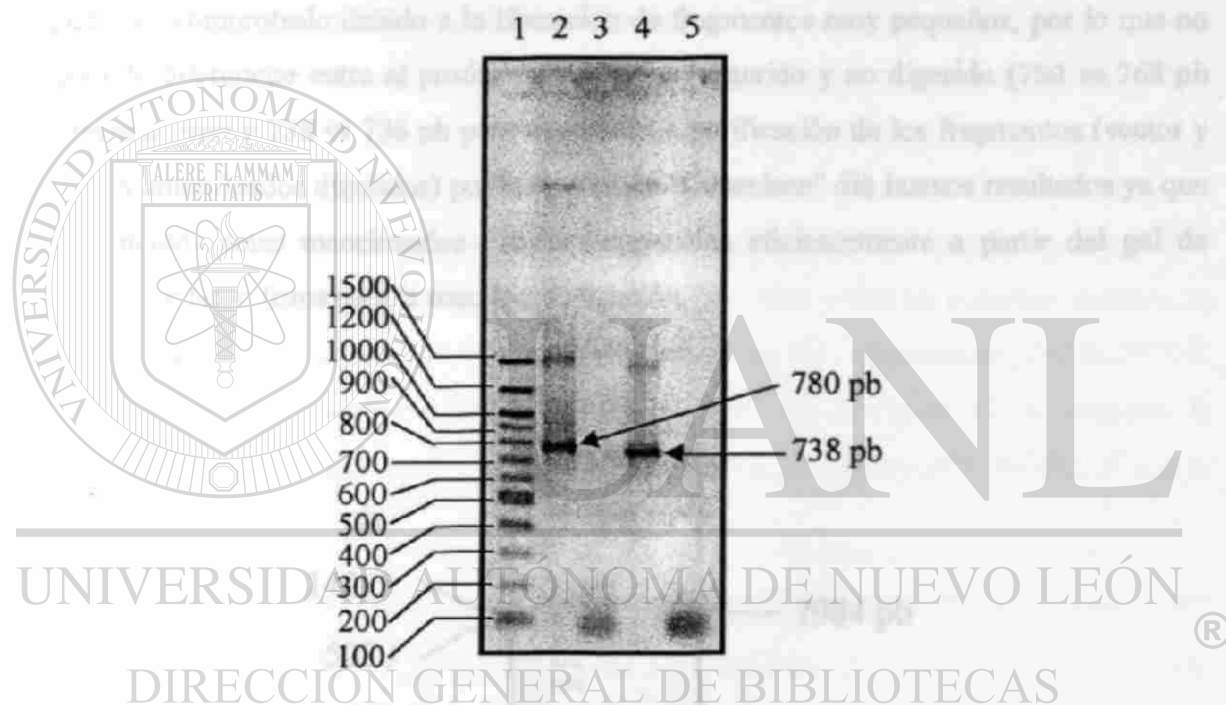
de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

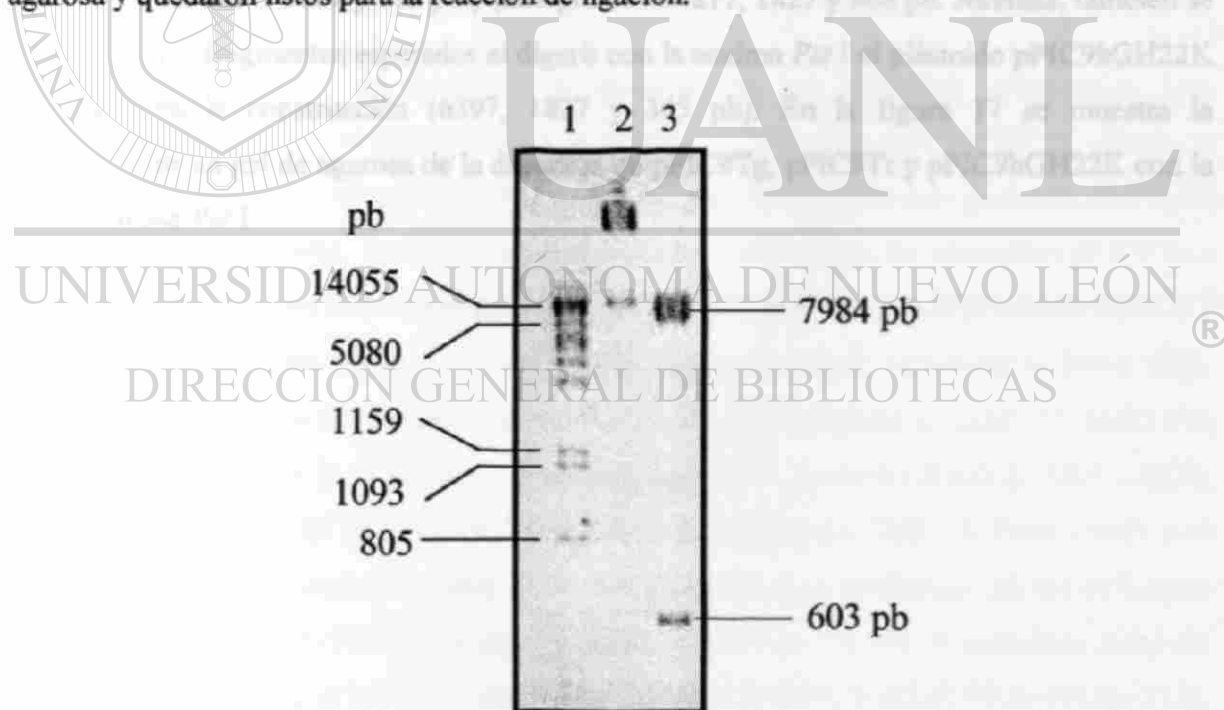
de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción

de *Dpn* I y *Dpn* II. Se muestra el análisis de los productos amplificados por las enzimas endonasas de restricción



**Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de productos amplificados para clonación.** Carril 1: Marcador de peso molecular(100 bp DNA ladder NEB), Carril 2: Producto amplificado de 780 pb correspondiente al ADNc de tripsinógeno, Carril 3: Control negativo de la PCR, Carril 4: Producto amplificado de 738 pb correspondiente al ADNc de tripsina, Carril 5: Control negativo de la PCR.

**4.1.3 Clonación de los ADN's de tripsina y tripsinógeno en pPIC9** de 7984 pb con cada uno de los fragmentos de 726 y 768 pb mostró la presencia de bandas de mayor peso molecular. La digestión del plásmido pPIC9hGH22K (Escamilla 2000) con las enzimas *Xho* I y *Avr* II liberó un fragmento de 603 pb y el resto del vector de 7984 pb (esta parte del vector pPIC9hGH22K es equivalente al vector de expresión pPIC9 digerido con las enzimas de restricción *Xho* I y *Avr* II es decir sin los nucleótidos del 1193 al 1228, por lo que contiene todas las regiones necesarias para la expresión, como son: el promotor de *AOX*, el marcador de selección *HIS4* etc.) detectados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (Fig. 16). Las digestiones de los productos amplificados con las mismas enzimas de restricción no pudo ser comprobado debido a la liberación de fragmentos muy pequeños, por lo que no era posible diferenciar entre el producto amplificado digerido y no digerido (780 vs 768 pb para tripsinógeno y 738 vs 726 pb para tripsina). La purificación de los fragmentos (vector y productos amplificados digeridos) por la técnica de "GeneClean" dio buenos resultados ya que los fragmentos antes mencionados fueron recuperados eficientemente a partir del gel de agarosa y quedaron listos para la reacción de ligación.



**Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE para verificar la digestión de pPIC9hGH22K con las endonucleasas *Xho* I y *Avr* II. Carril 1: Marcador de peso molecular ( $\lambda$  + *Pst* I), Carril 2: pPIC9hGH22K (8587 pb), Carril 3: pPIC9hGH22K + *Xho* I + *Avr* II (7984 y 603 pb).**

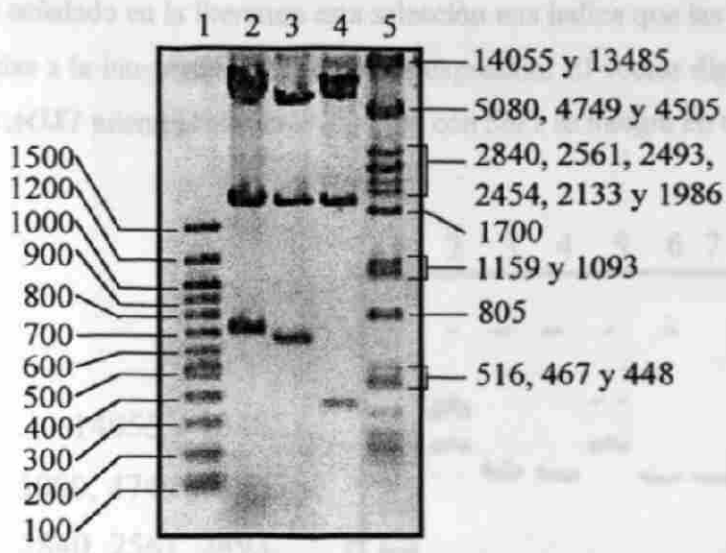
El análisis electroforético de la reacción de ligación del fragmento de 7984 pb con cada uno de los fragmentos de 726 y 768 pb mostró la presencia de bandas de mayor peso molecular que el fragmento de ligación de 7984 pb (correspondiente al vector) tanto para la construcción de pPIC9Tg como pPIC9Tr. Estas bandas mostraron una mayor intensidad que los propios fragmentos de ligación. Esto fue indicativo de una reacción de ligación eficiente aunque ligeramente parcial, que sin embargo fue aceptable y suficiente para llevar a cabo las siguientes etapas.

De la transformación de *E. coli* con 5  $\mu$ L del producto de ligación para construcción del plásmido pPIC9Tg se obtuvieron 43 colonias mientras que para la construcción del plásmido pPIC9Tr se obtuvieron 53 colonias. De 20 colonias de cada transformación que se les hizo aislamiento de ADN plasmidico solo a 6 de cada una se les digirió con la endonucleasa *Pst* I enzima con la que era posible distinguir entre los plásmidos pPIC9Tg, pPIC9Tr y pPIC9hGH22K. Todas las clonas analizadas resultaron poseer el plásmido de interés ya que al digerir dichos plásmidos con la endonucleasa *Pst* I se obtuvieron los fragmentos esperados: para pPIC9Tg 6217, 1827 y 710 pb y para pPIC9Tr 6217, 1827 y 668 pb. Además, también se obtuvieron los fragmentos esperados al digerir con la enzima *Pst* I el plásmido pPIC9hGH22K empleado en la construcción (6397, 1827 y 365 pb). En la figura 17 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de la digestión de pPIC9Tg, pPIC9Tr y pPIC9hGH22K con la endonucleasa *Pst* I.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



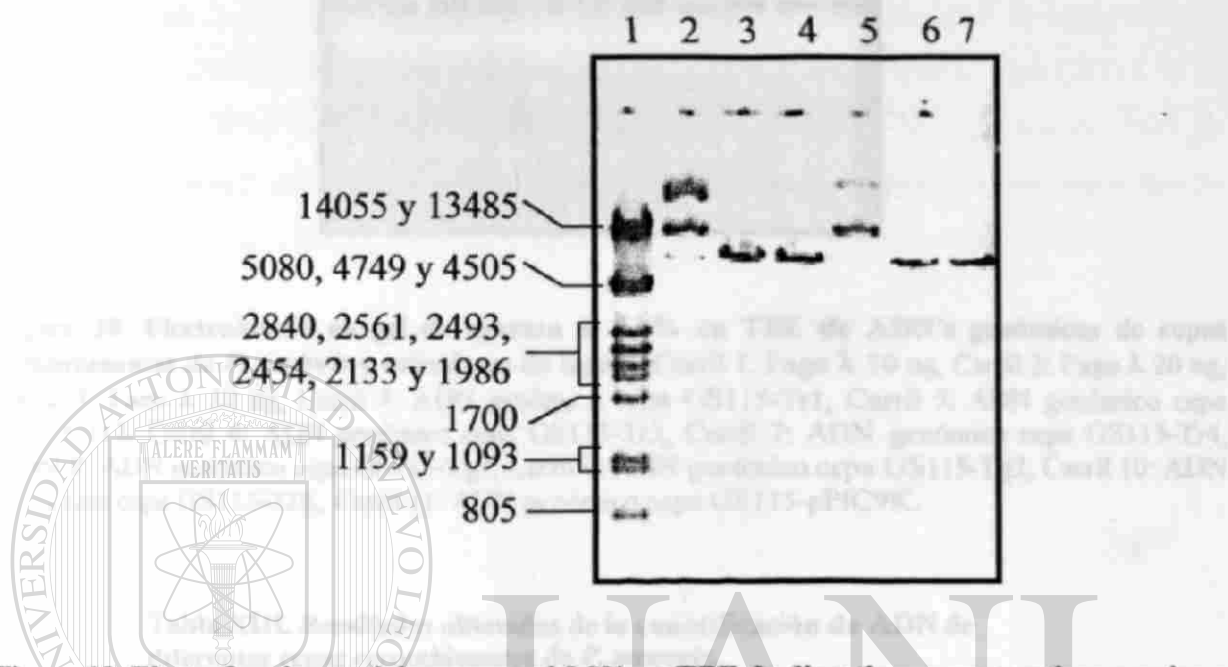
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de los plásmidos pPIC9Tg, pPIC9Tr y pPIC9hGH22K digeridos con la endonucleasa *Pst* I. Carril 1 Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder NEB), Carril 2: pPIC9Tg + *Pst* I (6217, 1827 y 710 pb), Carril 3: pPIC9Tr + *Pst* I (6217, 1827 y 668 pb), Carril 4: pPIC9hGH22K + *Pst* I (6397, 1827 y 365 pb), Carril 5: Marcador de peso molecular ( $\lambda$  + *Pst* I).**

Con estos resultados se comprobó la identidad de los plásmidos construidos. Los fragmentos de 710 pb de pPIC9Tg, 668 pb de pPIC9Tr y 365 pb de pPIC9hGH22K obtenidos de la digestión de estos plásmidos con la endonucleasa *Pst* I son los que permiten distinguir entre estos tres plásmidos. En la figura 18 se muestra gráficamente los plásmidos pPIC9Tr y pPIC9Tg y sus regiones más importantes. El plásmido pPIC9Tr contiene el promotor de *AOX1* (5'*AOX1*) en la posición 1-948, la secuencia señal del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* de 949 a 1203, el ADNc de tripsina de 1204 a 1917, el terminador de la transcripción de *AOX1* (3'*AOX1 TT*) de 1943 a 2276, el gen de la histidinol deshidrogenasa de *P. pastoris* (*HIS4*) de 5203 a 2670, el fragmento 3' de *AOX1* de 5558 a 6315, el origen de replicación *ColE1* de 7400 a 6781 y el gen de resistencia a ampicilina (*amp r*) de 8402 a 7542. Las posiciones de las diferentes regiones del plásmido pPIC9Tg son las siguientes: 5'*AOX1* de 1 a 948, la secuencia señal del factor  $\alpha$  de 949 a 1203, el ADNc de tripsinógeno de 1204 a 1959, 3'*AOX1 TT* de 1985 a 2318, *HIS4* de 5245 a 2712, 3' de *AOX1* de 5600 a 6357, *ColE1* de 7442 a 6823 y *amp r* de 8444-7542.

De acuerdo con lo señalado en la literatura esta selección nos indica que las colonias tienen un fenotipo His<sup>+</sup> gracias a la integración del vector de expresión. El vector digerido con *Sac* I se integra en el locus *AOX1* mientras el vector digerido con *Sal* I se integra en el locus *his4* (9).



**Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de digestiones preparativas previas a la transformación de *Pichia pastoris*.** Carril 1: Marcador de peso molecular ( $\lambda$  + *Pst* I), Carril 2: pPIC9Tg sin digerir, Carril 3: pPIC9Tg + *Sac* I (8754 pb), Carril 4: pPIC9Tg + *Sal* I (8754 pb), Carril 5: pPIC9Tr sin digerir, Carril 6: pPIC9Tr + *Sac* I (8712 pb), Carril 7: pPIC9Tr + *Sal* I (8712 pb).

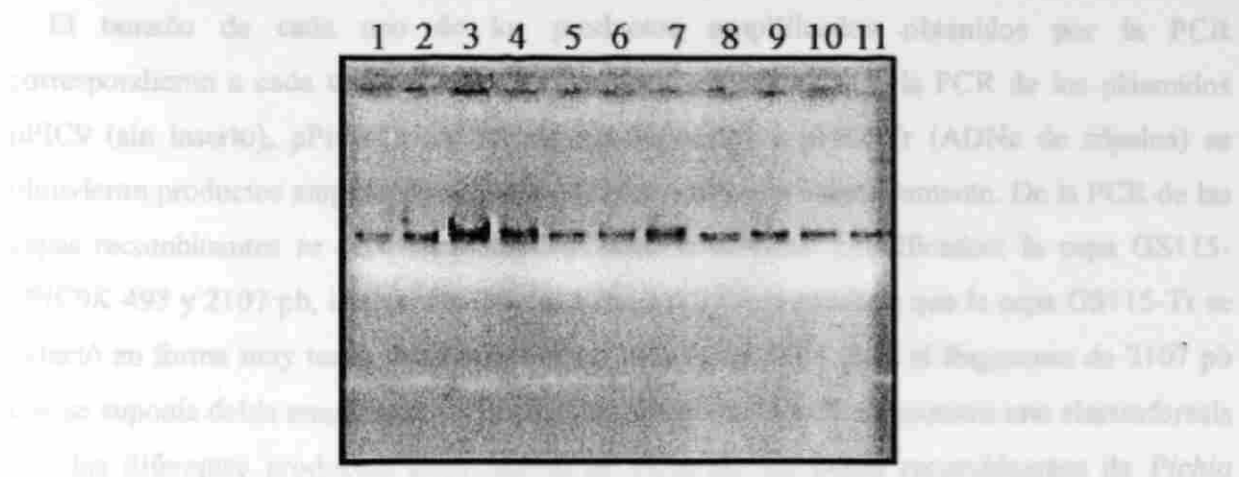
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

#### 4.3 Caracterización de genotipos y fenotipos de las clonas recombinantes

##### 4.3.1 Verificación de la integración del vector de expresión

Los ADN's genómicos aislados de 4 cepas recombinantes GS115-Tr, 2 cepas recombinantes GS115-Tg y las dos cepas control no mostraron degradación aparente (Fig. 20). La electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de los ADN's genómicos y los estándares se muestran en la Figura 20, mientras que los resultados de la cuantificación se presentan en la tabla XIII.

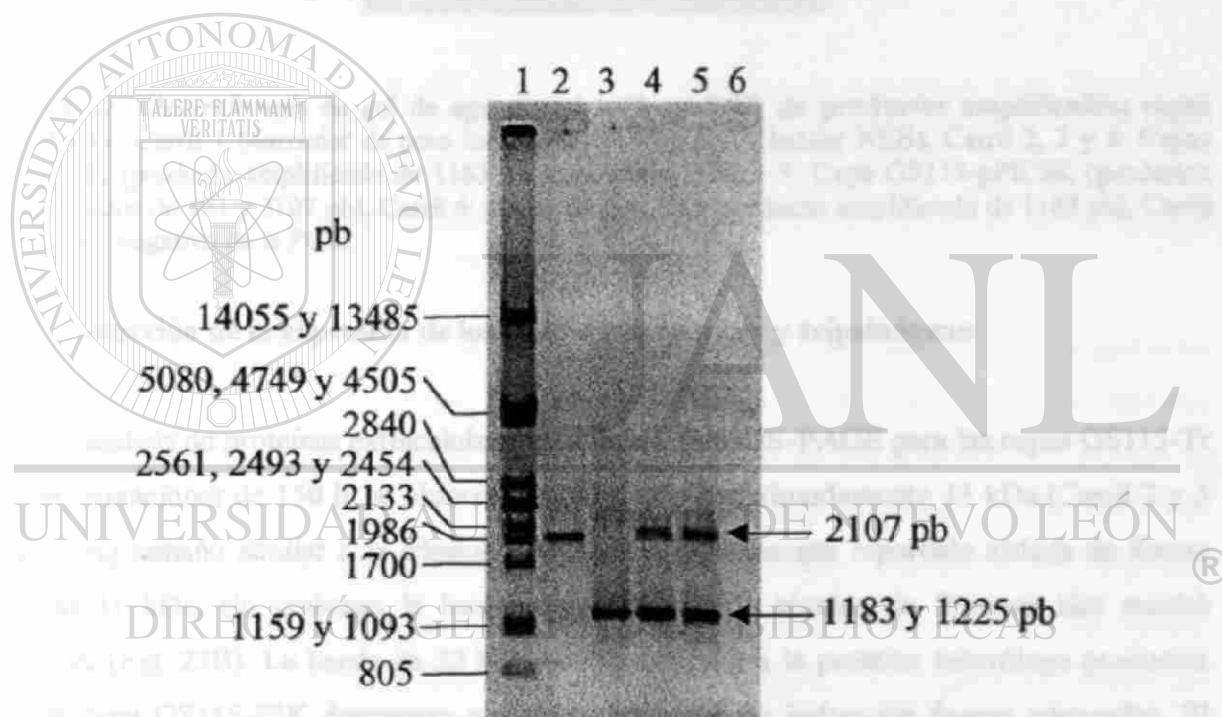


**Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de ADN's genómicos de cepas recombinantes de *P. pastoris* y estándares de fago  $\lambda$ .** Carril 1: Fago  $\lambda$  10 ng, Carril 2: Fago  $\lambda$  20 ng, Carril 3: Fago  $\lambda$  30 ng, Carril 4: ADN genómico cepa GS115-Tr1, Carril 5: ADN genómico cepa GS115-Tr2, Carril 6: ADN genómico cepa GS115-Tr3, Carril 7: ADN genómico cepa GS115-Tr4, Carril 8: ADN genómico cepa GS115-Tg1, Carril 9: ADN genómico cepa GS115-Tg2, Carril 10: ADN genómico cepa GS115-22K, Carril 11: ADN genómico cepa GS115-pPIC9K.

**Tabla XIII. Resultados obtenidos de la cuantificación de ADN de diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris*.**

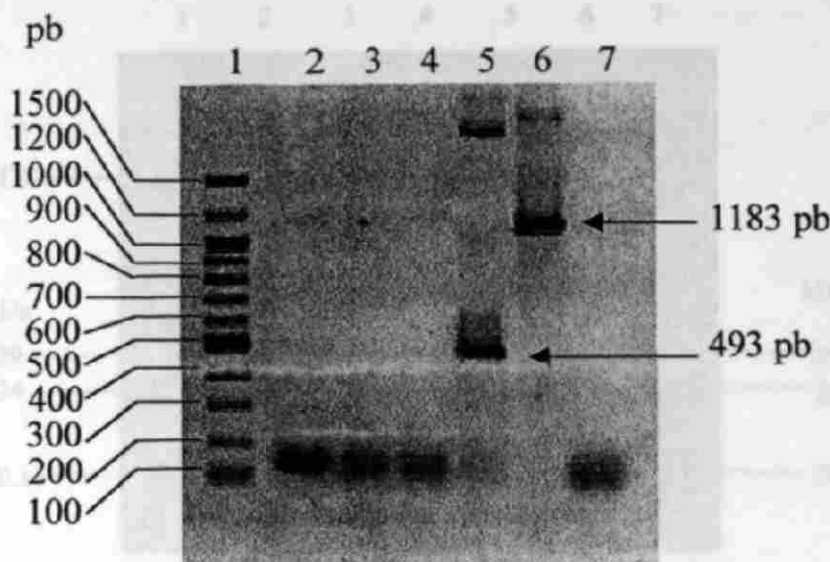
Cepa	Masa (ng)	Volumen en el carril ( $\mu\text{L}$ )	Conc. (ng/ $\mu\text{L}$ )
GS115-Tr1	24.40	2.5	61.00
GS115-Tr2	14.22	2.5	35.55
GS115-Tr3	13.55	2.5	33.88
GS115-Tr4	20.33	2.5	50.83
GS115-Tg1	14.66	2.5	36.65
GS115-Tg2	15.70	2.5	39.25
GS115-22K	13.41	2.5	33.53
GS115-pPIC9K	15.67	2.5	39.18

El tamaño de cada uno de los productos amplificados obtenidos por la PCR correspondieron a cada uno de los ADN's moldes empleados: De la PCR de los plásmidos pPIC9 (sin inserto), pPIC9Tg (ADNc de tripsinógeno) y pPIC9Tr (ADNc de tripsina) se obtuvieron productos amplificados de 493, 1225 y 1183 pb respectivamente. De la PCR de las cepas recombinantes se obtuvieron los siguientes productos amplificados: la cepa GS115-pPIC9K 493 y 2107 pb, la cepa GS115-Tg 1225 y 2107 pb mientras que la cepa GS115-Tr se detectó en forma muy tenue un producto amplificado de 1183 pb y el fragmento de 2107 pb que se suponía debía amplificar, no fue así. En la figura 21 y 22 se muestra una electroforesis con los diferentes productos amplificados de PCR de las cepas recombinantes de *Pichia pastoris*.



**Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de productos amplificados; cepas GS115-Tg.** Carril 1 Marcador de peso molecular ( $\lambda$  + *Pst* I), Carril 2: Cepa GS115 (producto amplificado de 2107 pb), Carril 3: pPIC9Tr (producto amplificado de 1183 pb), Carril 4 y 5: Cepas GS115-pPIC9KTg (productos amplificados de 1225 y 2107 pb), Carril 6: Control negativo de la PCR.

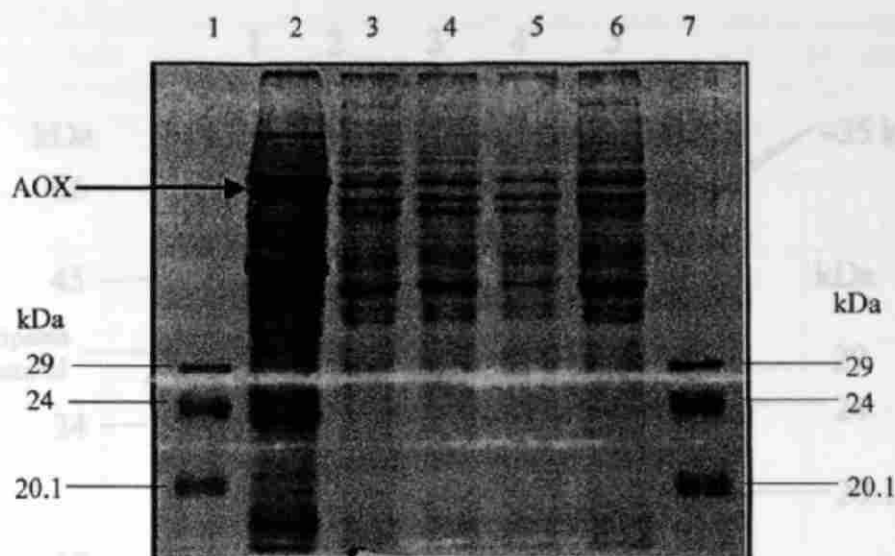




**Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TBE de productos amplificados; cepas GS115-Tr.** Carril 1: Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder NEB), Carril 2, 3 y 4: Cepas GS115-Tr (producto amplificado de 1183 pb muy tenue), Carril 5: Cepa GS115-pPIC9K (productos amplificados de 493 y 2107 pb), Carril 6: plásmido pPIC9Tr (producto amplificado de 1183 pb), Carril 7: Control negativo de la PCR.

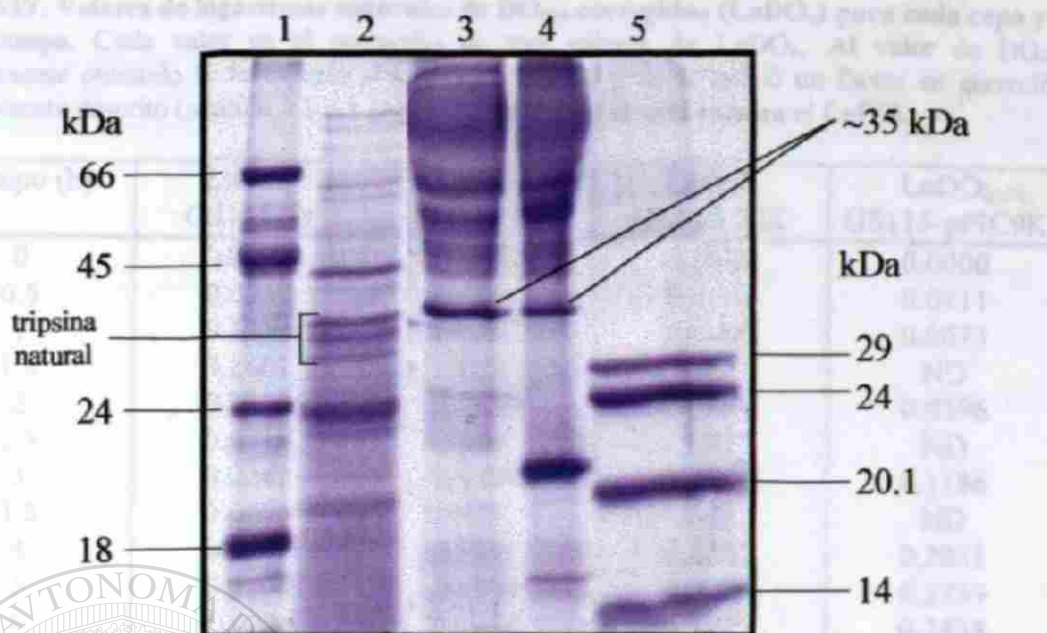
#### 4.3.2 Inducción de la expresión de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno

En los análisis de proteínas extracelulares realizados por SDS-PAGE para las cepas GS115-Tr de fermentaciones de 150 h, se observó una banda de aproximadamente 33 kDa (Carril 2 y 3 Fig. 23A) tamaño similar a la tripsina de camarón previamente reportada aislada de fuente natural 31 kDa, sin embargo la inmunodetección por la técnica de Western blot resultó negativa (Fig. 23B). La banda de 22 kDa correspondiente a la proteína heteróloga producida por la cepa GS115-22K demuestra que las condiciones de inducción fueron adecuadas. El extracto de hepatopáncreas (carril 4 Fig. 23) presentó señal positiva en la inmunodetección para una banda con un tamaño aproximado a 31 kDa correspondiente a la tripsina natural de camarón glicosilada. La tripsina sin glicosilar tiene un tamaño aproximado de 25 kDa, aproximadamente a este tamaño se observa una banda intensa en el carril correspondiente al extracto de hepatopáncreas de camarón (carril 4 Fig. 23A) que sin embargo no presentó señal en la inmunodetección. Esto conduce a pensar que la glicosilación es necesaria para que la tripsina sea reconocida por los anticuerpos o bien se trata de otra proteína.



**Figura 24. Electroforesis SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de la fracción de proteínas intracelulares solubles de cepas GS115-Tr bajo condiciones de inducción. Carril 1 y 7: Marcadores de peso molecular. Carril 2: Cepa GS115-pPIC9K 150 h de inducción como control. Carril 3 al 6: Diferentes cepas GS115-Tr 150 h de inducción. Se observa un patrón de bandas diferente entre las cepas que portan el ADNc de tripsina y la cepa control. En el carril 2 se señala con una flecha la probable banda que corresponde a la enzima alcohol oxidasa.**

En cuanto a los análisis electroforéticos de los medios de cultivo libre de células y proteínas intracelulares solubles de las cepas GS115-Tg, no se logró identificar con los métodos empleados el producto recombinante esperado. En los geles de poliacrilamida de medios de cultivo libre de células se observó una banda de un tamaño aproximado a ~35 kDa, sin embargo en la cepa control fue detectada una banda con tamaño similar (Fig. 25). Por otro lado, en el extracto de hepatopáncreas de *Litopenaeus* se observó una banda de un tamaño aproximado de 31 kDa correspondiente a tripsina glicosilada (Fig. 25), también se observó una banda de aproximadamente 24 kDa que podría ser tripsina de camarón no glicosilada. La inmunodetección por la técnica de Western blot resultó negativa para la cepa GS115-Tg, tanto en medios de cultivo libre de células como en proteínas intracelulares solubles. El extracto de hepatopáncreas presentó la misma señal positiva descrita anteriormente (carril 4 Fig. 23).



**Figura 25. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de proteínas extracelulares de la cepas GS115-Tg y una cepa control (GS115-22K), bajo condiciones de inducción. Carril 1 y 5: Marcadores de peso molecular, Carril 2: Extracto proteico de hepatopáncreas de camarón, Carril 3: Cepa GS115-Tg, Carril 4: Cepa GS115-22K. Se observa que el patrón proteico de las cepas GS115-Tg y GS115-Tr es muy similar a excepción de la proteína de 22 kDa producida por la cepa control.**

#### 4.4 Determinación de los posibles factores que afectan la producción de las proteínas de interés

##### 4.4.1 Cinéticas de crecimiento en medio BMM

Las cinéticas de crecimiento en medio BMM (condiciones de inducción) estimadas tanto por  $DO_{600}$  como UFC/mL, evaluadas para las cepas GS115-Tg, GS115-Tr, GS115-pPIC9K y GS115-22K arrojaron los valores de  $\ln DO_e$  vs tiempo mostrados en la tabla XIV y los valores de  $\ln V_e$  vs tiempo mostrados en la tabla XV.

**Tabla XIV. Valores de logaritmos naturales de  $DO_{600}$  corregidos ( $LnDO_c$ ) para cada cepa y a cada tiempo. Cada valor es el promedio de tres valores de  $LnDO_c$ . Al valor de  $DO_{600}$  originalmente obtenido se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de corrección anteriormente descrito (sección 3.3.5.1 pag 39), obteniendo de esta manera el  $LnDO_c$ .**

Tiempo (h)	$LnDO_c$ GS115-Tr	$LnDO_c$ GS115-Tg	$LnDO_c$ GS115-22K	$LnDO_c$ GS115-pPIC9K
0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.5	0.0318	0.0251	0.0101	0.0411
1	0.1359	0.0362	0.0069	0.0673
1.5	0.1601	ND	ND	ND
2	0.0852	-0.0004	-0.0245	0.0396
2.5	0.0713	ND	ND	ND
3	0.0247	0.0449	0.0791	0.1186
3.5	0.0454	ND	ND	ND
4	0.0109	0.1301	0.1462	0.2031
5	0.0166	0.2393	0.2716	0.2739
6	-0.0286	0.3394	0.3737	0.3438
8	-0.0758	0.3470	0.5961	0.5369
10	-0.0603	0.3324	0.7855	0.6882
12	-0.1069	0.3561	0.9249	0.8528
14	-0.0857	0.3939	1.0415	0.9863
16		0.3499	1.0358	1.0330

ND: No determinado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

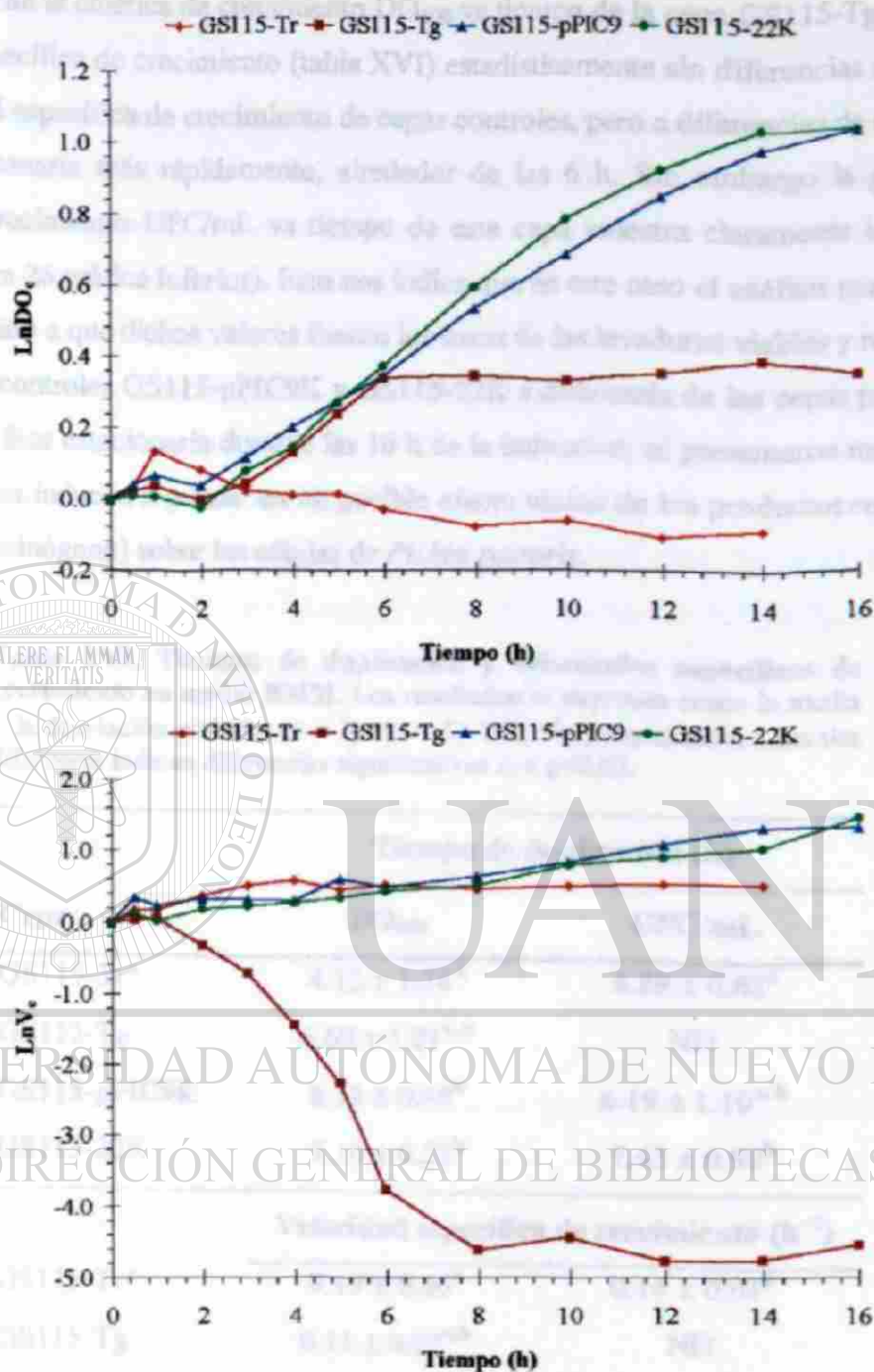
**Tabla XV. Valores de logaritmos naturales de UFC/mL corregidos ( $\text{LnV}_c$ ) para cada cepa y a cada tiempo.** Cada valor es el promedio de tres valores de  $\text{LnV}_c$ . Al valor de UFC/mL originalmente obtenido se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de corrección anteriormente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

Tiempo (h)	$\text{LnV}_c$ GS115-Tr	$\text{LnV}_c$ GS115-Tg	$\text{LnV}_c$ GS115-22K	$\text{LnV}_c$ GS115-pPIC9K
0	0	0	0	0
0.5	0.1757	-0.2217	0.0219	0.3428
1	0.1664	0.0211	0.0708	0.2316
1.5	0.3743	ND	ND	ND
2	0.3700	-0.4884	0.0714	0.3329
2.5	0.4430	ND	ND	ND
3	0.5063	-1.0237	0.0834	0.3197
3.5	0.5384	ND	ND	ND
4	0.5897	-1.6281	0.1434	0.3022
5	0.4536	-1.8633	0.3199	0.6028
6	0.5097	-3.4528	0.4504	0.4714
8	0.4592	-4.1897	0.4127	0.6357
10	0.5040	-2.9809	0.7178	0.8273
12	0.5391	-3.4942	0.8376	1.0923
14	0.5403	-1.6136	0.9863	1.3429
16	ND	-2.6747	1.4075	1.3219

ND: No determinado

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

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



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

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

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

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

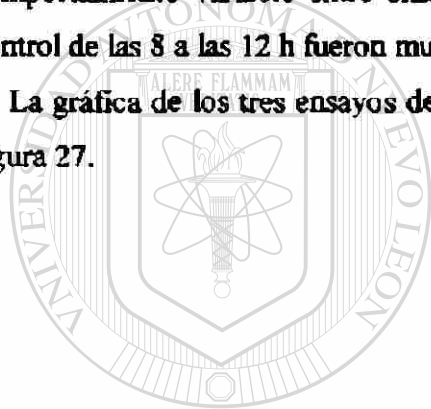
Cepas	Tiempo de duplicación (h)	
	$DO_{600}$	UFC/mL
GS115-Tr*	$4.12 \pm 1.78^a$	$4.89 \pm 0.62^a$
GS115-Tg	$6.69 \pm 1.21^{a,b}$	ND
GS115-pPIC9K	$8.19 \pm 0.49^b$	$6.19 \pm 1.10^{a,b}$
GS115-22K	$7.10 \pm 0.21^b$	$7.43 \pm 0.99^b$
Cepas	Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )	
	$DO_{600}$	UFC/mL
GS115-Tr*	$0.19 \pm 0.06^a$	$0.14 \pm 0.01^a$
GS115-Tg	$0.11 \pm 0.02^{a,b}$	ND
GS115-pPIC9K	$0.08 \pm 0.01^b$	$0.11 \pm 0.02^b$
GS115-22K	$0.098 \pm 0.003^b$	$0.09 \pm 0.01^b$

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

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

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

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



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

**Actividad de Alcohol Oxidasa (U/mg) Ensayo 1**

Tiempo (h)	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-pPIC9K	GS115-22K
0	0.000	0.000	0.000	0.011
2	0.000	0.011	0.102	0.074
4	0.000	0.064	0.148	0.251
6	0.000	0.107	0.071	0.210
8	0.000	0.046	0.088	0.257
10	0.000	0.013	0.089	0.328

**Actividad de Alcohol Oxidasa (U/mg) Ensayo 2**

Tiempo (h)	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-pPIC9K <sup>Δ</sup>
0	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.007	0.065
4	0.000	0.097	0.357
6	0.000	0.252	0.305
8	0.000	0.214	0.201
10	0.000	0.072	0.486
12	0.000	0.009	0.536

**Actividad de Alcohol Oxidasa (U/mg) Ensayo 3**

Tiempo (h)	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-Tg	GS115-22K
0	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.002	0.000	0.078
4	0.000	0.069	0.036	0.055
6	0.000	0.247	0.284	0.752
8	0.000	0.337	0.329	0.458
10	0.000	0.130	0.035	0.438
12	0.000	0.014	0.003	0.264

Las actividades específicas de la enzima AOX de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos.

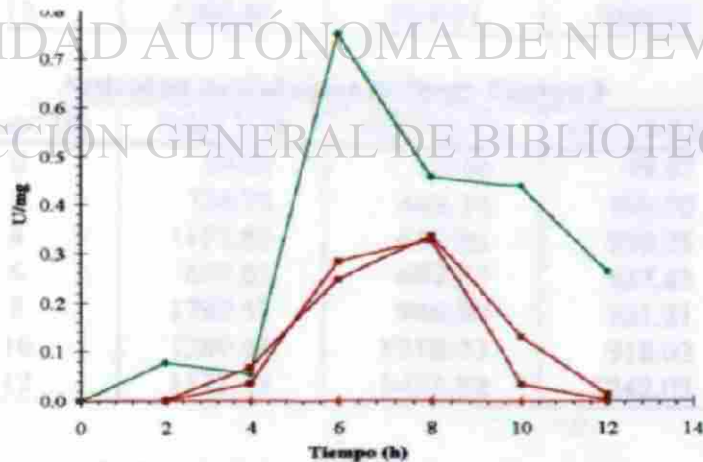
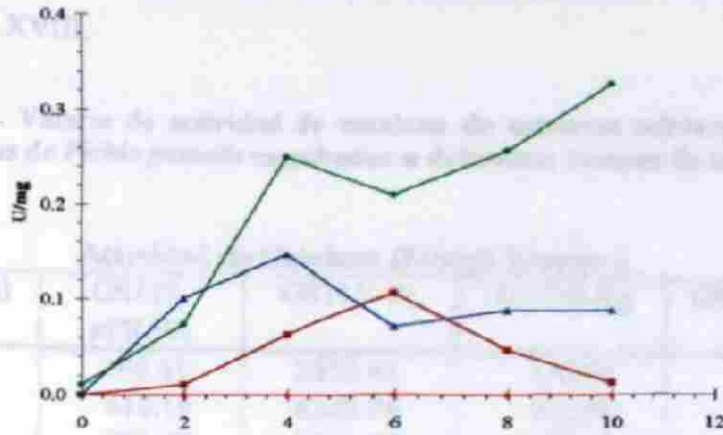


Figura 27. Actividad específica de la enzima AOX de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos. Se muestran los tres ensayos realizados. Cepa GS115-Tg (■), cepa GS115-Tr (◆), cepa GS115-pPIC9K (▲), cepa GS115-22K (●).

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

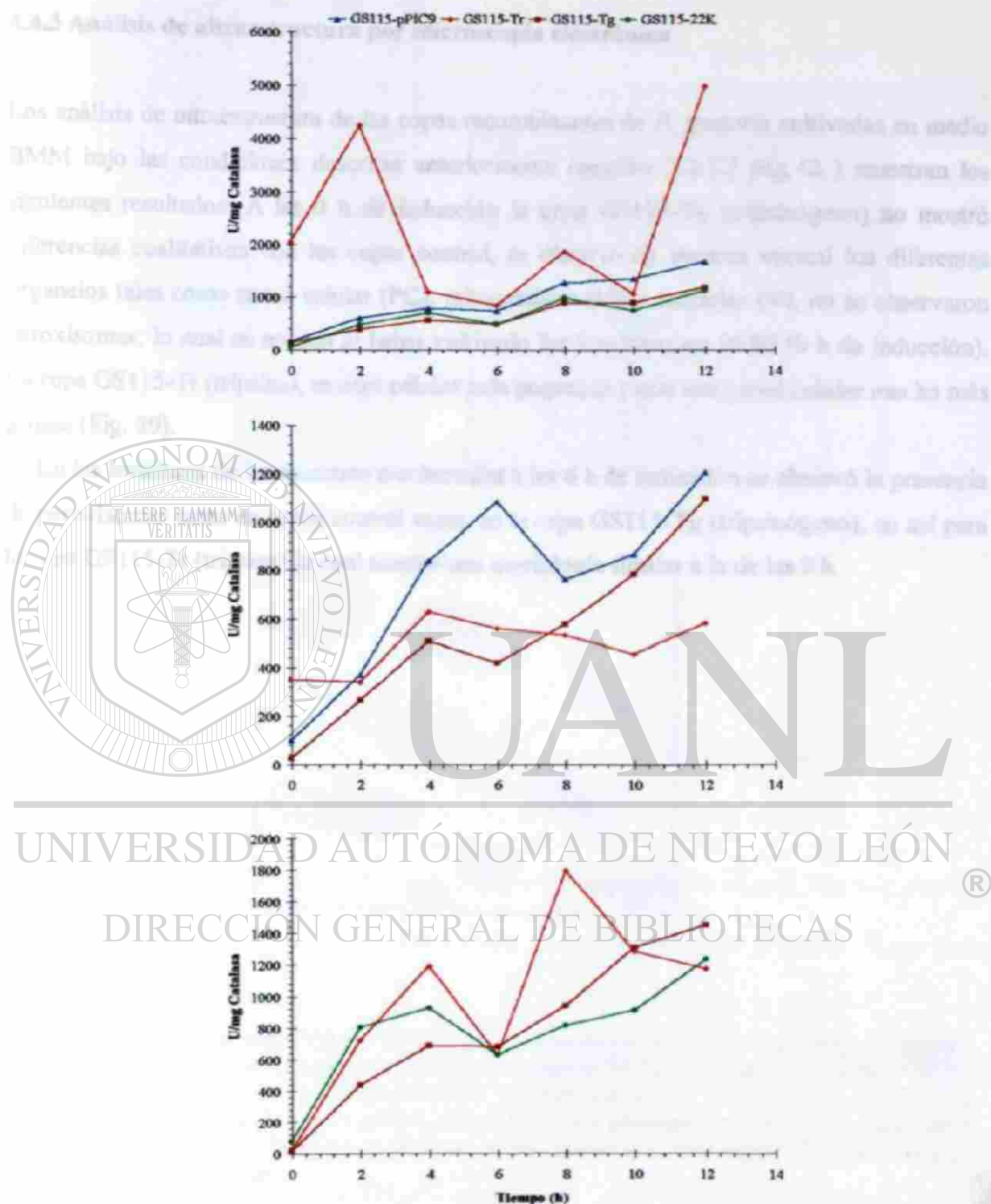
**Tabla XVIII. Valores de actividad de catalasa de extractos celulares de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a diferentes tiempos de inducción en medio BMM.**

Actividad de Catalasa (U/mg) Ensayo 1				
Tiempo (h)	GS115-pPIC9K	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-22K
0	166.41	2052.41	150.58	71.31
2	618.19	4260.34	401.88	493.89
4	803.65	1110.15	579.30	714.93
6	755.92	860.21	498.90	500.29
8	1268.41	1873.16	907.55	996.16
10	1361.96	1076.51	914.05	768.55
12	1686.29	4999.26	1200.46	1137.92

Actividad de Catalasa (U/mg) Ensayo 2			
Tiempo (h)	GS115-pPIC9K	GS115-Tr	GS115-Tg
0	100.26	349.31	26.41
2	370.36	339.36	263.73
4	841.94	631.45	511.95
6	1088.82	561.69	419.89
8	761.39	535.06	578.74
10	866.65	455.04	783.62
12	1208.86	584.91	1096.81

Actividad de Catalasa (U/mg) Ensayo 3			
Tiempo (h)	GS115-Tr	GS115-Tg	GS115-22K
0	19.28	17.10	78.67
2	724.78	443.14	809.50
4	1193.55	688.36	930.05
6	637.05	687.57	637.83
8	1799.57	946.90	821.21
10	1289.69	1318.41	918.02
12	1177.43	1455.82	1242.03

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

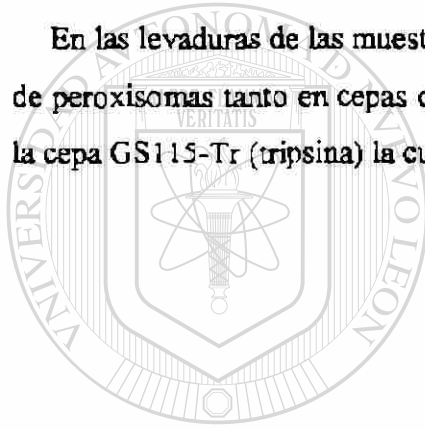


**Figura 28. Actividad específica de la enzima catalasa de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos. Se muestran los tres ensayos realizados. Cepa GS115-Tg (■), cepa GS115-Tr (◆), cepa GS115-pPIC9K (▲), cepa GS115-22K (●).**

#### 4.4.3 Análisis de ultraestructura por microscopía electrónica

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

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

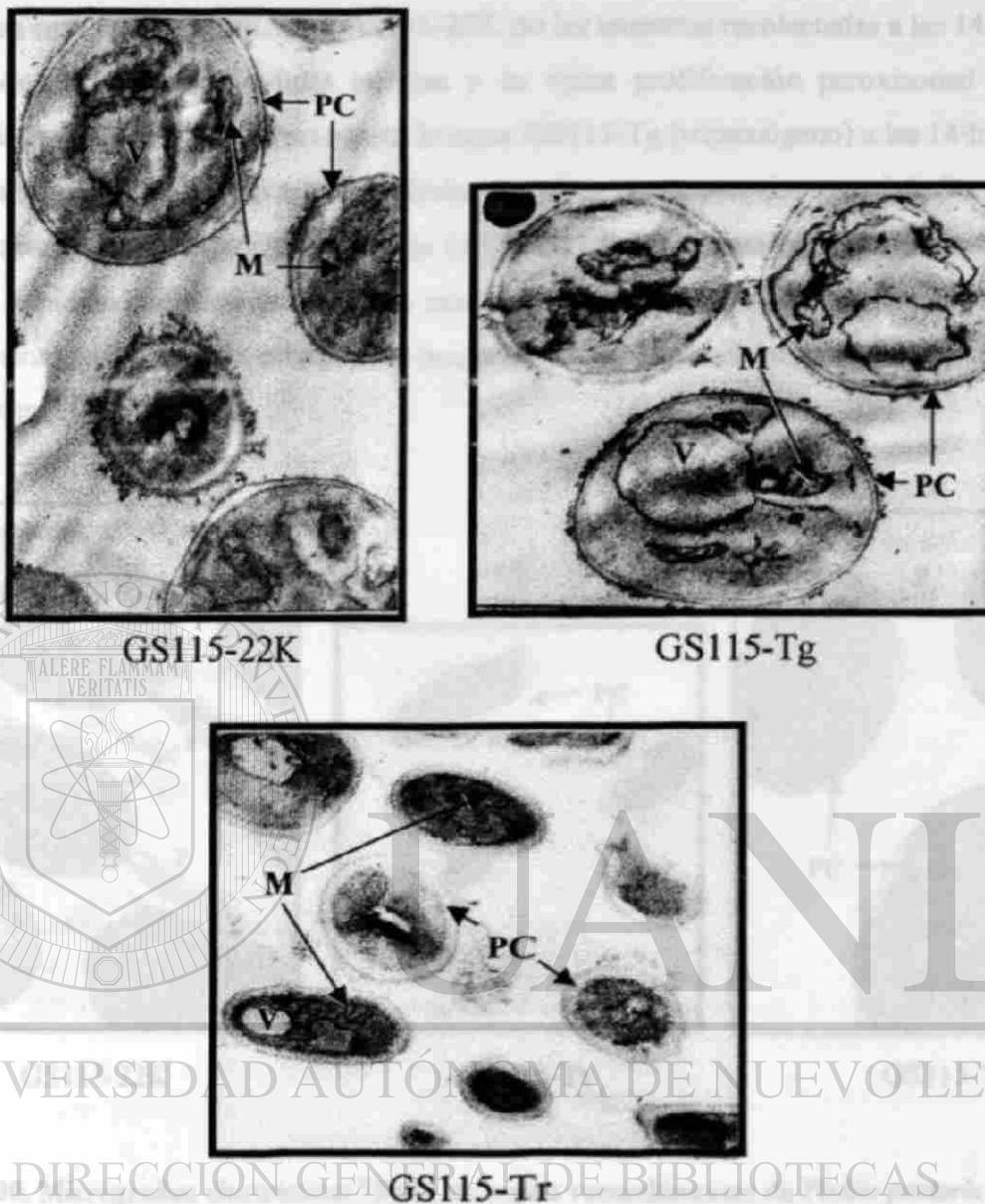


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

Las células de GS115-Tr (tríplicas) no poseen muchas diferencias ultraestructurales entre las 0, 6, 14 y 150 h de inducción. Esto es conjunto con previas pruebas de cinética de crecimiento y actividad de alcohol oxidasa, revelando a pensar que estas cepas permanecen en un estado de latencia durante la inducción.

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



GS115-22K

GS115-Tr

GS115-Tg

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

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

#### 4.4.4 Cinéticas de crecimiento en medio BMG

Las cinéticas de crecimiento de las cepas GS115-Tr, GS115-Tg y GS115-pPIC9K en medio BMG (condiciones de no inducción) estimadas tanto por  $DO_{600}$  como UFC/mL, arrojaron los valores de  $\text{LnDO}_e$  vs tiempo y de  $\text{LnV}_e$  vs tiempo mostrados en la tabla XIX.

**Tabla XIX. Valores de  $\text{LnDO}_e$  y de  $\text{LnV}_e$  para cada tiempo obtenidos durante las cinéticas de crecimiento en medio BMG. Cada valor es el promedio de tres valores de  $\text{LnDO}_e$  o de  $\text{LnV}_e$ . Al valor originalmente obtenido ( $DO_{600}$  o UFC/mL) se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de corrección anteriormente descrito (sección 3.3.5.1 pag 39), obteniendo de esta manera el  $\text{LnDO}_e$  y de  $\text{LnV}_e$ .**

Tiempo (h)	$\text{LnDO}_e$ GS115-Tr	$\text{LnDO}_e$ GS115-Tg	$\text{LnDO}_e$ GS115-pPIC9K
0	0	0	0
2	0.6138	0.4541	0.3746
4	1.0233	0.9019	0.9720
6	1.7852	1.3823	1.3155
8	2.1452	1.9663	1.9049
10	2.4388	2.6319	3.0170

Tiempo (h)	$\text{LnV}_e$ GS115-Tg
8	1
10	1.1163
12	1.1582
14	1.1954

Tiempo (h)	$\text{LnV}_e$ GS115-Tr
2	1
3	0.9777
4	1.0030
5	1.0020
7	1.0398
8	1.0727
10	1.0518
23.25	1.2207
25.25	1.2321
28.25	1.2539



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

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

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

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

Las cinéticas de crecimiento de las cepas GS115-Tg, GS115-Tr y GS115-pPIC9K en medio BMM suplementado con sorbitol estimadas tanto por  $DO_{600}$  como UFC/mL, arrojaron los valores de  $\text{Ln}DO_e$  vs tiempo mostrados en la tabla XXI y los valores de  $\text{Ln}V_e$  vs tiempo mostrados en la tabla XXII.

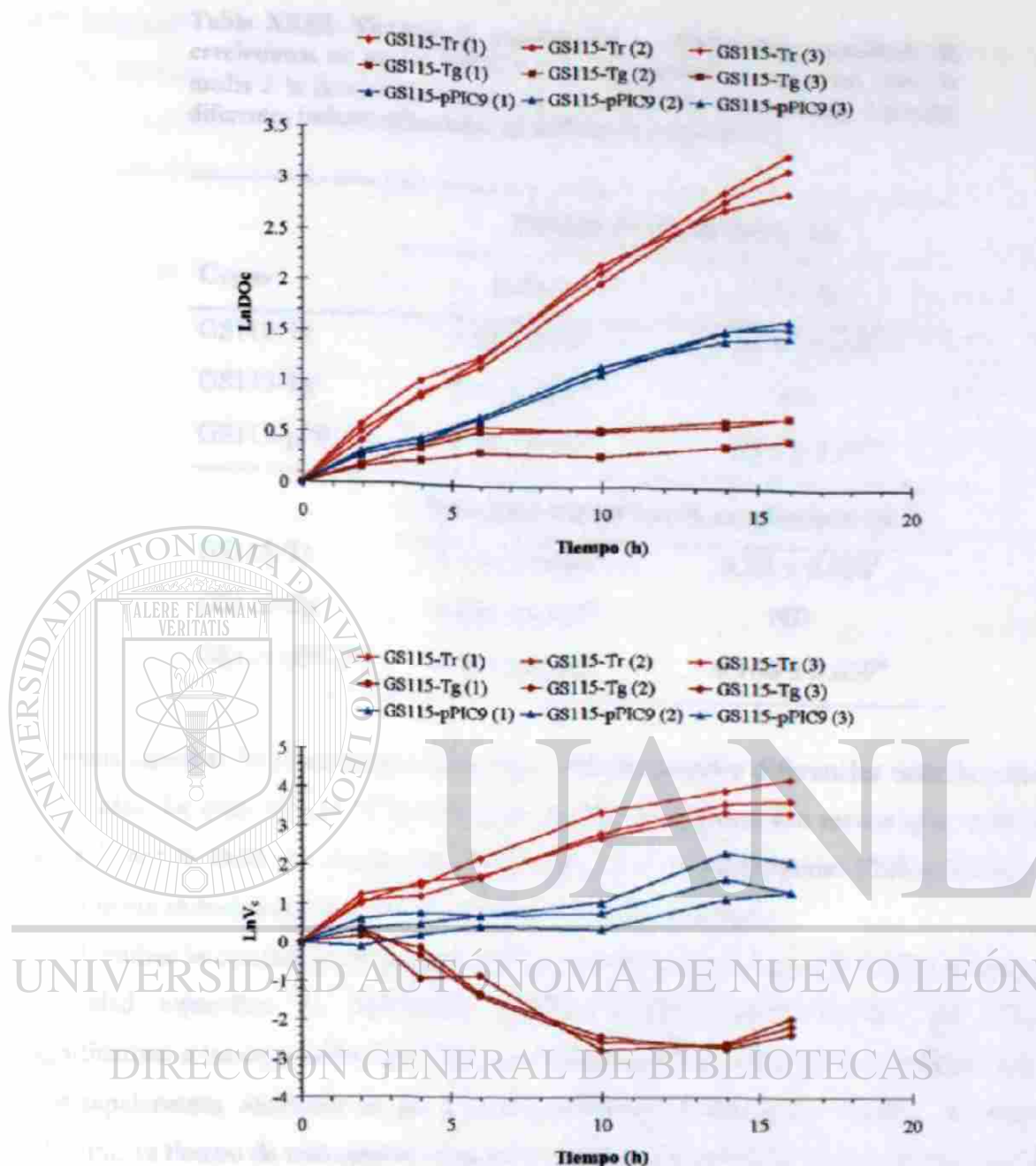
**Tabla XXI.** Valores de logaritmos naturales de  $DO_{600}$  corregidos ( $\text{Ln}DO_e$ ) de los tres ensayos realizados para cada cepa y a cada tiempo. Al valor de  $DO_{600}$  originalmente obtenido se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de corrección anteriormente descrito (sección 3.3.5.1 pag 39), obteniendo de esta manera el  $\text{Ln}DO_e$ .

Tiempo (h)	$\text{Ln}DO_e$ GS115-Tr			$\text{Ln}DO_e$ GS115-Tg			$\text{Ln}DO_e$ GS115-pPIC9K		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.4112	0.5735	0.5085	0.1595	0.1769	0.2679	0.3039	0.2716	0.2968
4	0.8989	1.0275	0.8641	0.2324	0.3540	0.4014	0.4480	0.3991	0.4533
6	1.1707	1.2722	1.2434	0.3378	0.5300	0.5918	0.6822	0.6803	0.6557
10	2.0126	2.1226	2.1999	0.2900	0.5550	0.5370	1.1731	1.1782	1.1084
14	2.8612	2.9496	2.7711	0.4023	0.6604	0.6116	1.5650	1.4658	1.5581
16	3.1766	3.3301	2.9503	0.4747	0.7038	0.7051	1.6065	1.5118	1.6776

**Tabla XXII.** Valores de logaritmos naturales de UFC/mL corregidos ( $\text{Ln}V_e$ ) de los tres ensayos realizados para cada cepa y a cada tiempo. Al valor de UFC/mL originalmente obtenido se le calculó el logaritmo natural y se le aplicó un factor de corrección anteriormente descrito (sección 3.3.5.1 pag 39), obteniéndose de esta manera el  $\text{Ln}V_e$ .

Tiempo (h)	$\text{Ln}V_e$ GS115-Tr			$\text{Ln}V_e$ GS115-Tg			$\text{Ln}V_e$ GS115-pPIC9K		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1.2536	1.0799	1.0371	0.3675	0.1709	0.3568	0.6194	0.3621	-0.0793
4	1.4937	1.2327	1.5937	-0.3027	-0.0974	-0.9171	0.7817	0.5034	0.2078
6	2.2201	1.7079	1.7576	-1.3863	-1.3101	-0.8401	0.7302	0.7298	0.4558
10	3.3851	2.8250	2.7085	-2.5543	-2.4265	-2.7668	0.7817	1.0734	0.3533
14	3.9805	3.6381	3.4147	-2.6676	-2.7317	-2.6000	1.6882	2.3494	1.1735
16	4.2777	3.7105	3.4016	-2.1484	-2.3505	-1.9457	1.3555	2.1161	1.3477

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



**Figura 31. Cinéticas de crecimiento de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* en medio BMM suplementado con sorbitol.** La gráfica superior fue construida con mediciones de  $\text{DO}_{600}$  mientras que la gráfica inferior fue construida con determinaciones de  $\text{UFC}/\text{mL}$ . El eje de la ordenadas muestra los valores de  $\text{LnDO}_e$  (gráfica superior) y  $\text{LnV}_c$  (gráfica inferior) mientras que el eje de las abscisas muestra los valores de tiempo en horas. El color café (■) representa a la cepa GS115-Tg, el color rojo (♦) a la cepa GS115-Tr, y el color azul (▲) a la cepa GS115-pPIC9K.

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

Cepas	Tiempo de duplicación (h)	
	D.O.	UFC/mL
GS115-Tr	$3.52 \pm 0.01^a$	$2.79 \pm 0.27^a$
GS115-Tg	$8.73 \pm 3.02^b$	ND
GS115-pPIC9K	$6.36 \pm 0.12^b$	$6.95 \pm 2.17^b$

Cepas	Velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )	
	D.O.	UFC/mL
GS115-Tr	$0.197 \pm 0.008^a$	$0.25 \pm 0.024^a$
GS115-Tg	$0.079 \pm 0.022^b$	ND
GS115-pPIC9K	$0.109 \pm 0.002^b$	$0.108 \pm 0.039^b$

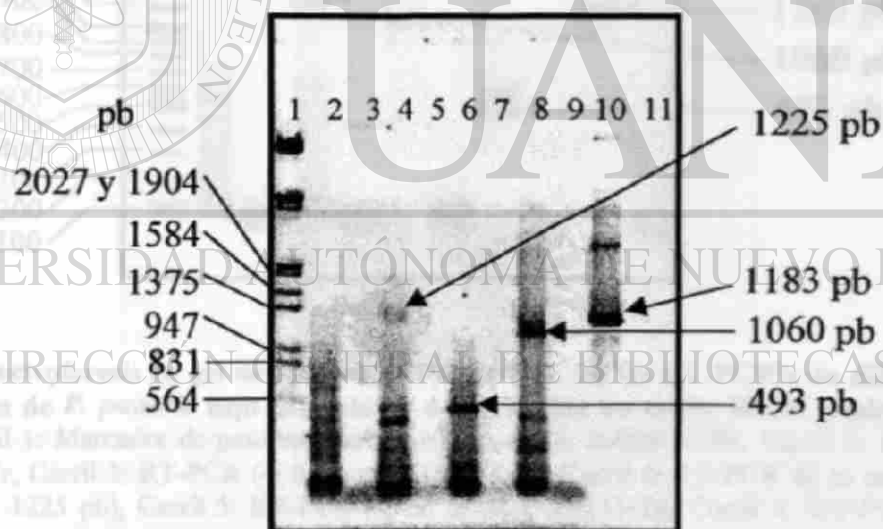
Estas cinéticas de crecimiento indican que existen grandes diferencias entre las tres cepas estudiadas. La cepa GS115-Tr presentó un tiempo de duplicación menor que el de la cepa control, por lo tanto una mayor velocidad específica de crecimiento (Tabla XXIII), y este crecimiento se mantuvo constante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

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

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

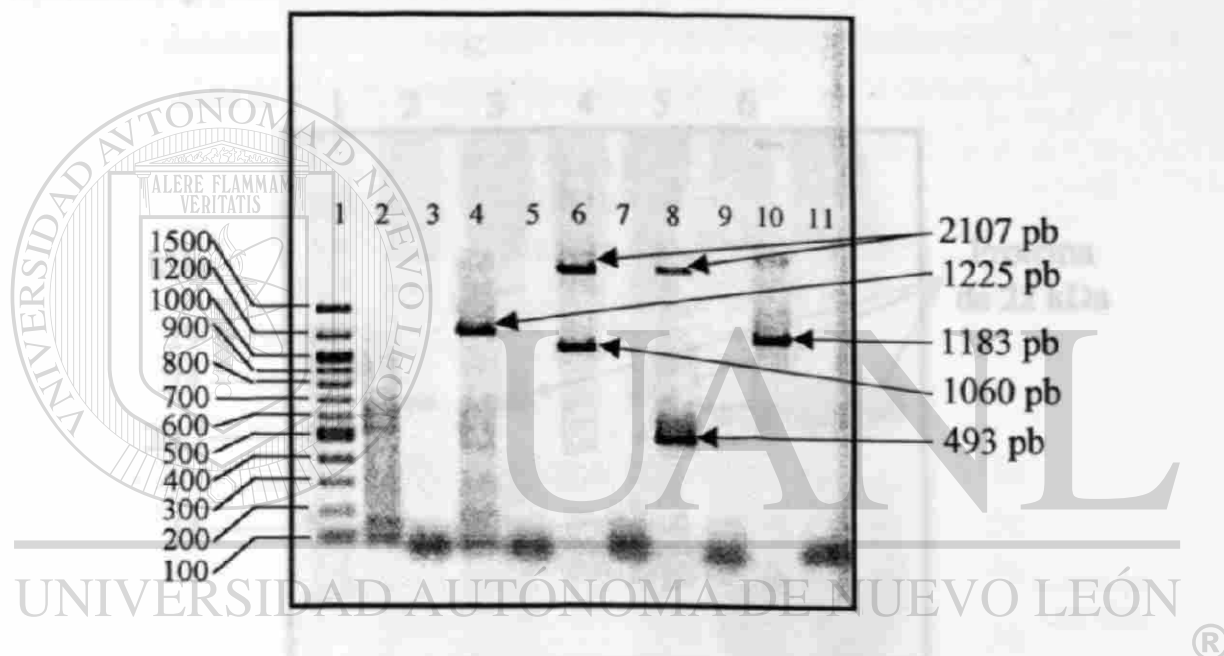
##### 4.5.1 Detección de transcritos por RT-PCR

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



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

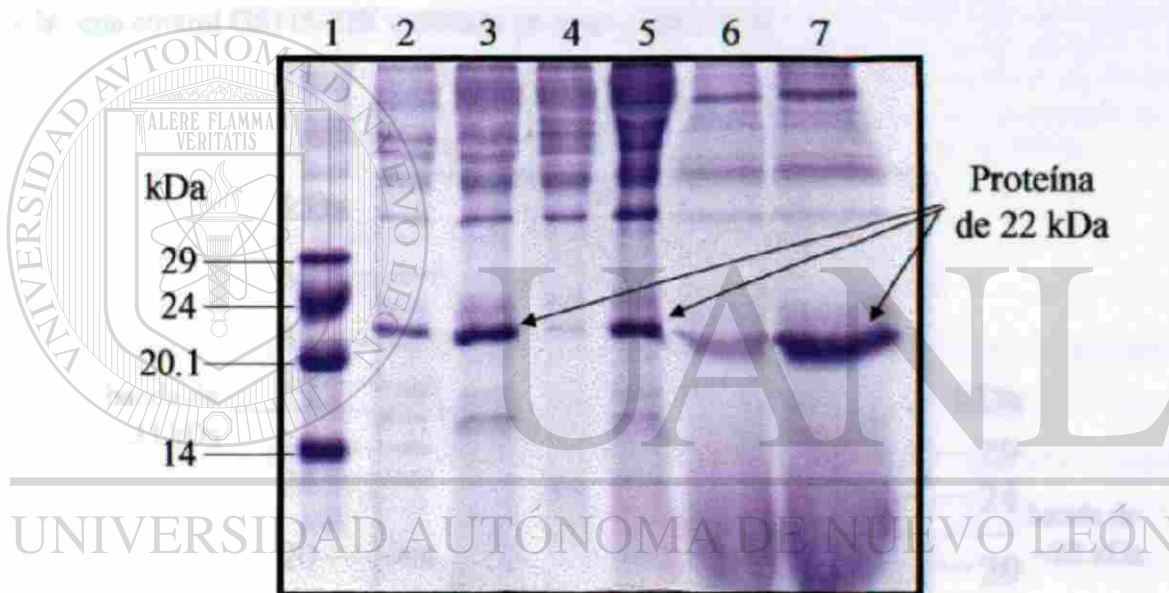
Los resultados del análisis de RT-PCR de las cepas de *P. pastoris* cultivadas en medio BMM suplementado con sorbitol son los siguientes: Para la cepa GS115-Tr no fue posible detectar el transcrito específico esperado de 1183 pb, mientras que para las demás cepas si fueron detectados los transcritos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



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

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

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



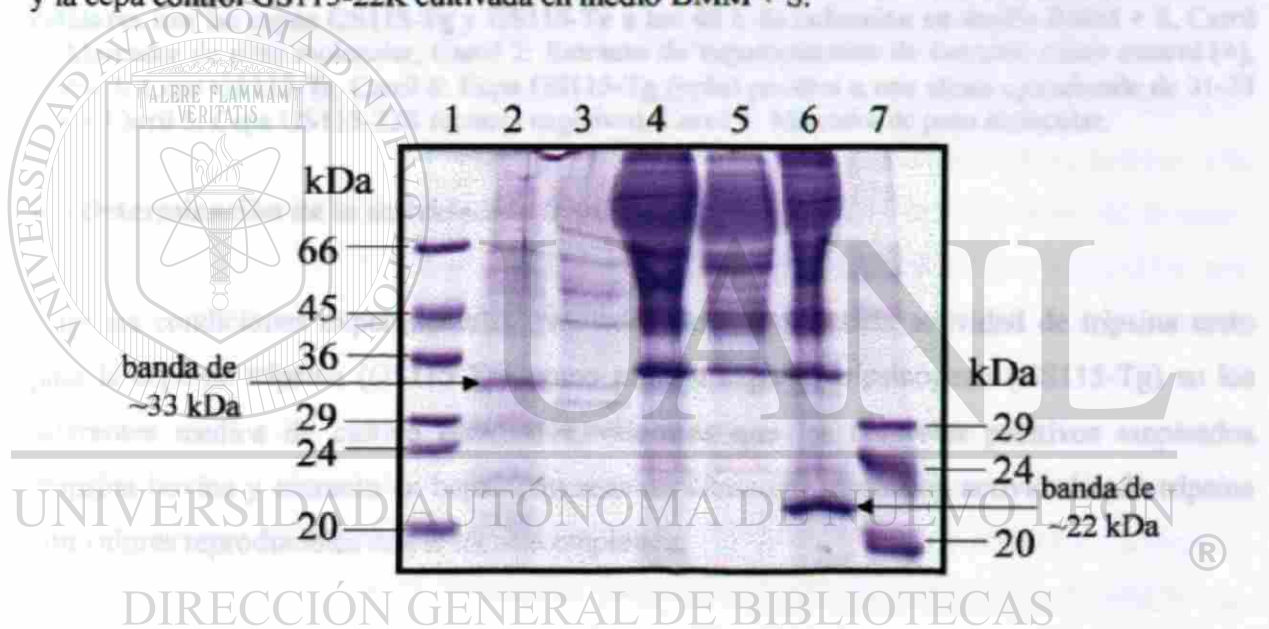
**Figura 34. Electroforesis SDS-PAGE al 15% de proteínas extracelulares de fermentaciones con la cepa GS115-22K.** Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2 y 3: En medio BMM 12 y 24 h de inducción, Carril 4 y 5: En medio BMM suplementado con sorbitol 12 y 24 h de inducción, Carril 6 y 7: En medio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

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

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

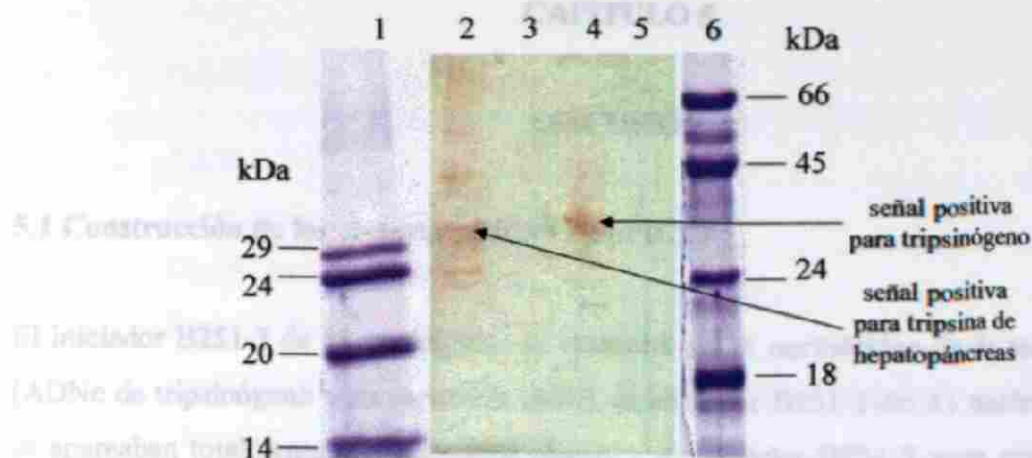
El medio de cultivo libre de células de fermentaciones con la cepa GS115-Tr cultivada en medio BMM suplementado con sorbitol presentó una banda de tamaño aproximado a 33 kDa (tamaño similar al de la tripsina de camarón purificada de fuente natural 31 kDa) (Fig. 35) que no se observó en los otros medios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

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



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





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

#### 4.6 Determinación de la actividad de tripsina

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO 5

### DISCUSIÓN

#### 5.1 Construcción de los vectores pPIC9Tr y pPIC9Tg

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

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

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

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

La integridad de los plásmidos construidos pPIC9Tg (portador del ADNc de tripsinógeno) y pPIC9Tr (portador del ADNc de tripsina) fue corroborada mediante la digestión de éstos con la endonucleasa *Pst* I. Los tamaños de cada uno de los fragmentos obtenidos con estas digestiones correspondieron a los tamaños teóricos obtenidos por el programa *DNA Strider 1.1*, además con esta digestión fue posible diferenciar entre los plásmidos pPIC9Tg, pPIC9Tr y pPIC9hGH22K debido a que cada uno éstos presentó un producto de digestión distintivo. El pPIC9Tg de 710 pb, el pPIC9Tr de 668 pb y el pPIC9hGH22K de 365 pb.

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

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

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

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 5.3 Caracterización de genotipos y fenotipos de cepas recombinantes

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

La integración del vector pPIC9Tg fue corroborada en una clona obtenida de la transformación del vector digerido con *Sal* I (integración en el locus *his4*) y en otra obtenida de la transformación del vector digerido con *Sac* I (integración en el locus *AOX1*) al llevar a cabo la PCR y obtener dos productos amplificados de 1225 y 2105 pb (correspondientes al vector recombinante y al gen *AOX1* respectivamente), mientras que al llevar a cabo el análisis de

PCR de cuatro clonas para comprobar la integración de pPIC9Tr por la misma metodología: 2 obtenidas de la transformación del vector digerido con *Sac* I y otras dos obtenidas de la transformación del vector digerido con *Sac* I, presentaron solo un producto amplificado de 1183 pb identificado por una banda tenue en un gel de agarosa al 1% (correspondiente al vector recombinante), el fragmento de 2105 pb proveniente del gen *AOX1* no fue detectado. Inicialmente se pensó que el gen heterólogo o su producto ocasionaba alguna alteración en la célula, debido a que al realizar el aislamiento de ADN genómico se presentaron mayores dificultades con estas cepas (GS115-Tr) que con las demás cepas analizadas (GS115-Tg, GS115-22K y GS115-pPIC9) por ejemplo, se obtenía menor cantidad de ADN genómico debido a que fueron más difícil de lisar dichas células. También se pensó que estas alteraciones afectaban la eficiencia de la PCR por lo que difícilmente se obtenía una sola banda y muy tenue.

### 5.3.2 Inducción de la expresión de los ADNc's heterólogos

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

##### 5.4.1 Cinéticas de crecimiento en BMM

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

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

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

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

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

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

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

#### 5.4.3 Análisis de ultraestructura por Microscopía Electrónica

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

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



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

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

#### 5.4.4 Cinéticas de crecimiento en medio BMG

Los resultados de las cinéticas de crecimiento en medio BMG indican que la velocidad específica de crecimiento de la cepa GS115-Tr fue menor que la cepa control (GS115-pPIC9), mientras que la cepa GS115-Tg mostró una ligera diferencia (menor) en el crecimiento que el mostrado por la cepa control. Anteriores reportes en la literatura (11) indican que aún bajo estas condiciones de no inducción, existe una expresión basal de los genes heterólogos los cuales están controlados por el promotor de *AOX1*. La diferencia percibida en velocidades específicas de crecimiento podría ser efecto de los productos heterólogos sintetizados a causa de esta expresión basal.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

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

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

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

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

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

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

### 5.5.1 Detección de transcritos por RT-PCR

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

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

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

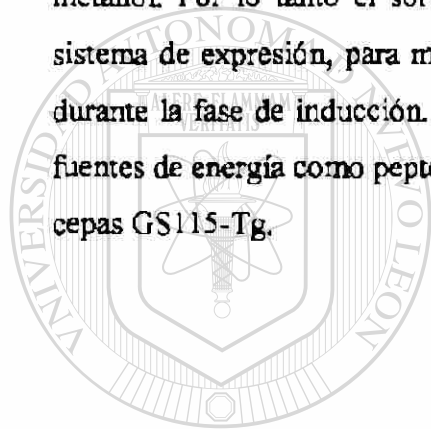
### 5.5.2 Análisis de proteínas de fermentaciones de altas densidades celulares

En los geles de poliacrilamida la banda intensa correspondiente a la proteína de 22 kDa de la cepa GS115-22K fue observada en los tres medios de cultivo empleados (BMM, BMMY y BMM + S) es una prueba más de que no existió represión del promotor *AOX1* y además se llevó a cabo la traducción en los medios de cultivo mencionados.

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

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

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



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

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

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

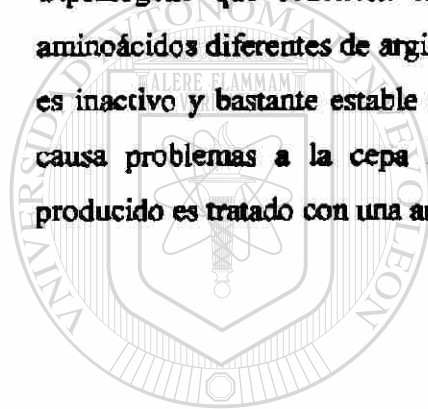
Al realizar la búsqueda de los factores que afectaban la producción de tripsina o tripsinógeno se encontraron importantes diferencias entre las cepas construidas (GS115-Tr y GS115-Tg) y las cepas control (GS115-22K y GS115-pPIC9K).

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

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

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

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



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPÍTULO 7

## BIBLIOGRAFÍA

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

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



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

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

## CAPÍTULO 8

## ANEXO

## Reporte del Genbank del ADNc de tripsina de camarón

LOCUS PVTRYPSIN 854 bp RNA INV 01-OCT-1996  
 DEFINITION P.vannamei mRNA for trypsin.  
 ACCESSION X86369  
 NID g785034  
 KEYWORDS trypsin.  
 SOURCE Penaeus vannamei.  
 ORGANISM Penaeus vannamei  
 Eukaryotae; mitochondrial eukaryotes; Metazoa; Arthropoda;  
 Crustacea; Malacostraca; Eucarida; Decapoda; Dendrobranchiata;  
 Penaeidae; Penaeus.

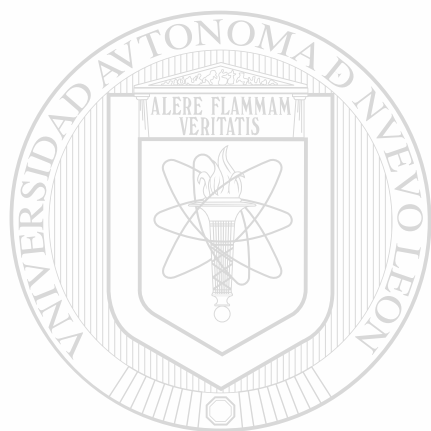
REFERENCE 1 (bases 1 to 854)  
 AUTHORS Klein,B., Le Mouillac,G., Sellos,D. and Van Wormhoudt,A.  
 TITLE Molecular cloning and sequencing of trypsin cDNAs from Penaeus  
 vannamei (Crustacea, Decapoda): use in assessing gene expression  
 during the moult cycle  
 JOURNAL Int. J. Biochem. Cell Biol. 28 (5), 551-563 (1996)  
 MEDLINE 96252881  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 854)  
 AUTHORS Van Wormhoudt,A.E.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (18-APR-1995) A.E. Van Wormhoudt, College de France /  
 CNRS, Laboratoire de Biologie Marine, BP 225, 29182 Concarneau,  
 FRANCE

FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..854  
 /organism="Penaeus vannamei"  
 /db\_xref="taxon:6689"  
 /dev\_stage="adult"  
 /tissue\_type="hepatopancreas"  
 sig\_peptide 3..41  
 CDS 3..803  
 /EC\_number="3.4.21.4"  
 /codon\_start=1  
 /product="trypsin"  
 /db\_xref="PID:g785035"  
 /translation="MKTLILCVLLAGAFAPSRKPTFRRLNKI VGGTQATPGELPYQ  
 LSFQDISFGFAWHECCGASIIYENWALCAGHCVQGEDMNNPQYLQVVAGELNQDVDEGT  
 EQTVILSKI IQHEDYNGFTTISNDISLLKLSQPLSFNDNVRAIDIPAGGHAASGDCIYS  
 GWTTSSEGGSTPSVLQKVTVPVIVSDECRDAYGQSDIEDSMICAGVPEGGKDCQGD  
 GGPLACSDITASTYLAGIVSNWGYGCARPGYPGVYAEVSYHVWIKANAV"

BASE COUNT 174 a 277 c 222 g 181 t

ORIGIN  
 1 ccatgaagac cctcctctc tgtgtgctc ttgctggagc ttttgccgc cctccaggc  
 61 agcccaectt ccgccgcggt ctcaacaaga tcgtcggagg aactgacgac actcccggg  
 121 agctgcetta ccagctcagt ttccaggaca tctccttctg ctttgcctgg cacttctgog  
 181 ggcctccat ctacaacgag aactgggcca tctgcgocgg ccactgctc cagggcgagg  
 241 acatgaacaa ccccgattac cttcaggteg ttgccggaga acttaaccag gatgtggatg  
 301 agggcaccga gcagacggte atcctctcca agatcatcca acacgaggac tacaacggt  
 361 tcaccatcag caacgacatc tccctgctca agctgtctca gctctgagc tcaatgaca  
 421 acgttcgocg catcgatatt ccgctcagg gtcacgctgc cttcggcag tgcctgctc  
 481 ccggtggggg caccacctcc gagggaggaa gcaccccag tgcctgagc aaggtgaccg  
 541 ttccatcgt gtctgacgac gactgtcgcg atgcttatgg ccagagcgac attgaggact  
 601 ccatgatctg tgcgggagtg ccgagggcg gcaaggactc gtgccagggt gactctggcg

661 gccccttgc ctgctctgac acggcctcca cctacctggc eggcctcgtg tcttggggct  
721 acggctgtgc cegtcccggc taccctggcg tgtacgtga ggtctctac catgtcgatt  
781 ggattaaggc caatgctggt taatcaagtt gtttaacatg tacttacctt gaaagcaata  
841 aagaaaaaaa tata

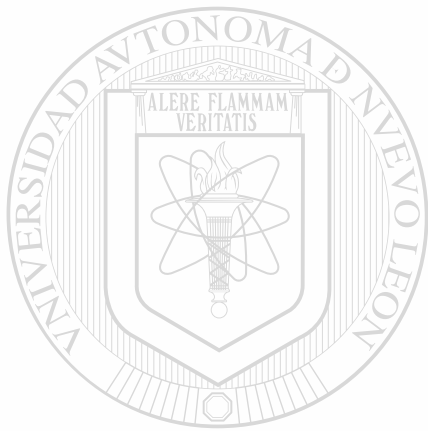


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



