

ANEXO 3
BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.
DESCRIPCIÓN DE LA TESIS DOCTORAL O DEL TRABAJO DE GRADO
FORMULARIO

TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO						
Cbración y expresión del gen optimizado de la enzima 1 duronato 2-sulfato sulfatasa humana (IDS) en Pichia pastoris.						
SUBTÍTULO, SI LO TIENE						
AUTOR O AUTORES						
Apellidos Completos		Nombres Completos				
Díaz Álvarez		Sergio Andrés				
DIRECTOR (ES) TESIS DOCTORAL O DEL TRABAJO DE GRADO						
Apellidos Completos		Nombres Completos				
Córdoba Ruiz		Henry Alito.				
FACULTAD						
Ciencias						
PROGRAMA ACADÉMICO						
Tipo de programa (seleccione con "x")						
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado			
x						
Nombre del programa académico						
Microbiología Industrial						
Nombres y apellidos del director del programa académico						
Janeth del Carmen Anas Pabicas.						
TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:						
PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):						
CIUDAD						
AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO		NÚMERO DE PÁGINAS				
Bogotá DC		2011				
TIPO DE ILUSTRACIONES (seleccione con "x")						
Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos	Mapas	Fotografías	Partituras
		x				
SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO						
Nota: En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.						

MATERIAL ACOMPAÑANTE					
TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO		
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?
Vídeo					
Audio					
Multimedia					
Producción electrónica					
Otro Cuál?					
DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS					
Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. (En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo biblioteca@javeriana.edu.co, donde se les orientará).					
ESPAÑOL			INGLÉS		
RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS (Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)					
<p>La mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o Síndrome de Hunter, es una enfermedad hereditaria de almacenamiento lisosomal ligada al cromosoma X, causada por la deficiencia de la enzima Iduronato 2-sulfato sulfatasa (IDS). Actualmente la producción de esta enzima para la terapia de reemplazo enzimático se realiza en células de mamífero y representa costos altamente elevados. La levadura <i>Pichia pastoris</i>, como sistema de expresión de proteínas recombinantes presenta ventajas para la producción de este tipo de enzimas. En este trabajo se utilizó el gen de IDS optimizado con el objetivo de incrementar los rendimientos hasta ahora reportados. Se realizó la clonación de este gen en <i>P. pastoris</i> GS115, los clones fueron evaluados a escala de 10 ml los clones que presentaron mayor actividad fueron evaluados posteriormente a volumen de 100 mL observando valores máximos de actividad con el clon 8 y 13 de 6.4 y 5.99 U/mg de proteína respectivamente. Adicionalmente se evaluó el clon 13 a escala de 1500 mL obteniendo valores de actividad 7.9 U/mg proteína total. Estos resultados preliminares sugieren que la optimización del gen de IDS para <i>P. pastoris</i> tiene un efecto positivo sobre la actividad de la enzima comparada con resultados obtenidos en trabajos previos, mostrando la factibilidad de usar este sistema de expresión como alternativa para la producción de la IDS recombinante activa para el futuro tratamiento de la Mucopolisacaridosis tipo II.</p> <p>The mucopolisacaridosis type II (MPS II) or Hunter syndrome is a X-linked inherited lysosomal storage disease, caused by the deficiency of the enzyme iduronate 2-sulfate sulfatase (IDS). Currently the production of this enzyme for enzyme replacement therapy is performed in mammalian cells and It is quite expensive. Yeast <i>Pichia pastoris</i>, has advantages for the production of such enzymes as expression system of recombinant proteins. In this work it was used the IDS gene optimized in order to increase yields so far reported. Performed cloning of this gene in <i>P. pastoris</i> GS115, the clones were evaluated at 10 ml clones that showed higher activity were subsequently evaluated at 100 mL in clone 8 and 13 of 6.4 and 5.99 U / mg protein, respectively. Additionally clone 13 was evaluated at 1500 mL obtaining values of activity of 7.9 U / mg total protein. These preliminary results suggest that optimizing the IDS gene for <i>P. pastoris</i> has a positive effect on enzyme activity compared with results obtained in previous works, showing the feasibility of using this expression system as an alternative for the production of active recombinant IDS for the future treatment of Mucopolysaccharidosis type II.</p>					

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN OPTIMIZADO DE LA ENZIMA IDURONATO 2-SULFATO
SULFATASA HUMANA (IDS) EN *Pichia pastoris***

SERGIO ANDRES DIAZ ALVAREZ

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
para optar por el título de**

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C. 2011**

**CLONACION Y EXPRESION DEL GEN OPTIMIZADO DE LA ENZIMA IDURONATO 2-SULFATO
SULFATASA HUMANA (IDS) EN *Pichia pastoris***

SERGIO ANDRES DIAZ ALVAREZ

APROBADO

HENRY ALIRIO CÓRDOBA RUÍZ I.Q MSc.

Director

EDWIN ALEXANDER RODRIGUEZ LOPEZ L.Q.

Co-Director

CARLOS JAVIER ALMÉCIGA DIAZ QF. Ph.D.

Asesor

NOTA DE ADVERTENCIA

ARTÍCULO 23 DE LA RESOLUCIÓN No.13 DE JULIO DE 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo por buscar verdad y justicia”

RESUMEN

La mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o Síndrome de Hunter, es una enfermedad hereditaria de almacenamiento lisosomal ligada al cromosoma X, causada por la deficiencia de la enzima Iduronato 2-sulfato sulfatasa (IDS). Actualmente la producción de esta enzima para la terapia de reemplazo enzimático se realiza en células de mamífero y representa costos altamente elevados. La levadura *Pichia pastoris*, como sistema de expresión de proteínas recombinantes presenta ventajas para la producción de este tipo de enzimas. En este se utilizó el gen de IDS optimizado que fue desarrollado mediante el uso de la herramienta Mr. Gene® y se encargó la síntesis a la compañía GENEART® con el objetivo de incrementar los rendimientos hasta ahora reportados. Se realizó la clonación de este gen en *P. pastoris* GS115, obteniéndose 20 clones, los cuales fueron evaluados a escala de 10 ml de cultivo durante 96 horas de inducción a 30°C y pH 4.5. La concentración de proteínas y la actividad enzimática en el medio de cultivo, fueron medidas cada 24 horas. La mayor actividad observada fue de 42,5 U·mg⁻¹ a las 48 h (clon 12) y de 49,76 U·mg⁻¹ a las 72 h (clon 13). Se evaluaron los clones que presentaron mayor actividad a 10 mL (Clones 8,11,12,13,14 y 15) a volumen de 100 mL observando valores máximos de actividad con el clon 8 y 13 de 6.4 y 5.99 U/mg de proteína respectivamente, a las 48 horas de inducción. Adicionalmente se evaluó el clon 13 a escala de 1500 mL obteniendo valores de actividad 7.9 U/mg proteína total, a temperatura de 28°C, agitación 900 rpm. Estos resultados preliminares sugieren que la optimización del gen de IDS para *P. pastoris* tiene un efecto positivo sobre la actividad de la enzima comparada con resultados obtenidos en trabajos previos, mostrando la factibilidad de usar este sistema de expresión como alternativa para la producción de la IDS recombinante activa para el futuro tratamiento de la Mucopolisacaridosis tipo II. Sin embargo, es necesario analizar los factores que pueden dar la posible producción de proteína no activa con el objetivo de mejorar la expresión a diferentes escalas.

JUSTIFICACIÓN-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para el tratamiento de uno de los Errores innatos del metabolismo como es la mucopolisacaridosis tipo II, se ha incursionado en la terapia de reemplazo enzimático (11); para esta terapia ha sido necesaria la producción a gran escala de una sulfatasa, la enzima Iduronato 2-sulfato (IDS) encargada de evitar la acumulación de Glicosaminoglicanos en diferentes tejidos, con la consecuente disminución de las patologías evidenciadas en el paciente afectado (10). No obstante, es preciso afirmar que la producción de esta enzima se ha llevado en diferentes sistemas de expresión y existe en la actualidad un producto comercial producido en líneas celulares de alto costo (14). Con el objetivo de obtener esta enzima en otro modelo diferente a líneas celulares con menores costos. El IEIM (Instituto de Errores Innatos del Metabolismo- PUJ) ha venido estudiando el uso de la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión, el cual ha sido ampliamente utilizado para la producción de otras enzimas, dentro de las cuales se encuentran enzimas humanas, no precisamente sulfatasas (23). Se han observado niveles bajos de producción de esta enzima al parecer por la presencia del péptido señal nativo y/o porque los codones empleados en la secuencia de la IDS humana no son los más eficientes para expresión de la enzima por la levadura (35). De esta forma, en este estudio se desea optimizar la producción de IDS hasta hoy reportada por medio de células transformadas con el gen de la IDS optimizado y sin el péptido señal nativo. Esta investigación es vital ya que es la primera vez que se reporta la expresión de esta enzima en *P.pastoris* a partir de un gen sintético.

TABLA DE CONTENIDO

	PAG.
INTRODUCCION	12
I MARCO TEORICO	13
1. ERRORES INNATOS DEL MATABOLISMO	13
1.1 MUCOPOLISACARIDOSIS	13
1.1.1 MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II	14
2. IDURONATO 2- SULFATO SULFATASA (IDS)	15
3. TRATAMIENTO SINDROME DE HUNTER	16
3.1 TERAPIA DE REMPLAZO ENZIMATICO (TRE)	16
4. SISTEMAS DE EXPRESION DE PROTEINAS	17
4.1 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN <i>Pichia pastoris</i> (<i>P. pastoris</i>)	18
5. OPTIMIZACION DE CODONES PARA MEJORAR LA EXPRESION	19
II OBJETIVOS	20
1. OBJETIVO GENERAL	20
1.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
III MATERIALES Y METODOS	21
1. MICROORGANISMOS	21
1.1 <i>Escherichia coli</i>	21
1.2 <i>Pichia pastoris</i>	21
1.3 <i>E.coli</i> ELECTROCOMPETENTES	21
2. BANCO DE CÉLULAS DE <i>P.pastoris</i>	21
3. OPTIMIZACIÓN DEL GEN DE IDS	22
4. PLÁSMIDOS	22
4.1 PPIC9	22
4.2 IDS-OPT	23
4.3 PPIC9-IDS	23
5. TRANSFORMACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS EN <i>E.coli</i>	23
5.1 TRANSFORMACIÓN DE <i>E.coli</i> POR ELECTROPORACIÓN	23
5.2 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMIDICO	24
5.2.1 CUANTIFICACIÓN DE ADN	24
6. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN PPIC9-IDS	24
6.1 CORTE CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	24
6.2 REACCIÓN DE LIGACIÓN INSERTO VECTOR	24
7. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS <i>E.COLI</i> COMPETENTES CON LIGANDO	25
8. EVALUACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL PLÁSMIDO	25
9. TRANSFORMACIÓN DE <i>P.pastoris</i> CON PPIC9-IDS	25
9.1 PREPARACIÓN DEL PLÁSMIDO PARA ELECTROPORACIÓN	25
9.2 ELECTROPORACIÓN DE CÉLULAS DE <i>P.pastoris</i>	26
9.3 DETERMINACIÓN DE FENOTIPOS DE CÉLULAS OBTENIDAS	26
10. EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN A DIFERENTES ESCALAS	26
10.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA	26
10.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES	26
10.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y VOLUMÉTRICA IDS	27

10.4 CULTIVO DE CLONES A VOLUMEN DE 10ML	27
10.5 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE IDS A ESCALA DE 100ML	28
10.6 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE IDS A ESCALA DE BIOREACTOR	28
IV RESULTADOS	29
1. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN	29
a. EVALUACIÓN DE LA INTEGRACIÓN DEL GEN DE IDS Y EL VECTOR	31
b. LINEARIZACIÓN DEL CONSTRUCTO PPIC9-IDS Y DEL VECTOR PPIC9	32
2. TRANSFORMACIÓN DE <i>P.PASTORIS</i> CON EL PLÁSMIDO PPIC9-IDS Y PPIC9	33
3. EVALUACIÓN DEL FENOTIPO MUT ⁺ MUT ^S	34
4. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IDS EN <i>P.pastoriS</i> A ESCALA DE 10ML	34
a. CRECIMIENTO	34
b. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EXTRACELULARES	36
c. ACTIVIDAD IDS HUMANA RECOMBINANTE	37
5. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IDS EN <i>P.pastoris</i> A ESCALA DE 100ML	38
a. CRECIMIENTO	38
b. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EXTRACELULARES	40
c. ACTIVIDAD IDS HUMANA RECOMBINANTE	41
6. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IDS EN <i>P.pastoris</i> A ESCALA DE 1500ML	42
a. EVALUACION DEL CULTIVO	42
V DISCUSIÓN	45
VI CONCLUSIONES	51
VII RECOMENDACIONES	52
VIII BIBLIOGRAFIA	53
ANEXO 1	57
ANEXO 2	66

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Pacientes con Síndrome de Hunter	15
Figura 2. Plásmido pPIC9	22
Figura 3. Plásmido IDS-OPT	23
Figura 4. Digestión del vector IDS-OPT	29
Figura 5. Construcción del plásmido de expresión	30
Figura 6. Análisis de restricción del plásmido recombinante ppic9-IDS	31
Figura 7. Linearización de constructo pPic9-IDS y del vector pPic9	32
Figura 8. Mecanismo de recombinación	32
Figura 9. Evaluación de la transformación de células de <i>P.pastoris</i>	33
Figura 10. Determinación de fenotipos Mut s Mut +	34
Figura 11. Perfil de crecimiento	35
Figura 12. Producción de proteínas totales	36
Figura 13. Actividad específica de los clones evaluados	37
Figura 14. Perfil de crecimiento	39
Figura 15. Producción de proteínas totales	40
Figura 16. Actividad específica de los clones evaluados	41
Figura 17. Estudio cinético de la expresión de IDS a escala de 1.5L	42
Figura 18. Biomasa corregida durante todo el tiempo de fermentación.	43
Figura 19. Fase de crecimiento en glicerol a volumen de 1.5L	43
Figura 20. Fase de inducción en metanol a volumen de 1.5L	44
Figura 21. Variables evaluadas durante el cultivo en bioreactor	44

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de las MPS	14
Tabla 2. Actividad de los diferentes clones	38
Tabla 3. Parámetros cinéticos determinados a escala de 100 mL.	40

INTRODUCCIÓN

La Mucopolisacaridosis Tipo II o Síndrome de Hunter (OMIM # 309900) es una enfermedad de depósito lisosomal ligada al cromosoma X, causada por la deficiencia de la enzima Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa (IDS) y donde la acumulación de los sustratos heparán y dermatán sulfato trae consigo consecuencias serias en los pacientes con esta deficiencia dependiendo su grado de severidad. En la actualidad se cuenta con la terapia de reemplazo enzimático en donde se le proporciona la enzima al paciente disminuyendo así la acumulación de las sustancias no degradadas.

Debido a que la producción de esta enzima se está realizando actualmente en líneas celulares, el costo del medicamento es considerablemente alto. Como respuesta a esta dificultad y con el objetivo de mejorar la calidad e vida del paciente y la reducción de los costes de producción, el Instituto de Errores Innatos de la Universidad Javeriana (IEIM) ha incursionado en la expresión de ésta y otras enzimas, en diferentes sistemas bacterianos como *Escherichia coli* y eucariotes como *Pichia pastoris*. En este último sistema ha sido expresado el gen nativo de la IDS con el péptido señal obteniendo resultados satisfactorios.

Teniendo en cuenta que la expresión de IDS en *P.pastoris* es un método viable, con el objetivo de incrementar la expresión de esta enzima, se ha optimizado el gen utilizando técnicas de ingeniería genética, donde se ha modificado la secuencia del gen para hacerlo mas adecuado para la expresión en este sistema. Posterior a la síntesis del gen por la compañía Genart® fue insertado en el vector de clonación pPic9 para ser expresado en *P.pastoris* GS115.

CLONACION Y EXPRESION DEL GEN OPTIMIZADO DE IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA HUMANA (IDS) EN *Pichia pastoris*

I. MARCO CONCEPTUAL

1. ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son alteraciones bioquímicas que se generan por la pérdida parcial o total de la función enzimática de una proteína comprometida en alguna vía metabólica; debido a mutaciones, modificaciones o deleciones de los genes que las codifican, favoreciendo la acumulación del sustrato sobre el que actúan. Estas alteraciones generan complicaciones a nivel sistémico en los pacientes que las padecen y aunque su incidencia es baja, se quiere contribuir a mejorar la calidad de vida de los afectados (1). Se conocen hasta el momento cerca de 600 EIM con una prevalencia global de 1/600 nacidos vivos (2).

Dentro de los EIM conocidos se encuentran las enfermedades de almacenamiento lisosomal, las cuales se clasifican de acuerdo al sustrato acumulado e incluyen esfingolipidosis, glicoproteinosis, mucopolisacidos, mucopolisacidos, entre otras (3).

1.1 MUCOPOLISACARIDOSIS (MPS)

Son un grupo de desordenes de almacenamiento lisosomal que afectan cerca de 1:22,500 nacidos vivos, a nivel mundial y son originadas por la alteración en el metabolismo de glucosaminoglicanos (GAG), también llamados mucopolisacidos. Es así, como la acumulación de estas moléculas eventualmente resulta en disfunciones celulares en diferentes tejidos y órganos. La clasificación de estas enfermedades se da de acuerdo a la enzima afectada y al GAG acumulado como se muestra en la Tabla 1. Actualmente no se conocen datos de incidencia de este grupo de desordenes en Colombia (4).

Tabla 1. Clasificación de las MPS con epónimos, defectos enzimáticos y glicosaminoglicanos depositados.

Tipo	Epónimo	Enzima deficiente	Glucosaminoglicano acumulado
MPS I grave	Enfermedad de Hurler	α -L-iduronidasa	DS, HS
MPS I atenuada	Enfermedad de Scheie	α -L-iduronidasa	
MPS I intermedia	Enfermedad de Hurler-Scheie	α -L-iduronidasa	
MPS II grave	Enfermedad de Hunter grave	Iduronato sulfatasa	
MPS II atenuada	Enfermedad de Hunter menos grave	Iduronato sulfatasa	
MPS III A	Enfermedad de Sanfilippo A	Heparán N-sulfatasa	HS
MPS III B	Enfermedad de Sanfilippo B	N-acetil- α -glucosaminidasa	
MPS III C	Enfermedad de Sanfilippo C	Acetil CoA: α -glucosaminidotransferasa	
MPS III D	Enfermedad de Sanfilippo D	N-acetilglucosamina 6 sulfatasa	
MPS IV A	Síndrome de Morquio A	Galactosamina 6 sulfatasa	QS, CS
MPS IV B	Síndrome de Morquio B	Galactosidasa β	QS
MPS VI	Síndrome de Marotiaux-Lamy	Galactosamina 4-sulfatasa (arilsulfatasa β)	DS
MPS VII	Enfermedad de Sly	Glucuronidasa β	DS, HS

MPS: mucopolisacaridosis, DS: dermatán sulfato, HS: heparán sulfato, QS: queratán sulfato

Tomado de (5)

1.1.1 MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (MPS II) O SÍNDROME DE HUNTER (OMIM 309900)

Es un trastorno causado por una deficiencia de la enzima iduronato 2 sulfato sulfatasa (IDS) (EC 3.1.6.13) cuya herencia es ligada al cromosoma X. La pérdida de la funcionalidad de la IDS es consecuencia de mutaciones en el gen que codifica para esta enzima, localizada en Xq28, dentro de las cuales se encuentran, sustituciones de nucleótidos, errores en la maduración del RNA, inserciones o deleciones puntuales, deleciones parciales del gen o rearrreglos del gen completo. Ésta deficiencia conlleva a la acumulación de los sulfatos de heparán y dermatán en tejido óseo y cartílago principalmente (6).

Se han descrito diferentes formas de la enfermedad enmarcadas en un espectro de severidad que va desde una forma leve hasta una grave, dependiendo de la actividad residual de la IDS y la acumulación HS y DS en las células afectadas. Por ejemplo, la forma leve tiene un inicio lento durante los primeros años de infancia, el Sistema Nervioso Central se ve mínimamente afectado y el compromiso esquelético y morfométrico es exiguo. Por otra parte, en la forma severa de pacientes con MPS II los síntomas incluyen rigidez articular, estatura baja, rasgos faciales toscos, deformidades esqueléticas, síndrome de túnel carpiano, retraso mental y muerte. Esta última, causada principalmente por enfermedades obstructivas de vías aéreas debido a la disfunción

pulmonar y falla cardíaca; este padecimiento es común en las personas con el síndrome, afectando el 91% de los casos (7-8).

Se han descrito diferentes presentaciones clínicas, que van desde graves a atenuadas, que se correlacionan con la actividad residual de IDS y el grado de acumulación de los compuestos sulfatados en los tejidos afectados. La forma leve de la enfermedad tiene un inicio lento durante los primeros años de infancia, el Sistema Nervioso Central está mínimamente afectado, al igual que los compromisos esqueléticos y morfométricos son exigüos. Por otra parte, en la forma severa los síntomas incluyen rigidez articular, estatura baja, rasgos faciales toscos, deformidades esqueléticas, síndrome de túnel carpiano, retraso mental y muerte temprana causada principalmente por enfermedades obstructivas de vías aéreas debido a la disfunción pulmonar y falla cardíaca (7-8).



Figura 1. Pacientes con Síndrome de Hunter. Infante con forma severa (Izq), Adulto con forma leve (Der) (7)

2. IDURONATO 2- SULFATO SULFATASA (IDS)

La enzima es una proteína de 550 aminoácidos, los primeros veinticinco corresponden al péptido señal nativo, otros son eliminados en el proceso postraduccional. Esta enzima está implicada en la degradación de los sulfatos de heparán y dermatán. Para la producción y estudio de esta proteína, se obtiene comercialmente en fibroblastos y células CHO. Sin embargo, es necesario probar otros sistemas de producción, de menores costos respecto al de estas líneas celulares (9-10).

3. TRATAMIENTO SINDROME DE HUNTER

Inicialmente el manejo de los pacientes con MPS II había sido paliativo, enfocado en el manejo de los problemas clínicos derivados de la enfermedad, principalmente en el tejido óseo. Como una alternativa viable para el tratamiento se ha propuesto el trasplante de células hematopoyéticas con el objetivo de obtener células capaces de sintetizar IDS, logrando correcciones sistémicas sistémicas en algunos tejidos, sin embargo, los resultados a largo plazo son limitados. No se ha probado acción alguna de este tratamiento en el sistema nervioso central y los donadores compatibles son pocos. De igual forma, es importante aclarar que el tratamiento debe ser llevado a cabo en etapas tempranas de la vida para prevenir la aparición de la sintomatología y las secuelas a largo plazo (11).

Alternativamente, se ha tomado en consideración el uso de la terapia génica en con el objetivo de modificar las células involucradas por medio de la transferencia de una copia del gen afectado. Así, las células modificadas pueden liberar la enzima necesaria. Los vectores que han mostrado mayor eficiencia en la transferencia del gen son los retrovirus, como es el caso de la síntesis de IDS en linfocitos de sangre periférica (12).

Como respuesta a esto, se ha incursionado en otro tipo de terapias como por ejemplo la terapia de reemplazo enzimático la cual consiste en proporcionarle al paciente la enzima activa purificada de origen exógeno, para proveerla a los tejidos en los cuales se encuentra la enzima deficiente, para que ocurra la degradación del material acumulado (13-14).

3.2 TERAPIA DE REPLAZO ENZIMATICO (TRE)

En el proceso de obtención y utilización de las enzimas deseadas se presentan algunas dificultades que incluyen, el desconocimiento sobre los sistemas de reconocimiento de las células blanco y la obtención de la enzima a partir de diversas fuentes (15).

La TRE con proteínas humanas recombinantes ha sido usada satisfactoriamente en el tratamiento de otras enfermedades de almacenamiento lisosomal como la enfermedad de Gaucher (16), enfermedad de Fabry (17), MPS I (18), y MPS VI (19).

En el año 2003 experimentos con roedores con MPS II en TRE usando Idursulfase® mostraron un efecto positivo al tratamiento, en la disminución de la acumulación de GAG. Idursulfase® ha sido aprobada recientemente para el tratamiento de MPS II por la asociación Americana de alimentos y medicamentos. Los resultados de la fase clínica II fue publicada en el año 2006 obteniendo

resultados satisfactorios. Actualmente, la TRE para síndrome de Hunter es una realidad y se está usando en clínica, es decir ya se comercializa. Sin embargo, este medicamento por ser producido en líneas celulares es un medicamento de alto costo para el sistema de salud, incluso más que algunos producidos con el objetivo de enfrentar enfermedades como el cáncer (14).

Ante estas dificultades se ha incursionado en nuevas alternativas biotecnológicas tales como la expresión de dichas enzimas usando otros modelos, como bacterias y levaduras a partir de las cuales se pueden obtener productos similares a los humanos para poder desarrollar de forma efectiva y menos costosa la TRE (20)

En el IEIM desde hace algunos años se ha venido trabajando en diferentes alternativas para el tratamiento de ciertas mucopolisacaridosis tal es el caso de la MPS IV donde se ha incursionado en la terapia génica (21), la expresión de la proteína recombinante afectada en esta enfermedad N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa-GALNS en el sistema *E.coli* (22). Así mismo se ha realizado la expresión de la enzima recombinante IDS en *P.pastoris* (23), obteniendo resultados satisfactorios a nivel de laboratorio.

4. SISTEMAS DE EXPRESION DE PROTEINAS

La expresión de proteínas recombinantes, se refiere a la síntesis de una proteína, producto de la expresión de un gen exógeno en una célula hospedera, lo cual involucra técnicas de manipulación genética para recombinación de ADN (24).

Para estos fines se han utilizado diferentes sistemas tanto bacterianos como eucariotas (levaduras, células de mamífero). Este primero presenta facilidades de manipulación, costo y se obtienen buenos rendimientos. Algunas proteínas recombinantes no se han podido expresar exitosamente en bacterias, principalmente como resultado de la falta modificaciones como glicosilaciones, puentes disulfuro o "folding". Particularmente, durante los procesos de optimización de la producción en *E.coli*, se provoca que las proteínas heterólogas se agreguen formando cuerpos de inclusión, lo cual requiere un posterior proceso de resolubilización y renaturación del producto de interés, lo que dificulta los procesos de purificación y por consiguiente aumentan los costos (25).

Por otra parte, las levaduras han sido empleadas como sistemas de expresión de proteínas. Ya que combinan técnicas conocidas para la fácil manipulación genética y molecular, la capacidad para realizar modificaciones postraduccionales, la simplicidad y economía de los sistemas de expresión bacterianos y la autenticidad de los sistemas de células de mamífero (26).

4.1 Expresión de proteínas en *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)

El género *Pichia* pertenece a la **Familia:** *Saccharomycetae* **Orden:** *Saccharomycetales*, **Clase:** *Saccharomycetes*, **Filo:** *Ascomycota*. Presenta reproducción sexual con producción de ascosporas. En medio sólido forma colonias no filamentosas de color blanco crema. (27)

P.pastoris se ha convertido en una de las levaduras más ampliamente estudiadas, ha sido ampliamente utilizada como sistema de expresión y hasta el año 2006 se habían expresado exitosamente más de 500 proteínas recombinantes en este sistema (29-31), considerandos como uno de los sistemas de expresión de proteínas heterológicas más útiles y versátiles, teniendo las ventajas que presenta sobre sistemas bacterianos y otros sistemas eucarióticos, entre las que se cuentan:

- El metabolismo de esta levadura privilegia un crecimiento puramente respiratorio sobre el fermentativo, disminuyéndose así la formación de intermediarios metabólicos como el etanol, acetaldehído y ácidos orgánicos
- La habilidad de crecer en medios mínimos (salinos) a altas densidades celulares (> 100 g/L), secretando la proteína de interés, lo cual facilita los procesos de *downstream*.
- Lleva a cabo diferentes modificaciones post-traduccionales tales como la formación de puentes disulfuro o la N-glicosilación; éste último evento es de gran importancia en especial en la producción de proteínas con potencial terapéutico dadas las implicaciones de estas modificaciones en procesos de señalización y reconocimiento celular (28).
- A escala industrial presenta ventajas económicas relacionadas con el medio de crecimiento, la secreción del producto al medio y el control de su producción con la inducción del promotor alcohol oxidasa (AOX) por la presencia de metanol y represión por la presencia de glicerol.

Para el metabolismo del metanol se requiere producción de enzimas como la alcohol oxidasa (AOX) codificada por dos genes diferentes. La síntesis de esta enzima es regulada transcripcionalmente y es así como el promotor del gen de la AOX es útil para expresión de genes foráneos. Cuando se emplean sustratos como glucosa, etanol, o glicerol, la enzima alcohol oxidasa es indetectable, ya que estos compuestos funcionan como represores del promotor. En ausencia de los anteriores sustratos, cuando se coloca metanol, se expresa el gen de AOX, y si el gen heterólogo de la proteína de interés está asociado al promotor AOX, se inducirá su expresión (32, 33).

En este orden de ideas, debido a la manera como se hace la recombinación del gen foráneo al genoma, es importante señalar que existen tres fenotipos diferentes de *P. pastoris* que se clasifican de acuerdo al consumo del metanol. Cuando los dos genes de la AOX son funcionales se denominan Mut⁺, estas cepas son muy sensibles a altas concentraciones de metanol lo cual dificulta el control del cultivo y su escalado, disminuyéndose el rendimiento deseado. Adicionalmente, la velocidad de crecimiento en este sustrato es mayor. En la cepa denominada Mut^s se tiene una baja velocidad de crecimiento, respecto a la cepa anteriormente descrita, lo cual permite un manejo adecuado respecto al consumo de oxígeno, de igual forma, su baja sensibilidad a las concentraciones de metanol hacen el proceso fácil de escalar. La cepa Mut⁻ no expresa ninguno de los genes AOX y como consecuencia no puede crecer en metanol como sustrato (24,34).

5. OPTIMIZACION DE CODONES PARA MEJORAR LA EXPRESION

El código genético es degenerado, es decir, que para cada aminoácido existe más de una tripleta o codón que lo codifica, de igual forma es necesario afirmar que la frecuencia de los codones varía según la especie u organismo. Esta característica de la información genética ha sido utilizada con el objetivo de optimizar la expresión de proteínas heterólogas, básicamente por la implementación de codones más eficientes para aumentar la eficacia de la traducción del gen de interés. Esta mejora en la traducción del gen se logra mediante una modificación de nucleótidos en la secuencia de ADN. Los codones van a reemplazar por uno nuevo, seleccionado principalmente por su alta frecuencia de distribución dependiendo de la especie en la que se quiere realizar la expresión. En este proceso el aminoácido a ser producido sería el mismo, pero el codón de baja frecuencia sería reemplazado por uno de alta frecuencia. Este proceso es bastante útil para incrementar los niveles de expresión de la proteína (35). De hecho, en sistemas de expresión de proteínas como *P.pastoris* esta técnica ha sido ampliamente utilizada reportándose rendimientos hasta diez veces, obtenidos con este cambio (36).

II OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de un gen sintético de la IDS en *P.pastoris* a escala de 1500 mL

1.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener los clones de *P.pastoris* de la cepa GS115 con el gen de IDS optimizado y sin el péptido señal nativo.
- Seleccionar el clon que mejor expresión presente a escala de 10 y 100 mL de volumen efectivo de trabajo
- Estudiar la cinética del clon de mejor expresión de IDS a escala de Birreactor (1500 mL)

III MATERIALES Y METODOS

Obj 1: Obtener los clones de *P.pastoris* de la cepa GS115 con el gen de IDS optimizado y sin el péptido señal nativo.

1. Microorganismos

1.1 *Escherichia coli*

Para la multiplicación y amplificación de los plásmidos, pPIC9, IDS-OPT, y pPIC9-IDSse empleó la cepa *E.coli* Dh5 α , del banco de cepas del IEIM.

1.2 *Pichia pastoris*

Para la expresión de IDS en levaduras se utilizó la cepa de *Pichia pastoris* GS115 (his4⁻) (Invitrogen San Diego Ca. U.S.A.). Las cepas GS115/His⁺/Mut^s/HSA y GS115/His⁺/Mut⁺/B-Gal se usaron como control de fenotipos y de expresión de proteínas. Como control negativo de expresión se utilizó la cepa transformada con el plásmido pPic9 y la cepa sin transformar *P.pastoris* GS115 (37).

1.3 *E.coli* electrocompetentes

Para la multiplicación de los vectores y constructos en células bacterianas luego de las reacciones de ligación se utilizaron cepas *E.coli electrocomp TOP10* de invitrogen™ las cuales se les indujo su estado de competencia específicamente para obtener un alto porcentaje de transformación (37).

2. Banco de células de *P.pastoris*

Para conservar las células viables durante el proceso de investigación y para conservar los constructos obtenidos tanto viables como genéticamente estables, se tomó una colonia de cada cepa para inocular 10 mL de de medio YPD (Extracto de levadura 1%v, Peptona 2% p/v, Dextrosa (D-Glucosa) 2% p/v) durante un periodo de 20 horas a 28 °C \pm 2, en agitación a 300 rpm . Luego se adicionó este preinoculo a 490 mL de medio YPD y se incubó a 28 C \pm 2, en agitación a 300 rpm por 48 horas. Finalmente, estas células fueron centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células resuspendidas en YPD con Glicerol 15% v/v. Las células fueron distribuidas en alicuotas de 1mL y almacenadas a -80°C. El análisis de estos viales

fue realizado por coloración de Gram para determinar la pureza y siembra en agar respectivo para evaluar estabilidad genética (37).

3. Optimización del gen de IDS

Para este trabajo se realizó la optimización del gen de IDS para *P. pastoris* mediante el uso de la herramienta Mr. Gene® y se encargó la síntesis a la compañía GENEART®

4. Plásmidos

4.1 pPIC9

Este es un vector de 8037 pb y posee un fragmento que codifica para la señal de secreción α -Factor, lo que posibilita que la proteína sea enviada al medio y no internalizada. El gen HIS 4 le confiere la habilidad de sintetizar histidina por lo cual se utiliza como marcador de selección, de esta forma los clones que tengan este plásmido podrán crecer en un medio mínimo sin histidina. Figura 2.

Al no contener origen de replicación propio, luego de la linearización con la enzima Bgl I y la transformación, se espera que el plásmido inserte al cromosoma de la levadura por recombinación homologa (37).

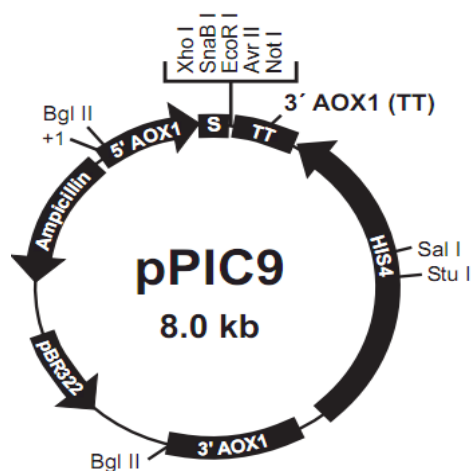


Figura 2. Plásmido pPIC9, los diferentes componentes son: Promotor de AOX 1-954 pb, 5' sitio de unión del primer 855-875 pb, señal de secreción α -Factor 949-1215 pb, Sitio de clonación múltiple, 3' AOX terminación de la transcripción (TT) 1253-1586 pb, 3' AOX sitio del primer 1327-1347, HIS4 ORF 4514-1980 pb, fragmento 3' AOX 4870-5626 pb, pBR332 sitio de origen de replicación 6706-6034 pb. Finalmente, gen de resistencia a ampicilina 7713-6853 pb (37)

4.2 IDS-OPT

Este vector de 3951 pb sintetizado por Genart®. Además de tener un origen de replicación bacteriano, contiene el gen optimizado de IDS de aproximadamente 1600pb y posee diferentes sitios de restricción creados por ingeniería genética para favorecer tanto la extracción del gen de interés como la creación de extremos compatibles con el objetivo de favorecer la ligación al vector de expresión, Figura 3.

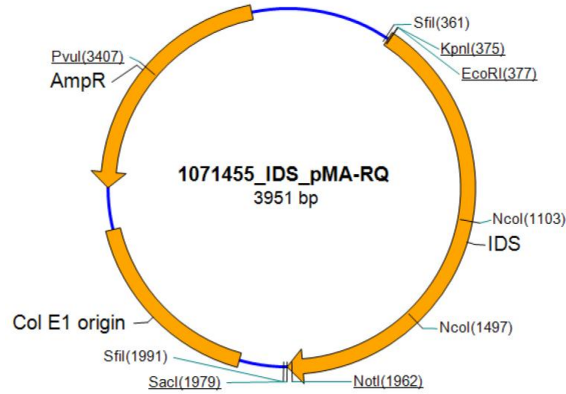


Figura 3. Plásmido IDS-OPT, los diferentes componentes son:
Promotor de AOX 1-954 pb, 5' sitio de unión del primer 855

4.3 pPic9-IDS

Este plásmido se obtuvo luego de una serie de reacciones de digestión enzimática y ligaciones en donde el objetivo principal fue insertar el gen de IDS optimizado del plásmido IDS-OPT en el vector pPic9.

5. Transformación y amplificación de los plásmidos en *E.coli*

5.1 Transformación de *E.coli* por electroporación

Para este proceso se utilizaron células *E.coli* electrocomp TOP10, siguiendo el protocolo de electroporación indicado por Invitrogen™ (Anexo 1, protocolo 1) en un electroporador Bio-Rad Gene Pulse a 1400V y 200Ω (37).

5.2 Extracción de ADN plasmidico

El proceso de extracción se llevó a cabo siguiendo las indicaciones de Sambrook, *et al.* Utilizando un volumen de cultivo de 3 mL. (Anexo 1, protocolo 2) (37).

5.2.1 Cuantificación de ADN

La pureza y concentración de ADN obtenido durante las diferentes fases de la investigación fue determinada por la relación de la DO a 260-280 nm de longitud de onda según lo reportado por Sambrook *et al.* (38). Determinando la concentración en ng/ μ L según la ecuación 1.

$$(1) \text{ Concentración ADN (ng}/\mu\text{L)} = \text{ABS}_{260} * 40 * \text{fd}$$

6. Construcción del vector de expresión Ppic9-IDS

6.1 Corte con enzimas de restricción

Para el proceso de doble Digestión de los plásmidos pPic9 (Vector) e IDS-OPT (Inserto) se utilizaron las enzimas EcoRI (Invitrogen™) y NotI (Fermentas™) con cada uno de ellos, utilizando una unidad de enzima por cada μ g de ADN en Buffer O (Fermentas™), se incubó por 16 horas a 37°C, en un volumen final de 20 μ L. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en un gel de agarosa 1% p/v en un corrido en buffer TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH:8) por 1 hora a voltaje constante de 100V. El gel fue incubado en piscina de Bromuro de etidio por 30 minutos. Las bandas deseadas fueron extraídas del gel y el ADN fue purificado con el Kit de extracción "Purelink® Quick gel extraction kit" de Invitrogen™ (Anexo 1 protocolo 3) y fue cuantificado según el numeral 5.2.1.

6.2 Reacción de ligación inserto vector

La reacción de ligación se realizo con el Kit "Rapid DNA ligation Kit" de Fermentas™ para el cual se mezcló 1 μ L de T4ligasa, Rapid ligation buffer 1X, 100 ng de vector (pPic9 digerido) y se calcularon los nanogramos inserto según la ecuación 2, trabajando con una relación vector:inserto, 1:5.

(2)

$$A = [(B \times C) / D] * E$$

A: ng inserto

B: ng vector

C: Tamaño del inserto

D: Tamaño del vector

E: Relación vector:inserto

7. Transformación de células *E.coli* competentes con ligando

La transformación se realizó por electroporación según el protocolo 1 del anexo 1 recomendado por invitrogen™ con 6µL de producto de ligación, las células se sembraron por superficie en agar LBA (Extracto de levadura 0.5% p/v, Cloruro de sodio 1%p/v, Triptona 1% p/v, agar bacteriológico 1.5%, ampicilina 100mg/mL, pH: 7) y se incubó a 37°C por 16 horas.

8. Evaluación de la integración del plásmido por análisis de perfil de restricción

Se tomó cada una de las colonias obtenidas en el numeral 6.3 y se inocularon en 3 mL de caldo LBA (Extracto de levadura 0.5, Triptona 1, NaCl 1% Ampicilina 100mg/mL) y se incubó por 16 horas a 37°C en agitación a 250 rpm, para realizar posteriormente extracción de ADN siguiendo el protocolo 2 del anexo 1. Luego se realizó la respectiva cuantificación y la digestión con EcoRI y NotI como en el numeral 6.1.

9. Transformación de *Pichia pastoris* con Ppic9-IDS

9.1 Preparación del plásmido para electroporación (pPic9 y pPic9-IDS)

Con el objetivo de obtener en esta fase una mayor concentración y pureza de ADN, se utilizó un volumen de cultivo de 100 mL y el procedimiento de extracción de ADN según el protocolo reportado por Poutou 2006 (Protocolo 4, anexo 1), El plásmido obtenido fue digerido con la enzima de restricción Bgl I (1µL), Buffer O (2µL), ADN (20µg), Agua (csp. 20µL), por 16 horas a 37°C. Luego se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%p/v, se extrajo la banda de interés, se purificó con el kit "Purelink® Quick gel extraction kit" de Invitrogen y se realizó la cuantificación de ADN. Se precipitó el ADN según el protocolo 5 del anexo 1 y se resuspendió en

10 μ L de buffer TE (EDTA 1Mm Tris HCl 10mM) con el objetivo de concentrar el ADN obtenido y asegurar la transformación de células de *P.pastoris* (39).

9.2 Electroporación de células de *P.pastoris*

Se prepararon células competentes siguiendo el protocolo 6 del anexo 1. La transformación se llevo a cabo con 40 μ L de células competentes, en un electroporador BioRad a 1500V y 200 Ω (protocolo 7 anexo 1) y 5 μ L de DNA del numeral 6.51 (pPic9 y pPic9-IDS). Posterior al impulso, se realizó una incubación en 1mL de Sorbitol 1M por 3 horas a 30°C sin agitación y el producto final se sembró en superficie en medio mínimo con dextrosa (MD: 1.34% YNB, 4x10⁻⁵ Biotina, 2%D-Glucosa) para la selección de transformantes y medio mínimo con histidina (MDH: 1.34% YNB, 4x10⁻⁵ Biotina, 2%D-Glucosa, 0.004% L-Histidina) como control de viabilidad. Se incubó a 30°C hasta observar colonias, de igual forma se incubó una caja de petri con medio MD y MDH sin sembrar como control de contaminación.

9.3 Determinación de fenotipos de células obtenidas

Los diferentes clones obtenidos fueron aislados en medio mínimo con metanol como fuente de carbono, la morfología y el tipo de crecimiento fue comparado con la morfología y el tipo de crecimiento que presentaron cada uno de los controles de fenotipo ofrecidos por Invitrogen®

Obj 2. Seleccionar el clon que mejor expresión presente a escala de 10 y 100 mL de volumen efectivo de trabajo

10. Evaluación de expresión de clones *P.pastoris* pPic9-IDS a diferentes escalas

10.1 Determinación de Biomasa

Con el objetivo de determinar la concentración de biomasa presente en cada uno de los muestreos, se termino la densidad óptica (DO) a 620 nm en un espectrofotómetro Shimadzu. A partir de estos valores, se calculó la concentración (g/L) mediante la curva de calibración, Concentracion biomasa g/L: $(0.619 \times DO_{620nm}) / (0.528 \times \text{factor de dilución})$ con R²: 0.99 reportada por Córdoba, 2003. Los resultados fueron transformados logarítmicamente (Ln (X/Xo)) para su representación gráfica. Se calcularon los parámetros de velocidad especifica (μ_x) y el tiempo de duplicación ($td = \ln 2 / (\mu_x)$) (40).

10.2 Determinación de proteínas extracelulares

Se colocaron 4 µL de la muestra en una placa de ELISA de 96 pozos. Se adicionó 196 µL de reactivo de Bradford BioRad®. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se realizó la lectura en un lector de Elisa a una longitud de onda de 595 nm. Finalmente, se determinó la concentración de proteínas de la muestra, despejando la absorbancia obtenida de cada muestra en la ecuación patrón de concentraciones conocidas de Albúmina llevada a cabo simultáneamente con cada lectura (41).

10.3 Determinación de actividad específica y volumétrica IDS

La actividad específica catalítica de la enzima es la propiedad que tiene la IDS de catalizar la reacción de hidrólisis del grupo sulfato en posición 2 del ácido idurónico: en la que 1.0 nmol de sustrato es transformado en 1 hora/mg de proteína total. Este valor se obtuvo llevando a cabo el protocolo 8 (Anexo 1). La lectura se realizó con longitudes de onda de excitación de 360 nm y emisión de 450 nm. Utilizando la ecuación 3. Una Unidad enzimática (U) fue determinada como la capacidad de la enzima para liberar 1 nmol de producto/hora. Para determinar la actividad volumétrica se despreció el valor de la concentración de proteína de la muestra (42).

(3)

$$U/mg \text{ de prot} = ((A-B)/4)/(C \times D)$$

A: Fluorescencia de la muestra

B: Fluorescencia del medio

C: Fluorescencia del estándar

D: Concentración de proteína de la muestra (mg/mL)

10.4 Cultivo de clones a volumen de 10mL

Cada una de las colonias obtenidas en el numeral 6.5.2 se inocularon en 10 mL de caldo BMG (Glicerol 1%, Biotina 4×10^{-5} %, YNB 1.34%, Fosfato de potasio 100mM pH 6) en un tubo para centrifuga de 50mL y se crecieron en agitación a 290rpm por 48h a 30°C con el objetivo de obtener altas densidades celulares, luego se centrifugaron los tubos a 4000 rpm en una centrifuga eppendorff a 4°C, con el objetivo de retirar el medio con glicerol y empezar la inducción con metanol, para esto se resuspendieron las células en 10mL de caldo BMM (Metanol 0.5%, Biotina 4×10^{-5} %, YNB 1.34%, Fosfato de potasio 100mM pH 6), esta etapa de inducción se desarrolló durante 96 horas a 30°C y en agitación a 290 rpm. Cada 24 horas de la fase de inducción se tomó

una muestra de 200 μ L para llevar a cabo los análisis correspondientes. De igual forma se adicionó 50 μ L de metanol 100%v/v para mantener una concentración de metanol de 0.5%v/v en el medio durante las 96 horas de inducción.

10.5 Evaluación de expresión de IDS a escala de 100mL

Cada una de las colonias que presentaron mayor actividad específica y volumétrica a escala de 10 mL se inocularon en 10 mL de caldo YPG (Extracto de levadura 1%p/v, Peptona 2%p/v, Glucosa 2%) en un tubo para centrifuga de 50mL y se crecieron en agitación a 290rpm por 24h a 28°C con el objetivo de obtener altas densidades celulares. Luego se inocularon estos 10 mL en 90 mL de caldo BMG, se incubó por 48h a 28°C y se tomó muestra de 1 mL cada 12h para posteriores análisis. Luego de transcurridas las 48h de crecimiento se indujo el cultivo adicionando 500 μ L Metanol 100%v/v, con el objetivo de obtener una concentración final de 0.5%v/v en el medio de cultivo. De igual forma se tomaron muestras de 1mL cada 24 h, para los respectivos análisis. Esta metodología se realizó por duplicado.

Obj 3. Estudiar la cinética del clon de mejor expresión de IDS a escala de Birreactor

10.6 Evaluación de expresión de IDS a escala de Bioreactor

El clon que presentó mayor actividad específica y volumétrica a escala de 10 mL se inoculó en 20 mL de caldo YPG repartidos en dos volúmenes de 10mL en un dos tubos para centrifuga de 50mL, y se crecieron en agitación a 290rpm por 24h a 28°C, este fue el pre-inoculo de la fermentación. Luego se inocularon los 20 mL en 180 mL de caldo MGli (Glicerol 1%, YNB sin aminoácidos 1.34%), se incubó por 24h a 28°C. Luego de transcurridas las 24h de crecimiento se mezclaron 150 mL del inoculo con 1.35 L de medio salino (composición anexo 2) en un Bioreactor Bioengineering de 3L, para obtener un volumen final de 1.5L. El pH se mantuvo a 4.5 con NH_4OH , las condiciones del cultivo fueron modificadas de acuerdo a las necesidades del proceso con el objetivo de mantener el porcentaje de oxígeno disuelto (%OD) en 40% aproximadamente, para esto se utilizaron dos estrategias; la primera fue aumentar la agitación a medida que el microorganismo crecía, hasta el límite de 900rpm. Por otra parte, el control de temperatura cambiaba de acuerdo al (%DO) hasta el límite de 22°C. Esta primera fase de crecimiento fue en batch, para lo cual se espero se agotara la fuente de carbono del medio, para luego comenzar con el lote alimentado con Glicerol 50% 0.5rpm por 4 horas. Inmediatamente después, se dio inicio el lote alimentado con metanol 35% mediante una bomba peristáltica de flujo variable a 0.2 rpm en donde se dio comienzo la etapa de inducción. Durante todo el proceso se tomaron 5mL de muestra a diferentes horas para los análisis respectivos.

IV RESULTADOS

7. Construcción del vector de expresión

En la figura 4 se evidencia el tamaño del vector parental de plásmido IDS-OPT digerido con las enzimas de restricción (EcoRI – NotI) se pueden observar dos bandas: Una de 2400 pb correspondiente al segmento del vector donde se localiza el origen de replicación en *E.coli* en donde se llevo a cabo la multiplicación del vector y el gen de resistencia a ampicilina, antibiótico por el cual se seleccionaron las células transformadas. Adicionalmente, se evidencia otra banda de aproximadamente 1600 pb correspondiente al gen optimizado de IDS, el cual fue extraído para la posterior ligación para la construcción del vector, tal como se evidencia en la figura 5.

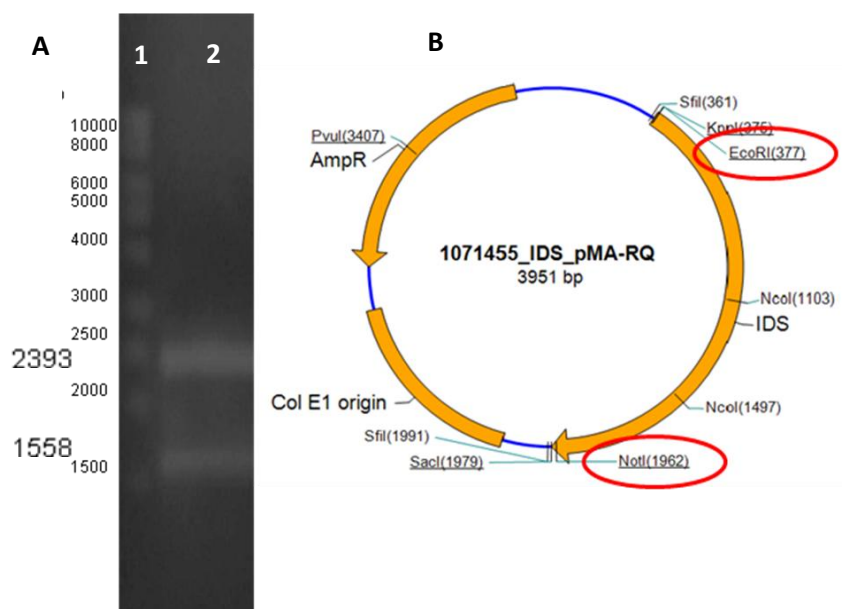


Figura 4. Digestion del vector IDS-OPT, (A) Electroforesis en gel de agarosa: 1: Marcador de peso molecular 2: Plásmido IDS-OPT digerido con EcoRI y NotI.. (B) Plásmido IDS-OPT donde se evidencian los sitios de corte para Eco RI y Not I con el objetivo de extraer el gen optimizado

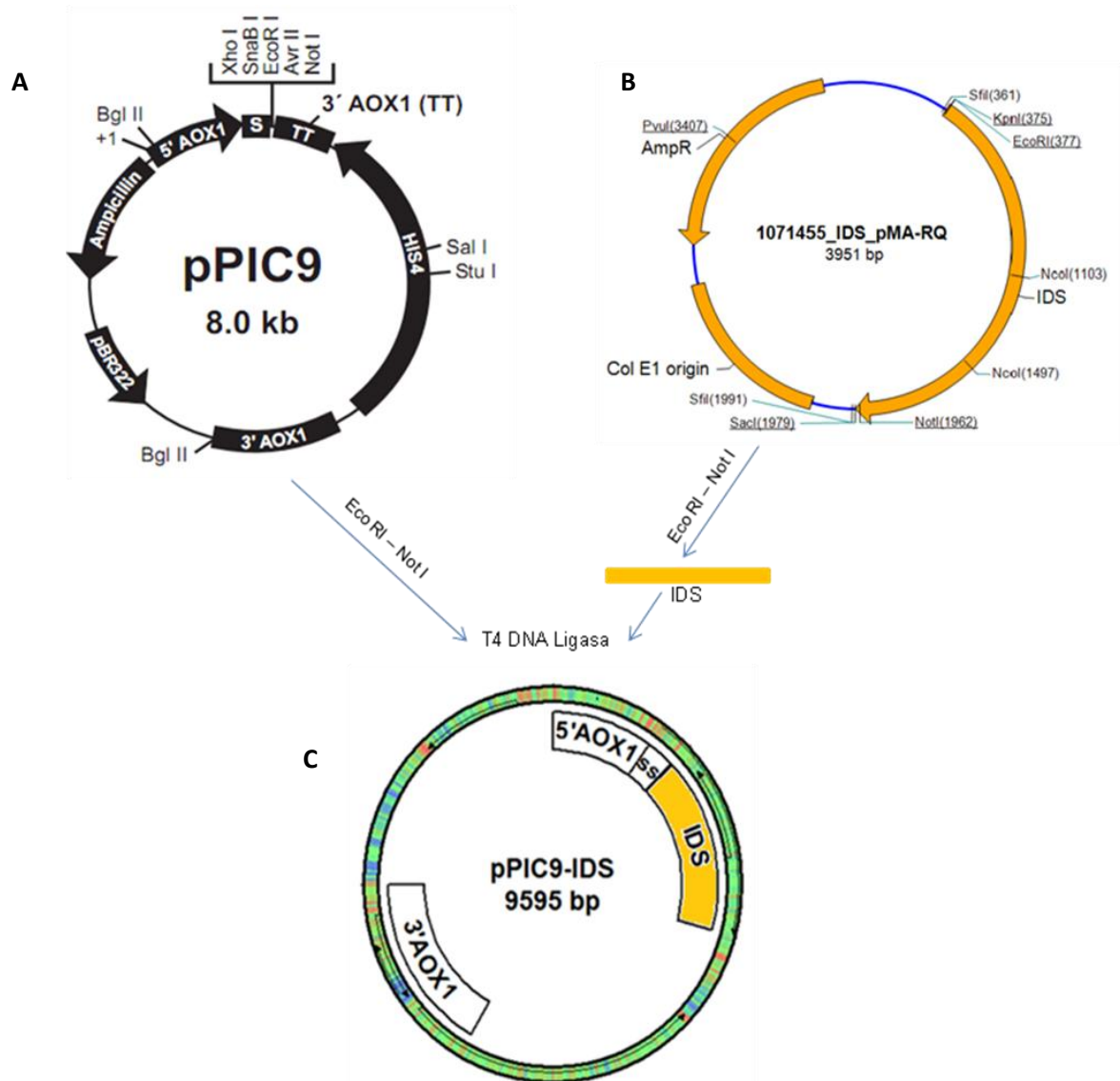


Figura 5. Construcción del plásmido de expresión. El DNA de la IDS fue clonado en el vector de expresión extracelular para *P. pastoris* **pPic9**. Para este propósito el plásmido IDS-OPT (B) fue digerido con Eco RI y NotI y el gen de la IDS extraído y purificado. El vector Ppic9 (B) fue digerido con EcoRI y NotI y el fragmento de la IDS obtenido fue ligado. El plásmido obtenido fue llamado pPic9-IDS (C).

1.1 Evaluación de la integración del gen de IDS y el vector

La evaluación de la integración del inserto se realizó por digestión con enzimas de restricción, con las enzimas *EcoRI* y *NotI*, las mismas con las cuales se realizó la digestión inicial del inserto y el vector para la ligación. En la Figura 6 se evidencian dos bandas una de 8023 pb y otra de 1585 pb correspondientes al vector y al gen de IDS respectivamente.

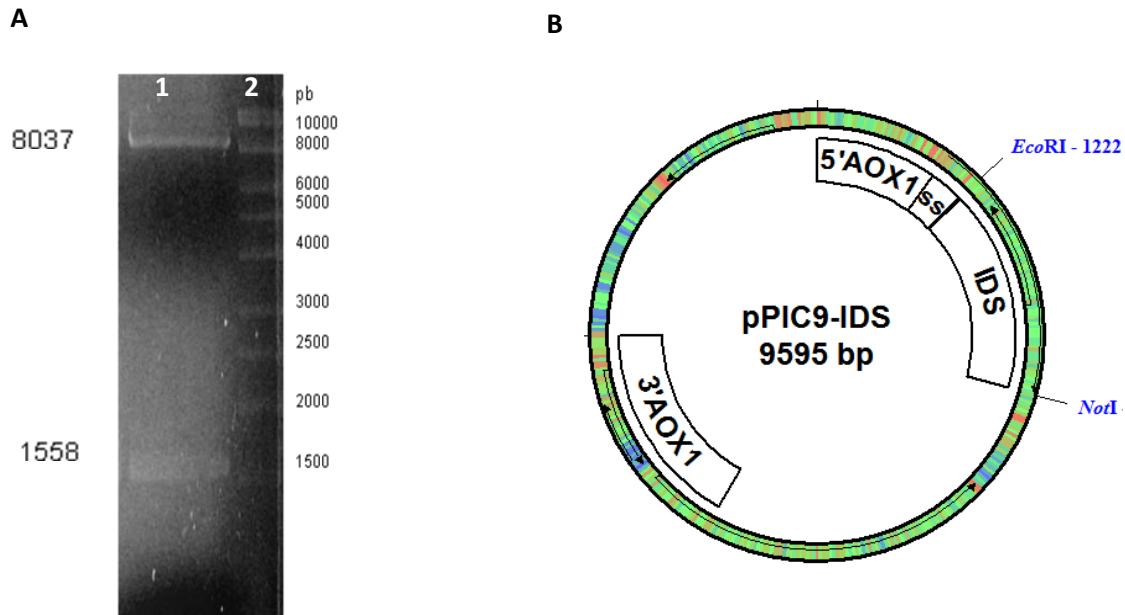


Figura 6. Análisis de restricción del plásmido recombinante pPIC9-IDS . (A): Fotografía de electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando: (Carril 1) Los fragmentos para del vector -8037 pb - y el inserto-1558 pb- confirmando la inserción. (2) Marcador de peso molecular. (B) Esquema del plásmido mostrando los tamaños de los fragmentos esperados y su correspondencia en el nuevo constructo.

1.2 Linearización del constructo pPic9-IDS y del vector pPic9

Con el objetivo de lograr la integración de la información genética deseada al cromosoma de *P.pastoris* fue necesario linearizar el nuevo constructo pPic9-IDS y como control negativo de expresión se linearizó el plásmido pPic9, para la posterior transformación. En la figura 7 se evidencian los productos de la digestión del plásmido con la enzima de restricción Bgl II. Este proceso de integración se logra por recombinación homóloga del promotor AOX y la región 3'AOX con el genoma de la levadura tal como se evidencia en la figura 8 (Invitrogen).

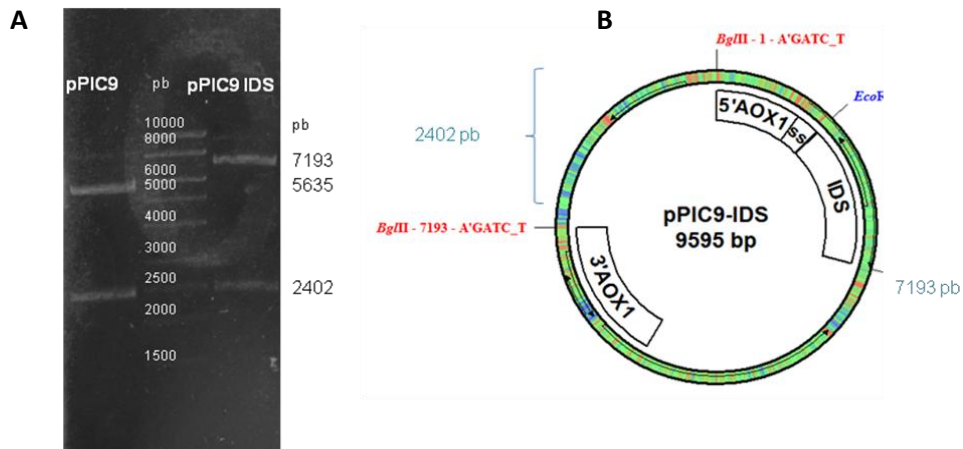


Figura 7. Linearización de constructo pPic9-IDS y del vector pPic9. (A) Fotografía de electroforesis en gel de agarosa 1% mostrando: (Carril 1) Los fragmentos del vector pPic9 luego de la digestión, una banda de 5635 pb y otra de 2402 pb aproximadamente. (Carril 2) Marcador de peso molecular. (3) Linearización del constructo pPic9-IDS donde se evidencia una banda de 7193 y otra de 2402 pb aproximadamente. (B): Esquema del plásmido pPic9-IDS mostrando los sitios de restricción de la enzima de linearización Bgl II y los fragmentos obtenidos.

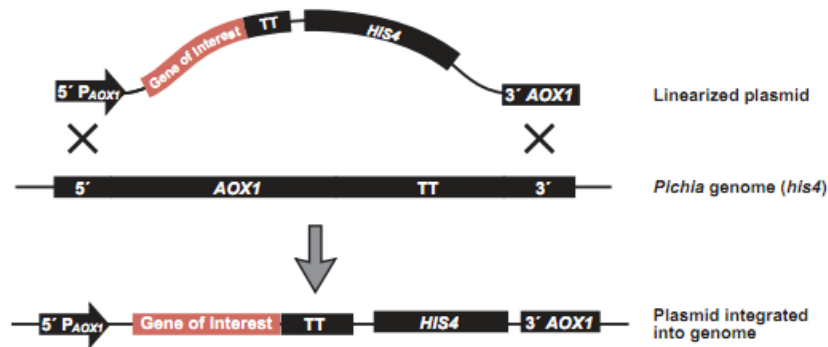


Figura 8. Mecanismo de recombinación del segmento linearizado del vector pPic9-IDS y del plásmido pPic9 (37).

2. Transformación de *P.pastoris* con el plásmido pPic9-IDS y pPic9

Los diferentes plásmidos luego de ser digeridos, fueron utilizados para la respectiva transformación. Al realizarse la recombinación homóloga se da la complementación del gen HIS4, así, las células transformadas se seleccionaron por ser prototrofas de Histidina [His⁺].

Los clones fueron seleccionados en agar MD. Obteniendo: 20 clones transformados con el vector pPic9-IDS y 4 transformados con el plásmido pPic9. De igual forma, se realizó el control de viabilidad y de células no transformadas en medio MD suplementado con Histidina, resultados mostrados en la figura 9.

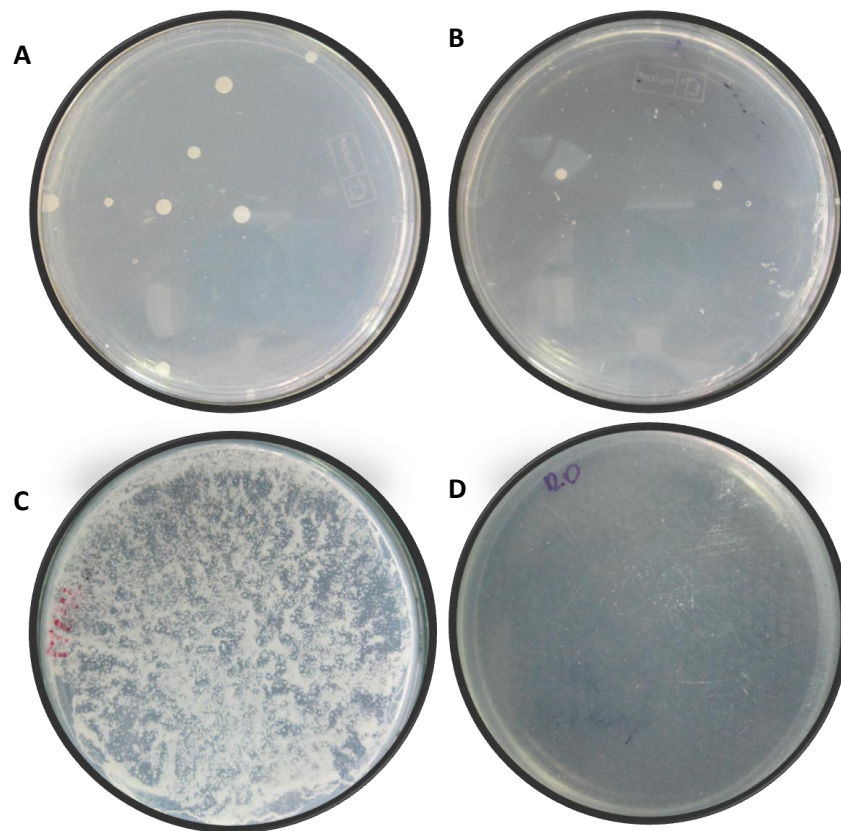


Figura 9 Evaluación de la transformación de células de *P.pastoris*. (A) Crecimiento de células transformadas con el plásmido pPic9-IDS en agar MD. (B) Crecimiento de células transformadas con el plásmido pPic9 en agar MD. (C) Control de viabilidad de células transformadas y no transformadas en medio MD con Histidina. (D) Siembra de *P.pastoris* GS115 no transformada.

3. Evaluación del fenotipo Mut⁺ Mut^s

Las colonias que crecieron en el medio MD fueron aisladas en medio MM, se monitorearon durante tres días, los diferentes clones mostraron una morfología determinada en este medio ya fuera colonias blancas y grandes (figura 10 Izq) correspondientes a fenotipos Mut⁺ o un crecimiento lento mostrando colonias pequeñas y traslucidas (figura 10 Der) muestra el resultado de este crecimiento para algunos de los clones.

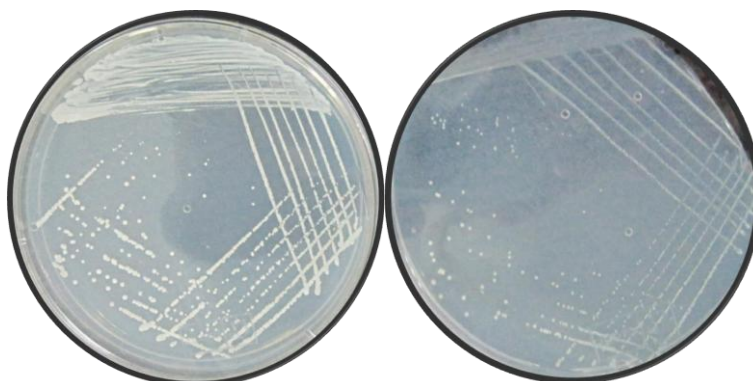


Figura 10 Cepa Mut⁺ (Izq.) y Cepa Mut^s (Der.), en medio mínimo con metanol

De esta forma se dedujo que solamente los clones pPic9-IDS 3, 9 y 17 son fenotipo Mut^s. Los demás clones pPic9-IDS y los clones pPic9 son Mut⁺. Esto se infirió con ayuda de los controles ofrecidos por invitrogen™.

4. Evaluación de la expresión de IDS en *P.pastoris* a escala de 10mL

4.1 Crecimiento

Se evaluaron los 20 clones pPic9-IDS obtenidos, se seleccionó un clon pPic9 como control negativo de expresión y se tomaron como controles de fenotipo y controles positivos de expresión las cepas de Initrogen™ GS115/His⁺/Mut^s/HSA y GS115/His⁺/Mut⁺/B-Gal que expresan Albumina humana y B-Galactosidasa, respectivamente. En la Figura 11 se muestra la cinética de crecimiento solamente durante la fase de inducción con metanol. Adicionalmente en la Tabla 2 se muestran las velocidades de crecimiento (μ^{-1}) y el tiempo de duplicación (h) de cada clon. Esto se realizó para estudiar el perfil de crecimiento inicial de los clones.

Es evidente la marcada diferencia entre los fenotipos Mut⁺ y Mut^s, este ultimo presente menor velocidad de crecimiento ($0.0074 \mu^{-1}$) y un tiempo de duplicación mayor (93 h), en comparación con la cepa control Mut⁺, de esta forma se pudo determinar que los clones que presentan valores

cercanos pueden ser descritos como clones Mut^s, tal es el caso de los clones 3, 17, 18, 9, 1. Por otra parte los demás clones, pueden ser catalogados como fenotipo Mut⁺.

Es importante aclarar que los mayores valores de biomasa alcanzaron los 30g/L y el mínimo valor detectado para el final de la fermentación fue de 12 g/L.

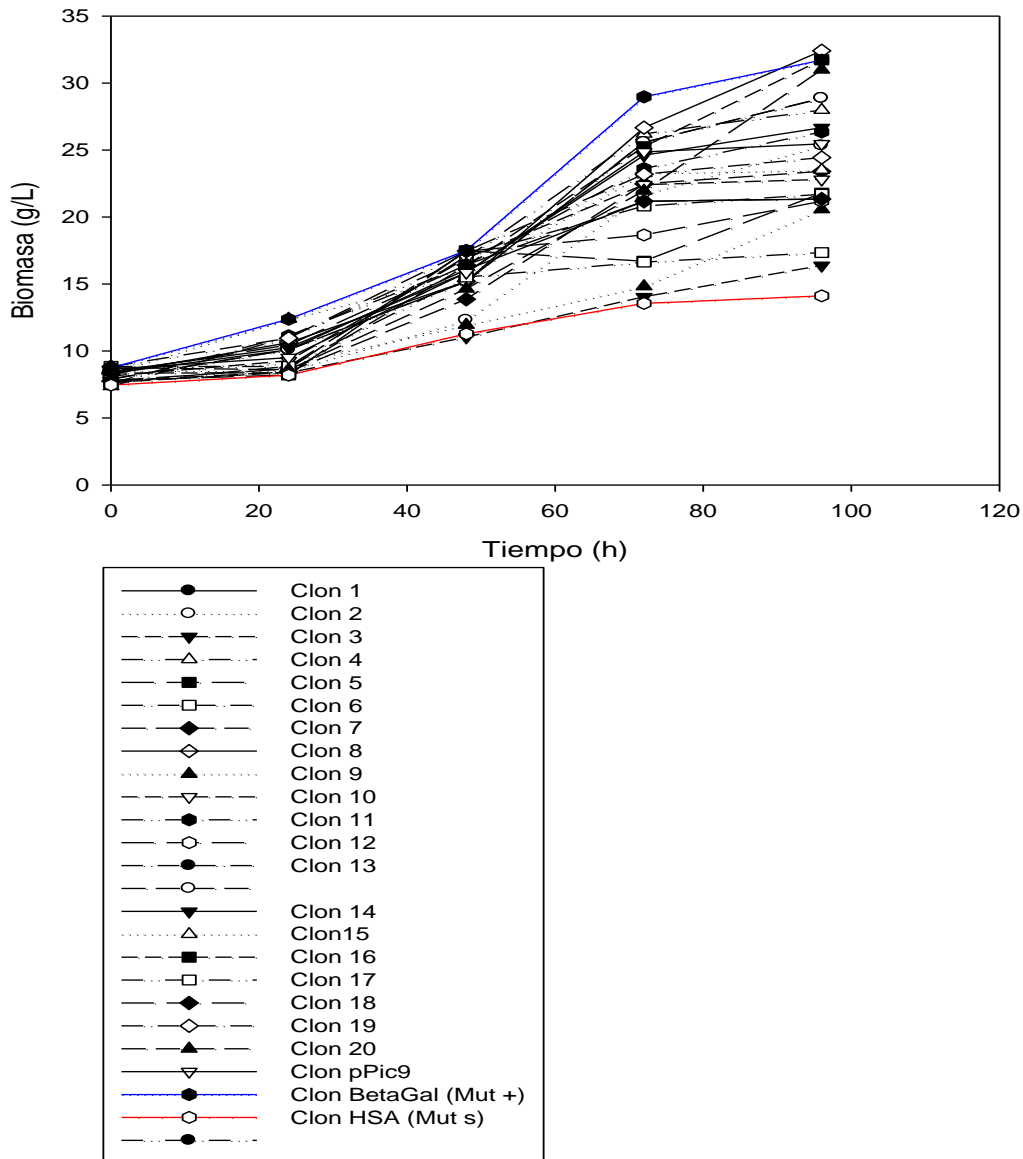


Figura 11 Perfil de crecimiento de los clones pPic9-IDS, el clon pPic9 y los controles, durante fase de inducción con metanol.

4.2 Cuantificación de proteínas totales extracelulares

En la figura 12 se observa la concentración de proteínas totales detectadas en el extracto crudo de cada uno de los muestras realizados cada 24 horas durante las 96 horas de la fase de inducción.

No se observan diferencias marcadas entre cada de los clones en cuanto a la expresión de proteínas. Sin embargo, vale la pena afirmar que a medida que pasan las horas de fermentación aumenta la concentración de éstas, así, en la hora 96 se presentó el máximo punto de producción (0.07mg/mL).

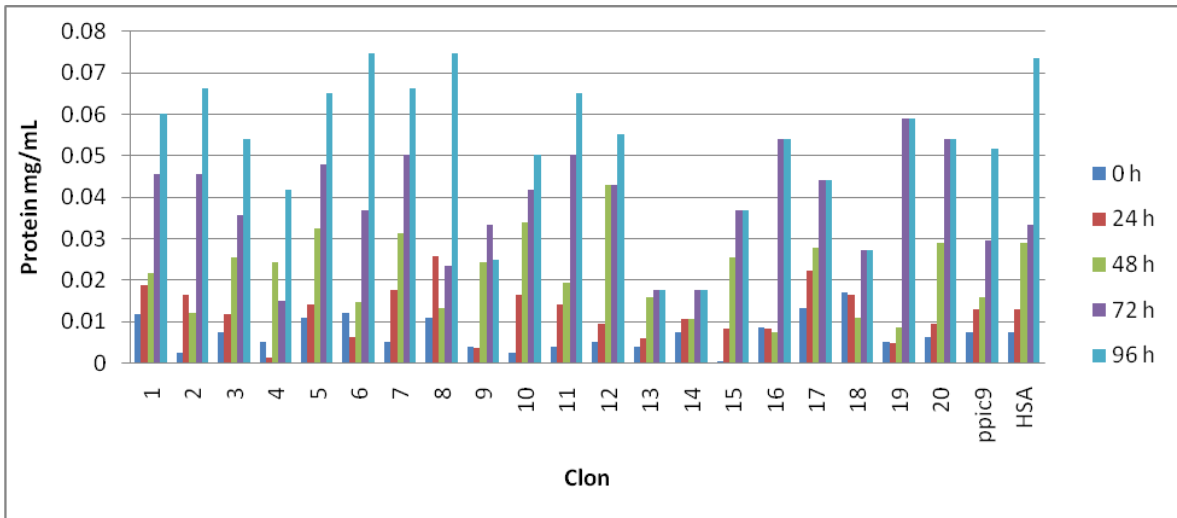


Figura 12 Producción de proteínas totales de cada uno de los clones evaluados durante las 96 horas de inducción con metanol.

4.3 Actividad IDS humana recombinante

La actividad fue medida para los mismos 20 clones pPic9-IDS y para el control pPic9. Los valores más altos de actividad rondaron los valores de 35 a 49 U/mg de proteína, especialmente durante la hora 48 y 72 de inducción (Figura 13).

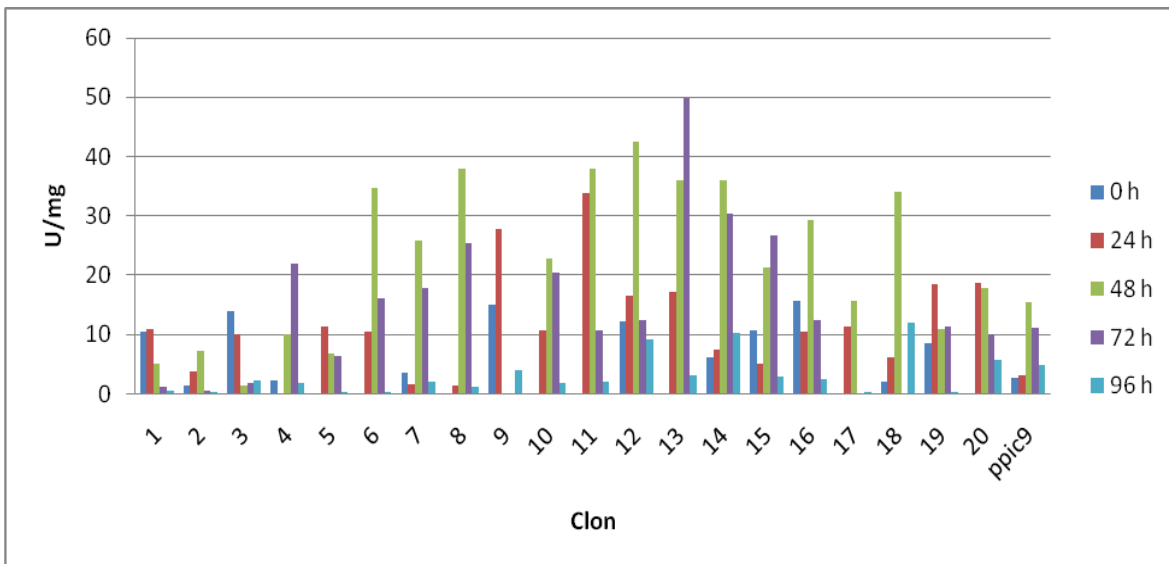


Figura 13 Actividad específica de los clones evaluados durante 96 horas de fase de inducción en metanol como sustrato.

Los clones que presentaron mayores valores de actividad son: 8, 11, 12, 13, 14 y 15. Los cuales van a ser utilizados para posteriores análisis a escala de 100 mL. (Tabla 3). De igual forma, se tomó el clon número 13 para ser evaluado a escala de Bioreactor (1.5 L) por ser el clon con mayor promedio de actividad, durante los diferentes tiempos evaluados.

Tabla 3. Actividad de los diferentes clones a las horas 48 y 72 de inducción con metanol.

48 h		72 h	
Clon	U/mg	Clon	U/mg
12	42.5	13	49.76
11	38.0	14	30.47
8	38.0	15	26.61
13	35.9	8	25.35
14	35.9	4	21.96
6	34.7	10	20.47
18	34.1	7	17.86
16	29.4	6	16.10
7	25.8	16	12.46
10	22.7	12	12.34
15	21.2	19	11.45
20	17.8	PPIC9	11.17
17	15.8	11	10.65
PPIC9	15.4	20	10.06
19	10.9	5	6.43
4	10.0	3	1.91
2	7.2	1	1.27
5	6.7	2	0.54
1	5.1	9	0.00
3	1.4	17	0.00
9	0.0	18	0.00

5. Evaluación de la expresión de IDS en *P.pastoris* a escala de 100mL

5.1 Crecimiento

Se evaluaron los 6 clones pPic9-IDS que presentaron mayor actividad durante el estudio a escala de 10 mL. Para esto se determinó el comportamiento durante 144 horas de fermentación en donde las primeras 48 horas fueron de crecimiento en glicerol como fuente de carbono y las próximas 92 de inducción en metanol, se utilizaron los mismos controles pero se trabajó adicionalmente con la cepa GS115 sin transformar como control negativo de transformación.

Es importante aclarar que los mayores valores de biomasa alcanzaron los 14g/L y el mínimo valor detectado para el final de la fermentación fue de 11 g/L y 1.3g/L para el control negativo.

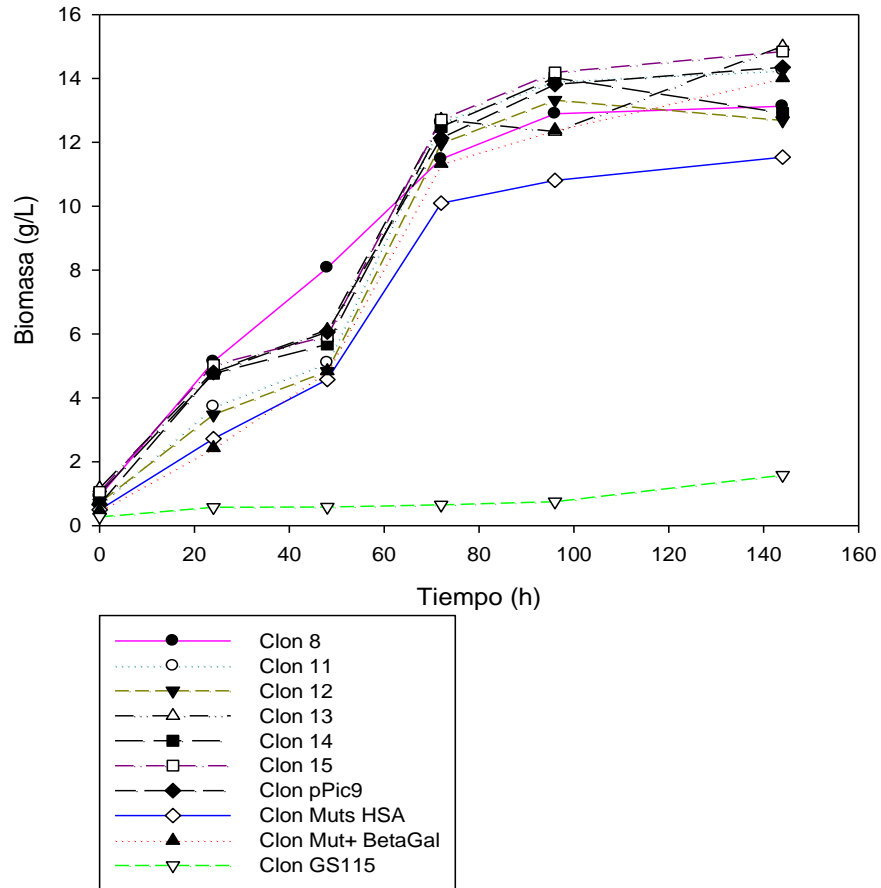


Figura 14 Perfil de crecimiento de los clones pPic9-IDS, el clon pPic9 y los controles, durante toda la fermentación.

Tabla 4. Parámetros cinéticos determinados a escala de 100 mL.

Fase	Crecimiento		Inducción	
Clon	μ (h^{-1})	td (h)	μ (h^{-1})	td (h)
8	0.045	15.335	0.0045	154.033
11	0.043	16.271	0.0090	77.016
12	0.040	17.329	0.0085	81.547
13	0.035	20.091	0.0073	94.952
14	0.036	19.254	0.0079	87.740
15	0.036	19.254	0.0081	85.574
Ppic9	0.046	15.003	0.0077	90.019
HSA	0.046	14.971	0.0080	86.643
BGal	0.048	14.351	0.0092	75.342
GS115	0.016	42.787	0.0034	203.867

5.2 Cuantificación de proteínas totales extracelulares

En la figura 15 se observa la concentración de proteínas totales detectadas en el extracto crudo de cada uno de los muestreos realizados durante las 96 horas de la fase de inducción.

No se observan diferencias marcadas entre cada uno de los clones en cuanto a la expresión de proteínas. Sin embargo, vale la pena afirmar que a medida que pasan las horas de fermentación aumenta la concentración de éstas, así, en la hora 96 se presentó el máximo punto de producción (0.17mg/mL).

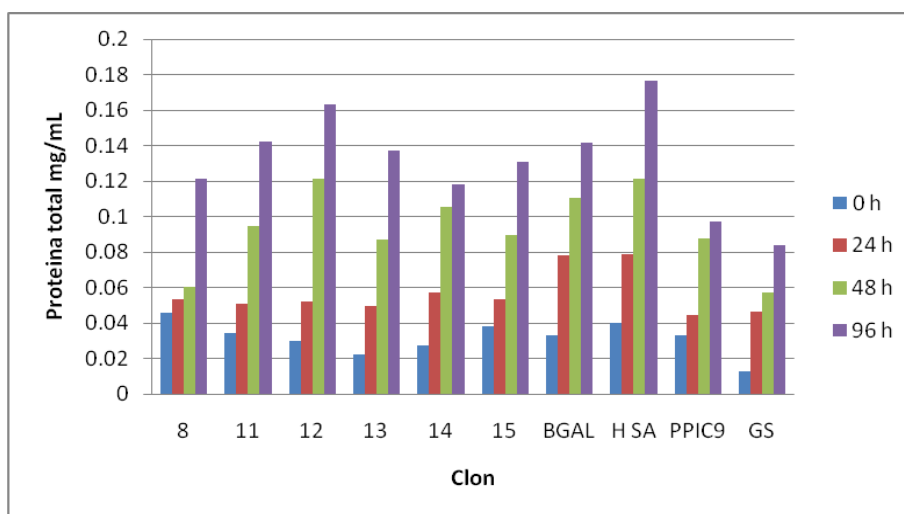


Figura 15 Producción de proteínas totales de cada uno de los clones evaluados durante las 96 horas de inducción con metanol.

5.3 Actividad IDS humana recombinante

Se determinó la actividad específica durante las 96 horas de inducción y se observaron valores máximos con el clon 8 y 13 de 6.4 y 5.99 U/mg de proteína respectivamente, a las 48 horas de inducción mientras que a la hora 0 y hora 96 se presentaron valores considerablemente bajos en comparación con el resto del proceso de inducción.

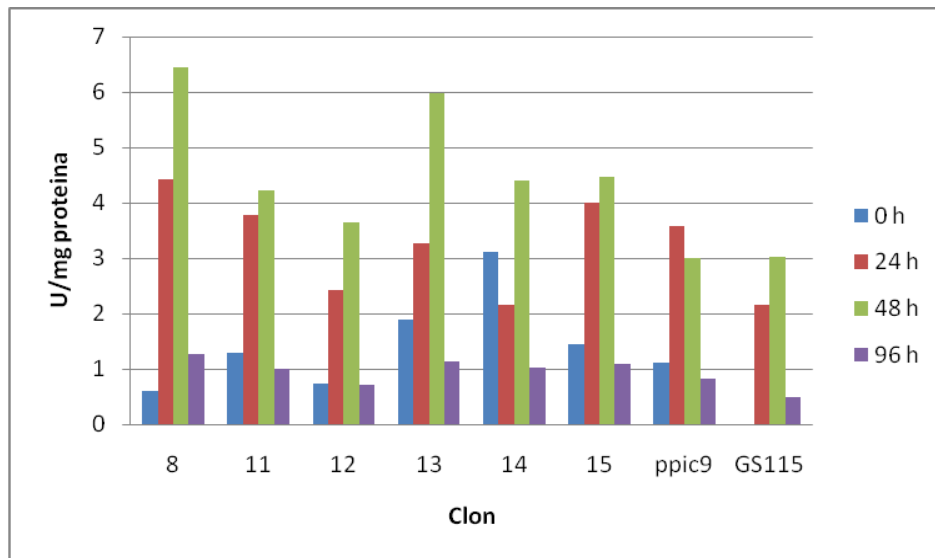


Figura 16 Actividad específica de los clones evaluados durante 96 horas de fase de inducción en metanol como sustrato.

6. Evaluación de la expresión de IDS en *P.pastoris* a escala de 1500mL

6.1 Evaluación del cultivo

Durante el cultivo del clon 13 en el Bioreactor a volumen de 1.5L se determino que la mayor actividad se presento a la hora 46 (7.9 U/mg prot), adicionalmente se presentaron valores estables de proteína que para el final del cultivo superaban la concentración de 0.2mg/mL Figura 17.

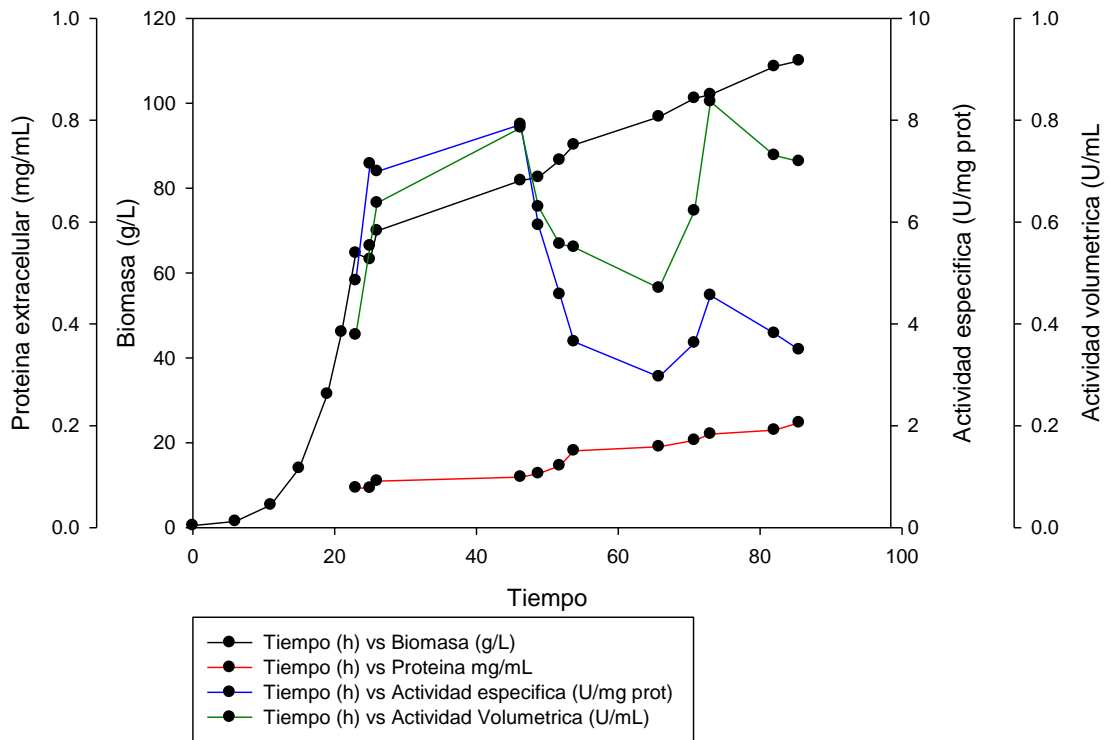


Figura 17 Estudio cinético de la expresión de IDS a escala de 1.5L

En la cinética de crecimiento del microorganismo a escal de 1.5L se evidencia la fase de crecieinto hasta la hora 25 del proceso y la segunda fase de induccion luego de la hora 25 hasta la hora 85 tal y como se evidencia en la figura 18.

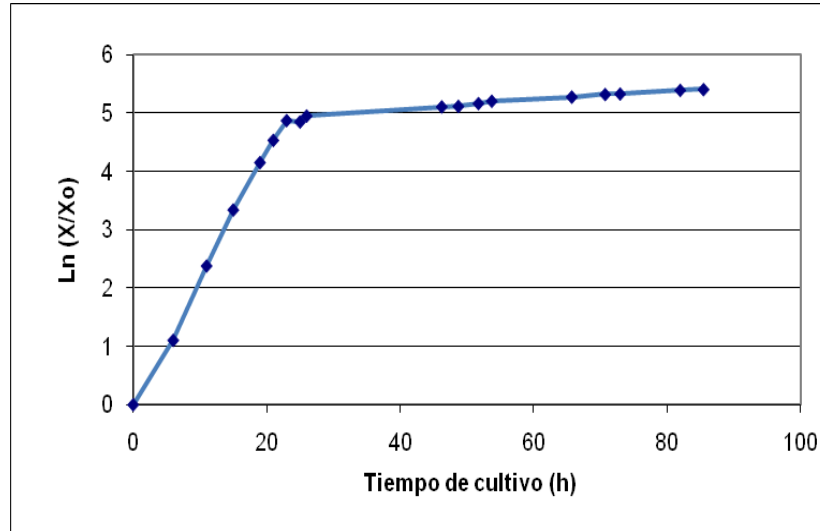


Figura 18 Biomasa corregida durante todo el tiempo de fermentación.

La velocidad de crecimiento durante la fase de inducción fue de 0.2184 h^{-1} y el tiempo de duplicación fue de 3.17horas Figura 19.

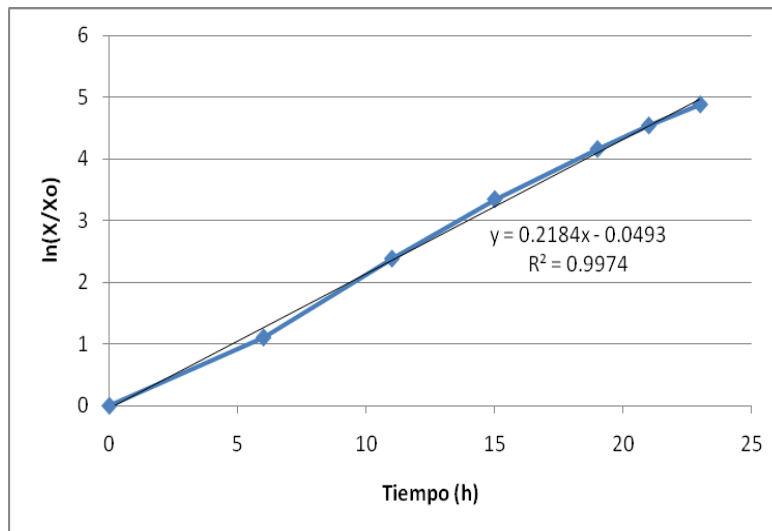


Figura 19 Fase de crecimiento en glicerol a volumen de 1.5L

La velocidad de crecimiento durante la fase de inducción fue de 0.0078 h^{-1} y el tiempo de duplicación fue de 88.86 horas Figura 20.

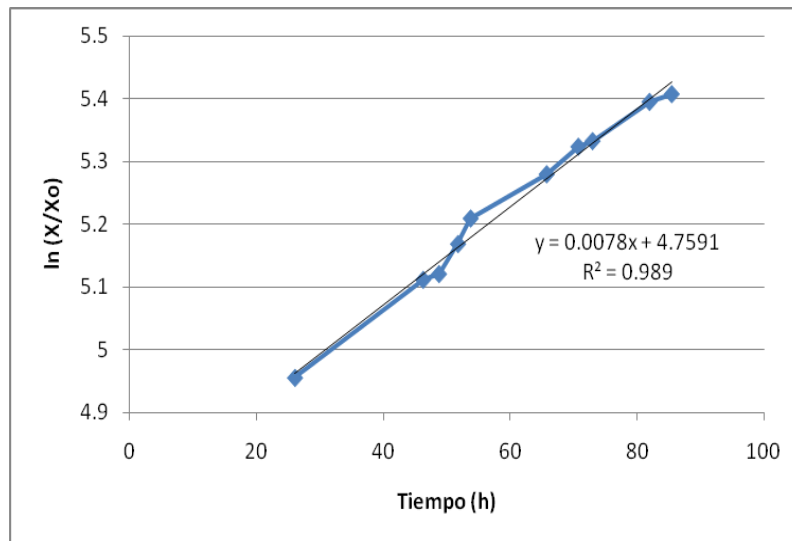


Figura 20 Fase de inducción en metanol a volumen de 1.5L

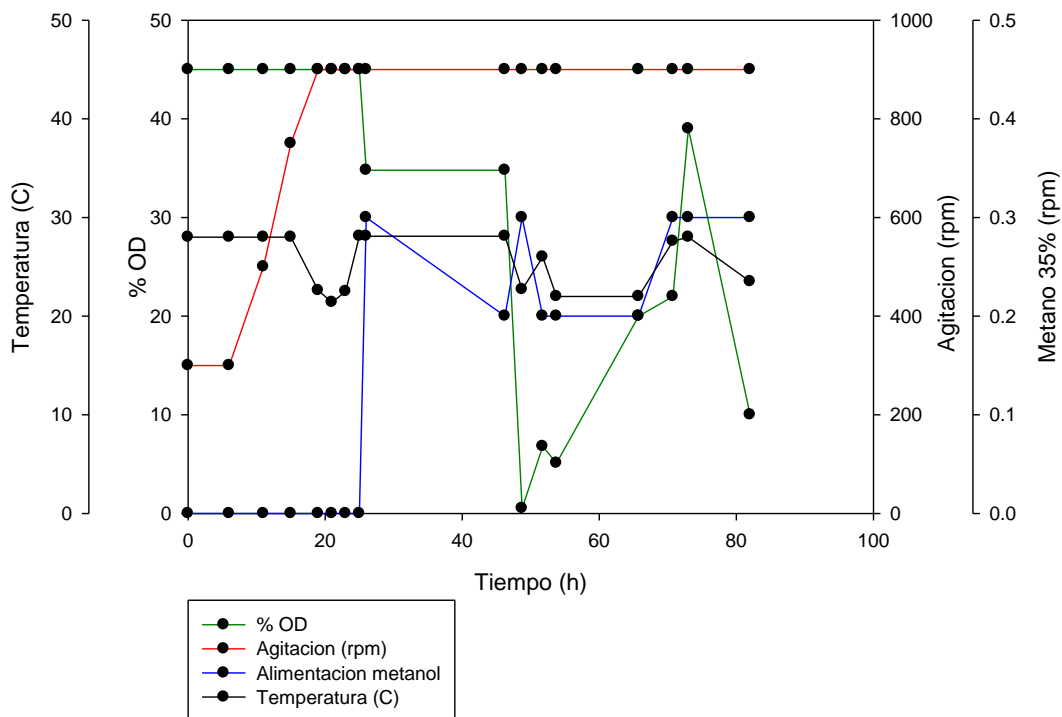


Figura 21 Variables evaluadas durante el cultivo en Bioreactor

V DISCUSIÓN

La MPS II es causada por la deficiencia de la enzima IDS, el tratamiento de esta enfermedad actualmente presenta costos considerablemente altos, debido a que la proteína está siendo expresada en líneas celulares. Como respuesta a esta dificultad se ha incursionado en la expresión de IDS en otros sistemas eucariotes como en la levadura metilotrófica *P.pastoris*, la cual está siendo utilizada para expresar exitosamente numerosas proteínas heterólogas, En estudios preliminares en el IEIM se ha mostrado la posibilidad de producir una enzima recombinante IDS en forma activa en *P.pastoris*, mostrando resultados satisfactorios (23).

No obstante, se quiere mejorar el rendimiento y la productividad hasta hoy obtenida por medio del uso de un gen optimizado de IDS con ciertas características: Sin el péptido señal nativo, con mayor contenido de G-C y con codones de alta frecuencia para *P.pastoris*. Se transformaron células de *P.pastoris* con el vector recombinante pPic9-IDS y se evaluaron diferentes parámetros de los clones obtenidos a diferentes escalas de producción: 10mL, 100mL y 1500mL.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, demuestran el éxito de la clonación y expresión del gen optimizado de la IDS humana en *P.pastoris*, evidenciándose en las figuras 6 y 9 en donde se puede confirmar la inserción de gel al vector y la correcta selección de transformantes en los medios mínimos, respectivamente. En este estudio a diferencia de los ya realizados en el IEIM no fue necesaria la evaluación de la direccionalidad del gen, ya que, por ingeniería genética se sintetizó el gen optimizado de IDS con sitios de corte para enzimas de restricción que crean extremos cohesivos y que actúan también en el sitio de múltiple de clonación del vector, de esta forma, al digerir con las enzimas de restricción EcoRI y NotI, el vector pPic9 y el plásmido donde venía contenido el gen (Figura 5), se asegura el correcto ensamble y direccionamiento del inserto en el vector, evitando así análisis posteriores de direccionalidad (23). De igual forma en la figura 9 se evidencia cómo el control negativo de transformación, es decir, la cepa *P.pastoris* GS115 sin transformar, no tuvo la capacidad de crecer en medio mínimo sin Histidina, lo que sugiere que las células que fueron transformadas y crecieron en el medio mínimo sufrieron el proceso de recombinación de la figura 8 y por consiguiente tiene la habilidad de sintetizar histidina y al tener este constructo el gen de la IDS, se pudo inferir que también se está expresando (37).

Luego de obtener los clones deseados, se realizó la clasificación de su fenotipo, determinado básicamente por el tipo de crecimiento que mostró cada clon en el medio mínimo con metanol cuando fue sembrado por aislamiento (Figuras no mostradas), esto se realizó con el fin de predecir el comportamiento de estas cepas en fase de inducción. De igual forma esta clasificación fue confirmada en los diferentes ensayos donde se evidenció el comportamiento característico de estas levaduras cuando utilizan metanol como fuente de carbono, la velocidad de crecimiento bajó

considerablemente (10 veces menos) en comparación con la velocidad de crecimiento en fase de crecimiento con Glicerol como fuente de carbono, en los tres ensayos. Esto se da por que el microorganismo en la primera fase utiliza la fuente de energía con el objetivo de crecer celularmente, mientras en la segunda fase es posible deducir que el descenso de la velocidad de crecimiento se da porque la energía producida a partir del metanol es mínimamente utilizada para producir biomasa ya que en su mayoría se usa para expresar AOX y por consiguiente la enzima de interés (23).

La expresión de IDS a escala de 10mL se realizó con el objetivo de reducir el número de clones para ser evaluados a escala de 100mL. Es importante señalar, que las cepas control GS115 y ppic9 presentaron valores de actividad bajos lo que se determino como una actividad basal de las cepas por consiguiente los clones que presentaran esta actividad o actividad menor se tomarían como falsos positivos, así los clones con una actividad mayor serian seleccionados para los estudios a 100mL.

Las condiciones de cultivo afectan directamente la producción y la actividad de la enzima ya que variables como el porcentaje de oxígeno disuelto (OD), la alimentación de metanol y otras variables que serán discutidas a continuación influyen directamente en el proceso. Es preciso aclarar que los mayores valores de actividad obtenidos a escala de 100 mL fueron de 6.4 y 5.9 U/mg de proteína extracelular total presentados por los clones 8 y 13 respectivamente a las 48h de inducción. A esta escala el mayor valor de actividad reportado por Landázuri 2009 fue de 4.21 U/mg de proteína extracelular total a las 72 horas de inducción (23).

Vale la pena atribuir este incremento de la actividad al uso del gen optimizado de IDS. Diversos reportes han evidenciado incrementos en la producción de proteínas recombinantes cuando se utilizan genes optimizados en sistemas como *P.pastoris*, tal es el caso de lo reportado por Sinclair 2002 donde se logró una expresión de 7 a 10 veces más de Glucocerebrosidasa recombinante utilizando el gen optimizado para esta levadura (43).

Este incremento en la expresión de la proteína recombinante, se da principalmente por el aumento de la traducción del gen debido a la secuencia específica que presenta codones de alta frecuencia que dependiendo de la especie se utiliza para la respectiva expresión, de esta forma, se puede correlacionar los codones de baja frecuencia con un bajo nivel de aminoacil-tRNA's intracelulares. Estas moléculas están implicadas en el encuentro en el ribosoma entre el codón y el aminoácido correspondiente en el proceso de la síntesis de proteínas. Así, si hay deficiencia de un aminoacil-tRNA particular, el uso del codón correspondiente disminuirá la velocidad de síntesis de la proteína específica. Ha sido experimentalmente comprobado que los genes que usan codones de baja frecuencia tienden a ser bajamente expresados en comparación con aquellos genes que usan

codones de alta frecuencia. Vale la pena aclarar que esta frecuencia varía significativamente de una especie a otra (35).

Aparte del uso de codones de alta frecuencia, la optimización del gen radicó también en el aumento del contenido de G-C en la secuencia, lo que aumenta la estabilidad y resistencia del gen a ciertas condiciones, favoreciendo su expresión. Por esto se obtuvieron resultados similares a los conseguidos por Yadava en el 2003 para la producción de un prospecto de vacuna contra la malaria, donde se aumentó la expresión de la enzima en comparación con reportes de expresión del gen sin optimizar (44).

Sin embargo, durante el proceso de expresión de IDS a diferentes escalas se presentaron algunas complicaciones que pudieron haber afectado directamente sobre la expresión y la actividad enzimática. Esto trae a colación algunas hipótesis por las cuales la producción de IDS no fue mayor en este estudio.

En primera instancia, se sabe que el OD es vital para obtener buenas productividades (>20%) pero esta variable fue posible cuantificarla solamente a escala de bioreactor mas no a escala de 100 o 10 mL. No obstante, fue posible evidenciar que para las 46 horas de cultivo ya este valor era de 0%, como lo muestra la figura 21. Bajo estas condiciones de microaerofilia o anoxia comienzan a aparecer productos derivados del metabolismo de la levadura tales como el etanol y acetato, los cuales pueden llegar a tener un efecto negativo en la producción de la proteína de interés (45).

Estos valores de OD indican que se ha agotado el glicerol por esta razón se inició una fase de transición, en esta se alimentó el glicerol en cantidades que mantengan el crecimiento exponencial limitado por sustrato con el objetivo de obtener una alta densidad celular (46)

Luego de esta alimentación con glicerol que se llevó a cabo solamente a escala de 1500mL, fue necesaria la alimentación con metanol con el objetivo de inducir la expresión de IDS. La figura 17 sugiere que la levadura fue capaz de responder rápidamente al cambio de condiciones ambientales, adaptándose al nuevo sustrato y activando el promotor AOX1 para metabolizar el metanol. Ya para esta fase se ha superado la dificultad relacionada con el oxígeno disuelto por la adición de sustrato de inducción. Sin embargo, la velocidad de consumo y de alimentación de metanol debe ser iguales con el objetivo de no acumular subproductos de degradación de metanol también denominados como ROS (*reactive oxygen species*) como formaldehído y peróxido de hidrógeno (47).

El posible estrés oxidativo causado por la alta concentración intracelular de ROS puede causar daños celulares e inclusive lisis lo que conlleva a la liberación de proteasas al medio, disminuyendo

tanto la productividad celular y por consiguiente la productividad de IDS. Esta liberación afecta directamente el proceso, tanto por la muerte de maquinaria para producir proteína como por la degradación de proteína ya producida (36). Así, la acumulación de estos productos debe controlarse por la adición regulada de metanol.

P. pastoris es un microorganismo capaz de secretar al medio las proteínas que expresa, en medios tanto complejos como mínimos convirtiendo se en un microorganismo útil para la producción de proteínas heterólogas, facilitándose los procesos de *downstream*. Aunque, este microorganismo presenta una desventaja, la degradación de producto recombinante (46). En algunos casos el producto permanece intacto, mientras en otros no se puede recuperar producto activo debido a la actividad proteolítica. Según lo reportado por Poutou 2006 para IDS la mayor actividad proteolítica se dio para el final del proceso de producción. Sin embargo este fenómeno varía de acuerdo al cultivo realizado (39). Las diferencias en la sensibilidad a las proteasas dependen de la secuencia de aminoácidos y la conformación tridimensional que pueden concebir sitios reconocibles para la degradación. En *P.pastoris* han sido encontradas proteasas tipo serina, cisteína o ácido aspártico, las cuales pueden ser intracelulares o extracelulares. Como se afirmó anteriormente en alimentación con metanol puede haber mayores niveles de muerte celular, altos niveles de estrés causados por el metanol mismo o simplemente por el cambio de sustrato, lo que puede llevar a una sobre-expresión de proteasas, trayendo como resultado la degradación de la proteína de interés, esta puede ser una explicación a los bajos niveles de actividad mostrados al final de los procesos de inducción en las diferentes escalas evaluadas (hora 96) (48). De igual forma han sido identificadas cuatro proteasas vacuolares que pueden llegar a interferir y disminuir la productividad de algunas proteínas heterólogas expresadas en *P.pastoris*, PrA, PrB, CpY y aminopeptidasa, encontradas comúnmente en el extracto crudo de fermentaciones llevadas a cabo con este microorganismo (49).

Para realizar un mejor análisis del cultivo y determinar cuál de las hipótesis planteadas referentes a la producción de IDS activa, se sugiere llevar a cabo un estudio de actividad proteolítica para lo cual se han el protocolo reportado por Hubner, 1994. Donde se cuantifica la degradación de caseína marcada (50).

Factores tales son la temperatura y la lisis celular inciden en la producción de proteasas y la estabilidad de la proteína de interés, a escala de 1500mL se quiso llevar a cabo la expresión de IDS en un lote alimentado limitado por temperatura (Figura 21), según los reportes la temperatura en donde mejores valores de rendimiento y actividad se obtiene es a cuando la temperatura desciende, mecanismo con el cual no se cuenta en el IEIM, este incremento en la actividad de la proteína a esta temperatura se da básicamente para evitar la deficiencia de oxígeno en altas densidades celulares. Se ha reportado que cuando el crecimiento celular no es limitado por

metanol es bastante útil limitar el proceso por temperatura cuando se trabaja con cepas Mut⁺ como en este estudio. En el estudio llevado a cabo por Jahic, 2003 Se obtuvo, mayores densidades celulares, mayor concentración de producto de interés, menor muerte celular y menor actividad proteolítica en el medio (51).

Otra variable a tener en cuenta es la densidad celular, en este estudio se obtuvo una concentración de biomasa de 14g/L y de 109 g/L a escala de 100 mL y 1.5L, respectivamente. Mientras en estudios anteriores se había obtenido 10g/L y 30 g/L de biomasa. Durante todo el proceso fermentativo y sobre todo a escala de bioreactor donde las células estaban sometidas a 900rpm de agitación con turbinas tipo Rushton, es de esperar que se haya dado un alto grado de lisis celular la cual tal y como se afirmó anteriormente puede influenciar la producción de proteasas que afecten el sistema, este fenómeno se observa en cultivos de alta densidad. A medida que se presenta un incremento en la biomasa, se aumenta la actividad proteolítica, por esta razón los altos niveles de biomasa observados en este estudio impidieron que se dieran niveles más altos de actividad IDS. Datos similares fueron reportados para la expresión de otras proteínas como interferones, donde la densidad celular no es directamente proporcional a la expresión y actividad de la proteína, en ese estudio se determinó la máxima productividad volumétrica cuando la densidad era de 328.9g/L, mientras la máxima productividad específica se alcanzó cuando la densidad era de 287.7g/L, por esta razón se sugiere realizar estos estudios que relacionen la productividad volumétrica con la productividad específica en la expresión de proteínas como IDS en *P.pastoris* (52)

Por otra parte, se correlaciono cómo los diferentes clones presentaron una velocidad de crecimiento mayor en metanol, en comparación con el control Mut^s lo que hace pensar que la mayoría de los clones son fenotipo Mut⁺, lo que se corroboró en los aislamientos en el medio mínimo con metanol donde solamente 3 de los 20 clones obtenidos fueron clasificados como fenotipos Mut^s, esto quiere decir que en los clones utilizados en escala de 100mL y 1.5L, los dos genes de la alcohol-oxidasa son funcionales y presentan mayores concentraciones de producto en las primeras horas de la fermentación, por esto a lo largo del estudio y a los diferentes volúmenes de trabajo evaluados se observó que las mayores actividades se presentaron a la hora 48 de inducción de los cultivos, al momento de trabajar con cepas Mut⁺, es necesario tomar en consideración el hecho de que estas cepas crecen a mayor velocidad que las cepas Mut^s cuando se tiene metanol como fuente de energía, adicionalmente, requieren grandes cantidades de metanol durante el cultivo, pero de igual forma son mucho más sensibles a las variaciones de concentración del sustrato lo que hace del sistema un poco complicado para escalar y es posible que la expresión de la alcohol-oxidasa puede competir con la expresión IDS por la maquinaria celular, disminuyendo así el rendimiento del producto deseado. Esta puede ser considerada como otra razón por la cual no se obtuvieron mayores rendimientos (34).

Adicionalmente es necesario tener en cuenta la acción de algunas proteínas implicadas en la activación enzimática de enzimas sulfatasas, como la IDS. Las sulfatasas contienen residuos de Formilglicina (FGli), el cual es esencial para la actividad enzimática, por ser específicamente su sitio de acción catalítica. La formación de este residuo FGli ocurre como una modificación postraduccional llevada a cabo por la oxidación de Cisteína, el gen que codifica para la enzima generadora de FGli es conocido como SUMF1 (*Sulfatase Modifying Factor 1*) y aunque ha sido reportado desde bacterias hasta mamíferos, no se ha identificado la presencia de este gen en levaduras o nemátodos. Es evidente que sin la presencia de este gen es posible que se este dando la producción de esta enzima pero de una forma inactiva, lo que puede argumentar el fenómeno de la figura 17 en donde se da producción de proteína a lo largo del cultivo pero la actividad no presenta valores considerables. Como respuesta a estas complicaciones se ha llevado a cabo coexpresión de proteínas con el objetivo de producir la enzima y su activador simultáneamente, proceso que se recomienda para futuros estudios con los clones obtenidos (53).

Futuros trabajos deben estar enfocados a la optimización de las condiciones de cultivo, con el objetivo de incrementar la producción y la actividad del IDS, la purificación de la enzima recombinante y la evaluación de la expresión de la proteína a diferentes niveles, como Western Blot, SDS-PAGE, ELISA, Inmunodifusión, entre otros.

VI CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los clones de *P.pastoris* de la cepa GS115 transformados con el vector pPic9-IDS conteniendo el gen optimizado de IDS.
- Se determinó la cinética de crecimiento, la producción de proteínas extracelulares totales y la actividad IDS durante los tiempos de fermentación de los diferentes clones obtenidos y estudiados durante cada etapa a diferentes volúmenes de trabajo.
- Los resultados mostraron mayores actividades IDS a escala de 10mL y 100mL reportados hasta ahora en el IEIM
- Se determinaron posibles causas por las cuales la actividad a escala de 3L fueron menores que las reportadas hasta ahora y se plantearon posibles estrategias para responder a estas dificultades

VII RECOMENDACIONES

- Detectar por PCR la presencia del gen IDS optimizado en el genoma de *P.pastoris*.
- Cuantificar y detectar la proteína IDS por medio de diferentes técnicas inmunológicas, se recomienda, Western Blot, ELISA, Inmunodifusión o Dot Blot.
- Estudiar simultáneamente la expresión del gen nativo con el péptido señal utilizado en estudios anteriores (PUC13-IDS) y el gen sintético sin el péptido señal nativo (pPic9-IDS).
- Llevar a cabo diferentes estrategias de cultivo y alimentación que permitan aumentar la productividad y mejorar el rendimiento IDS
- Evaluar la coexpresión de SUMF1 con IDS para identificar la necesidad de realizar la modificación postraducciona de cisteína a formilglicina, necesaria para la activación enzimática.

VIII BIBLIOGRAFIA

1. Menéndez C, Zaldivar C, González M. Errores Innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales. *Revista Cubana de Pediatría. Revista Cubana de Pediatría*. 2002 **74**(1) 68-67
2. Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: A heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *J Pediatr* 2004; **144**, 27-35.
3. Ioannou Y.A. Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders with Neuropathology. *Journal of American Society of Nephrology*. **11** 1542-1547.
4. Parkinson E, Muller V, Hopwood J y Brooks D. Iduronate-2-sulphatase protein detection in plasma from mucopolysaccharidosis type II patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004, **81**. 58–64
5. Correa Garzón, Las mucopolisacaridosis. Universidad Militar Nueva Granada. En línea: http://www.scp.com.co/precop/precop_files/modulo_4_vin_3/mucopolisacaridosis.pdf
6. Vafiadaki E, Cooper A, Heptinstall L, Hatton E, Thornley M, Wraith J. Mutation analysis in 57 unrelated patients with MPS II. *Archives of diseases in childhood*. 1998. **79**:237-241.
7. Neufeld E, Muenzer J. *The Mucopolysaccharidoses*, In *The Metabolic and molecular bases of inherited disease*. Scriver C.H., Beaudet A.L, Sly W.S. Editor. McGraw Hill: New Yor, USA. 2001. 3421-3425
8. Kettlesa D.I, Sheppardb M, Liebmannc R, Davodsona C. Left ventricular aneurysm, Aortic valve disease and coronary narrowing in a patient with Hunter's syndrome. *Cardiovascular pathology*. 2002. **11**, 94-96.
9. Wilson P, Meaney C, Hopwood J, Morris C. Sequence of the human Iduronate 2-Sulfatase gene, *Genomics*. 1993. **17**. 773-775.
10. Wilson P. Morris C. Anson D. Occhidoro T. Bielick J. Clements P. Hopwood J. Hunter Syndrome. Isolation of an Iduronate 2-sulfatase cDNA Clone and Analysis of patients DNA. *Proceedings of National Academy of Science*. 1990 **87** 8531-8535
11. Barrera L.A, La terapia de reemplazo enzimatico en el tratamiento de enfermedades geneticas. *Universitas scientarum*. 2003, **8** (2). 31-42
12. Hong Y, Yu S.S., Kim J-M, Lee K, Na Y, Kim S. Construction of a high efficiency retroviral vector for gene therapy of Hunter's Syndrome. *The journal of gene medicine*. 2002.
13. Desnick R.J. Replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. *J Inher Metab Dis*. 2004. **27**. 385-410
14. Muenzer J, Gucevas-Calikoglu M, Shawn E, Shuetz T, Kimura A. A phase I/II clinical of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter's Syndrome).

15. Rattazzi M. Enzyme Replacement: Overview and prospects. *Treatment of genetics diseases*. Editor. 1991. 134-151.
16. N.W. Barton, R.O. Brady, J.M. Dambrosia, A.M. Di Bisceglie, S.H. Doppelt, S.C. Hill, H.J. Mankin, G.J. Murray, R.I. Parker, C.E. ArgoV, et al., Replacement therapy for inherited enzyme deficiency—macrophage targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease, *N. Engl. J. Med.* 1991. **324** 1464–1470
17. R. SchiVmann, J.B. Kopp, H.A. Austin 3rd, S. Sabnis, D.F. Moore, T. Weibel, J.E. Balow, R.O. Brady, Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial, *JAMA* 2001 **285** 2743–2749.
18. J.E. Wraith, L.A. Clarke, M. Beck, E.H. Kolodny, G.M. Pastores, J. Muenzer, D.M. Rapoport, K.I. Berger, S.J. Swiedler, E.D. Kakkis, T. Braakman, E. Chadbourne, K. Walton-Bowen, G.F. Cox, Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human alpha-L-iduronidase (laronidase), *J. Pediatr.* 2004 **144** 581–588.
19. P. Harmatz, D. Ketteridge, R. Giugliani, N. GuVon, E.L. Teles, M.C. Miranda, Z.F. Yu, S.J. Swiedler, J.J. Hopwood, Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamysyndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase *Pediatrics* 2005 **115** e681–e689. articulo fabry
20. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology reviews*. 2000. **24**. 45-66.
21. Gutierrez M, Garcia-Vallejo F, Tomatsu S, Ceron F, Alméciga-Díaz C, Domínguez M. Construction of an Adenoassociated virus-derived vector for the treatment of Morquio A disease. *Biomédica* 2008; **28**; 448-459
22. Rodríguez A, Espejo J, Hernández A, Velásquez O, Lizaraso L, Cordoba H, Sánchez O, Alméciga-Díaz C, Barrera L. Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant Nacetylgalactosamine- 6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; DOI 10.1007/s10295-010-0766-x
23. Landázuri P, Poutou-Piñales RA, Acero-Godoy J, Córdoba-Ruiz HA, Echeverri-Peña OY, Sáenz H, Delgado JM, Barrera LA. Cloning and shake flask expression of hrlDS-Like in *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol* 2009; **8**,2871-2877.
24. Baneyx F. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in Biotechnology*. 1999 **10** 411-421
25. Chiruvolu V, Gregg J, Meagher M. Recombinant protein production in an alcoholoxidase defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme Microb Technol.* 1997 **21** 277–283

26. Montesino R, Nimitz M, Quintero O, Garcia R, Falcon V, Cremata JA. Characterization of the oligosaccharides assembled on the *Pichia pastoris*-expressed recombinant aspartic protease. *Glycobiology*. **9** 1094-1043
27. Jenkins N, Parenkin R, James D. Getting the glycosylation right, implication for the biotechnology industry. *Nat Biotechnology*. **14**. 975-981.
28. Poutou R, Quevedo B, Cordoba H, Saenz H, Barrera L. Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA*. 2005. **3**. (3). 75-87.
29. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 2005. **22**, 249–270
30. Daly R, Hearn TW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*. 2005. **18**, 119–138
31. Cos O, Ramón R, Montesinos J, Valero F, Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microb Cell Fact* 5. 2006 **5** 17
32. Cregg J, Vedvick T, Raschke W, Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* *Nat. Biotechnol.* 1993 **11** 905–910.
33. Sreekrishna K, Brankamp R, Kropp K, Blankenship T, Smith P, Wierschke J, Subramaniam A, Birkenberger A. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Gene* 1997 **190** 55–62.
34. Cos O, Resina D, Ferrer P, Montesinos J, Valero F, Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochem Eng J*. 2005 **26** 86–94
35. Welch M, Villalobos A, Gustafsson C, Minshull J. You're one in a googol: optimizing genes
36. Potvin G, Ahmad A, Zhang Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*. 2010. Article in for protein expression, *J. R. Soc.* 2009 **6** S467–S476 press.
37. Invitrogen. *Pichia* Expression kitA manual of method for expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*. Cat No. K1710-01 California. Invitrogen
38. Sambrook J, Manniatis T, Fritsh E. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. 1989 2nd ed. New York. 1-62, 458-459
39. Poutou RA. *Expresión de Sulfatasas Humanas en Escherichia coli y Pichia pastoris*, **Tesis Doctoral**. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., 2006, 162p
40. Cordoba, H. Estudio de la producción a nivel de laboratorio de la enzima iduronato 2-sulfatasa humana recombinante (IDS-2hr) en *Pichia pastoris*. **Tesis de Maestría**. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, 2003.
41. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding" *Anal. Biochem*. 1976 **72**:248-254

42. Voznyi YV, Keulemans LM, Diggelen OP. A fluorogenic enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease). *J. Inherit. Metabolism*, 2001 **24**: 675-680.
43. Sinclair G., F.Y.M.Choy, Synonymous codón usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, *Protein Expr.Purif.*2002 **26** 96–105.
44. Inan, M.M.Meagher, The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*, *J.Biosci.Bioeng.*2001, **92** 337–341.
45. Yadava A, Christian F. Ockenhouse. Effect of Codon Optimization on Expression Levels of a Functionally Folded Malaria Vaccine Candidate in Prokaryotic and Eukaryotic Expression. *Infection and Immunity*. 2003 **71** (9) 4961-4969.
46. Idiris, H. Tohda, H. Kumagai, K. Takegawa, Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*2010 **86** 403–417.
47. Xiao A, X.Zhou, L.Zhou, Y.Zhang. Improvement of cell viability and hirudin production by ascorbic acid in *Pichia pastoris* fermentation, *Appl.Microbiol. Biotechnol.* 2006 **72** 837–844.
48. S.Yamashita, H.Yurimoto, D.Murakami, M.Yoshikawa, M.Oku, Y.Sakai, Lagphase autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *GenesCells* 2009 **14** 861–870.
49. J.Sinha, B.A.Plantz, M.Inan, M.M.Meagher, Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant to vine interferon-T, *Biotechnol.Bioeng.* 2005 **89** 102–112.
50. Hubner U. Production of alkaline serine protease subtilisin caltsber by *Bacillus licheniformis* on Complex medium in a Stirred Tank Reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993. **40**, 182-188.
51. M.Jahic, F. Wallberg, M. Bollok, P. Garcia, S.O.Enfors, Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. *Microb.CellFact* 2003 **2** 6.
52. W.Zhang, C.P.Liu, M.Inan, M.M.Meagher, Optimization of cell density and dilution rate in *Pichia pastoris* continuous fermentations for production of recombinant proteins. *J.Ind.Microbiol.Biotechnol.* 2004 **31** 330–334.
53. M. Sardiello, I. Annunziata, G. Roma and A. Ballabio. Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics*. 2005 **14** (21) 3203–3217

ANEXO 1

PROTOCOLO 1

ELECTROPORACION DE CELULAS DE *E.coli*

1. Descongelar un vial de células *E.coli* electrocomp TOP10
2. Agregar 4 μL de producto de ligación a 20 μL de células y mezclar cuidadosamente sin pipeteo
3. Transferir la mezcla del numeral 2 a una cuveta de 0.1 cm previamente enfriada (4C)
4. Electroporar las células a 1400 V, 200 Ω
5. Agregar inmediatamente 250 μL de SOC atemperado a las células.
6. Transferir la mezcla del numeral 5 un tubo para centrifuga de 15 mL e incubar 1 hora a 37C
7. Centrifugar a 1200 rpm a 4C, descartar el sobrenadante, resuspender las células en el medio sobrante.
8. Sembrar de 100 a 150 μL de cada transformante en una caja de petri con medio LBA previamente precalentada a 37C por media hora.
9. Incubar por 16 horas a 37C

(35)

PROTOCOLO 2

EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

1. Tomar cada una de las colonias y crecerlas en 3 mL de caldo LBA a 37°C por 16 horas.
2. Centrifugar las células a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C y descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 100µL de solución I
4. Adicionar 200µL de Solución II recién preparada, mezclar por inversión e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Adicional 150µL de solución III, mezclar por inversión e incubar 30 minutos en hielo.
6. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C y tomar el sobrenadante en un nuevo tubo.
7. Adicionar 2 volúmenes de isopropanol 100%v/v, agitar por inversión e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C, descartar el sobrenadante.
9. Lavar el pellet con 500µL de etanol 70%v/v.
10. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos, descartar el sobrenadante.
11. Dejar secar el pellet a 37°C o a temperatura ambiente por no más de 10 minutos.
12. Resuspender el pellet en 50µL de solución IV

(36)

Solucion I:

- Sacarosa 50Mm
- Tris HCl 25mM
- EDTA 10mM

Solucion II:

- NaOH 0.2M
- SDS 1% p/v

Solucion III:

- Acetato de potasio
- Acido acetico

(38)

PROTOCOLO 3

PURIFICACION DE ADN A PARTIR DE GEL DE AGAROSA

1. Cortar el segmento de gel correspondiente a la banda de interés
2. Pesar el trozo de gel que fue extraído y colocarlo en un tubo para centrifuga 1.5mL
3. Agregar 3 volúmenes de *Gel solubilization Buffer* por cada volumen de gel (paso2)
4. Incubar en baño termostatado a 50°C. Mezclando por inversión cada 3 minutos para favorecer la solubilización
5. Incubar 5 minutos más a 50°C sin agitación
6. Agregar 1 volumen de Isopropanol puro.
7. Cargar la columna con el volumen total de solubilizado
8. Centrifugar a 13000 por 1 minuto
9. Descartar el liquido
10. Agregar 600µL de *Wash+* etanol
11. Centrifugar a 13000 por 1 minuto y descartar el liquido
12. Centrifugar a 13000 por 1 minuto el tubo solo para retirar excesos de Buffer
13. Adicionar 50µL de Buffer de elución
14. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente
15. Centrifugar a 13000 por 1 minuto y retener el eluido en un tubo nuevo
16. Almacenar a -20°C si va a ser utilizado en periodos extensos de tiempo o a 4° si se va a usar en un lapso corto de tiempo.

(35)

PROTOCOLO 4

EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO CONCENTRA Y PURO.

1. Inocular *E.coli* en un "erlenmeyer" de 500ml con 100ml de medio LBA (10g/l Triptona, 5g/l Extracto de Levadura, 10g/l NaCl, 50µg/ml Ampicillina).
2. Incubar 4h (hasta $D_{600nm} \sim 0.6$), a 200 r.p.m., a 37°C.
3. Centrifugar 4000g, durante 15' a 4°C, en tubos de 50ml de capacidad.
4. Resuspender las células en 20ml de solución STE (0.1M NaCl, 10mM Tris-HCl (pH 8.0 ± 0.2), 1mM EDTA (pH 8.0 ± 0.2))
5. Centrifugar nuevamente a 4000g, durante 15' a 4°C.
6. Resuspender las celuas en 3.6ml de la solución I (50mM glucosa, 25mM Tris-HCl (pH 8.0 ± 0.2), 10mM EDTA (pH 8.0 ± 0.2),
7. Incubar la mezcla a 37°C durante 30'.
8. Añadir a cada tubo 8ml de la solución II (fresca) (0.2N NaOH, 1% (p/v) SDS),
9. Mezclar suavemente el contenido e incubarla incubado a temperatura ambiente (~25°C) durante 5 ó 10 minutos.
10. Adicionar 4ml de solución III (fría) (60ml acetato de potasio 5M, 11.5ml de ácido acético glacial, 28.5ml de H₂O)
11. Mezclar el contenido del tubo agitando varias veces e incubar en hielo durante 10 minutos.
12. Centrifugar el lisado 4000g, 15' a 4°C y filtrar ell sobrenadante en papel filtro, reteniendo el filtrado en un tubo limpio.
13. Precipitar el DNA 0.6 volúmenes de isopropanol, mezclar por inversión el tubo e incubar a temperatura ambiente (25°C) durante 10 minutos.
14. Recuperar el DNA 0por centrifugación a 5000g, 15' a temperatura ambiente (25°C). Descartar el sobrenadante
15. Lavar el "pellet" con 20ml de Etanol al 70% (v/v) en H₂O. Una vez descartado el etanol, se invertir el tubo sobre papel de filtro hasta evaporar el etanol.
16. Resuspender el pellet en 600µl de TE IX (10mM Tris-HCl (pH 8.0 ± 0.2), 1mM EDTA (pH 8.0 ± 0.2)) (2).
17. Purificar el DNA plasmídico, tomando 1ml del DNA obtenido en un tubo límpio y añadir 5µl de una solución de RNAsa 5mg/ml.
18. Mezclar por inversión e incubar a 37°C, durante 30 minutos; pasado este tiempo adicionar ½ volumen de Fenol: Cloroformo: Isoamilalcohol (24:1:1) y mezclar aplicando vortex por 1 minuto.
19. Centrifugar la mezcla a 12000g, 10 minutos a temperatura ambiente, separar la fase acuosa en un tubo limpio. Tratarla con con 2.5 volúmenes de isopropanol e incubar - 20°C, entre 15 y 20 minutos
20. Centrifugar a 4000g, 30 minutos, 4°C.
21. Descartar el isopropanol y colocar los tubos invertidos sobre un papel absorbente durante 5 minutos.
22. Lavar con Etanol 70% (v/v). Una vez descartado y evaporado el etanol el DNA resuspender en 1ml de TE 1X.

(38-39)

PROCOLO 5

PRECIPITACION DE ADN

1. Agregar 5 μ L de Buffer acetato de potasio –acido acético
2. Agregar 500 μ L de isopropanol al 100% frio
3. Mezclar por inversión e incubar en hielo por 5 minutos
4. Centrifugar a 13000 rpm a 4°C por 15 minutos
5. Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol 70%
6. Centrifugar a 13000 rpm a 4°C por 5 minutos
7. Descartar el sobrenadante y dejar secar bien el pellet por 10 minutos a 37°C
8. Resuspender el pellet en 10 μ L de buffer TE

Buffer TE

- EDTA 1mM
- Tris HCl 10mM

PROTOCOLO 6

INDUCCION DE ESTADO DE COMPETENCIA DE CELULAS DE *P.pastoris*

1. Crecer una colonia de *P.pastoris* en 5mL de caldo YPG por 16 horas a 30C
2. Agregar 0,5 mL del inóculo del numeral 1 a 500 mL de caldo YPD en un en un matraz de 2000 mL.
3. Incubar a 30C hasta obtener una DO_{600} : 1,3-1,5
4. Centrifugar a 3500 rpm por 5 minutos a 4C
5. Resuspender el pellet en 500 mL de Agua destilada esteril fría.
6. Centrifugar como en 4
7. Resuspender el pellet en 250 mL de Agua destilada esteril fría.
8. Centrifugar como en 4
9. Resuspender el pellet en 20 mL de Sorbitol 1M
10. . Centrifugar como en 4
11. Resuspender el pellet en 1 mL de Sorbitol 1M, para un volumen final de aproximadamente 1,5mL
12. Hacer alícuotas de 80 μ L.

(35)

PROTOCOLO 7

ELECTROPORACION DE CELULAS DE *P.pastoris*

1. Mezclar 40 μ L de células competentes con 5-20 μ g de ADN linearizado
2. Transferir la mezcla a una cuveta de 0.2 previamente enfriada
3. Realizar en pulso a 1500 V, 200 Ω .
4. Agregar inmediatamente 1 mL de Sorbitol 1M
5. Transferir la mezcla del numeral 4 a un tubo para centrifuga de 15 mL e incubar 3 horas a 30 C , sin agitación
6. Sembrar en superficie 200 μ L en medio MD y MH
7. Incubar a 30 C Hasta que aparezcan colonias (2-3 días)

(35)

PROCOLO 8

PROCOLO ACTIVIDAD IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA

1. Mezclar de 10 μ L de muestra (extracto crudo) con 20 μ L de sustrato e Incubar por 4 horas a 37C
2. Agregar 40 μ L de Buffer PiCi y 20 μ L de LEBT a la mezcla del numeral 1 luego de la incubación
3. Incubar a 37C por 24 horas
4. Agregar 200 μ L de solución stop

Sustrato:

1,25 mM Metil-Umberifenil- α iduronidoA-2S en Buffer sustrato.

Buffer sustrato:

0.1 M acetato de sodio/0.1 M acido acético pH 5

10 mM Acetato de Plomo

Buffer PiCi:

0.2 M Na₂HPO₄ / 0.1 M Acido cítrico pH 4.5 + 0.02% azida de sodio

LEBT (Enzimas lisosomales de bovino)

(39)

ANEXO 2

**COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO DEL REACTOR DE 3.L PARA EVALUACION DE
EXPRESION DE DE IDS EN VOLUMEN DE 1.5 L**

Fórmula	Composición por litro
• KH_2PO_4	25,74 G
• $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,00 G
• K_2SO_4	8,58 G
• $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,60 G
• Glicerol 100% (4% w/v de medio)	40,00 G
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,02 G
• KOH	
• Biotina (Solución Stock)	4,00 MI
• PTM4	1,00 MI
•	
• A. Silicona	5,00 MI
• NH_4OH (30%)	30,00 MI

PTM4

Microelementos por litro

- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g
- NaI 0.08 g
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 g
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g
- H_3BO_3 0.02 g
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g
- CoCl_2 0.5 g
- ZnCl_2 7.0 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.0 g
- Biotin 0.2 g
- H_2SO_4 (conc.) 1.0 ml