CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

# SUBCLONACION DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA LA Cu,Zn SOD-1 EN EL VECTOR DE EXPRESION pPICZ(α) Y PRODUCCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE

# T E S I S

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

p r e s e n t a

**Reyna de Jesús Romero Geraldo**

La Paz, B.C.S. Enero del 2001

# ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S.,siendo las 12:00 horas del día 23 del Mes de ENERO del 2001, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

**SUBCLONACION DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA LA Cu,Zn SOD-1 EN EL VECTOR DE EXPRESION pPICZ(α) Y PRODUCCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE**

Presentada por el alumno:

**REYNA DE JESUS ROMERO GERALDO**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **BIOTECNOLOGIA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

**Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra**
**Director de Tesis**

**Dr. Felipe Ascencio Valle**
**Asesor de Tesis**

**Dr. Jose Luis Ochoa Ochoa**
**Asesor de Tesis**

**DR. SERGIO HERNANDEZ VAZQUEZ,**
**DIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

# Resumen

Actualmente se emplean microorganismos manipulados genéticamente para portar y expresar genes heterólogos con los que es posible producir proteínas recombinantes de importancia biomédica y/o industrial. El éxito para la expresión de proteínas recombinantes radica en las características y propiedades de la proteína, así como el origen del sistema de expresión utilizado. En los años 80s el uso de levaduras no convencionales (*Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, etc.) como sistema de expresión de proteínas de origen eucariota ha sido eficiente, debido a que combina características de ruta secretora de proteínas de eucariotas superiores y, al mismo tiempo, como organismo unicelular es fácil de manipular y cultivar en medios no complejos. El modelo es atractivo por sus altos rendimientos en la producción de biomasa y, frecuentemente, es posible el escalamiento del proceso de fermentación para la sobre-expresión de producto recombinante. La enzima superóxido dismutasa tipo Cu,Zn (Cu,Zn SOD), pertenece a una familia de metaloproteínas que catalizan la dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Mediante su actividad catalítica reduce los daños que puede ocasionar el radical superóxido en algunas biomoléculas (ADN, proteínas, lípidos). La enzima tiene un amplio potencial de aplicación dentro del sector biomédico como: antiinflamatorio, medicamento auxiliar en la preservación de órganos susceptibles a transplante, en el tratamiento de ulceras, artritis reumatoide, etc. Además, ha dado excelentes resultados dentro de la industria cosmetológica al retardar el envejecimiento de la piel y como protector contra los efectos de la radiación solar. La Cu,Zn SOD de la levadura marina *Debaryomyces hansenii*, presenta mayor actividad específica y estabilidad al compararla con la correspondiente obtenida de otras fuentes, como el hígado y los eritrocitos de bovino, y *Saccharomyces cerevisiae*. La expresión de la secuencia codificante *dh sod-1* (C115), como proteína recombinante (Cu,Zn SOD de *D. hansenii* ), fué obtenida al utilizar el sistema de expresión de *P. pastoris* (levadura metilotrófica), que utiliza los vectores integrativos pPICZ (intracelular) y pPICZ($\alpha$) (extracelular). A la secuencia *dh sod-1* se le inserto la caja de Kozac mediante amplificación por PCR, utilizando oligos específicos. El producto se clonó en el vector pCR2.1 utilizando como hospedero *E. coli*. Los fragmentos obtenidos mediante digestión con Eco RI se subclonaron en los mismos sitios de los vectores integrativos, verificándose la orientación del fragmento por análisis de restricción con Kpn I. Se transformó la cepa GS115 de *P. pastoris*, realizándose ensayos de fermentación con BMMY (medio complejo con metanol). En homogenizados celulares obtenidos mediante disrupción mecánica se determinó la presencia de la proteína recombinante inmunoreactiva (western blot), que demostró ser biológicamente activa mediante *Page-Nativa*. El sistema de expresión de *P. pastoris* resultó eficiente en la expresión intracelular de Cu,Zn SOD recombinante. Sin embargo, a nivel extracelular la proteína recombinante no fué detectada; en trabajos futuros será reevaluado este nivel de expresión.

Palabras clave: *P. pastoris*, proteína recombinante, Cu,Zn SOD

Vo.Bo. Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra
Director de Tesis
Investigador Titular A del CIBNOR.

# Abstract

Genetically modified microorganisms are currently employed to carry and express heterologous genes coding proteins of medical and commercial importance. The success of expressing a recombinant protein relies on the characteristics and quality of a protein as well as expression systems. In the 80s, non-conventional yeasts (*Pichia pastoris, Hansenula polymorfa*, etc) were successfully used as expression systems for higher eukaryotic proteins. Those systems are efficient both because of secretory routes of proteins similar to that of eukaryotes and the ease of manipulation due to its unicellular nature. Additional advantage is that they grow on non-complex media. This model is attractive because of the high biomass production and the feasibility to scale up by frequent fermentation.

The Cu,Zn superoxide dismutase (Cu,Zn SOD) enzyme belongs to the family of metaloproteins that catalyzes dismutation of superoxide anion into molecular oxygen and hydrogen peroxide. As a result, the damaging effect of superoxide radical on biomolecules (DNA, proteins, lipids) is reduced. This property enables the possible application of this enzyme in biomedical fields: as anti-inflammatory drug, in the preservation of transplant organs, treatment of ulcers, rheumatoid, arthritis, etc. Besides, it has provided satisfactory results in the cosmetic industry by delaying the aging of skin and also protecting it from the effects of solar radiation. Among various sources, the stability and specific activity of the Cu,Zn SOD from the yeast *Debaryomyces hansenii* was proved to be superior to SOD obtained from bovine liver, erythrocytes and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

The sequence encoding *dh sod-1* (Cu,Zn SOD) from *D. hansenii* was expressed in *P. pastoris*, a methylotrophic yeast that uses the integrative expression vectors pPICZ (intracellular) and pPICZ(α) (extracellular), in the following way: through PCR amplification, the Kozac box was into the sequence of dh sod-1 by using specific oligonucleotides. The Kozac integrated product was cloned in the vector pCR2.1 utilizing the host *E. coli*. From the clone, the fragment coding dh sod-1 (Cu,Zn SOD) fragment was digested with Eco RI and subsequently subcloned in the Eco RI sites of the integrative vectors pPICZ and pPICZ(α). Finally, the fragment orientation was verified by restriction analysis with Kpn I.

The GS115 strain of *P. pastoris* was transformed through assays of fermentation in complex media. By doing western blot analysis presence of immunoreactive recombinant protein was detected on cell homogenates obtained by mechanical disruption. The enzymatic activity of protein was checked through Native-PAGE. However, at extracellular level, in the pPICZ(α) vector, the recombinant protein could not be detected. This indicated that *P. pastoris* could be an efficient expression system for intracellular expression of recombinant Cu, Zn SOD. Future work must be done to reevaluate the expression level.


Key words: *Pichia pastoris*, Recombinant proteins, Superoxide dismutase Cu,Zn.

Dedico esta tesis a:

Mis padres Anselmo y † Maria Elena por darme la oportunidad de vivir.

A Jorge mi esposo por su apoyo y cariño.

A mis hijos Jorge A., Israel, Rafael y Reyna por brindarme la oportunidad de ser madre.

A mis hermanos Loreto, Lupita, Anselmo, Maria (Chula), Francisco y Alicia por su fortaleza y cariño incondicional.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma estuvieron apoyando para la realización de esta meta.

A los alumnos del Instituto Tecnológico de La Paz por ser mi principal motivación para la superación.

# Agradecimientos.

Agradezco a la Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra por haber confiado en mi y mantener siempre viva la motivación de explorar en este mundo de la investigación científica, y al mismo tiempo por haber sido mi guía académica y amiga durante este espacio de vida.

Quiero expresar mi agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial por aceptar el reto: Dr. José Luis Ochoa Ochoa por abrir nuestros ojos en el camino de la superación a través de la ciencia, Dr. Felipe Ascencio Valle por su valiosa crítica del trabajo y su compañerismo y muy especialmente a la Dra. Norma Y. Hernández-Saavedra por todo el apoyo académico.

A mi gran familia Tecnológica por ayudarme a emprender este reto, especialmente al M.C. Marcelino Bauza R., M.C. Marlene Peralta G. Y mis amigos de siempre Nacho y Juan Manuel.

A la gran familia CIBNOR por haberme brindado su casa para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero.

A Osvelia, Lety, Betty, Lupita, Horacio y José Manuel por su apoyo incondicional y amigable.

A mi gran familia de Patología Marina y alguno que otro genetista: Pedro C., Delia (mi hermana), Flor, Gaby, Rogelio, Valeri, Roberto, Gabriel, Nacho, Toño, Daniel, Lily, Angel, Nadia, y a todos aquellos que de alguna u otra forma estuvieron cerca, iran por siempre donde quiera que vaya.

Al Dr. Neftalí Ochoa Alejo por sus consejos y apoyo brindado todo mi agradecimiento.

Al Dr. Murugan por su paciencia y asesoria en todo momento.

A mis compañeros de maestría por haber compartido esta apasionante aventura.

A Javier y José que me ayudaron a trabajar en un ambiente agradable.

A Chula mi hermana por toda su asesoría técnica y enseñarme el camino.

A todos los Doctores que contribuyeron para mi formación en este proceso.

Gracias!!

# INDICE

**Resumen** i

**Abstract** ii

**Dedicatoria** iii

**Agradecimientos** iv

**1. Introducción** 1

La tecnología del ADN recombinantes 1

Enzima Superóxido Dismutasa (SOD) 3

Selección del sistema de expresión para de la secuencia *dh sod-1* 5

Proteína recombinante o heteróloga 8

Vector de expresión. 8

Sistemas de expresión 9

Diferencias de los sistemas de transcripción y traducción en una célula (Eucariota y Procariota) 10

Funcionamiento del sistema de expresión de *Pichia pastoris* 11

**2. Objetivo general** 13

Objetivos específicos 13

**3. Materiales y Métodos** 14

3.1 Microorganismos, plásmidos, químicos y enzimas 14

3.2 Técnicas básicas 14

3.2.1 Preparación de células competentes 14

A. Método de Cloruro de Calcio (Sambrook, et al. 1989) para bacterias 14

B. De levadura P. pastoris (Pichia EasyComp™Kit) 15

3.2.2 Transformación. Método de Shock Térmico 16

A. De *E. coli* cepa TOP 10 16

B. De *P. pastoris* cepa GS115 16

3.3 Extracción y purificación de ADN plasmídico. Método de Lísis Alcalina (Sambrook et al. 1989) 17

3.3.1 Preparación de ADN plasmídico a mediana escala. 18

3.4 Subclonación de la secuencia *dh sod-1* en los vectores pPICZ y/o pPICZα 19

3.4.1 Integración de la caja de Kozac en la secuencia *dh sod-1* (C115) 19

3.4.2 Desfosforilación de los vectores de expresión 21

3.4.3 Construcción de los vectores de expresión (Subclonación) 21

3.4.4 Digestión para linearización del ADN recombinante 26

3.5 Obtener la expresión de la proteína recombinante *(hdh sod-1)* mediante inducción con metanol 26

3.5.1 Activación de cepas *Pichia pastoris* 26

3.5.2 Determinación de Fenotipo Mutante 27

3.5.3 Expresión de recombinantes en cepas de *Pichia pastoris* (GS115) 27

3.6 Verificación de la expresión de Cu,Zn SOD recombinante. 29

3.6.1 Western blot 29

3.6.2 Identificación de actividad por Page-Nativa 30

**4. Resultados** **31**

4.1 Identificación de la versión idónea de los vectores de expresión 31

4.2 Subclonación de la secuencia *dh sod-1* en los vectores pPICZ(α) y/o pPICZ. 32

4.2.1. Integración de la caja de Kozac en la secuencia *dh sod-1* 32

4.2.2 Clonación de *dh sod-1* en pCR2.1 (Cloning ® Kit Invitrogen) 33

4.2.3 Desfosforilación de ADN plasmídico linearizado 34

4.2.4 Subclonación de la secuencia *dh sod-1* 35

4.2.5 Linearización de las construcciones (pPICZC-KC115 y pPICZαC-C115) 36

4.3 Expresión de la enzima recombinante (*hdh sod-1*) mediante inducción con metanol 37

4.3.1 Determinación fenotípica 37

4.3.2 Expresión de Recombinantes en cepas de *Pichia pastoris* (GS115) 38

4.4 Verificación de la expresión de Cu,Zn SOD recombinante 40

**5. Discusión** **43**

**6. Conclusión** **46**

**7. Perspectivas** **48**

**8. Referencias** **50**

**Apéndice 1. Preparación de soluciones** **56**

**Apéndice 2. Secuencia codificante *dh sod-1*** **69**

**Apéndice 3. Diagramas de flujo de Metodología** **70**

# Lista de Figuras

**Figura 1.** Vector de clonación pCR2.1

**Figura 2.** Vector de expresión extracelular pPICZα

**Figura 3.** Vector de expresión intracelular pPICZ

**Figura 4.** Producto de amplificación por PCR

**Figura 5.** Clonas positivas digestión *Eco RI.*

**Figura 6.** Vectores linearizados con *Eco RI* y desfosforilados

**Figura 7.** Análisis de restricción *Kpn I.*

**Figura 8.** Vectores linearizados con *Sac I*

**Figura 9.** Clonas mutantes fenotipicamente positivas

**Figura 10.** Western blotting.

**Figura 11.** Identificación de actividad ennzimática por el método de NBT

# 1. Introducción

## La tecnología del ADN recombinante

La aplicación comercial de la tecnología del ADN recombinante inició a finales de los años 70, y no fue sino hasta los 80's cuando logró un mayor impacto y un mejor financiamiento en el sector farmacéutico para la producción de proteínas terapéuticas heterólogas. La hormona del crecimiento humana y la insulina fueron dos de los primeros productos recombinantes que se comercializaron; lograr su producción en una bacteria como *E. coli*, constituyó una hazaña que permitió satisfacer la demanda mundial con un producto seguro *(Gingold, 1997)*.

Para la eficiente producción de proteínas recombinantes fue necesario el desarrollo de una gran variedad de vectores de expresión para su aplicación en bacterias, hongos filamentosos, levaduras y células cultivadas. Algunos de estos vectores, así como los relativamente nuevos sistemas de expresión de baculovirus, son capaces de proporcionar altos rendimientos de productos recombinantes lo que depende sin embargo de las características de la proteína que se desea expresar.

Algunas proteínas eucariotas que se producen como recombinante en un sistema de expresión procariota (*E. coli*) se obtienen como agregados insolubles, son inestables y presentan diferentes propiedades de inhibición (p. ej. Acetilcolinesterasa, Heim et al, 1998), otras son inactivas (p. ej. 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa y superóxido dismutasa (SOD) humana *(Blum et al., 2000 y Hartman et al., 1986)*, posiblemente, debido a la falta de glicosilación o un plegamiento conformacional correcto. Por lo tanto, la elección de un sistema de expresión para lograr mayores rendimientos de proteína

recombinante depende, principalmente, de las propiedades específicas de la proteína y de la maquinaria del organismo que la produce.

Muchas proteínas presentes en el cuerpo humano (eritropoyetina, insulina, hepatitis B, hormona del crecimiento, etc.), poseen un elevado valor farmacéutico. Sin embargo, estas proteínas suelen estar presentes en cantidades muy pequeñas en los tejidos normales y es sumamente costosa su purificación. Por ello, desde hace tiempo, se ha venido intentando su producción en microorganismos.

El uso de enzimas como catalizadores industriales (biomédicos, cosmetológicos, farmacéuticos, alimentario) es limitado debido, en parte, a las propiedades de las enzimas, disponibilidad y costo. Estas propiedades, en particular la especificidad por el sustrato, la aptitud catalítica y la estabilidad, están gobernadas por la estructura precisa de la molécula enzimática, por lo que se requiere la utilización de un sistema de expresión que garantice la síntesis de manera eficaz y económica para lograr incrementar su nivel de expresión y obtener una proteína recombinante enzimáticamente útil.

Actualmente, la biotecnología de los fármacos, especialmente los productos de ADN recombinante, tiene un gran impacto clínico debido a que el tiempo de desarrollo es mucho menor que la de los fármacos convencionales. Por lo tanto, se ha demostrado que la aplicación de la Biología Molécular como herramienta para identificar nuevos productos terapéuticos y mejorar el proceso de desarrollo de fármacos constituye una buena alternativa para las industrias farmacéuticas, biomédicas y cosmetológicas.

## Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

Las enzimas superóxido dismutasa, (SODs) (SOD EC 1.15.1.1), son metaloproteínas que catalizan la dismutación del anión superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno y contienen Cu y Zn, Mn o Fe como grupo prostético natural. La dismutación del radical anión superóxido es una función molecular de gran importancia para la evolución de organismos aeróbicos ya que reduce los altos riesgos oxidativos producidos en cadena, iniciados por este radical libre (*Bannister et al., 1988*).

Las SODs han sido aisladas de numerosos microorganismos, plantas y animales. La Cu,Zn SOD se encuentra en el citoplasma, mientras que las Mn y Fe SOD se han observado a nivel mitocondrial de células eucariotas ( levaduras, plantas y animales) y en células procariotas tales como bacterias o algas azul-verde (*Halliwell y Gutteridge 1999*).

Se conoce que los radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas están involucrados en diferentes enfermedades humanas; Ellos han sido implicados en alrededor de 100 desórdenes patológicos, partiendo de artritis reumatoide y shock hemorrágico, hasta cardiomiopatía, fibrosis quística y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida *(Halliwell y Gutteridge, 1999)*. Estos padecimientos ocurren cuando las defensas antioxidantes de los organismos son incompletas o deficientes, por lo que no pueden prevenir el daño oxidativo ocasionado a las moléculas de ADN, proteínas, lípidos y pequeñas moléculas que puedan ser expresadas en los organismos aeróbicos.

Una de las defensas antioxidantes utilizadas por los organismos aeróbicos son las enzimas. El descubrimiento de la superóxido dismutasa (SOD) proporcionó muchas bases para el entendimiento de los mecanismos de defensa antioxidante. La especificidad de la SOD

para remover catalíticamente el anión superóxido ($\bullet O_2^-$) a través de la reacción $2\ O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ *(McCord y Fridovich, 1969)*, ha sido frecuentemente utilizada para investigar el involucramiento de este radical en sistemas biológicos. Por ejemplo, en la industria biomédica se utiliza para prolongar el tiempo de vida de órganos aislados para transplantes, como anti-inflamatorio, en el tratamiento de úlceras, artritis reumatoide, etc. Recientemente se encontró que cambios en la concentración de SOD afectan la susceptibilidad a infecciones e inmunocompetencia de pacientes diabéticos *(Uchimura et al., 1999*). En la industria cosmetológica se ha utilizado para retardar el envejecimiento de la piel y para protegerla de los efectos ocasionados por la radiación solar. Cabe aclarar que el mecanismo de defensa de un organismo en contra de las especies reactivas de oxígeno requiere un incremento balanceado en enzimas antioxidantes y no solo de un tipo de éstas *(Scott et al., 1987).*

Actualmente la enzima Cu,Zn SOD se obtiene al utilizar como fuente para su extracción hígado y/o eritrocito de bovino, además la levadura *Saccharomyces cerevisiae.* Sin embargo en estudios recientes se ha encontrado que la levadura marina *Debaryomyces hansenii* puede ser considerada como una fuente alterna, dado que la Cu,Zn SOD se encuentra presente en este tipo de microorganismo en cantidades significativas que pueden llegar a ser 16 veces mayores que los obtenidos a partir de levaduras convencionales (*S. cerevisiae y Candida sp.*). Además, la Cu,Zn SOD de *D. hansenii* presenta características fisicoquímicas comparables a las preparaciones comercialmente disponibles. En lo que refiere a la actividad específica, la fuente marina ofrece mayores ventajas sobre otras dado que exhibe 300 % mayor actividad (*Hernández et al., 1999*).

En otros estudios sé clonó la secuencia *dh sod-1* que codifica para la enzima Cu,Zn SOD de *D. hansenii*. Esta secuencia se comparó con secuencias de Cu,Zn SOD citosólicas obtenidas de otras especies, encontrándose que la *dh sod-1* presenta de un 55 a 71% de identidad con otras 15 especies y un 39.4% con la enzima EC SOD humana *(Hernández et al., 1998)*. Además se encontró que la secuencia *dh sod-1* tiene un tamaño de 470 pb, no presenta intrones, y con toda la información que codifica los aminoácidos necesarios para producir una proteína funcional. En la misma investigación se subclonó la secuencia codificante *dh sod-1* en un sistema de expresión bacteriano (pTcrHis de Invitrogen) para la obtención de proteínas recombinantes, sin embargo, no se obtuvo el éxito esperado (*Hernandez et al., 1998*).

Considerando lo anteriormente mencionado, se buscó la expresión de *dh sod-1* utilizando un sistema de expresión de origen eucariota *(P. pastoris)*, con el fin de proponer una posible fuente de producción de Cu,Zn SOD recombinante, de tal manera que, la disponibilidad, costos y calidad de la enzima puedan ser una buena alternativa dentro de la industria bimédica, cosmetológica y farmacológica.

**Selección del sistema de expresión para de la secuencia *dh sod-1*.** Se considera que la producción de una proteína recombinante funcional está íntimamente relacionada con la maquinaría del organismo que la produce. *E. coli* ha sido el sistema de expresión de muchas proteínas, seleccionado porque es genéticamente conocido, fácil de manipular y tiene rápido crecimiento en medios no complejos, etc. Sin embargo, aún cuando se conocen los procesos de transcripción, traducción y de plegamiento de las

proteínas, *E. coli* presenta deficiencias para expresar proteínas recombinantes de origen eucariota principalmente en la ruta secretora, sobre todo a nivel de modificaciones post-traduccionales (glicosilación, formación de enlaces disulfuro) y muchas veces las proteínas son recuperadas en forma no-funcional o incompletas *(Baneyx 1999)*.

En investigaciones recientes se utilizan levaduras como hospedero para la expresión de proteínas recombinantes de origen eucariota. Dado que al igual que *E. coli*, las levaduras también son facíles de manipular, su crecimiento en medios no complejos es rápido, son genéticamente conocidas y sobre todo, se pueden utilizar en procesos económicos que permiten la optimización de recursos y mayores rendimientos en la industrialización de los productos (proteínas recombinantes) *(Eckart y Bussineau, 1996)*. A diferencia de *E. coli* (procariota) las levaduras (eucariota) poseen rutas secretoras de proteína similares a las de organismos eucariotas superiores y, por lo tanto, el utilizarlas como hospedero para la expresión de proteínas recombinantes funcionales ha sido exitoso. La levadura más comúnmente utilizada como sistema de expresión es *S. cerevisiae*; y sirve como modelo para estudios de importancia médica y selección de compuestos activos para farmacología (*Sudbery, 1996*). Sin embargo, en años recientes se ha reflejado el uso de levaduras no-convencionales como sistema de expresión para proteínas recombinantes *(Buckholz, 1993, Romanos, 1995 y Cregg. et al, 1995*).

Para la expresión de genes no propios en levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris, Hansenula polymorfa* y *Kluyveromyces lactis,* se han desarrollado parámetros clave para lograr la obtención de altos niveles de expresión de los genes, incluyendo calidad y cantidad de producto específico ARNm *(Royer, 1992)*.

Los sistemas de expresión de levaduras son particularmente valorados por su habilidad para secretar proteínas heterólogas como producto, asumiendo que la ruta secretora permita eventos post-traduccionales tales como maduración proteolítica, glicosilación y la formación de puentes disulfuro *(Cregg JM. Et al. 1999). P. pastoris* una levadura metilotrófica, (capaz de asimilar el metanol como única fuente de carbono), ha sido utilizada como un excelente hospedero en la producción de proteínas no propias debido a que combina las características de una maquinaria de secreción eucariota con el rápido crecimiento en medios no complejos. Esto es particularmente atractivo dado que los niveles de secreción de proteínas endógenas son bajos y, por lo tanto, las proteínas no propias secretadas, frecuentemente son las únicas en el sobrenandante del cultivo, lo cual ofrece una mayor ventaja en procesamiento y purificación *(Cregg y Higgins, 1995).* Por lo anterior, se considera que la cepa recombinante de *P. pastoris* es más estable y más adaptable en un esquema de producción a escala industrial *(Brettaver y Casteellino, 1999; Goeddel, 1991).*

Estas ventajas se observaron en la producción de diferentes proteínas recombinantes como albúmina de suero humana (*Barr et al., 1992*), invertasa (*Tschopp et al., 1987*) y el precursor de insulina (*Kjeldsen et al., 1999*).

## Proteínas recombinantes o heterólogas.

El término de proteína recombinante o heteróloga es frecuentemente utilizado para proteínas producidas de un ADN recombinante en una célula hospedero extraña. El ADN recombinante surge como resultado de estrategias básicas en clonación molecular; como insertar un fragmento de ADN de interés en una molécula de ADN (llamada vector), que es capaz de replicarse independientemente o integrarse al genoma del hospedero. El resultado es una molécula recombinante, compuesta del ADN insertado unido a la secuencia de ADN del vector. *(Geoggrey, M.C., 1997)*

## Vector de expresión.

Un vector de expresión es una molécula de ADN (vector) especializada que es construida para que el gen que contiene pueda ser expresado en una célula hospedero (foránea). La secuencia a ser expresada es insertada en la relación correcta de hospedero-específica (promotor) y de otras secuencias de regulación transcripcional, así como en un correcto marco de lectura para que la proteína recombinante sea producida.

Además debe contener secuencias requeridas para eficientar la traducción, como son: un origen de replicación, un marcador de selección para la propagación del plásmido y mantenimiento y un sitio de unión al ribosoma, de tal manera que la expresión del gen esté sujeta a la manipulación experimental, para permitir inducir la expresión en el momento más favorable del ciclo de crecimiento. Algunos vectores presentan un promotor inducible y sitios de restricción (una región múltiple de clonación) en donde el ADN requerido puede ser clonado (*Goeddel, 1991 y Madigan et al., 1999).*

## Sistemas de expresión.

Son muchos los factores que influyen en el nivel de expresión de un gen y es preciso construir un vector en el que todos esos factores estén bajo control. Además, deberá seleccionarse para la transformación el tipo de células mas adecuado para obtener la expresión. Los requerimientos claves para un buen sistema de expresión se pueden considerar los siguientes:

✓ **El número de copias del gen por célula**. En general se fabrica más producto si están presentes muchas copias del gen, que cuando se trata de copias únicas.

✓ **Regulación y eficacia del promotor**. En la región promotora se produce el punto de inicio de la transcripción. Para conseguir altos rendimientos de producción es conveniente que el vector de expresión posea un promotor de alta eficiencia. Es importante que los promotores puedan ser regulados y así regular la expresión del gen clonado con el fin de maximizar el rendimiento del producto.

✓ **Iniciación de la traducción**. Con el fin de sintetizar proteína a partir de un ARNm, es esencial que los ribosomas se unan en el sitio correcto y empiecen a leer en el marco de lectura adecuado.

✓ **Estabilidad de la proteína**. Algunas proteínas son susceptibles de degradación por proteasas intracelulares y pueden ser destruidas antes de ser aisladas. Por lo tanto, es conveniente que la proteína recombinante se fabrique como un producto de fusión con una proteína codificada por el vector. Esto no sólo estabiliza la proteína sino podría simplificar la purificación. Las proteínas que se secretan deben tener la secuencia señal (cadena de

aminoácidos cortas generalmente hidrofóbicas) si han de atravesar la membrana citoplasmática.

Para que el sistema de expresión funcione como un sistema represor-inductor optimizando el proceso de fermentación para lograr mayor producto recombinante, el vector de expresión deberá contener el operador controlado por el represor al cual está unido el gen clonado. Esto permitirá la disposición adecuada de la secuencia de los elementos genéticos: promotor-operador-sitio de unión del ribosoma-gen estructural, de manera que tenga lugar una transcripción y una traducción eficientes *(Madigan et al., 1999).*

## Diferencias de los sistemas de transcripción y traducción en una célula (Eucariota y Procariota)

La transferencia de información se da en tres pasos: replicación, transcripción (síntesis de ARN (ácido ribonucleótido) a partir de ADN(ácido desoxirribonucleótido)) y traducción o síntesis de proteínas utilizando un ARNm como molde. Estos pasos se utilizan de manera similar por todo tipo de células sin embargo, existen algunas diferencias debido a la organización de la información genética y al hecho de que los eucariotas poseen un núcleo.

En los procariotas no existe división membranal entre cromosoma y citoplasma. Por lo tanto, la molécula circular de ADN se localiza en alguna región del citoplasma y consecuentemente la producción de ARNm a partir de ADN molde (transcripción) esta íntimamente ligado al proceso de traducción en los ribosomas.

En los eucariotas, por lo contrario, existe división membranal entre los cromosomas en un núcleo y los ribosomas en el citoplasma. Así, el genoma nuclear con formas genéticas

lineales de ADN lleva a cabo la síntesis de proteínas con procesos de transcripción (núcleo) y traducción (citoplasma) estando físicamente separados. Además, los genes eucarióticos que codifican para proteínas frecuentemente están partidos en regiones codificadoras (exones) separadas por regiones no codificadoras (introns) que primeramente se transcriben en un pre-ARNm, que posteriormente por procesamiento enzimático eliminan los introns quedando ARNm funcional *(Madigan et al., 1999).*

## Funcionamiento del sistema de expresión de *Pichia pastoris*

*P. pastoris* es una levadura metilotrófica. Ha sido manipulada genéticamente para ser un excelente hospedero en la producción de proteínas recombinantes. La principal característica que hace de *P. pastoris* un sistema de expresión único son consecuencia directa de las propiedades transcripcionales inherentes al promotor presente en sus vectores, mas comúnmente usado para controlar la expresión de genes no propios. Este promotor es derivado del gen alcohol oxidasa (*AOX1)*, que fue aislado, clonado, transformado, caracterizado e incorporado dentro de una serie de vectores de expresión integrativos de *P. pastoris*. Bajo el control de un promotor AOX1, los genes foráneos pueden ser mantenidos en una expresión cerrada ya que el promotor tiene un requerimiento virtual de metanol.

La expresión del gene *AOX1* es controlada a nivel de transcripción. En células crecidas en metanol, aproximadamente el 5% de la poli A+ ARN es del gen *AOX1*. La regulación del gen *AOX1* se realiza en un proceso de dos pasos: un mecanismo de represión/desrepresión y un mecanismo de inducción. El crecimiento con glucosa reprime la transcripción, aún

en la presencia del inductor (metanol), por esta razón se requiere el crecimiento celular en presencia de glicerol como única fuente de carbono. Una vez agotado el glicerol se agrega el metanol (como única fuente de carbono) al proceso de fermentación para inducir la expresión. El requerimiento de metanol para la transcripción del promotor AOX1 es único y tiene implicaciones importantes para la producción de proteínas heterólogas en cultivos de fermentación a gran volumen y alta densidad.

Algunos productos recombinantes obtenidos en el sistema de expresión de *P. pastoris* recientemente son, por ejemplo el dominio NA3 de antígeno carcinoembriónico *(Hellwing et al., 1999),* los fragmentos de anticuerpos monoclonales cadena sencilla de conejo (scFv) *(Schmitz et al., 1995; Fischer et al., 1999)*; y precursor de Insulina *(Kjeldsen et al., 1999).*

# 2. Objetivo general

Obtener Cu,Zn SOD recombinante, mediante la expresión de la secuencia *dh sod-1* en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, utilizando los vectores pPICZ (intracelular) y pPICZ (α) (extracelular).

# Objetivos específicos

✒ Identificar la versión (a, b ó c) de los vectores que permitan el uso adecuado del marco de lectura, para lograr la expresión de la secuencia *dh sod-1*.

✒ Subclonar la secuencia *dh sod-1,* realizando construcciones en los vectores pPICZ y/o pPICZ(α) en la versión apropiada, según el objetivo anterior.

✒ Obtener la expresión de la proteína recombinante (*hdh sod-1*) mediante la inducción con metanol.

# 3. Materiales y Métodos

## 3.1 Microorganismos, plásmidos y enzimas.

| | |
|---|---|
| Cepas de *Pichia pastoris* (INVITROGEN) | KM71 $MUT^S$ $ARG^+$. Hospedero para expresión fenotípicamente sensible |
| | GS115 $Mut^+$ his4. Hospedero para expresión fenotípicamente positivo |
| | GS115/pPICZ/lac Z his4 $Mut^+$. Control del kit |
| Células competentes de *E. coli* | TOP10 |
| Vectores de clonación | pCR2.1(Invitrogen)<br>pGEM 3Z+ (Stratagene |
| Vectores de expresión (Invitrogen) | pPICZ (A, B ó C) intracelular<br>pPICZα (A, B ó C) extracelular |
| Enzimas (GIBCOBRL) | Eco RI, Kpn I, Sac I, Ligasa y Taq polimeresa, fosfatasa alcalina (Sigma) |
| C115 | Secuencia codificante *dh sod-1* que expresa la Cu,Zn-SOD *D. hansenii* |
| Anticuerpos | 1er. Ab Cu,Zn SOD de *D. hansenii*<br>2do.Ab IgGαconejo conjugado con peroxidasa |

## 3.2 Técnicas básicas

### 3.2.1 Preparación de células competentes.

### A. Método de Cloruro de Calcio (Sambrook, et al. 1989) para bacterias

Se inocularon 50 mL de medio SOB con 100 μL de células (Stock *E. coli* TOP10 en glicerol a -80°C). Se Incubaron a 37°C con agitación orbital constante de 250 rpm durante 16-20 hrs. Con estas células (500μL) se inocularon 50 mL de SOB. El cultivo se incubó a 37°C con agitación orbital constante a 250 rpm durante 3 hrs. Posteriormente las células se transfirieron a tubos estériles (Falcon 2070), se enfriaron en hielo por 10 minutos y se recuperaron por centrifugación a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos. Se descartó el

sobrenadante, el pellet celular sé resuspendió en 10 mL de $CaCl_2$ 0.1M frio. Las células se recuperaron por centrifugación 4000 rpm a 4°C por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet celular se resuspendió en 2 mL de $CaCl_2$ 0.1M frió. Las células se distribuyeron en fracciones de 50 μL en tubos eppendorf de 1.5 mL estériles manteniéndose a 4°C, durante un período no mayor a una hora.

## B. De levadura *P. pastoris* cepa GS115 (*Pichia* EasyComp™Kit) (Ausubel et al., 1997).

Colonias aisladas de la cepa GS115, se inocularon en 10 mL de medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%) incubándose toda la noche a 30°C con agitación orbital constante a 250 rpm. Del cultivo celular (500μL) se inocularon 10 mL en medio YPD incubandose durante 4 horas con agitación orbital constante a 250 rpm. Las células se recuperaron por centrifugación a 500 x g por 5 minutos. Se resuspendió el pellet en 10 mL de solución I (sorbitol, etilen glicol y dimetil sulfóxido), recuperándose las células por centrifugación a 500 x g durante 5 minutos. Posteriormente el pellet se resuspendió en 1 mL de solución I. Las células frescas se distribuyeron (50 μL) en tubos estériles.

### 3.2.2 Transformación en células. Método de Shock Térmico (Sambrook et al. 1989).

### A. De *E. coli* cepa TOP 10

A cada 50 μL de células competentes, se agregó 5 μL de ADN (50ng) y 2μL de β-mercaptoetanol. Incubándose en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se realizó el choque térmico a 42°C durante 30 segundos en baño maría, incubándose los tubos en hielo durante 2 min. Posteriormente se agregaron 250μL de medio SOC. Incubándose a 37°C durante 1 hora con agitación orbital constante a 225 rpm. Posteriormente se inocularon 200μL de células sobre placas SOB agar con antibiótico (ampicilina para pCR2.1 y zeocina para pPICZ (α) a una concentración de 50μg/mL) distribuyéndose gentilmente sobre la superficie de agar. Las placas se incubaron invertidas a 37°C durante 18 horas. El control utilizado para este procedimiento se realizó utilizando agua en lugar de ADN.

### B. De *P. pastoris* cepa GS115

Los controles utilizados fueron el control del kit GS115/pPICZ/*lac* z y uno propio que fue la transformación de *P. pastoris* con el plásmido linearizado sin inserto. Por cada 50 μL de células competentes se agregaron 3 μL de plásmido (+ inserto linearizado), agregando 1 mL de solución II. La reacción de transformación se incubó 1 hora a 30°C en baño María, realizando agitación en vortex cada 15 minutos. Posteriormente se aplicó choque térmico a 42°C durante 10 minutos. Para finalizar a las células se les agregó medio YPD, incubándose durante 1 hora a 30°C. Las células se recuperaron por centrifugación a 3000 x

g por 5 minutos. El pellet sé resuspendió en 150μL de solución III. Se inocularon 150μL de células transformadas se placas YPDS (YPD-sorbitol 1M-zeocina 100μg/mL) distribuyéndose gentilmente sobre la superficie de agar. Las placas se incubaron invertidas a 30ºC durante 2 días.

## 3.3 Extracción y purificación de ADN plasmídico. Método de Lísis Alcalina (Sambrook et al. 1989)

Se realizaron minicultivos al inocular colonias únicas (picadas de placas de agar) en 3 mL de medio SOB con antibiótico. Se seleccionaron 10 colonias transformadas por placa. Los cultivos se incubaron a 37ºC con agitación orbital constante a 225 rpm durante 18 horas (Minipreps). Posteriormente las células se recuperaron (1.5 mL de cultivo) por centrifugación 14,000 rpm a 4ºC durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 mL de solución I fría (50 mM glucosa, 25 mM tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0). Se centrifugó 10,000 rpm a 4ºC por 1 minuto, descartando posteriormente el sobrenadante, resuspendiéndose el pellet en 100 μL de solución I fría. Se agregaron 200 μL de solución II (0.2 N NaOH, 1% SDS), mezclándose por inversión. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos en hielo. Se adicionaron 150 μL de solución III fría (60 mL de acetato de potasio 5 M, 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 mL de agua), se incubó en hielo durante 15 minutos. Después de la incubación se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos a 4 ºC, recuperándose los 350 μL de la capa superior los cuales se transfirieron en un tubo eppendorf estéril. Se realizó una extracción con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) mezclándose por

inversión. Se centrifugó 10,000 rpm por 2 minutos a 4°C, recuperándose la capa superior (este paso se realizó únicamente cuando las muestras iban a ser sometidas a digestión con enzimas de restricción). Para la precipitación del ADN plasmídico se utilizaron volúmenes de etanol absoluto preenfriado a -20°C. Centrifugándose a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con etanol al 70 % frío. Se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Los pellets de ADN se secaron en un Speedvac (Eppendorf). El ADN se resuspendió en 50 μL de TE buffer pH 7.5 adicionándose 2 μL de RNAsa (1 μg/μL). Las preparaciones se incubaron a 37°C durante una hora en baño María. Posteriormente se realizó una cuantificación espectrofotometrica (Abs 260/280) y el ADN plasmídico se visualizó por electroforesis en geles de agarosa-TBE al 1% preteñido con bromuro de etidio.

**3.3.1 Preparación de ADN plasmídico a mediana escala.** Las seis versiones de plásmidos manejadas por el EasySelect *Pichia* Expression Kit, versión B (pPICZ (ABC) y pPICZα(ABC)).

Las células transformadas se crecieron en 50 mL de medio SOB con Zeocina a 37°C por 16 horas con agitación orbital constante a 225 rpm. Las células se recuperaron por centrifugación a 12,000 rpm a 4°C por 10 minutos. Posteriormente, la purificación del ADN plasmídico se llevó a cabo mediante una columna AX100 de Nucleobond (Macherey-Nagel®), utilizando una modificación del método de lisis alcalina (Sec. 3.3) según las indicaciones del fabricante. El ADN plasmídico purificado se precipitó con 1.4 mL de isopropanol, recuperándose por centrifugación a 12,000 rpm a 4°C por 15 minutos. El pellet

se lavó con etanol al 70%, secándose en un Speedvac (Eppendorf). El ADN se resuspendió en 100 μL de TE pH 7.5. Se cuantificó la concentración de ADN plasmídico espectrofotométricamente y se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa-TBE al 1 % preteñidos con bromuro de etidio.

## 3.4 Subclonación de la secuencia *dh sod-1* en los vectores pPICZ y/o pPICZα

### 3.4.1 Integración de la caja de Kozac en la secuencia *dh sod-1* (C115).

Mediante digestión con *Eco RI* se obtuvo la secuencia codificante *dh sod-1* (clonada en el vector pCR II) que contiene 470 bp que codifica para una proteína teórica funcional de 153 aminoácidos *(Hernández et al. 1997)*. Este segmento de ADN se utilizó como templado para incluir la secuencia concenso ANN**ATG**G (caja de Kozac) mediante amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) utilizando oligos específicos:

Forward: AII **ATG** GTG CAG GCG GTG (WN43)

Reverse: ITT IGT IAG ICC IAT IAC ICC ACA (UD42)

La construcción de un nuevo fragmento *dh sod-1k* es necesaria para incluir el codón de inicio de la traducción en el vector intracelular pPICZ(A, B ó C) utilizados por *P. pastoris* para la expresión de proteínas recombinantes.

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

Para las amplificaciones se utilizó un Termociclador Techne (Cyclogene). Las reacciones (50μL) contenían 100 pmol de los oligonucleótidos específicos WN43 (forward) y UD42

(reverse), 10 μM de los cuatro deoxinucleósidos trifosfatos, 5μL de tampón para PCR 10X, 10 ng de ADN y 2 U de *Taq polimerasa*. La mezcla se cubrió con 50μL de aceite mineral y se sometieron al siguiente programa:

| Ciclos | Temp. | Tiempo |
|---|---|---|
| 1 | 95°C | 5' |
| 5 | 94°C<br>50°C<br>72°C | 5'<br>2'<br>3' |
| 25 | 94°C<br>50°C<br>72°C | 1'<br>2'<br>3' |
| 1 | 72°C | 3' |

Los productos (5μL) se analizaron en geles de agarosa-synergel-TBE al 1%, preteñidos con bromuro de etidio.

## Clonación de *dh sod-1k* en pCR2.1

Los productos de PCR se clonaron en el vector pCR2.1 (Fig. 1) utilizando el Original TA Cloning ® Kit (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La transformación se realizó por el método de choque térmico (Sec. 3.2.2A) y las transformantes obtenidas se seleccionaron en placas de SOB/ampicilina. El ADN plasmídico se extrajo por el método de lisis alcalina (Sec. 3.3). El ADN se digirió mediante enzima de restricción *Eco RI* para identificación de las clonas positivas. El ADN plasmídico (100μL) se analizó en geles de agarosa-TAE al 1% preteñidos con bromuro de etidio, para la posterior purificación del fragmento mediante el uso del Rapid Gel Extraction Kit (GIBCOBRL) y Kit Gene Clean

(Bio 101, La Jolla, CA). Los resultados se documentaron mediante fotografía bajo luz UV en un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP).

### 3.4.2 Preparación de los vectores pPICZ (A, B y C) y pPICZα (A, B y C) Desfosforilación de ADN plasmídico linearizado (Sambrook et al. 1989)(Sigma)

Se digirieron 20 μg de ADN plasmídico con *Eco RI.* Se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se precipitó el ADN con de etanol absoluto preenfriado a -20°C. El pellet de ADN se resuspendió en 90 μL de Tris 10 mM pH 8.3, adicionándose 10 μL del buffer 10X de fosfatasa alcalina y 1μL de enzima CIP. Para detener la reacción se agregó posteriormente SDS y EDTA (concentración final de 0.5 % y 5mM) respectivamente, realizándose una extracción con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El ADN plasmídico desfosforilado se precipitó con etanol absoluto preenfriado a -20°C durante toda la noche. El pellet de ADN se secó en un speedvac (Eppendorf) y se resuspendió en 50 μL de TE pH 7.5. El ADN plasmídico desfosforilado se visualizó mediante una electroforesis en geles de agarosa-TBE al 1% preteñidos con bromuro de etidio.

### 3.4.3 Construcción de los vectores de expresión (Subclonación)

La construcción se realizó con los vectores pPICZ y pPICZ(α) en sus versiones A, B y C (fig. 2 y 3). La reacción de ligación se efectuó bajo la correlación inserto:vector de

1:3 y de 1:2 , utilizando un kit de ligación rápida de T4 DNA Ligasa (GIBCOBRL). Con los productos obtenidos se transformo en *E. coli* (Sec. 3.2.2A), seleccionando las transformantes en placas con medio SOB/Zeocina. El ADN plasmídico se recuperó por lísis alcalina (Sec. 3.3) y se digirió con *Eco RI* para identificar las clonas positivas. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de restricción con *Kpn I* para verificar la orientación del inserto El esquema de reacción fue el siguiente: Albúmina acetilada BSA 10 X 3 μL, Buffer L 10X 3μL; enzima *Kpn I* 5 U/μg de DNA; 10μg de DNA. Los resultados de la digestión se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa-synergel TBE al 1% preteñido con bromuro de etidio y los resultados se documentaron mediante fotografía bajo luz UV en un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP).

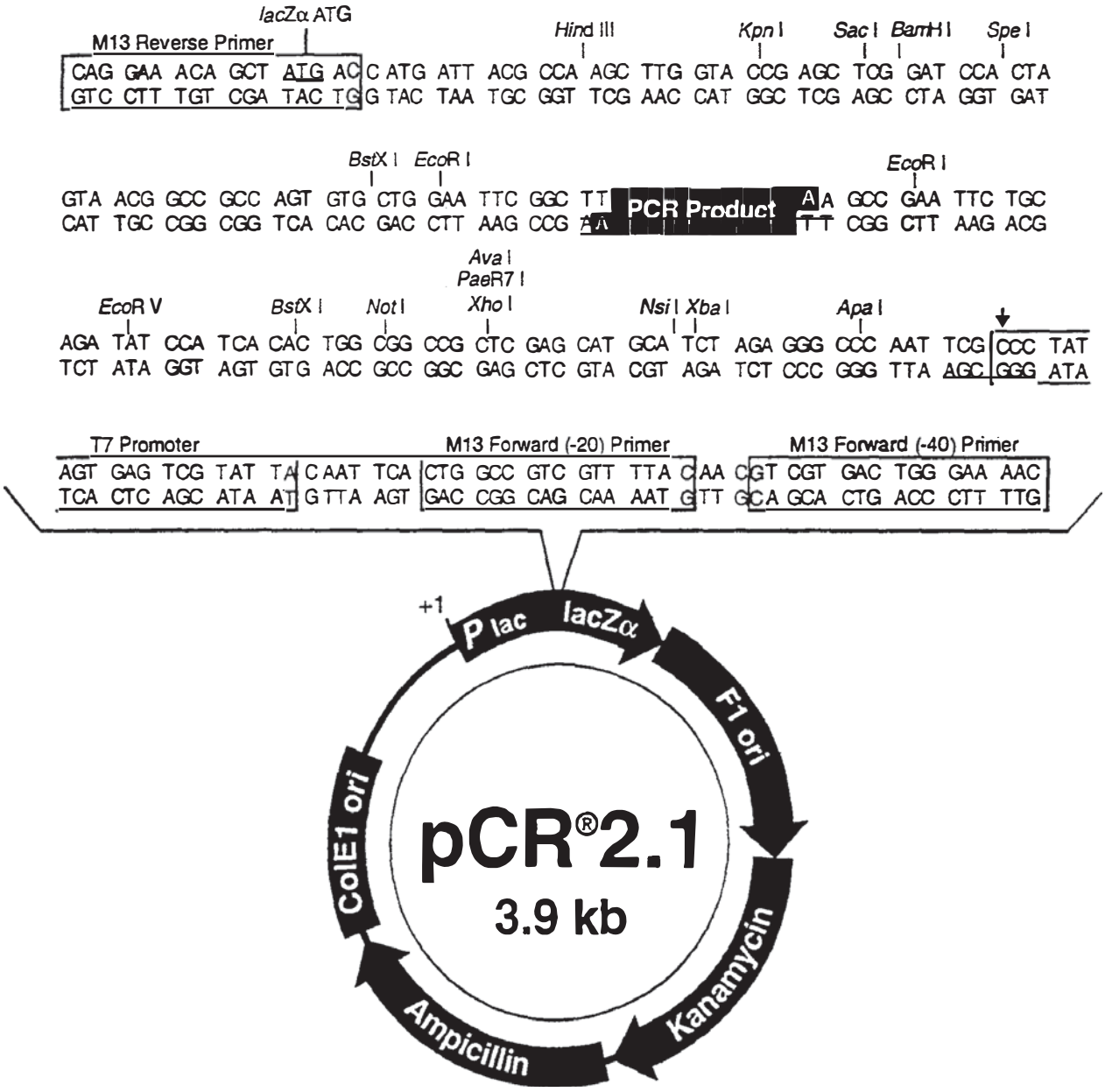



**Fig. 1. Vector pCR2.1** modificado en sitios *Eco RI*. El producto de PCR insertado es flanqueado a cada lado por un sitio *Eco RI*. Ayuda a eliminar modificaciones enzimáticas del producto de PCR. (Original TA Cloning Kit. Invitrogen)

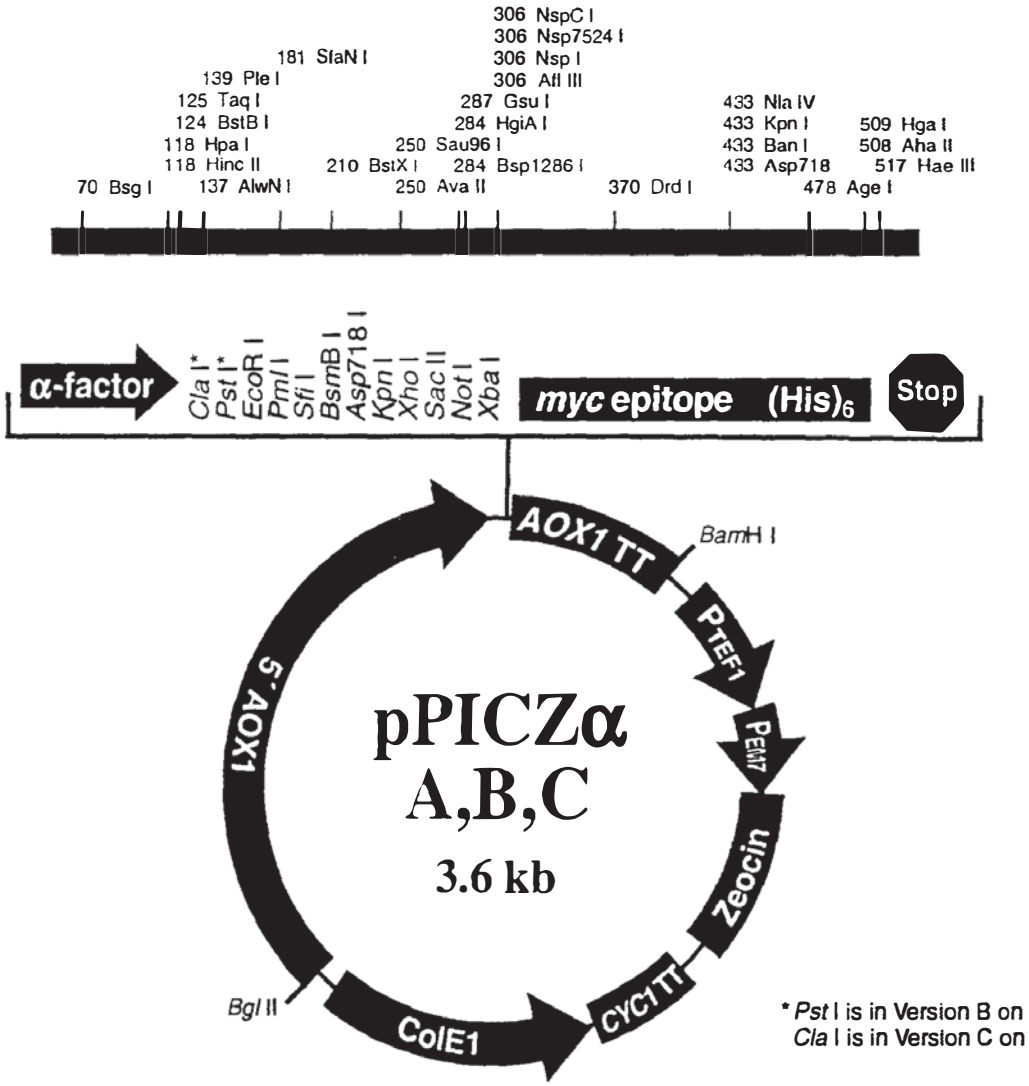



**Fig. 2. Vector de expresión extracelular.** Construcción pPICZα-*dh sod-1*. El fragmento *dh sod-1* se subclóno en el sitio *Eco RI* del "polylinker" del vector. En la barra *(dh sod-1)* estan indicados (en pares de base) la localización relativa de los sitios únicos de corte. El vector contiene el promotor 5´AOX, secuencia señal α-factor y seis residuos de histidina.(EasySelect *Pichia* Expression Kit. Invitrogen)

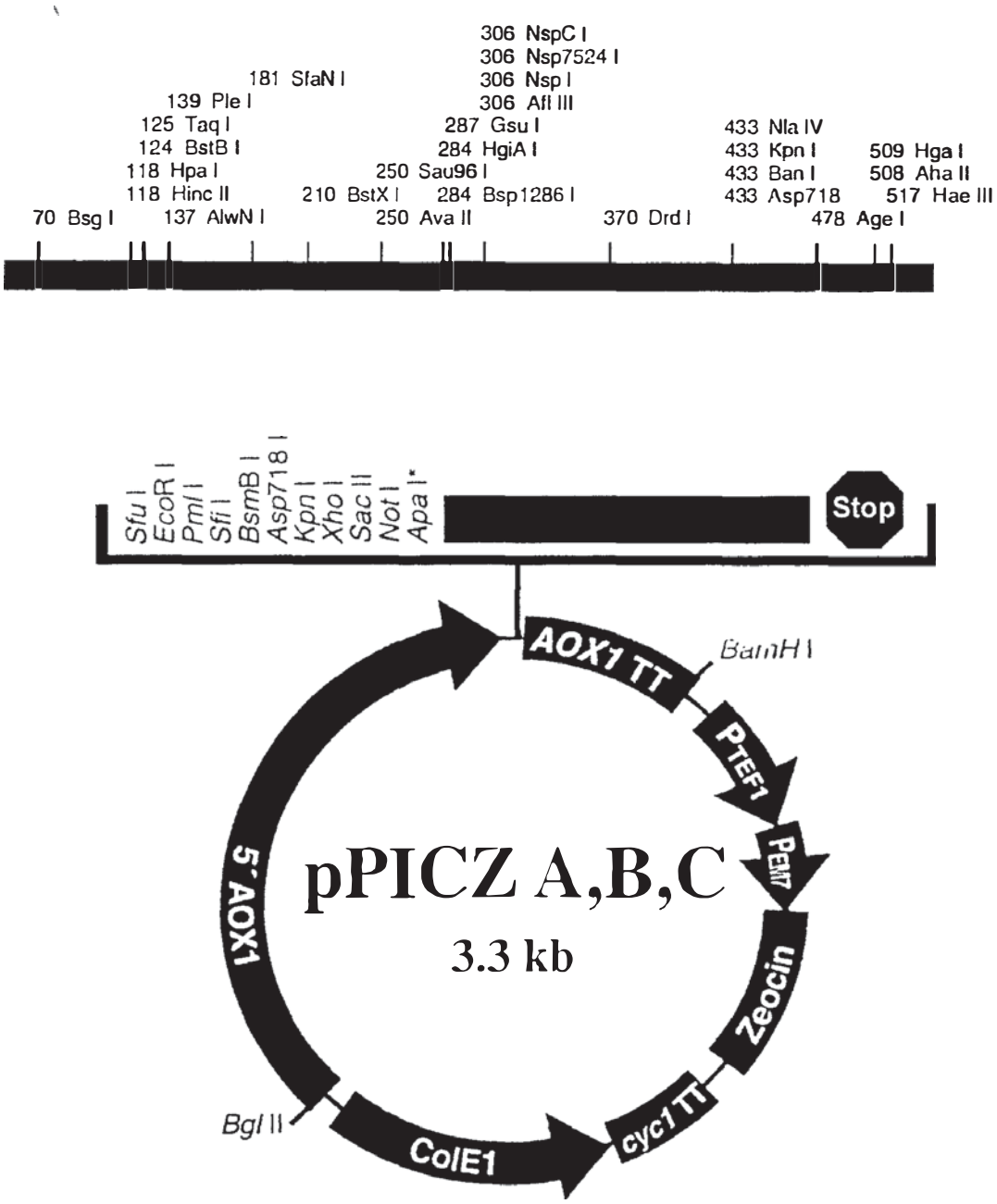



**Fig. 3. Vector de expresión intracelular.** Construcción pPICZ-*dh sod-1k*. El fragmento *dh sod-1k* se subclóno en el sitio *Eco RI* del "polylinker" del vector. En la barra *(dh sod-1)* están indicados (en pares de base) la localización relativa de los sitios únicos de corte. El vector contiene el promotor 5´AOX y un motivo de seis residuos de histidina. El fragmento lleva la caja de kozac. .(EasySelect *Pichia* Expression Kit. Invitrogen)

### 3.4.4 Digestión para linearización del ADN recombinante

Las clonas positivas se digirieron con *Sac I* siguiendo las indicaciones del fabricante, verificándose el corte de las digestiones mediante electroforesis en geles de agarosa-synergel-TBE 1%, preteñido con bromuro de etidio. Posteriormente a las preparaciones de ADN lineal se realizó una segunda extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), precipitándose finalmente con etanol absoluto preenfriado a -20°C. El ADN se recuperó por centrifugación y el pellet se lavó con etanol al 70%, secándose en un Speedvac (Eppendorf) y resuspendiéndose en 10µl de TE pH 7.5 para posteriormente transformar *P. pastoris* (Sec. 3.2.2B)

## 3.5 Obtener la expresión de la proteína recombinante *(hdh sod-1)* mediante inducción con metanol.

### 3.5.1 Activación de cepas *Pichia pastoris*

Primeramente se realizó la activación de 3 cepas de *Pichia* que estaban conservadas en glicerol, extraídas de EasySelect *Pichia* Expression Kit (Invitrogen).

KM71 $Mut^s$ his4 cepa control

GS115 $Mut^+$ his4 Cepa hospedero.

GS115/pPICZ/*lac* Z his4 $Mut^+$ Control del kit

Las células fueron crecidas en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa) bajo especificaciones del fabricante. Se Incubó a 30° C con agitación orbital constante a 225 rpm durante 48 hrs. Se prepararon placas de YPD de cada cepa para obtener un stock.

### 3.5.2 Determinación de Fenotipo Mutante

Se seleccionaron por picadura las colonias aisladas de *P. pastoris* transformada. Para inocular una placa con MMH (medio Mínimo Metanol + Histidina) y una placa con MDH (Medio Mínimo Dextrosa + Histidina). Como control positivo se utilizó la cepa GS115/pPICZ/lac Z $Mut^+$ y como control negativo KM71 $Mut^s$ . Las placas se incubaron a 30°C por 2 días. Posteriormente se observó y determinó como $Mut^+$ aquellas colonias que crecieron rápidamente en MDH y en MMH y como mutante sensibles aquellas colonias que crecieron en MDH pero lentamente en MMH.

### 3.5.3 Expresión de Recombinantes en cepas de *Pichia pastoris* (GS115)

Se realizó un ensayo de expresión utilizando medios mínimos BMGH (100mM fosfato de potasio, pH 6.0, 1.34% YNB, 0.00004 % de Biotina, 1% de glicerol) para producción de biomasa y BMMH (100mM fosfato de potasio, pH 6.0, 1.34% YNB, 0.00004 % de Biotina, 0.5% de Metanol) para inducir la expresión de la proteína, en un volumen de 50 mL. Este ensayo se llevó a cabo durante 24 horas sin hacer inducción con metanol, solo se consideró el 0.5% que tenia el medio de origen. Se tomaron alícuotas de 5mL cada hora durante las primeras 6 horas y el resto del muestreo se realizó cada 12 hrs. Los productos fueron visualizados mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), utilizando 3/4 partes de sobrenadante y 1/4 parte de LB-SDS (proteína extracelular).

Posteriormente se realizó un segundo ensayo de expresión con medio complejo BMGY (1% extracto de levadura, 2% de peptona, 100mM fosfato de potasio, pH 6.0, 1.34% YNB,

0.00004 % de Biotina, 1% de glicerol) que disminuye la actividad de las proteasas e incrementa el crecimiento y BMMY (1% extracto de levadura, 2% de peptona, 100mM fosfato de potasio, pH 6.0, 1.34% YNB, 0.00004 % de Biotina, 5% de Metanol), que induce la expresión en un volumen de 100 mL, se inocularon las cepas control y las clonas transformadas de GS115:

1) GS115/pPICZαC + C115 (extracelular)
2) GS115/pPICZC + C115 (intracelular)
3) GS115/pPICZ/*lac* Z (control del kit)
4) GS115/pPICZ (control propio)

Colonias únicas de cada cepa se inocularon en 25 mL de BMGY, los cultivos se crecieron toda la noche a 28-30°C con agitación orbital constante a 250 rpm. Las células se recuperaron por centrifugación 3000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. El pellet celular se resuspendió en 100 mL de medio BMMY. Posteriormente para inducir la expresión se incubaron nuevamente a 30°C con agitación orbital constante a 250 rpm. El proceso de expresión se llevó a cabo durante 120 hrs, induciendo cada 24 hrs con metanol para mantener una concentración de 0.5 % en el medio.

Las alícuotas de 5 mL fueron extraídas en los siguientes puntos de muestreo (horas): 0, 6, 12, 24 (un dia) 36,48 (dos días) 60,72 (tres días) 84, 96 (cuarto día) 108, 120 (quinto día) y se analizaron los niveles de expresión de la Cu,Zn SOD con el fin de determinar el punto óptimo de la inducción.

Las muestras se conservaron de la siguiente manera: De la transformante para la expresión extracelular (GS115/pPICZαC + C115) se transfirió el sobrenadante a un tubo

conservándose tanto el pellet como el sobrenadante a -80°C; al igual que los controles hasta su procesamiento posterior. Las muestras de la expresión intracelular (GS115/pPICZC + C115) se conservaron únicamente los pellets. Posteriormente se realizaron las pruebas de verificación de la expresión de la proteína recombinante utilizando SDS-Page; Western blot y actividad específica por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas (PAGE-Nativa).

## 3.6 Verificación de la expresión de Cu,Zn SOD recombinante.

### 3.6.1 Western blot

La extracción de proteínas intracelulares se realizó mediante lisis con perlas de vidrio (0.5mm Sigma), adicionando buffer de rompimiento (50 mM fosfato de sodio, pH 7.4, 1 mM de PMSF, 1mM EDTA, 5% glicerol). La ruptura celular fue mediante vortex (8 ciclos de 30 s vortex y 30 s en hielo), recuperándose el sobrenadante por centrifugación a 14,000 rpm por 10 min. a 4°C. Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry para realizar su separación por SDS-PAGE. El gel de poliacrilamida se transfirió a membrana de nitrocelulosa por el método de transferencia semiseca. El revelado de la proteína inmunoreactiva se realizó mediante un bloqueo de proteínas inespecíficas con leche semidescremada al 5% (w/v), y posteriormente se identificó con un anticuerpo policlonal Anti Cu,Zn SOD de *Debaryomyces hansenii* y como anticuerpo secundario se utilizó IgGαconejo conjugado con peroxídasa visualizándose la reacción por quimioluminiscencia utilizando como sustrato peróxido de hidrógeno y diaminobencidina.

### 3.6.2 Identificación de actividad por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones nativas (PAGE-Nativa)

Se prepararon geles en discontinuo de acrilamida-bis. 7.5 %. Se mezclaron 10 μg de proteína en volumen final de 50 μl de tampón de carga. De esta mezcla se cargaron 6 μg de proteína (30 μl) en cada carril del gel. La electroforesis se corrió a 40 V, fase de empaquetamiento y 80 V fase de corrimiento. La cámara se mantuvo en frió a 10ºC durante 4 horas. Finalmente el gel se tiñó con solución enzima-específica para evidenciar actividad enzimática.

### Tinción para revelar actividad de SOD

Soluciones Stocks 10 X: EDTA, Metionina, NBT y Riboflavina, disueltos en buffer de fosfatos 50 mM pH 7.8. Se mezclaron 5 mL de cada solución protegiéndose de la luz. Se vertió sobre el gel. Se incubó 30 min. en la oscuridad y a 10ºC. Se retiró la solución y se enjuagó con agua destilada. Se reveló colocando el gel bajo una lámpara de luz blanca hasta que el fondo se tornó azul violeta y aparecieron bandas blancas.

# 4. Resultados

## 4.1 Identificación de la versión idónea de los vectores de expresión

Se realizó un análisis de los marcos abiertos de lectura de cada una de las versiones de los vectores pPICZ (A, B y C) y pPICZα (A, B y C), contenidos en el manual de Invitrogen, y se marcó el inicio de la secuencia *dh sod-1* mediante la identificación del sitio de corte *Eco RI.* En este análisis se determinó que la versión C en ambos vectores era favorable para ubicar la secuencia *dh sod-1* en fase de lectura y lograr su expresión como recombinante.

Secuencia *dh sod-1:*

sitio de corte
5' TC TGC A**G**A ATT CGG CTT **ATG** GTG CAG GC 3'
AG ACG TCT **TAA** GCC GAA TAC CAC GTC CG
R I R L M V Q A

pPICZ**A** 5' AAC **G**AA TTC ACG TGG CCC AGC CGG CCG TCT CGG
ATC GGT ACC TGC AGC CGC GGC GGC CGC CAG CTT
GGG CCC GAA CAA AAA CTC ATC 3'

pPICZ**B** 5' ACG A**GG** AAT TCA CGT GGC CCA GCC GGC CGT CTC
GGA TCG GTA CCT CGA GCC GCG GCG GCC GCC AGC
TTT CTA GAA CAA AAA CTC ATC 3'

✓pPICZ**C** 5' CGA **GG**A ATT CAC GTC GCC CAG CCG GCC GTC TCG
(α) GAT CGG TAC CTC GAG CCG CGG CGG CCG CCA GTC
TAC GTA GAA CAA AAA CTC ATC 3'

## 4.2 Subclonación de la secuencia *dh sod-1* en los vectores pPICZ(α) y/o pPICZ.

### 4.2.1. Integración de la caja de Kozac en la secuencia *dh sod-1*

La secuencia codificante *dh sod-1* (C115), que contiene toda la información necesaria para producir una proteína funcional fue obtenida por (*Hernández, et al., 1997*). Se le agregó la secuencia consenso de la caja de Kozac mediante el método de PCR utilizando oligos específicos. Esta construcción fue necesaria para que los vectores de expresión intracelular pudieran reconocer el sitio de origen dentro del marco de lectura y con ella dar la señal de inicio para la traducción y expresión de la proteína. El producto de la amplificación observado en geles de agarosa al 1%-TAE, preteñido con bromuro de etidio correspondió al tamaño del inserto esperado 470 pb. (Fig. 4)

**M C115 KC115**

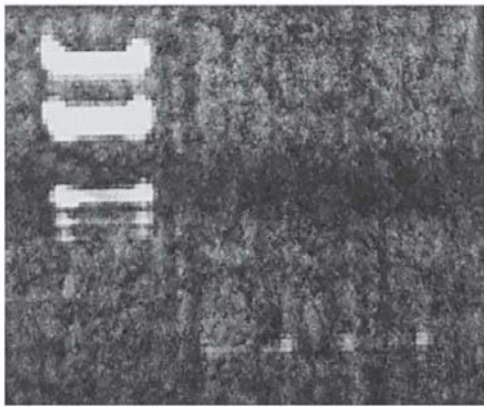


**Fig. 4 Producto de amplificación por PCR.** M. marcador de PM. C115. KC115 (fragmento con caja de kozac).

### 4.2.2 Clonación de *dh sod-1* en pCR2.1 (Cloning ® Kit Invitrogen)

El producto amplificado se clonó en el vector pCR2.1. Se transformó en *E. coli* (Sec. 3.2.2A). Se caracterizaron enzimáticamente 40 clonas, observándose positivas 8 de la construcción con la caja de Kozac y 4 con el segmento *dh sod-1* (C115) (Fig. 5). De los 2 métodos de purificación del segmento que se utilizaron, se obtuvo un mejor resultado de ligación con el producto purificado por Rapid Gel Extraction Protocol (GIBCOBRL) que con el tradicional Gene Clean. Ambos métodos utilizan en mismo fundamento de limpieza con silica gel, la diferencia es que uno tiene una columna empacada (membrana) y el otro la utiliza en forma líquida permitiendo que posibles residuos de silica intervengan en los resultados de los experimentos posteriores.

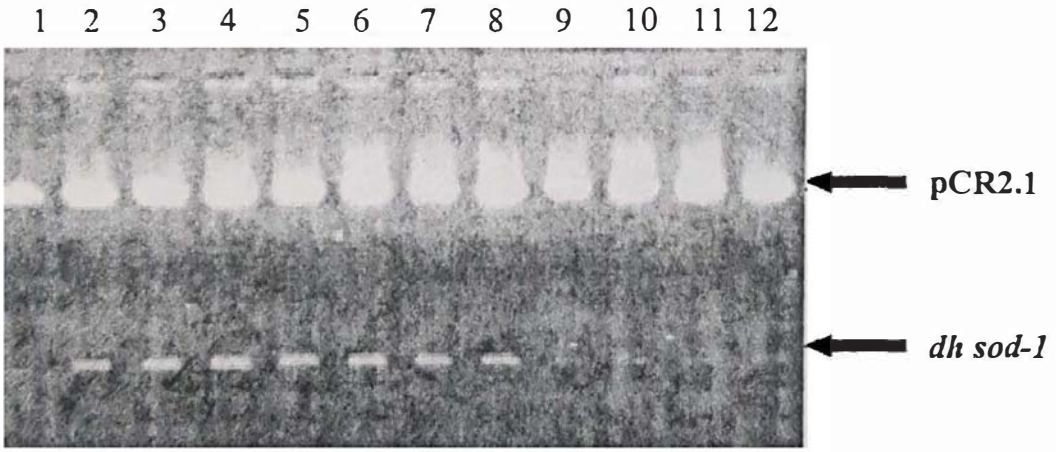



**Fig. 5. Clonas positivas digestión *Eco RI*.** Del 1 al 8 *dh sod-1-kozac*. Del 9 al 12 *dh sod-1*. Electroforesis en geles de agarosa-TBE 1%, preteñido con EtBr.

### 4.2.3 Desfosforilación de ADN plasmídico linearizado

Se realizó la desfosforilación de los vectores de expresión con CIP previamente linearizados con *Eco RI*. Con este paso se aumentó la eficiencia de ligación para la construcción de los vectores de expresión pPICZ (ABC) y pPICZα (ABC) con el inserto C115, utilizando T4 ligasa, al mismo tiempo se disminuyó el riesgo de autoligación. Para verificar la eficiencia de la desfosforilación, el plásmido linearizado y desfosforilado se transformó (Sec. 3.2.2A). El criterio a considerar fue, que como TOP10 no tiene sitio de reconocimiento del vector a nivel cromosomal, aún cuando es un vector integrativo, no podía integrarse o transformar en esa célula; por lo tanto, el crecimiento esperado en placas de SOB con Zeocina como antibiotico selectivo debería de resultar negativo o nulo. En caso contrario si la desfosforilación no se hubiera realizado eficientemente el plásmido se autoligaría y las placas con SOB+Zeocina hubieran presentado crecimiento. El resultado obtenido fue el esperado, todas las placas resultaron sin crecimiento y los controles tanto positivo (para viabilidad celular) y negativo (transformación con agua), presentaron su comportamiento correcto. Esto garantizó la eficiencia en la hidrólisis de grupos fosfatos amino terminal (Fig. 6).

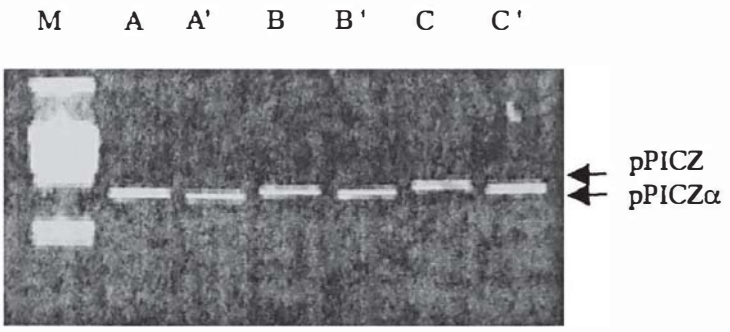



**Fig. 6. Vectores linearizados** con *Eco RI* **y desfosforilados** con fosfatasa alcalina (CIP). Electroforesis en geles de agarosa-TBE al 1%.

### 4.2.4 Subclonación de la secuencia *dh sod-1*

La secuencia *dh sod-1*, fue subclonada en el sitio *Eco RI* de los vectores pPICZ(ABC) y pPICZα(ABC) (Invitrogen) desfosforilados, así como plásmidos linearizados sin desfosforilar y plásmido linearizado extraído por columna Nucleobond (Sec. 3.3.1). Estos vectores de expresión contienen el promotor AOXI (que induce la expresión de secuencias extrañas en presencia de metanol 0.5% y seis residuos de histidina que funcionan como dominio enlazante de metal en la proteína de fusión traducida). Las 48 construcciones se realizaron con segmento recuperado con *Eco RI* y purificados (Gene Clean y Rapid Gel Extration) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se transformó (Sec. 3.2.2A) y la eficiencia de transformación observada de la ligación con plásmido desfosforilado y C115 purificado por Rapid Gel Extraction Protocol fue de aproximadamente 100 clonas por μg de ADN. Mientras que la eficiencia de transformación con los otros modelos fue baja o nula. De las clonas positivas se prepararon Minipreps SOB mas Zeocina con 10 clonas por vector. Se analizaron enzimáticamente con *Eco RI* 60 clonas. El resultado se observó en geles de agarosa-TBE al 1% preteñidos con bromuro de etidio. Identificando 7 clonas positivas de pPICZA, 5 de pPICZαA, 5 de pPICZB, 3 de pPICZαB, 8 de pPICZC y 2 de pPICZαC.

De las clonas positivas obtenidas de cada versión se realizó un análisis de restricción para verificar la orientación del segmento bajo el siguiente criterio: si está en buena orientación la construcción se lineariza; y, si está en orientación equivocada la construcción se divide en dos bandas de x número de pares de bases (Fig. 7).

Posterior al análisis de restricción se obtuvieron únicamente 2 clonas positivas de pPICZαC y pPICZC, 4 de pPICZB, 3 de pPICZαB, 7 de pPICZA y 4 de pPICZαA. Por lo tanto, se repitió el proceso para obtener mas clonas positivas de los vectores C, que es la versión ideal para la expresión de la Cu,Zn SOD obteniéndose 6 clonas mas de pPICZαC y 3 de pPICZC.

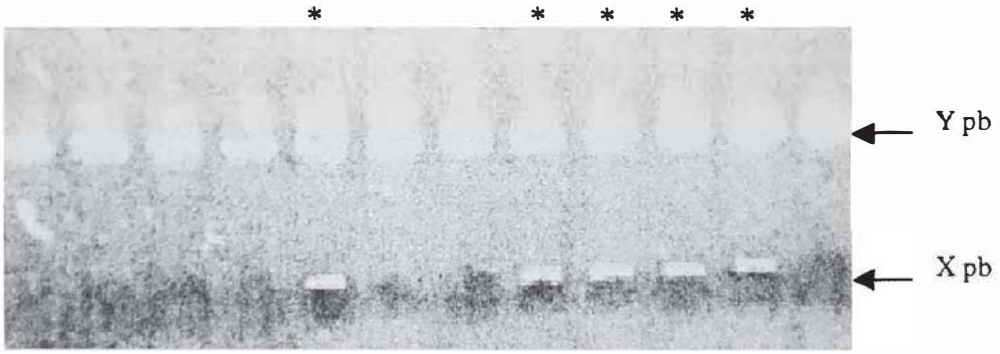



Fig. 7. Análisis de restricción Kpn I. (*) representan a las clonas negativas (inserto invertido). Electroforesis en geles de agarosa-TBE 1% preteñido con EtBr.

## 4.2.5 Linearización de las construcciones (pPICZC-KC115 y pPICZαC-C115)

Las clonas positivas de todas las construcciones se linearizaron con *Sac I* para transformar en *P. pastoris*. Esta enzima corta en un sitio único dentro del vector permitiendo dejar funcional el promotor AOX1 utilizado por *P. pastoris* para la integración en el loci cromosomal y al mismo tiempo regular la expresión de la proteína recombinante. (Fig. 8)

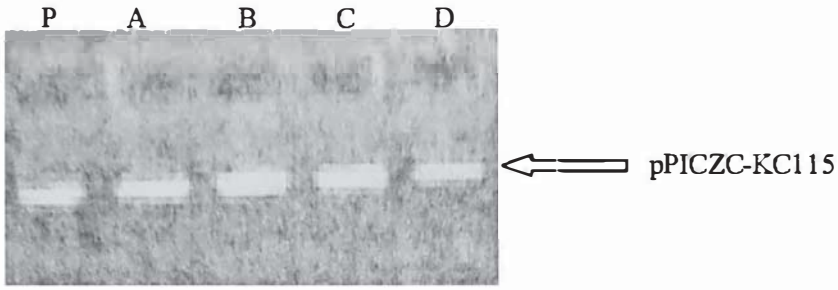



Fig. 8. Vectores linearizados con *Sac I.* P-pPICZC; A y B- pPICZC-KC115; C y D pPICZαC-C115. Electroforesis en geles de agarosa-TBE 1% preteñido con EtBr.

## 4.3 Expresión de la enzima recombinante *(hdh sod-1)* mediante inducción con metanol

### 4.3.1 Determinación fenotípica

Las cepas utilizadas para la transformación fueron GS115 $Mut^+$ y KM71 $Mut^s$ . Las colonias características de *Pichia pastoris* son de color blanco lechoso, no filamentosas y apariencia suave, circulares uniformes. En las dos cepas hospederos utilizadas se obtuvo buena eficiencia de transformación, aproximadamente 30 transformantes por placa. Se determinó el fenotipo mutante de cada transformante. Se recuperaron 15 clonas $Mut^+$ de pPICZαC y 7 clonas $Mut^+$ de pPICZC. El análisis fenotípico permitió elegir la cepa que mejor rendimiento en cuanto a crecimiento y expresión de la proteína recombinante tuviera durante el proceso de fermentación en un período de tiempo más corto. El criterio fue que una mutante positiva posterior a la inducción con metanol tarda de 6 horas a 2 días en expresar la proteína recombinante, mientras que una mutante sensible tarda de 1 a 6 días (Fig. 9). Para identificar cepas multicopias, las clonas positivas se inocularon en medio

MDH variando la concentración del antibiótico de selección (Zeocina) de 100 a 125 y 150 μg/mL, se esperaba que las cepas con mas copias crecieran en el medio con una concentración de antibiótico de 125 y 150 μg/mL, no obteniendo resultado favorable.

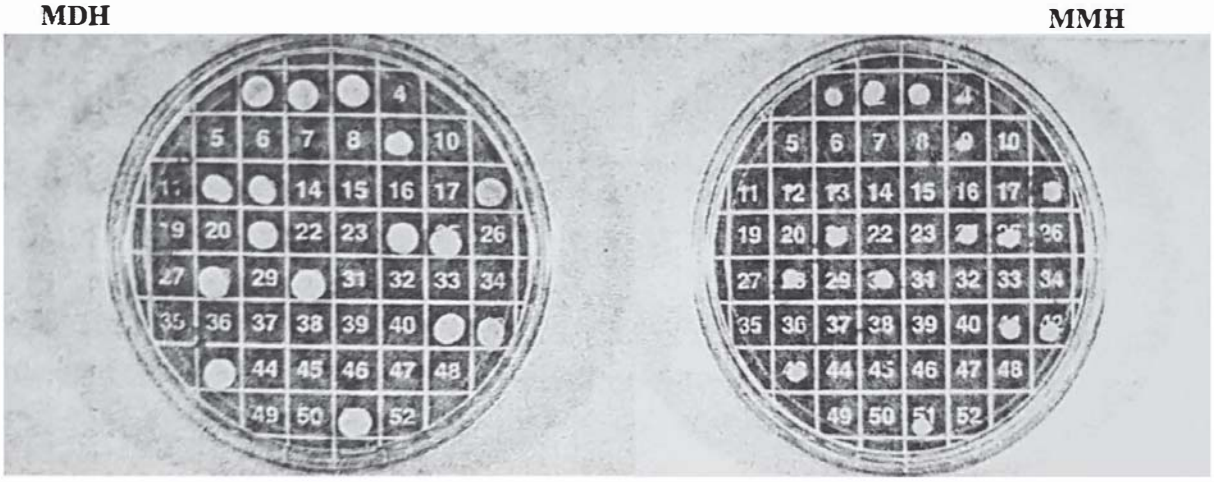



**Fig. 9. Clonas mutantes positivas** de GS115-pPICZC-KC115 (9,12,13,18). GS115-pPICZαC-C115 (24,25,28,30,,41,42,43). GS115-pPICZC (51). Colonias observadas después de 2 dias de incubación a 30°C.

## 4.3.2 Expresión de Cu,Zn SOD Recombinante en cepas de *Pichia pastoris* (GS115)

El primer ensayo de fermentación se realizó utilizando medios mínimos no obteniendo una buena producción de biomasa y al separar las proteínas por SDS-PAGE no se observó la banda proteica esperada, probablemente la deficiencia de nutrientes y sobre todo de metales trazas necesarios para la síntesis de Cu,Zn SOD recombinante causaron estos resultados, además este ensayo se corrió sin realizar inducción con metanol, solo se consideró el 0.5%

de la concentración inicial del medio. Dadas las características del promotor AOX1 utilizado por *Pichia* para la expresión de proteína recombinante, la inducción de metanol para sostener la concentración en la disponibilidad de ésta fuente de carbono inductora de expresión es muy importante. Sin embargo se pretendió únicamente conocer el comportamiento de *P. pastoris* en cuanto a expresión, crecimiento y resistencia por demanda de oxigeno, pH y stress de manipulación para poder realizar el escalamiento del proceso. Lo anterior tuvo como finalidad estandarizar las condiciones del proceso de fermentación y conocimiento de la levadura.

El segundo experimento de expresión se realizó con medios complejos, observándose un mayor rendimiento en la producción de biomasa. El primer paso de la fermentación que es considerada la fase de crecimiento se realizó a una concentración de 1% de glicerol. Posteriormente se eliminó el glicerol por centrifugación descartando el sobrenadante y la biomasa fresca se resuspendió en medio con 0.5% de metanol y a esa concentración se sostuvo durante 120 horas. La tasa de crecimiento aun cuando no se cuantificó fue abundante y característica de cepas mutantes positivas utilizadas por *P. pastoris*.

Antes de realizar la verificación de la presencia de la proteína recombinante por Western blot. Se cuantificó la concentración de proteínas por el **método de Lowry, c**on la finalidad de estandarizar las concentraciones de proteínas que serian estudiadas por electroforesis en geles de poliacrilamida tanto en condiciones nativa como desnaturalizantes y, con ello, descartar la probabilidad de que las diferencias de concentraciones pudieran generar error de apreciación en la expresión.

## 4.4 Verificación de la expresión de Cu,Zn SOD recombinante

El análisis de Western blot demostró la presencia de Cu,Zn SOD recombinante a nivel intracelular. Recordando que la enzima Cu,Zn SOD es citósolica y considerando que el sistema de expresión de *Pichia* tiene las rutas metabólicas para la síntesis de proteínas similares al resto de los organismos eucariontes, el éxito de la expresión a este nivel era de esperarse. El reconocimiento por los anticuerpos (Ab Cu,Zn SOD de *D. hansenii* y IgGαconejo conjugado con peroxídasa) fue evidente a diferencia de los controles negativos donde no hubo tal reconocimiento. La concentración de proteína recombinante fue en aumento conforme se corrió el experimento. Al realizar las inducciones con metanol durante la expresión se observó que ante el agotamiento de metanol disminuía la producción de recombinante, pero se sobreexpresa a las 12 horas posteriores a la inducción. Esto se observó en la intensidad de las bandas identificadas en un Western blot realizado con 10 μL de extracto proteico y la cuantificación realizada por el método de Lowry. Posteriormente se realizó un ensayo cualitativo de actividad PAGE-Nativa de la proteína recombinante y se puede observar 3 bandas (Mn SOD, Cu,Zn SOD y Cu,Zn SODR) a diferencia de las dos bandas de actividad mostrada por la cepa GS115, lo que indica que es una proteína activa (Fig. 11) . Ahora el reto será la purificación y caracterización de la proteína recombinante.

Sin embargo, en los análisis de Western blot no se observó la presencia de Cu,Zn SOD recombinante en el sobrenadante. Se esperaba un nivel de contenido proteico teórico > 30% dado que *P. pastoris* secreta muy bajos niveles de proteína nativa. La posibilidad de éxito en la utilización de este sistema de expresión extracelular es alto, debido a que la ruta

secretora de proteínas utilizada por *Pichia*, así como la secuencia señal prepro α factor de apareamiento (αMF) de 89 aminoácidos que transporta a la proteína por esta ruta a sido utilizada para la secreción de diferentes proteínas con buenos resultados (*Cregg, et al., 1995*). Desde luego las características propias de la proteína, así como su plegamiento y modificaciones post-traduccionales juegan un papel importante en la expresión de la misma como recombinante. Cabe aclarar que el experimento para la expresión de proteína secretada se realizó con una sola clona y por una ocasión, por lo tanto queda mucho trabajo por realizar para poder concluir que el sistema de *Pichia pastoris* para la expresión de Cu,Zn SOD *Deb. hansenii* a nivel extracelular no es funcional.

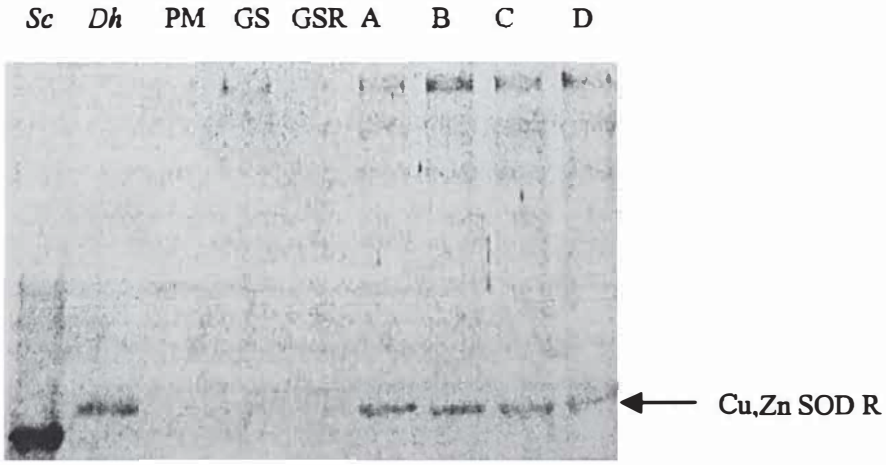



**Figura 10. Western blotting.** Detección de la proteína recombi-nante inmunoreactiva. Proteína fijada en membrana de nitrocelulosa

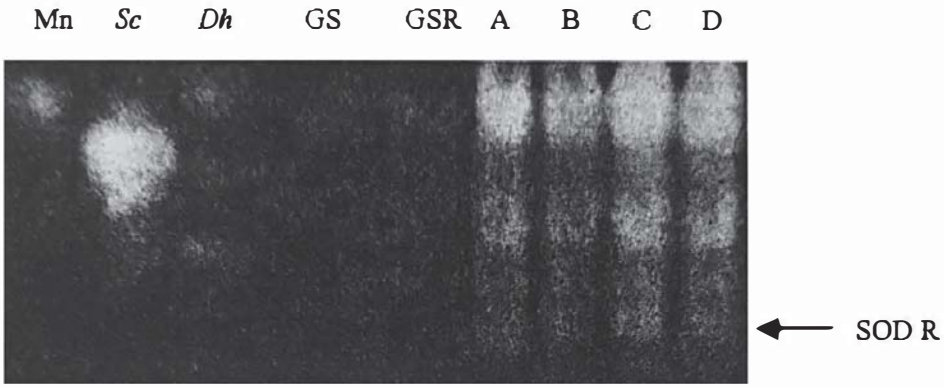



**Figura 11. Identificación de actividad enzimática por el método de NBT.** Electroforesis Page-Nativa 7.5%. Mn SOD, Cu,Zn SOD *Sc.* Cu,Zn SOD *Dh.*, GS115, GS recombinante en tiempo 0, GSR 24A, 36B, 48C, 60D hrs.

# 5. Discusión

La expresión de proteínas recombinantes consiste en cuatro pasos fundamentales: Clonación de la secuencia codificante de ADN dentro de un vector de expresión contenido dentro del promotor y una secuencia de terminación de la transcripción; transformación y mantenimiento estable de la integración del vector de expresión dentro del hospedero; Síntesis de la proteína recombinante, bajo las condiciones específicas de represión-inducción y purificación de la proteína recombinante para compararla con su contraparte nativa.

Para lograr lo anterior se tuvieron que realizar varios ensayos desde elegir el medio de cultivo ideal para el crecimiento de las células bacterianas donde se realizaría la propagación del plásmido y mantenimiento comparando los medios SOB y LB. El medio SOB, tanto en agar como líquido, resultó ser el más adecuado por sus rendimientos en la producción de biomasa y debido a la presencia de cationes divalentes como magnesio, por el aumento de la eficiencia de transformación en las células de *E. coli* (*Sambrook, et al., 1989*). Por lo tanto, SOB fue el medio en donde se realizaron todos los trabajos de crecimiento de células competentes de *E. coli* TOP10, las transformaciones, y la obtención de ADN plásmidico a pequeña y mediana escala.

Por otro lado, se buscó un sistema que estuviera disponible, que con técnicas moleculares básicas fuera fácil de manipular que los procesos de maduración de la proteína fueran estables y, lo más importante, que su proceso de escalamiento en la sobreexpresión de la proteína recombinante a gran volumen y alta densidad fuera sencillo y económico*(Cregg J.M et al., 2000)*. En años recientes *Pichia pastoris* ha sido utilizada para producir

aproximadamente 300 proteínas recombinantes y por las características de los vectores de expresión que utiliza resulta un sistema adecuado para probar y lograr la expresión de la secuencia *dh sod-1* (enzima Cu,Zn SOD recombinante).

Dado que los vectores pPICZ son faltantes de origen de replicación, estos son propagados como elementos integrativos en el cromosoma de *Pichia pastoris* donde la recombinación de ADN con el cromosoma ocurre vía homología (loci cromosomal y vector linearizado) y su integración es direccionada a la región 5`AOXI dejando el gen AOXI intacto (Promotor), para la conducción de la proteína recombinante expresada generando clonas mutantes positivas (*Romanos, M. 1995*).

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la utilización del sistema de expresión de *Pichia pastoris* como hospedero (cepa GS115), con sus vectores pPICZC y pPICZα C construidos como ADN recombinante con la secuencia *dh sod-1* que codifica a la enzima Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii,* es funcional para expresar la proteína recombinante soluble a nivel intracelular identificada con anticuerpos policlonales a través del ensayo Western blot. Estos anticuerpos no reconocen la Cu,Zn SOD de *Pichia pastoris* (control negativo). Lo que nos lleva a concluir que ambas enzimas poseen epitopes diferentes (*Rojas Espinoza, 1996*). Entonces, la detección de la enzima inmunoreactiva si corresponde a la expresada por la secuencia *dh sod-1*. En el proceso de expresión se manejaron como controles los proporcionados por el kit y el preparado bajo las mismas condiciones del proceso con las construcciones propias. En ambos la detección de la enzima Cu,Zn SOD, fue negativa. Al realizar un ensayo para identificar actividad PAGE-Nativa se observaron 3 bandas de actividad identificadas por el método de NBT

(quimioluminiscencia), que correspondían a la Mn SOD, a la Cu,Zn SOD de *Pichia* y a la Cu,Zn SOD recombinante, Lo anterior se confirmó mediante el control de *Pichia* que solo presenta dos bandas. Además, ello indica que la proteína Cu,Zn SOD recombinante es activa. Y con ello se confirma que la expresión de una proteína recombinante de origen eucariota tiene una mayor posibilidad de ser expresada correctamente en un sistema del mismo origen. Por otro lado, en un ensayo realizado con una clona, para la expresión extracelular (pPICZαC) de la enzima, la presencia de Cu,Zn SOD recombinante en el sobrenadante del cultivo no se detectó por Western blot.

Teóricamente el punto donde se logró observar una mayor expresión de enzima recombinante fue 12 horas después de realizado el pulso de inducción (36 horas), tomando en cuenta que las células en ese tiempo se encuentran en fase de crecimiento log y están fisiológicamente activas, a diferencia de las muestras analizadas dentro de la fase estacionaria (60, 96 y 120 horas), donde se considera que el rendimiento celular es aproximadamente un 50 %.

# 6. Conclusión

La secuencia codificante *dh sod-1* proviene de un organismo eucariota una levadura marina *D. hansenii*, por lo tanto, se buscó su expresión como proteína recombinante en un sistema similar (*Pichia pastoris*). Se confirmó que este fragmento constituido por 470 pb, que codifica para una proteína de 153 aminoácidos con un PM teórico de 15.9 KDa, no contiene intrones, y es capaz de ser expresada como una proteína heteróloga del tipo Cu,Zn SOD inmuno- y enzimáticamente activa, identificada como proteína soluble intracelular.

Las transformantes obtenidas de *Pichia* indica poseer copias únicas de vector de expresión por célula, por lo que para la sobre-expresión se deberán construir cepas multicopias sobreproductoras de enzima recombinante Cu,Zn SOD.

La expresión extracelular de la Cu,Zn SOD recombinante inmunoreactiva en *P. pastoris* no se logró identificar, a través de Western blot en las condiciones experimentales descritas en este trabajo. Por lo tanto, se deberá analizar el proceso de fermentación para optimizar condiciones de secreción considerando que el vector de expresión extracelular que se utiliza cuenta con la secuencia señal de 89 aminoácidos para conducir la secreción (Invitrogen). Para el caso de la enzima Cu,Zn SOD (metaloproteína), la primer consideración para este fin deberá ser la disponibilidad de Cu y Zn que estén presentes en el medio en concentración suficiente sin llegar a tener niveles tóxicos para la célula. Podemos hipotetizar que los procesos post-traduccionales pueden también afectar el rendimiento en la producción de la enzima secretada.

La selección de *Pichia pastoris* como hospedero en procesos de escalamiento de expresión a gran-volumen y alta densidad, es factible para establecer un sistema de expresión que sea capaz de producir gran cantidad de enzima recombinante Cu,Zn SOD de forma soluble y funcional a nivel intracelular.

Los vectores de expresión integrativos pPICZ (intracelular) y pPICZα (extracelular) utilizados por *P. pastoris* para conducir la expresión de la Cu,Zn SOD recombinante facilitaron la producción de cepas transformadas GS115 Mut+, ya que el vector linearizado en regiones de homología con el genoma, estimula grandemente la frecuencia de integración en el loci cromosomal inmediato al sitio de corte. Con este principio la recombinación homologa *P. pastoris* tiene la ventaja de formar cepas multicopias sobreproductoras de Cu,Zn SOD recombinante, donde el obtener cepas multicopias dependerá del método de transformación utilizado (EasySelect *Pichia* Expression Kit, Invitrogen). Por lo tanto, utilizando electroporación para transformar podemos suponer que tendríamos clonas multicopias y no copias únicas como las obtenidas con una transformación por métodos químicos. Considerando que clonas multicopias de la secuencia *dh sod-1* aumentarían la expresión de Cu,Zn SOD recombinante habrá que verificar dicha suposición.

# 7. Perspectivas

Construir cepas multicopias de *Pichia pastoris*, (por el método de electroporación), con el fin de sobreproducir la enzima Cu,Zn SOD de *D. hansenii* como recombinante.

Purificación de la proteína recombinante Cu,Zn SOD de *D. hansenii* obtenida a nivel intracelular utilizando métodos cromatográficos con columnas de afinidad y realizar la comparación con su contraparte nativa.

Lograr obtener el volumen requerido de enzima, para caracterización estructural. Con el fin de determinar si las variaciones en sus sitios de unión a histidinas del Ion $Cu^{++}$ participan en el aumento de la actividad presentada por la enzima Cu,Zn SOD de *Deb. hansenii* en comparación con enzimas Cu,Zn SOD extraídas de otras fuentes y son comercialmente disponibles.

Comparar la actividad y características de la enzima recombinante Cu,Zn SOD de humano (hígado) obtenida de otros sistemas de expresión (*Lactococus lactis*, Sheng 2000) (otras levaduras utilizando el promotor gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), Yoo HY et al. 1999) ambas enzimáticamente activas, con la enzima Cu,Zn SOD de *D. hansenii* como recombinante obtenida en este trabajo. Con el fin de determinar si la levadura marina *Debaryomyces hansenii* es una fuente alternativa viable de la enzima Cu,Zn SOD con mayor actividad, así como valorar el sistema de expresión en cuanto a la expresión de una proteína enzimáticamente útil. Los rendimientos en la producción de Cu,Zn SOD

recombinante de diferentes fuentes de extracción y diferentes sistemas de expresión hace de esto un reto interesante para obtener mayor producción de enzima a bajo costos. Para entonces, ofrecer una alternativa más atractiva al sector industrial en las áreas biomédica, farmacéuticas, cosmetológicas y alimentaría.

Realizar otros experimentos con el objetivo de lograr la expresión de Cu,Zn SOD recombinante a nivel extracelular. Dentro de los factores a considerar están: el número de copias del casette de expresión, el fenotipo Mut+ (sitio y modo de integración cromosomal del vector de expresión), la composición del medio en este caso buscar niveles de concentración de Cu y Zn disponibles sin ser tóxicos, o bien utilizar algunos inhibidores para evitar el daño celular (Sreekrishna K. et al. 1997), variar el pH del medio, ya que la fermentación puede ser conducida en un amplio rango de pH (3.0 - 6.0), y un crecimiento prolífico a bajo pH sin afectar a la enzima minimiza los riesgos de contaminación microbiana y por último, ajustar la actividad proteolítica y parámetros propios de la fermentación, para optimizar las condiciones del medio y el crecimiento.

# 8. Referencias

**Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E:, Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** 1997. *Short Protocols in Molecular Biology*. Jonh Wiley & Sons, Inc. 3era. Ed. USA.

**Baneyx, F.** 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology. **10:** 411-421.

**Bannister, W.H. and Bannisteer, J.V.** 1988. Isolation and Characterization of Superoxide Dismutase: A Personal History and Tribute to Joe McCord and Irwin Fridovich. Free Radical Biology & Medicine. **5**:371-376

**Barr, et al** 1992. In. Current Protocols in Protein Science. 1995 by John Wiley & Sons, Inc. Unit 5.7

**Blum, A., Martin, H.J., Maser, E.** 2000. Human 11beta-hydroxysteroid dehydogenase 1/carbonyl reductase: recombinant expression in the yeast *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. Toxicology. **144**(1-3): 113-120.

**Bretthauer, R.K. and Castellino, F.J.** 1999. Glycosylation of Pichia pastoris-derived proteins. Biotechnol. Appl. Biochem. **30**: 193-200.

**Cereghino, G.P.L. and Cregg, J.M.** 1999. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. Current Opinion in Biotechnology. **10**:422-427.

**Cereghino, G.P.L. and Cregg, J.M.** 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol Rev. 24(1):45-66.

**Creeg, et al** 1987. In. Current Protocols in Protein Science. 1995 by John Wiley & Sons, Inc. Unit 5.7

**Cregg, J.M., . Vedvick, T.S. and Raschke, W.C.** 1993. Recent advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. Bio/Technology.**11**: 995-910.

**Cregg, J.M. and Higgins, D.R.** 1995. Produccion of foreign proteins in the yeast Pichia pastoris. Can. J. Bot. **73** (suppl 1): 891-S897.

**Dykes, G.W.** 1997. *Biologia Molecular en la Industria Farmacéutica.* En: : Walker J.M. y Gingold E.B. 2da. Ed. Biología Molecular y Biotecnología. Acribia, S.A. Zaragoza (España). Pp 173-195.

**Eckart, M.R. and Bussineau, C.M.** 1996. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. Current Opinion in Biotechnology. **7**:525-530.

**Emr, S.D.** 1991. *Heterologous Gene Expression in Yeast.* En: Goeddel D.V. 1era. Ed. Gene Expression Technology. Academic Press, Inc. San Diego, California. Pp 231-482.

**Fischer, R., Drossard, J., Emans, N., Commandeur, U. , Hellwig, S.** 1999. Towards molecular farming in the future: *Pichia pastoris*-based production of single-chain antibody fragments. Biotechnol. Appl. Biochem. **30**: 117-129.

**Fleer, R.** 1992. Engineering yeast for high level expression. Current Opinion in Biotechnology. **3**:486-496.

**Geoggrey, M.C.** 1997. *The Cell a Molecular Approach.* ASM Press. !era. ed. Washington, D.C. 673 p.

**Giga-Hama, Y and Kumagai, H**. 1999. Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe.* Biotechnol. Appl. Biochem. **30**: 235-244.

**Gingold, E.**B. 1997. *Una introducción a la Tecnología del ADN recombinante.* En: Walker J.M. y Gingold E.B. 2da. Ed. Biología Molecular y Biotecnología. Acribia, S.A. Zaragoza (España). Pp 23-52.

**Goeddel, D.**V. 1991. *Systems for Hetelogous Gene Expression*. En: Goeddel D.V. 1era. Ed. Gene Expression Technology. Academic Press, Inc. San Diego, California. Pp 3-7.

**Gold, L.** 1991. *Expression of Heterologous Proteins in Escherichia coli*. En: Goeddel D.V. 1era. Ed. Gene Expression Technology. Academic Press, Inc. San Diego, California. Pp 11-195.

**Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.** 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford University Press. 3era. Ed. New York. 936 p.

**Hartman, J.R., Geller, T. Yavin, Z. Bartfeld, D., Kanner D., Aviv, H., Gorecki, M.** 1986. High-level expression of enzymatically active human Cu/Zn superoxide dismutase in *Escherichia coli.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83(19):7142-7146.

**Heim, J., Schmidt-Dannert, C., Atomi, H., Schmid , R.D.** 1998. Funcional expression of a mammalian acetylcholinesterase in *Pichia pastoris*: comparison to acetylcholinesterase, expressed and reconstituted from *Escherichia coli.* Biochim. Biophys. Acta. **1396**(3):306-319.

**Hellwing, S., Robin, F., Drossard, J., Raven, N.P.G., Vaquero-Martin, C., Shively, J.E. and Fischer, R.** 1999. Production of carcinoembryonic antigen (CEA) N-A3 domain in *Pichia pastoris* by fermentation. Biotechnol. Appl. Biochem. **30**:267-275.

**Hernández, N.Y. and Ochoa, J.L.** 1999. Copper-Zinc Superoxide Dismutase from the Marine Yeast *Debaryomyces hansenii.* Yeast. **15**: 657-668.

**Hernández, N.Y.** 1997. Characterization of the superoxide dismutase enzyme type copper-zinc from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*, and cloning of the encoding sequence from cADN. PhD Thesis. CIBNOR, La Paz, B. C. S., México.

**Hernández, N. Y., Marc, E.J. and Ochoa, J. L.** 1998. Cloning and Sequencing of a cDNA encoding a Copper-Zinc Superoxide Dismutase Enzyme from the Marine Yeast *Debaryomyces hansenii*. Yeast. **14**: 573-581.

**Higgins, D.R.** 1995. *Overview of Protein Expressioon in Pichia pastoris*. Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc. 5.7.1.-5.7.16.

**Holdom, M.D., Lechenne, B., Hay, R.J., Hamilton, A.J., Monod, M.** 2000. Production and characterization of recombinant Aspergillus fumigatus Cu, Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. J. Clin. Microbiol. **38**: 558-562.

**Hollenberg, C.P. and Gellissen G. 1997**. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeast. Current Opinion in Biotechnology. **8**:554-560.

**Kjeldsen, T., Pettersson A.F., Hach M.** 1999.Secretory expression and characterization of insulin in Pichia pastoris. Biotechnol. Appl. Biochem. **29**:79-86.

**Koths, K.** 1995. Recombinant proteins for medical use: the attractions and challenges. Current Opinion in Biotechnology. **6**:681-687.

**Madigan, M.**T., Martinko J.M., Parker J. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall. 8va. Ed. Madrid (España). 1064 p.

**McCord, J.M. and Fridovich I.** 1969. Superoxido Dismutase. An Enzimatic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. **224**: 6049-6055.

**Montesino, R., Garcia, R., Quintero, O., Cremata, J.A.** 1998. Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Protein. Expr. Purif. **14**(2):197-207

**Ridder, R., Schmitz, R., Legay, F. and Gram, H.** 1994. Generation of Rabbit Monoclonal Antibody Fragments from a Combinatorial Phage Display Library and Their Production in the Yeast *Pichia pastoris*. Bio/Technology . **13**: 255-260.

**Rojas-Espinoza, O.** 1996. Inmunología. Editorial Medica Panamericana. 1era. Ed. México, D.F. 228 p

**Romanos, M.** 1995. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Current Opinion in Biotechnology. **6**: 527-533.

**Sambrook, J, Fritsch, E.F., Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2da. Ed. USA.

**Scorer, C.A., Buckholz, R.G., Clare, J.J., Romanos, M.A.** 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene. **136**(1-2): 111-119.

**Scott, M.D., Meshnick, S.R. and Eaton J. W.** 1987. Superoxide Dismutase-rich Bacteria, Paradoxical increase in oxidant toxicity. The Journal of Biological Chemestry. **262**: 3640-3645

**Sreekrishna, K. y Kropp, K.E.** *Pichia pastoris*. En: Wolf K. Nonconventional Yeast in Biotechnology. Springer-Verlag N.Y. pp 203-250.

**Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wiershke, J.D., Subramaniaam, A., Birkenberger, L.A.** 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Gene. **190**:55-62.

**Sreekrishna, et al** 1989. In. Current Protocols in Protein Science. 1995 by John Wiley & Sons, Inc. Unit 5.7

**Sudbery, P.E**. 1996. The expression of recombinant proteins in yeast. Curr. Opin. Biotechnol. **7**:517-524.

**Trevan, M.D., Boffey, S., Goulding, K.H. and Stanbury, P.** 1991. *Biotecnología: Principios Biológicos*. Acribia, S.A. 1era. Ed. Zaragoza (España). 284 p.

**Tschopp, et al** 1987. In. Current Protocols in Protein Science. 1995 by John Wiley & Sons, Inc. Unit 5.7

**Uchimura K., Nagasaka A., Hayashi R., Makino M., Nagata M., Kakizawa H., Kobayashi T., Fujiwara K., Kato, T., Iwase, K., Shinohara, R., Kato, K., Itoh,M.** 1999. Changes in superoxide dismutase activities and concentrations and myeloperoxidase activities in leukocytes from patients with diabetes mellitus. J. Diabetes Complications. **13**(5-6):264-270.

**Xiang, H., Wei, W., Tan, H., Guo, S**. 2000. Cloning and expression of human Cu/Zn superoxide dismutase gene in Lactococcus lactis. Sheng Wu Kung Cheng Hsueh Pao. **16**:6-9.

**Yoo, H.Y., Kim, S.S. and Rho, H.M**. 1999. Overexpression and simple purification of human superoxide dismutase (SOD1) in yeast and its resistance to oxidative stress. J. Biotechnol. **68**(1):29-35.

# Apéndice 1.

Determinación de proteínas por el método de Lowry (1951)

Preparación de curva estandar:

| NO. DE TUBO | µG BSA** | µL STD* | µL AGUA |
|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 0 | 200 |
| 2 | 2 | 2 | 198 |
| 3 | 4 | 4 | 196 |
| 4 | 6 | 6 | 194 |
| 5 | 8 | 8 | 192 |
| 6 | 10 | 10 | 190 |
| 7 | 15 | 15 | 185 |
| 8 | 20 | 20 | 180 |

*Concentración en el espectro
** Estandar BSA 1mg/mL.

**Reactivos requeridos para cuantificar proteínas.**

Soluciones stocks

A. $Na_2CO_3$/NaOH 0.2 N 3%

| | |
|---|---|
| $Na_2CO_3$ | 15 gr. |
| NaOH | 4 gr. |
| Agua destilada | 500mL |

B. $CuSO_4$ 2%

| | |
|---|---|
| $CuSO_4$ | 2 gr. |
| Agua destilada | 100mL |

C. Tartrato de Na y K 4%

| | |
|---|---|
| Tartrato de Na y K | 4 gr. |
| Agua destilada | 100mL |

Disolver los reactivos por agitación hasta obtener soluciones cristalinas.

Preparación de las muestras.

Preparar dilución 1:20 de cada muestra, agregar 200 μL de la dilución en cada tubo, para el blanco agregar 200 μL de agua destilada. Preparar la solución D (48 mL. de solución A , 1.0 mL de solución C , 1.0 mL de solución B). Reposar por 10 minutos a temperatura ambiente y agregar 100 μL de reactivo Folin & Ciocalteu`s Phenol. Reposar media hora a temperatura ambiente en la oscuridad y realizar la lectura al espectro en Abs 750 nm

**Reactivos requeridos para electróforesis en gel de poliacrilamida NATIVA-PAGE**

Soluciones stocks

Acrilamida-bisacrilamida 30%

| | |
|---|---|
| Acrilamida | 60 gr. |
| Bisacrilmida | 1.6 gr. |

Disolver en 200 mL de agua destilada. Filtrar con papel wathman No.1 y almacenar a 4°C.

A. 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

| | |
|---|---|
| Tris base | 45.41 gr. |
| Agua destilada | 250 mL |

Ajustar el pH 8.8 con HCl.

B. 0.5M Tris/HCl, pH 6.75

| | |
|---|---|
| Tris base | 15.13 gr. |
| Agua destilada | 250 mL |

Ajustar el pH 6.75 con HCl

C. Tampón de corrimiento (5X)

| | |
|---|---|
| Tris base | 6.05 gr. |
| Glicina | 28.5 gr. |
| Agua destilada | 1000 mL |

Ajustar el pH a 8.3 con HCl. Mezclar 100 mL de buffer 5X con 400 mL de agua destilada para tener una concentración 1X

D. Tampón de carga

| | |
|---|---|
| Tris/HCl 0.5 M | 5 mL |
| Glicerol | 4 mL |
| Azul de bromofenol | 500µL |

E. Persulfato de Amonio 10 %

F. N,N,N,N,-Tetramethylethlenediamine (TEMED)

Preparación del gel de corrimiento y empaquetamiento.

| | 7.5% corrimiento | 4% empaquetamiento |
|---|---|---|
| Acrilamida/bis | 2.5 mL | 1.3 mL |
| Buffer 8.8 | 2.5 mL | |
| Buffer 6.8 | | 2.5 mL |
| H2O destilada | 4.5 mL | 6.1 mL |
| PSA 10 % | 100 µL | 100µL |
| TEMED | 10µL | 10µL |
| Total del monómero | 10 mL | 10 mL |

Preparación de geles para electroforesis SDS-PAGE

| | 15% corrimiento | 4% empaquetamiento |
|---|---|---|
| Acrilamida/bis 30% | 5.0 mL | 1.7 mL |
| Buffer 8.8 | 2.5 mL | |
| Buffer 6.8 | | 1.25 mL |
| SDS 10% | 100µL | 100 µL |
| H2O destilada | 2.3 mL | 6.8 mL |
| PSA 10 % | 100 µL | 100µL |
| TEMED | 4 µL | 10µL |
| Total del monómero | 10 mL | 10 mL |

**Preparación de solución para evidenciar actividad enzimática (Manchenko, 1994).**

**Superóxido Dismutasa (SOD)**

Soluciones stocks (10X)

| | |
|---|---|
| EDTA | 0.066 gr. |
| Metionina | 3.8 gr. |
| NBT | 0.12 gr. |
| Rivoflavina | 0.014 gr. |
| Buffer de fosfatos 50 mM pH 7.8 | 400 mL |

Disolver cada reactivo en 100 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.8

Mezclar 5 mL de cada solución stock en una botella ambar, vertir sobre el gel y dejar incubar en oscuridad 30 minutos a 10ºC, retirar la solución y enjuagar con agua destilada; para el revelado, colocar el gel bajo una lámpara de luz blanca hasta que el fondo se torne azul violeta y aparezcan bandas claras.

**Medios**

Soluciones stocks.

10X YNB (13.4% base de nitrógeno para levaduras con sulfato de amonio sin aminoácidos).

Disolver 134 gr. de YNB base de nitrógeno para levaduras con sulfato de amonio sin aminoácidos en 1000 mL de agua y esterilizar por filtración. Calentar la solución para disolver completamente el YNB en agua. Almacenar a 4ºC.

500X Biotina (Biotina 0.02%): Disolver 20 mg. de biotina en 100 mL de agua y esterilizar por filtración. Almacenar a 4ºC. La vida útil de esta solución es aproximadamente un año.

100X Histidina (0.4% Histidina): Disolver 400 mg. de L-histidina en 100 mL de agua. Calentar la solución si es necesario a una temperatura no mayor de 50°C. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. La vida útil de esta solución es aproximadamente un año.

10X Dextrosa (20% Dextrosa): Disolver 200 gr. de D-glucosa en 1000 mL de agua. Esterilizar en autoclave por 15 min. La vida útil de esta solución es aproximadamente un año.

10X Metanol (5% Metanol): Mezclar 5 mL de metanol con 95 mL de agua. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. La vida útil de esta solución es aproximadamente dos meses.

10X Glicerol (10% Glicerol): Mezclar 100 mL de glicerol con 900 mL de agua. Esterilizar por filtración o autoclave. Almacenar a temperatura ambiente. La vida útil de esta solución es mas de una año.

1M Buffer de Fosfato de Potasio, pH 6.0

Combinar 132 mL de 1M $K_2HPO_4$, 868 mL de 1M $KH_2PO_4$ y confirmar que el pH este en 6.0 $\pm$ 1( si s necesario ajustar el pH, usar ácido fosfórico o KOH). Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente. La vida útil de esta solución es mas de un año.

Medios usados por *Pichia*

| **Medio** | **Descripción** | **Aplicación** |
|---|---|---|
| YPD o YEPD | Medio complejo y rico | Crecimiento general y almacenaje |
| YPDS+Zeocina | YPD con sorbitol y Zeocina | Selección de transformantes Pichia $Zeo^R$ |
| MGYH | Medio mínimo conteniendo glicerol e histidina | Expresión intracelular: Generación de biomasa previo a inducción con metanol |
| MDH | Medio mínimo conteniendo glucosa e histidina | Determinación de fenotipo Mut |
| MMH | Medio mínimo conteniendo metanol e histidina | Determinación de fenotipo Mut. Expresión intracelular de proteína deseada. |
| BMW | Medio mínimo amortiguado conteniendo glicerol e histidina | Expresión secretada: Usado para el control de pH en el medio y generar biomasa. |
| BM | Medio mínimo amortiguado conteniendo metanol e histidina | Expresión secretada: usado para controlas pH del medio e inducir la expresión de la proteína deseada. |
| BMGY | Medio complejo amortiguado conteniendo glicerol | Expresión secretada: Control de pH en el medio, disminuye la actividad de proteasas y genera biomasa |
| BMMY | Medio complejo amortiguado conteniendo metanol | Expresión secretada: Control de pH en el medio, disminuye la actividad de proteasas e induce la expresión. |

**YPD o YEPD Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa (1 Lt)**

1% de extracto de levadura

2% peptona

2% dextrosa

Disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 mL de agua. Nota: Agregar 20 g de agar si se desea hacer placas. Esterilizar en autoclave por 20 min. y adicionar 100 mL de stock 10 X dextrosa.

El medio liquido es almacenado a temperatura ambiente y las placas a 4ºC.

**YPD + Zeocina.**

1% de extracto de levadura

2% peptona

2% dextrosa

± 2% de agar

± 100 μg/mL de Zeocina

Disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 mL de agua. Nota: Agregar 20 g de agar si se desea hacer placas. Esterilizar en autoclave por 20 min., enfriar aproximadamente a 60ºC y adicionar 100 mL de stock 10 X dextrosa y 1 mL de100 mg/mL de Zeocina.

El medio líquido con zeocina se almacena a 4ºC en la oscuridad. Su vida útil es de una a dos semanas.

**Agar YPDS+ Zeocina**

1% de extracto de levadura

2% peptona

2% dextrosa

1M de sorbitol

2 % de agar

100 μg/mL de Zeocina

Disolver 10 g de extracto de levadura, 182.2 g de sorbitol y 20 g de peptona en 900 mL de agua. Agregar 20 g de agar. Esterilizar en autoclave por 20 min., enfriar aproximadamente a 60°C y adicionar 100 mL de stock 10 X dextrosa y 1 mL de Zeocina 100mg/mL..

Almacenar las placas conteniendo Zeocina a 4°C en la oscuridad. La vida útil es de una a dos semanas.

**MGYH Medio mínimo de glicerol mas histidina (1 lt)**

1.34% YNB

1% glicerol

$4 \times 10^{-5}$ % de biotina

± 0.004 % histidina

Combinar asépticamente 800 mL de agua estéril con 100 mL de 10X YNB, 2 mL de 500X de biotina, 100 mL de glicerol y 10 mL de 100X histidina. Almacenar a 4°C. La vida útil de esta solución es aproximadamente dos meses.

**MDH Medio Mínimo Dextrosa mas Histidina**

1.34% YNB

2 % dextrosa

$4 \times 10^{-5}$ % de biotina

± 0.004 % histidina

1.5 % de agar

Combinar asépticamente 800 mL de agua estéril mas agar con 100 mL de 10X YNB, 2 mL de 500X de biotina, 100 mL de 10X dextrosa y 10 mL de 100X histidina. Después de mezclar vaciar las placas inmediatamente. Almacenar a 4ºC durante varios meses.

**MMH Medio Mínimo de Metanol mas Histidina (1 lt)**

1.34% YNB

0.5 % Metanol

4 x $10^{-5}$ % de biotina

± 0.004 % histidina

1.5 % de agar

Combinar asépticamente 800 mL de agua estéril mas agar con 100 mL de 10X YNB, 2 mL de 500X de biotina, 100 mL de 10X Metanol y 10 mL de 100X histidina. Después de mezclar vaciar las placas inmediatamente. Almacenar a 4ºC durante varios meses.

**BMGH y Medio Mínimo de Glicerol**

**BMMH Medio Mínimo de Metanol (1lt)**

100 mM de fosfato de potasio, pH 6.0

1.34% YNB

1 % de glicerol o 0.5 % Metanol

4 x $10^{-5}$ % de biotina

± 0.004 % histidina

Esterilizar en autoclave 690 mL de agua por 20 min. Enfriar a temperatura ambiente, adicionar 100 mL de fosfato de potasio, 100 mL de 10X YNB, 2 mL de 500X de biotina, 100 mL de 10X Glicerol, para BMMH, agregar 100 mL de 10X Metanol en lugar de glicerol, y 10 mL de 100X histidina. Mezclar y almacenar a 4 °C. La vida útil del medio es de aproximadamente dos meses.

**BMGY y Medio Complejo con glicerol**

**BMMY Medio Complejo con Metanol (1lt)**

1 % Extracto de Levadura

2% Peptona

100 mM de fosfato de potasio, pH 6.0

1.34% YNB

1 % de glicerol o 0.5 % Metanol

$4 \times 10^{-5}$ % de biotina

± 0.004 % histidina

Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona en 700 mL de agua. Esterilizar en autoclave por 20 minutos. Enfriar a temperatura ambiente, adicionar 100 mL de fosfato de potasio, 100 mL de 10X YNB, 2 mL de 500X de biotina, 100 mL de 10X Glicerol, para BMMH, agregar 100 mL de 10X Metanol en lugar de glicerol, y 10 mL de 100X histidina. Mezclar y almacenar a 4 °C. La vida útil del medio es de aproximadamente dos meses.

**Buffer de rompimiento**

50 mM de fosfato de sodio, pH 7.4

1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)

1 mM EDTA

5 % de Glicerol

Preparar la solución stock de el inhibidor de proteasa, siguiendo recomendaciones del fabricante.

Para un litro disolver lo siguiente en 900 mL de agua deionizada. 6 g de fosfato de sodio monobásico, 372 mg. de EDTA, 50 mL de glicerol. Utilizar NaOH para ajustar el pH y llevar a un volumen final de 1 Lt. Almacenar a 4 °C. Antes de ser usado adicionar el inhibidor de proteasa.

**YNB Base de Nitrógeno para Levaduras sin aminoácidos. (1lt)**

Fuente de nitrógeno: 5 g de sulfato de amonio

Vitaminas: 2μg de biotina, 400μg pnatotenato de calcio, 2μg de Ácido Fólico, 2000μg de Inositol, 400μg de Niacina, 200 μg Ácido aminobenzoico, 400 μg Hidroclorato de Piridoxina, 200 μg Rivoflavina, 400μg hidroclorato de Tiamina.

Compuestos agregados como elementos trazas: 500μg de Ácido Bórico, 40μg de Sulfato de cobre, 100μg de Ioduro de Potasio, 200μg Cloruro férrico, 400μg Sulfato de manganeso, 200μg Molibdato de sodio y 400μg de sulfato de Zinc.

Sales: 1 g de fosfato de potasio monobásico, 0.5 g de sulfato de magnesio, 0.1 g cloruro de sodio y 0.1 g cloruro de calcio. Se esteriliza por filtración .

**Medio SOB (1 Lt)**

20 g de Triptona

5 g de Extracto de Levadura

0.5 g de NaCl

10 mL de KCl 250 mM

Mezclar en 900 mL de agua. Ajustar a un pH de 7.0, llevar a un volumen final de 990 mL. Esterilizar por autoclave y enfriar a temperatura ambiente, y agregar 10 mL de una solución estéril de $MgCl_2$ 1 M antes de usarse. Para placas de agar agregar en el primer paso 20 g de agar.

**Medio SOC (1 Lt)**

Adicionar al medio SOB, 20 mL de una solución estéril de glucosa 1M por litro de medio.

**Soluciones utilizadas para preparar las células competentes de *Pichia* y transformar. (The *Pichia* EasyComp™Comp)**

| COMPONENTE | DESCRIPCIÓN |
|---|---|
| Solución I | Solución de sorbitol, conteniendo etilenglicol y DMSO para la preparación de células competentes. |
| Solución II | Polietilenglicol para la transformación de células competentes |
| Solución III | Solución de sales para lavado y plaqueo de células transformadas. |

# Apéndice 2. Secuencia de bases nucleotidicas y aminoácidos de *dh sod-1*

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AGA | ATT | CCG | CTT | ATG | GTG | CAG | GCG | GTG | GCG | GTG | TAA | AGA | GGT | GAT | TCT | AAG | GTT | AGC | GGT |
| | | | | M | V | Q | A | V | A | V | L | R | G | D | S | K | V | S | G |
| | | | | | | | | | | | | | 10 | | | | | | |
| GTC | GTT | AAC | TTC | GAA | CAA | TCG | TCA | GAG | TCT | GAC | CCA | ACT | ACT | ATT | ACA | TGG | GAG | ATT | TCT |
| V | V | N | F | E | Q | S | S | E | S | D | P | T | T | I | T | W | E | I | S |
| | | | 20 | | | | | | | | | | 30 | | | | | | |
| GGT | AAT | GAT | GCT | AAT | GCT | TTA | AGA | GGT | TTC | CAC | GTC | CAC | ACA | TTT | GGT | GAT | AAC | ACC | AAC |
| G | N | D | A | N | A | L | R | G | F | H | V | H | T | F | G | D | N | T | N |
| | | | 40 | | | | | | | ↑ | | ↑ | 50 | | | | | | |
| GGT | TGT | ACT | TCT | GCT | GGA | CCT | CAC | TTC | AAC | CCG | TTC | ACA | AAG | GAA | CAT | GGT | GCT | CCA | GAA |
| G | C | T | S | A | G | P | H | F | N | P | F | T | K | E | H | G | A | P | E |
| | ↑ | | 60 | | | | ↑ | | | | | | 70 | | ↑ | | | | |
| GAC | GAT | AAC | AGA | CAT | GTC | GGT | GAT | TTA | GGT | AAC | GTT | ACA | ACT | GAT | ACT | TCT | GGT | GTT | GCT |
| D | D | N | R | H | V | G | D | L | G | N | V | T | T | D | T | S | G | V | A |
| | | | 80 | ↑ | | | ↑ | | | | | | 90 | | | | | | |
| AAG | GGT | TCT | AAA | CAA | GAC | TTA | TTC | GCT | AAG | TTA | ATC | GGT | CAA | AAT | TCC | ATT | TTA | GGT | AGA |
| K | G | S | K | Q | D | L | F | V | K | L | I | G | Q | N | S | I | L | G | R |
| | | | 100 | | | | | | | | | | 110 | | | | | | |
| ACT | GTT | GTT | ATT | CAC | GCC | GGT | ACC | GAC | GAT | TTA | GGT | AAG | GGT | GGT | AAT | GCT | GAA | TCT | AAG |
| T | V | V | I | H | A | G | T | D | D | L | G | K | G | G | N | A | E | S | K |
| | | | 120 | ↑ | | | | | | | | | 130 | | | | | | |
| AAG | ACC | GGT | AAC | GCT | GGT | GCT | AGA | CTA | GCC | TGT | GGC | GTC | ATC | GGC | CTC | ACC | AAC | TAA | AGC |
| K | T | G | N | A | G | A | R | L | A | C | G | V | I | G | L | T | N | * | |
| | | | 140 | | | | ↑ | | | ↑ | | | 150 | | | | | | |
| CGA | ATT | CCA | | | | | | | | | | | | | | | | | |

# Apéndice 3. Diagramas de Flujo de la Metodologia

## Selección de la versión del vector de expresión

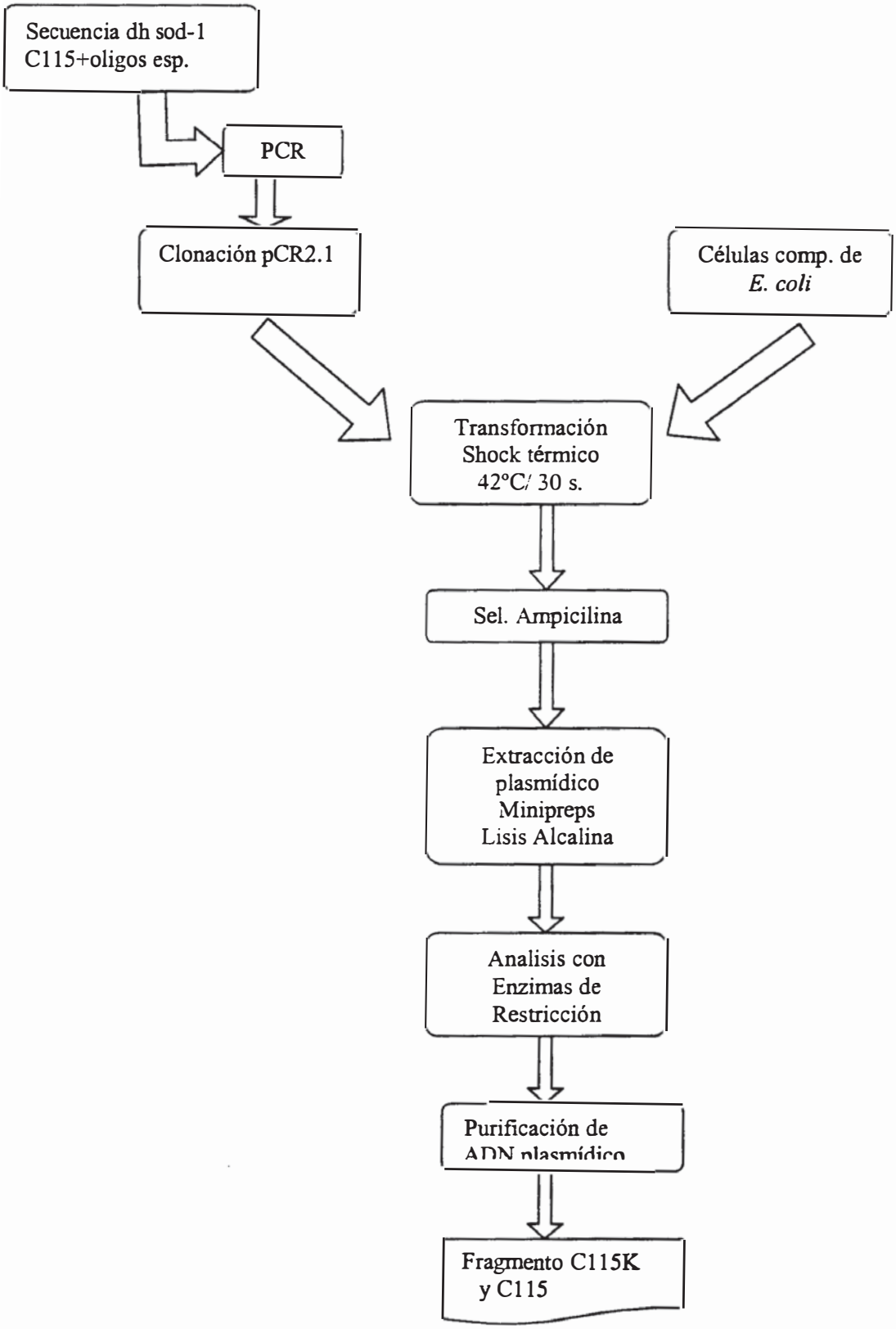
TC TGC AG**A** ATT CGG CTT **ATG** GTG CAG GC
AG ACG TCT **TAA** GCC GAA TAC CAC GTC CG

R I R L M V Q A

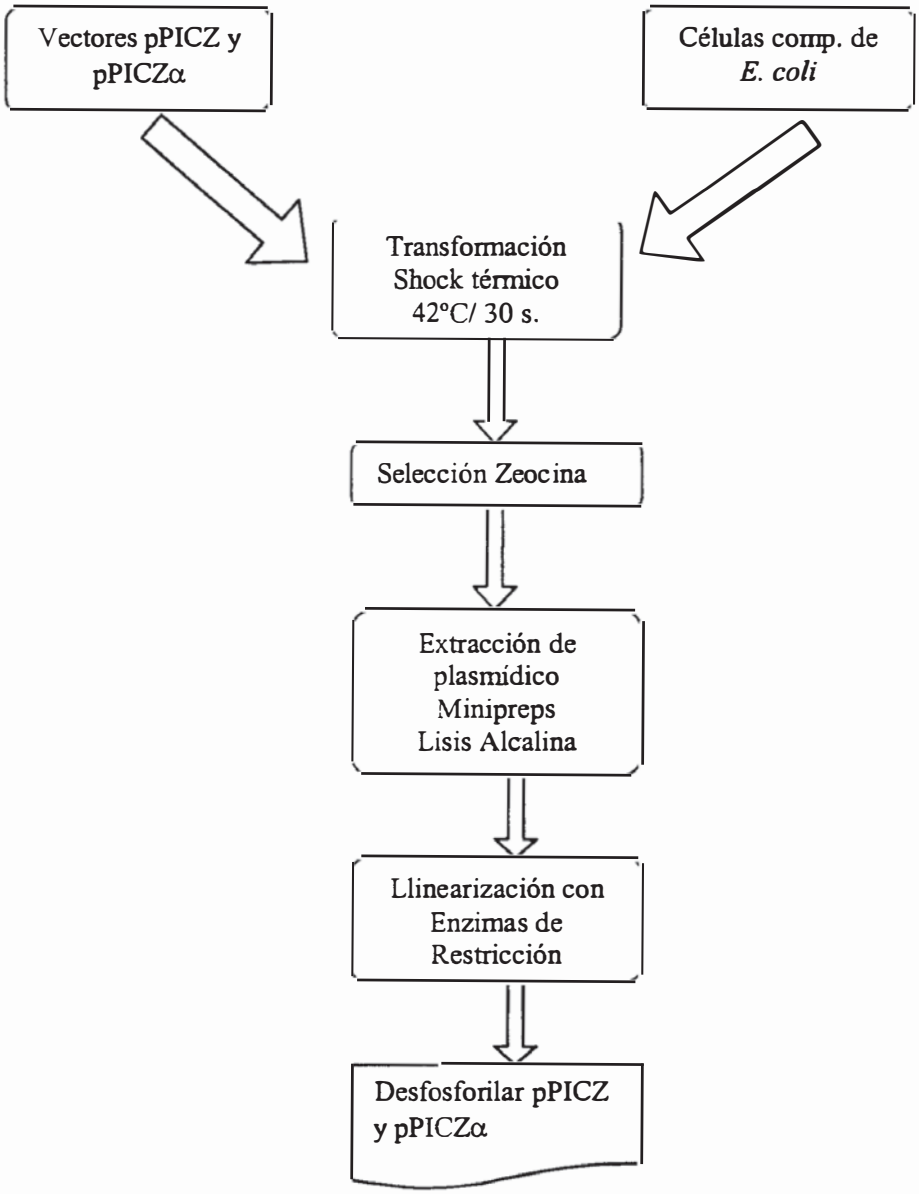
Inicio de secuencia *dh sod-1*

Se realizó la selección de la versión de los vectorespPICZ (a, b ó c) y pPICZα(a, b ó c), que permitirá a la secuencia *dh sod-1* quedar en un correcto marco de lectura. La versión seleccionada fué C en ambos.

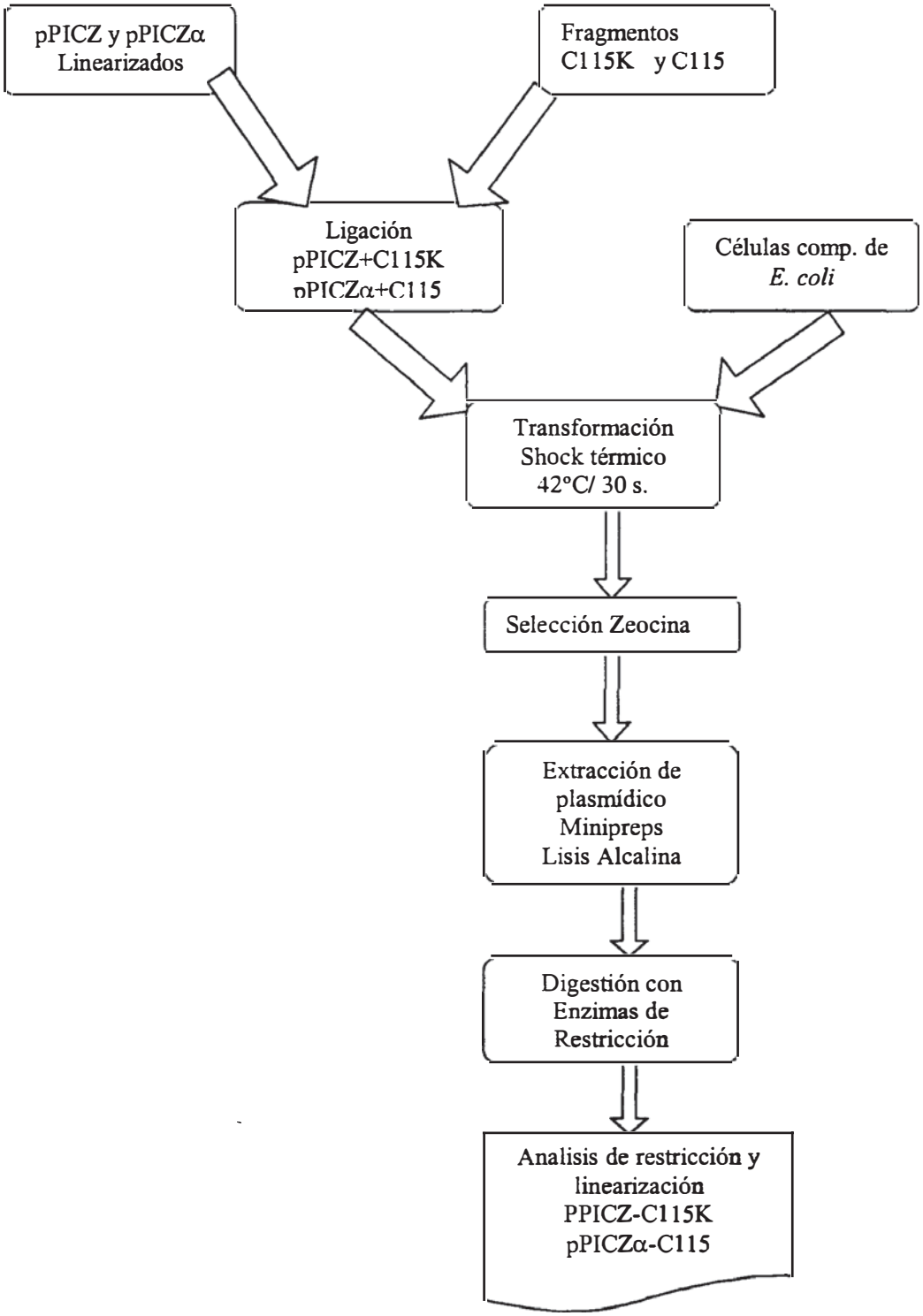
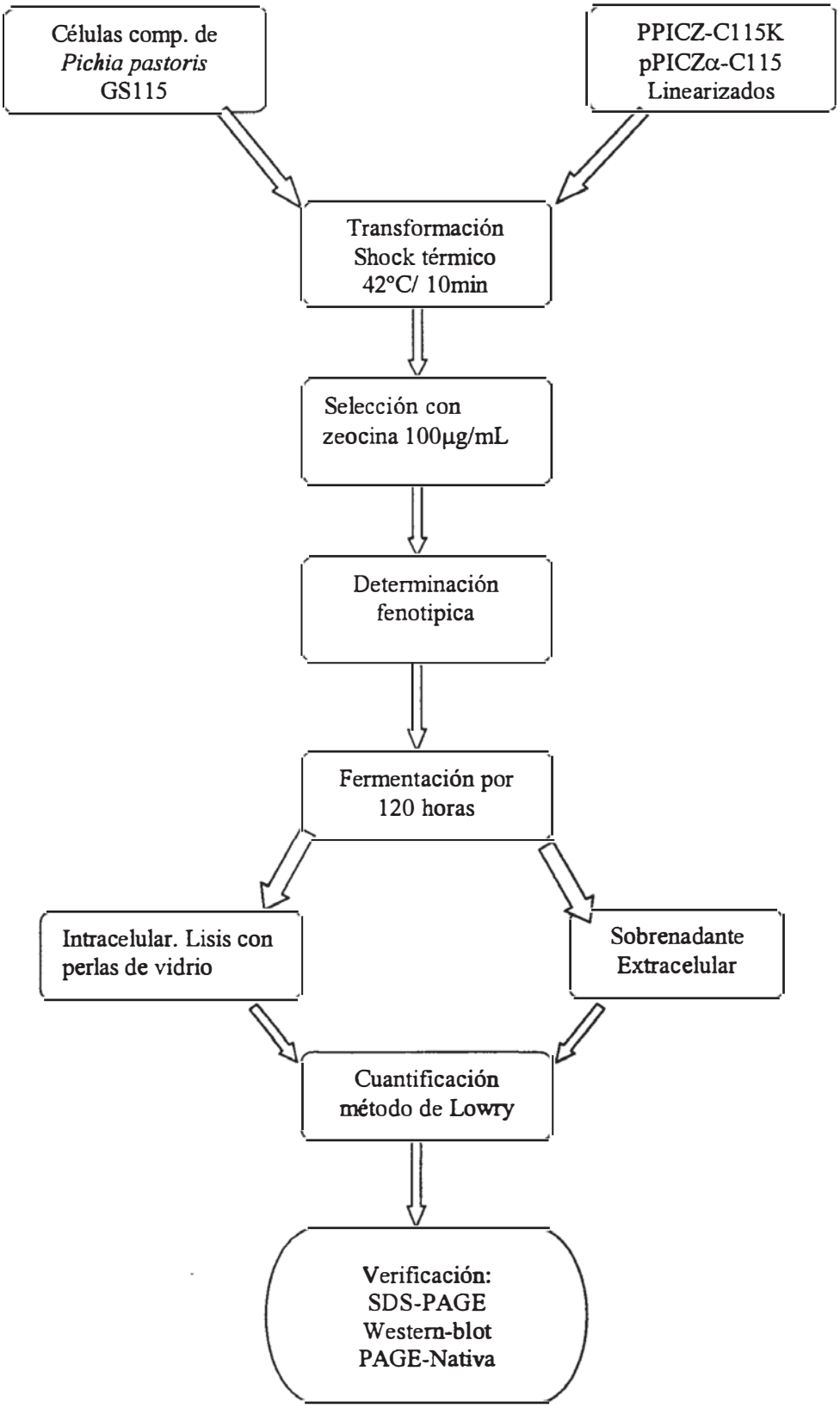
# Subclonación 1era Etapa
# Integración de la caja de Kozac



# Subclonación 2da. Etapa
# Linearización de los vectores pPICZ y pPICZα



# Subclonación 3era Etapa.
# Construcción pPICZ y pPICZα (ADN recombinante)



# Expresión de Cu,Zn recombinante