

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRES  
HEXOSAMINIDASAS LISOSOMALES RECOMBINANTES EN *Pichia pastoris***

**ANGELA JOHANA ESPEJO MOJICA**

**Bogotá, D.C. Colombia**

**2016**

**PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRES  
HEXOSAMINIDASAS LISOSOMALES RECOMBINANTES EN *Pichia pastoris***

**ANGELA JOHANA ESPEJO MOJICA**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Área**

**ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO**

**Director**

**LUIS ALEJANDRO BARRERA AVELLANEDA Ph.D**

**Codirector**

**CARLOS JAVIER ALMÉCIGA DÍAZ Ph.D**

**INSTITUTO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
BOGOTA, D.C., COLOMBIA  
2016**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

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

Artículo 23, resolución No. 13 de 1946

**PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRES  
HEXOSAMINIDASAS LISOSOMALES RECOMBINANTES EN *Pichia pastoris***

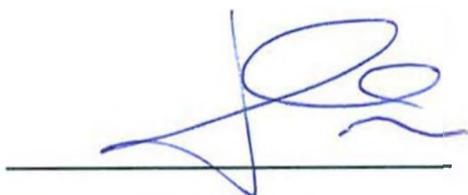
**APROBADA**



**LUIS ALEJANDRO BARRERA A., Ph.D**  
Director



**CARLOS JAVIER ALMÉCIGA DÍAZ, Ph.D**  
Codirector



**LAURA GORT, Ph.D.**  
Jurado



**FRANCISCO VALERO, Ph.D.**  
Jurado



**FABIÁN ARISTIZÁBAL, Q.F., Ph.D.**  
Jurado



**RAÚL A. POUTOU-PIÑALES, M.Sc, Ph.D.**  
Jurado



**RICARDO VERA, Q., Ph.D.**  
Jurado

**PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE TRES  
HEXOSAMINIDASAS LISOSOMALES RECOMBINANTES EN *Pichia pastoris***

**APROBADA**

---

CONCEPCIÓN PUERTA BULA , Bact. Ph.D.  
Decana  
Facultad de Ciencias

---

ALBA ALICIA TRESPALACIOS, MSc. Ph.D.  
Directora Posgrado  
Facultad de Ciencias

## DEDICATORIA

*A Dios porque sin su gracia y fortaleza no habría sido posible seguir adelante.*

*A mis padres por estar siempre a mi lado apoyándome incondicionalmente*

*A mi esposito Diego, porque siempre ha confiado en mí, porque ha sido mi hombro para llorar y mi confidente en todo momento, porque ha estado lleno de paciencia y siempre ha tenido una palabra de aliento*

*A mis hermanos, sobrinos, cuñados y a Aleja por estar siempre presentes.*

*A todos mis compañeros y amigos del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo porque cada uno de ellos de diferente forma contribuyeron en este proceso, ya fuera en lo personal y/o profesional.*

*A Alex por estar siempre dispuesto a colaborar en lo que necesitara.*

*A Javier por darme ánimo y guiarme en el proyecto*

*Al Doctor Barrera por haberme dado la oportunidad de realizar el doctorado en el Instituto.*

*A mis amigas (ausentes y presentes en mi vida), porque me impulsaron a comenzar en este proceso y me motivaron a continuar en él hasta el final*

*A todas las personas que indirectamente me colaboraron en este proceso académico.*

GRACIAS

## AGRADECIMIENTOS

- Al Departamento Administrativo de Ciencia Tecnología e Innovación Colciencias por la financiación del proyecto y por la el apoyo financiero de la Beca de Doctorados Nacionales otorgada en 2010
- A la Pontificia Universidad Javeriana, y la Facultad de Ciencias por el apoyo financiero en proyectos adjuntos al proyecto central
- A la Universidad de Texas A&M, especialmente al Doctor Frank Raushel y al Doctor Laurence Dangott por haberme permitido realizar la pasantía en su laboratorio y haberme colaborado en el desarrollo de algunas pruebas de mi tesis.
- Al Instituto de Errores Innatos del Metabolismo, Laboratorio de Expresión de Proteínas por haberme permitido trabajar en sus instalaciones y usar todos sus equipos.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. GANGLIOSIDOSIS GM2	16
2.1.1. Enfermedad de Tay Sachs	19
2.1.2. Enfermedad de Sandhoff	20
2.1.3. Deficiencia del activador GM2 o variante AB	21
2.1.4. Terapias	22
2.1.4.1. Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE)	23
2.2. B-D-N-ACETILHEXOSAMINIDASAS	25
2.2.1. Hexosaminidasas Lisosomales	27
2.2.1.1. Genes	27
2.2.1.2. Síntesis y estructura	28
2.2.1.3. Hexosaminidasas recombinantes	33
2.3. SISTEMAS DE EXPRESIÓN	33
2.3.1. Levaduras metilotróficas	35
2.3.1.1. Metabolismo de las levaduras metilotróficas	36
2.3.2. <i>Pichia pastoris</i>	36
2.3.2.1. Características generales	36
2.3.2.2. Plegamiento de proteínas en <i>P. pastoris</i>	37
2.3.2.3. Glicosilaciones en <i>Pichia pastoris</i>	38
2.3.2.4. <i>P. pastoris</i> como sistema de expresión	42
2.3.2.5. Condiciones de cultivo para <i>P. pastoris</i> bajo el promotor AOX	46
3. OBJETIVOS	48
3.1. OBJETIVO GENERAL	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. MATERIALES Y MÉTODOS	49
4.1. CEPAS Y VECTORES UTILIZADOS	49
4.2. ELABORACIÓN DE CONSTRUCTOS	50
4.2.1. Optimización de los genes	50
4.2.2. Construcción de los vectores de expresión	50
4.2.3. Transformación de microorganismos	52
4.2.3.1. <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	52
4.2.3.2. <i>Pichia pastoris</i> GS115	52
4.2.4. Confirmación por PCR	53
4.2.4.1. Extracción de ADN genómico	53
4.2.4.2. Determinación de fenotipo por PCR	54
4.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES	55
4.3.1. Escalas de 10 y 100 mL. Tamizaje de clones	55
4.3.2. Escala de biorreactor 1,65 L	55
4.4. PURIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE PROTEÍNA	56
4.5. ANÁLISIS PARA EL SEGUIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	57
4.5.1. Seguimiento y caracterización de las proteínas recombinantes	57
4.5.1.1. Determinación de la densidad celular	57
4.5.1.2. Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinconínico (BCA)	57
4.5.1.3. Determinación de Actividad Enzimática	57
4.5.1.4. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE	58

4.5.1.5.	Evaluación de interacciones ante diferentes agentes desnaturalizantes -----	58
4.5.1.6.	Western-blot -----	59
4.5.1.7.	Secuenciación de aminoácidos -----	59
4.5.1.8.	Análisis de proteínas por digestión de fragmentos trípticos por MALDI-TOF --	59
4.5.1.9.	Cinética enzimática -----	60
4.6.	<b>EFFECTO DE PH Y TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD ENZIMÁTICA DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES -----</b>	<b>61</b>
4.6.1.	Efecto del pH-----	61
4.6.2.	Efecto de la temperatura -----	61
4.6.3.	Efecto de incubación en suero humano -----	61
4.7.	<b>EVALUACIÓN DE CAPTURA CELULAR UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES PURIFICADAS -----</b>	<b>62</b>
4.7.1.	Evaluación de endocitosis de las enzimas recombinantes -----	62
4.7.2.	Evaluación de la entrada por receptores manosa y manosa-6-fosfato (M6P) -----	62
4.7.3.	Evaluación de tráfico intracelular <i>in-vitro</i> -----	63
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----</b>	<b>64</b>
5.1.	TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA -----	64
5.2.	EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES A 10 ML, 100 ML Y 1,65 L-----	68
5.3.	PROCESOS DE PURIFICACIÓN DE LAS HEXOSAMINIDASAS RECOMBINANTES -----	75
5.4.	CARACTERIZACIÓN DE LAS HEXOSAMINIDASAS RECOMBINANTES-----	79
5.4.1.	Caracterización por peso molecular-----	79
5.4.2.	Caracterización por estabilidad a diferentes condiciones-----	88
5.5.	CAPTURA CELULAR DE HEXOSAMINIDASAS RECOMBINANTES-----	95
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES -----</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES -----</b>	<b>105</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS-----</b>	<b>106</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXO -----</b>	<b>115</b>
9.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO RHHEX-A: -----	115
9.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO RHHEX-B: -----	118
9.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO RHHEX-S: -----	121
<b>10.</b>	<b>PRODUCTOS ACADÉMICOS GENERADOS DURANTE LA FORMACIÓN DOCTORAL -----</b>	<b>124</b>
10.1.	ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ORIGINALES -----	124
10.2.	PRESENTACIONES EN CONGRESOS-----	125

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del gangliósido GM2 .....	16
Figura 2. Cadena de degradación de algunos esfingolípidos en el lisosoma de la célula.	17
Figura 3. Manifestaciones y principales síntomas de gangliosiosis GM2. ....	21
Figura 4. Mecanismo catalítico de las N-acetilhexosaminidasas. ....	26
Figura 5. $\beta$ -Hexosaminidasas. ....	28
Figura 6. Procesamiento de las subunidades $\alpha$ y $\beta$ . ....	30
Figura 7. Estructura de la Hexosaminidasa B (Hex-B). ....	32
Figura 8. Estructura de la Hexosaminidasa A (Hex-A). ....	34
Figura 9. Metabolismo del metanol .....	37
Figura 10. Vías de glicosilación en humanos y levaduras .....	41
Figura 11. Mapa del plásmido pPIC9K. ....	49
Figura 12. Plásmidos enviados por Geneart, .....	51
Figura 13. Constructos. ....	65
Figura 14. Verificación constructos pPIC9k-alpha y pPIC9k-beta por análisis de restricción .....	66
Figura 15. Verificación de inserción de genes por PCR. ....	67
Figura 16. Determinación del fenotipo por PCR. ....	67
Figura 17. Evaluación de la expresión clones a 10 mL. ....	69
Figura 18. Expresión de las proteínas rhHexA, rhHexB, y rh HexS a escala de 100 mL. .	70
Figura 19. Evaluación del efecto de las concentraciones de glicerol y metanol en cultivos a escala de bioreactor (1,65 L). ....	72
Figura 20. Producción de $\beta$ -hexosaminidasas a escala de biorreactor (1,65 L). ....	75
Figura 21. Evaluación del perfil de purificación de rhHex-A empleando dos columnas de intercambio aniónico Q-sefarosa o DEAE. ....	78
Figura 22. Purificación rhHex-A por DEAE sepharosa. A. ....	80
Figura 23. Electroforesis de $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes purificadas. ....	81
Figura 24. Evaluación de las interacciones entre las subunidades de las enzimas recombinantes. ....	82
Figura 25. Western blot rhHexosaminidasas. ....	83
Figura 26. Análisis de huella peptídica de las proteínas purificadas por MALDI-TOF. ....	85
Figura 27. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las hexosaminidasas .....	89
Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las hexosaminidasas .....	91
Figura 29. Efecto de 45 y 52°C sobre las hexosaminidasas recombinantes. ....	93
Figura 30. Estabilidad de las hexosaminidasas recombinantes en suero humano normal. ....	94
Figura 31 Evaluación de captura celular de las hexosaminidasas recombinantes. ....	97
Figura 32. Evaluación de la captura celular a 4 y 37°C. ....	98
Figura 33. Evaluación de la entrada por receptores manosa y manosa-6-fosfato (M6P). 100	
Figura 34. Captura celular y relocalización de la enzima recombinante en células HEK293 .....	102

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características genéticas de Gangliosidosis GM2 y las $\beta$ -hexosaminidasas. ....	18
Tabla 2. Opciones de terapia para diferentes glicosfingolipidosis. ....	24
Tabla 3. Comparación entre diferentes sistemas de expresión. ....	35
Tabla 4. Algunos promotores inducibles y constitutivos de <i>Pichia pastoris</i> para la producción de proteínas recombinantes .....	44
Tabla 5. Ligación de los genes <i>HEXA</i> o <i>HEXB</i> con el vector pPIC9K. ....	52
Tabla 6. Componentes PCR confirmación inserción de genes alfa y beta .....	54
Tabla 7. Componentes PCR determinación de fenotipo.....	54
Tabla 8. Purificación de las rhHexosaminidasas producidas en <i>Pichia pastoris</i> .....	77
Tabla 9. Alineamientos realizados por pBLAST. ....	86
Tabla 10. Descripción de péptidos representativos de los dominios de la familia GH20 ..	87
Tabla 11. Identificación de fragmentos trípticos Vs epitope de anticuerpos. ....	87
Tabla 12. Datos de cinética Km y Vmax de las tres hexosaminidasas recombinantes .....	88

## RESUMEN

La deficiencia o alteración de una proteína homopolimérica o heteropolimérica en el organismo puede causar una de cientos de enfermedades monogénicas conocidas. Las N-acetilhexosaminidasas, lisosomales, son un grupo de enzimas poliméricas formadas por subunidades codificadas por genes diferentes *HEXA* y *HEXB* formando tres isoenzimas diferentes: un heteropolímero HexA ( $\alpha\beta$ ), y dos homopolímeros HexB y HexS ( $\beta\beta$  y  $\alpha\alpha$  respectivamente). Tay Sachs y Sandhoff, o gangliosidosis GM2, son producidas por la alteración en la actividad de Hex-A o Hex-B respectivamente. Hasta el momento estos trastornos lisosomales no tienen una terapia aprobada, sin embargo, la terapia de reemplazo enzimático (TRE) se ha venido estudiando como una posible alternativa viable para este tipo de enfermedades. A la fecha las enzimas aprobadas para TRE han sido enzimas coexpresadas a partir de un solo gen, y han sido obtenidas generalmente en células de mamífero. Sistemas de expresión como los microorganismos han sido evaluados debido a su facilidad de cultivo, su mayor rendimiento de producción y su costo relativamente menor al que genera la producción de enzimas recombinantes en células de mamífero con fines terapéuticos. Las levaduras tienen la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales semejantes a las humanas, una ventaja que se debe tener en cuenta para cumplir con los requerimientos mínimos necesarios de pureza y funcionalidad biológica de una enzima nativa. En este estudio las enzimas Hex-A, Hex-B y Hex-S fueron producidas en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, empleando genes optimizados para su expresión. El péptido señal nativo fue retirado, y se mantuvo la señal de secreción ( $\alpha$ -Factor) de *Saccharomyces cerevisiae*. Los genes se subclonaron en el plásmido pPIC9K independientemente. La producción de las enzimas recombinantes se evaluó en muestras extracelulares. En cultivos a 1,65 L las actividades específicas más altas fueron 12.624 U mg<sup>-1</sup> para rhHex-A; 10.343 U mg<sup>-1</sup> para rhHex-B y 14.606 U mg<sup>-1</sup> para rhHex-S. Estas enzimas recombinantes mostraron estabilidad al ser incubadas a 4 y 37°C durante 48 horas, a pH entre 4,0 y 5,0 y a incubación en suero humano. Todas las proteínas recombinantes fueron internalizadas por líneas celulares HEK293 y fibroblastos normales en cultivo, posiblemente mediada por diferentes vías endocíticas y por receptores de manosa y manosa-6-fosfato. Fue posible visualizar el tráfico intracelular mediante microscopía confocal. Estos resultados mostraron el potencial tanto de *P. pastoris* GS115 para la producción de proteínas dimericas recombinantes como de las hexosaminidasas lisosomales recombinantes obtenidas en este trabajo como posibles herramientas terapéuticas para ser usadas en TRE.

## ABSTRACT

Deficiency or alteration of homopolymeric or heteropolymeric proteins in the body can cause one of hundreds of monogenic diseases known. The lysosomal, N-acetylhexosaminidases, are a group of proteins encoded by two different genes *HEXA* and *HEXB* forming three different polymeric isoenzymes, one heteropolymer HexA ( $\alpha\beta$ ), and two homopolymers Hex-B and Hex-S ( $\alpha\alpha$  and  $\beta\beta$  respectively). Tay Sachs and Sandhoff, or GM2 gangliosidosis, are caused by alteration in the activity of Hex-A or B respectively. At this moment these lysosomal disorders have not approved therapy, however, enzyme replacement therapy (ERT) could be an available alternative that has been studied for these diseases. To date enzymes approved for TRE have been co-expressed from a single gene, and have generally been obtained in mammalian cells. Other expression systems such as microorganisms have been evaluated because are easy to manipulate and growth, have higher production yields, and are relatively cheaper than mammalian cells production of therapeutic proteins. Yeasts have the ability to perform posttranslational human-like modifications, which are an advantageous to meet the minimum requirements of purity and biological function of the native enzyme. In this study, Hex-A, Hex -B and Hex-S enzymes were produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using optimized expression genes. The native signal peptide was removed, and had secretion signal ( $\alpha$ -factor) of *Saccharomyces cerevisiae*. The genes were sub-cloned into plasmid pPIC9K independently. The production of recombinant enzymes was evaluated in extracellular samples. The highest specific activities obtained from cultures at 1.65 L were 12,624 U mg<sup>-1</sup> rhHex-A; 10,343 U mg<sup>-1</sup> rhHex-B and 14,606 U mg<sup>-1</sup> rhHex-S. These recombinant enzymes showed stability at 4 and 37°C during 48 h of incubation, at pH between 4,0 and 5,0 and incubation in human serum. All recombinant proteins were internalized by cultured cells, HEK293 and normal fibroblasts, possibly mediated by endocytic pathways and different mannose and mannose 6-phosphate receptors. It was possible to visualize intracellular trafficking by confocal microscopy. These results show the potential of *P. pastoris* GS115 for producing recombinant dimeric proteins and the potential of recombinant hexosaminidases as therapeutic tools for use in ERT.

## 1. INTRODUCCIÓN

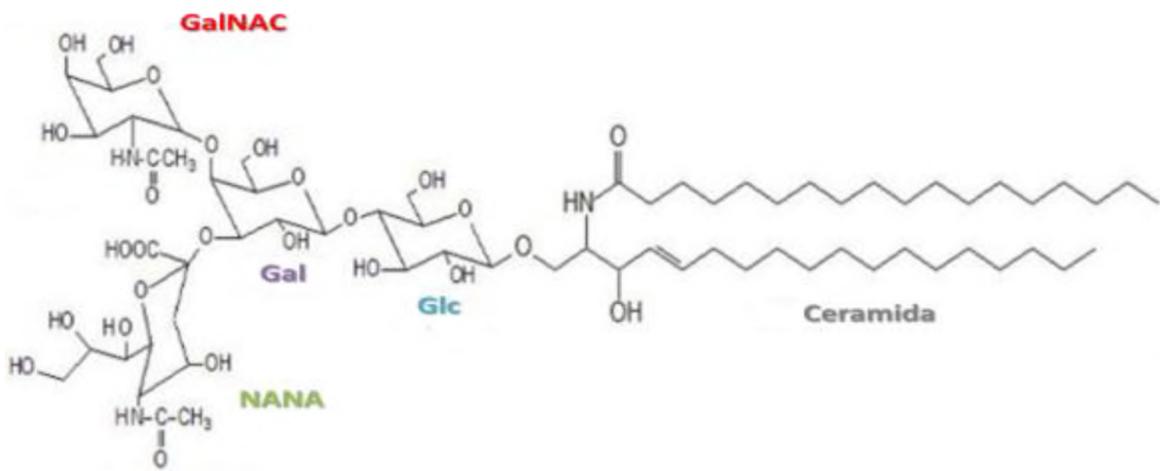
Los errores innatos del metabolismo (EIM) son enfermedades monogénicas causadas por un defecto o mutación en un gen que codifica para una proteína específica. Estas mutaciones generan pérdida de actividad biológica de las enzimas haciendo que se acumulen a nivel celular metabolitos que causan cambios físicos en los pacientes. Tay Sachs y Sandhoff son dos desórdenes de depósito lisosomal, en los cuales la mutación de uno de los genes (*HEXA* o *HEXB*) que codifica para las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  de las hexosaminidasas lisosomales Hex-A y Hex-B, causa la acumulación de gangliósidos en los lisosomas de las células principalmente del sistema nervioso central. Los síntomas relacionados con estas enfermedades incluyen distonía progresiva, degeneración espinocerebral, afeción neuromotora o psicosis. El resultado del mal funcionamiento neuronal y degeneración conduce a convulsiones, ceguera, pérdida de todas las habilidades intelectuales y cognitivas entre otras. Para el tratamiento de este tipo de enfermedades se ha considerado el uso de la Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE) como alternativa terapéutica. La TRE ya ha sido aprobada y empleada en desórdenes como Gaucher, Hunter, Hurler, Fabry, entre otros. Sin embargo, las proteínas utilizadas para la mayoría de estas enfermedades han sido producidas en células de mamífero como sistema de expresión, debido a que las características de la proteína producida son similares a las humanas, siendo una herramienta importante para su uso como proteínas terapéuticas. Sin embargo, en la última década se han venido estudiando y evaluando otros sistemas de expresión como microorganismos, células vegetales y animales, que permitan obtener dichas proteínas heterólogas con niveles de producción más altos, y de ser posible con menores costos de bioproceso. En este trabajo se produjeron de forma recombinante tres enzimas lisosomales humanas rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S, usando la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* GS115 como sistema de expresión. Los genes *HEXA* y *HEXB* fueron optimizados para su expresión en la levadura; su gen nativo fue removido y reemplazado por la señal de secreción ( $\alpha$ -Factor) de *Saccharmyces cerevisiae*, para obtenerla en el medio extracelular. Los genes fueron subclonados independientemente y/o simultáneamente en el plásmido pPIC9K y coexpresados bajo el promotor AOX1 inducible con metanol. La expresión de estos genes permitió la obtención de las tres enzimas lisosomales con actividad enzimática entre 20 a 30 veces superior respecto a los valores de individuos normales medidos en leucocitos. La obtención de estas isoenzimas permitió realizar la caracterización bioquímica y la evaluación de la estabilidad de las enzimas a diferentes condiciones de pH, temperatura y suero humano. Adicionalmente, estas enzimas se usaron para ser evaluadas en procesos de

captura celular usando líneas celulares como HEK293 y fibroblastos humanos. Los resultados mostraron la capacidad de estas enzimas recombinantes de entrar a las células de mamífero, aún cuando es bien sabido que existen diferencias en los patrones de glicosilación con respecto a las humanas. Este proyecto es la primera evidencia de caracterización y evaluación a nivel celular de hexosaminidasas recombinantes producidas en levadura, mostrando el potencial de *P. pastoris* GS115 para la producción de enzimas recombinantes con posibles usos terapéuticos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. GANGLIOSIDOSIS GM2

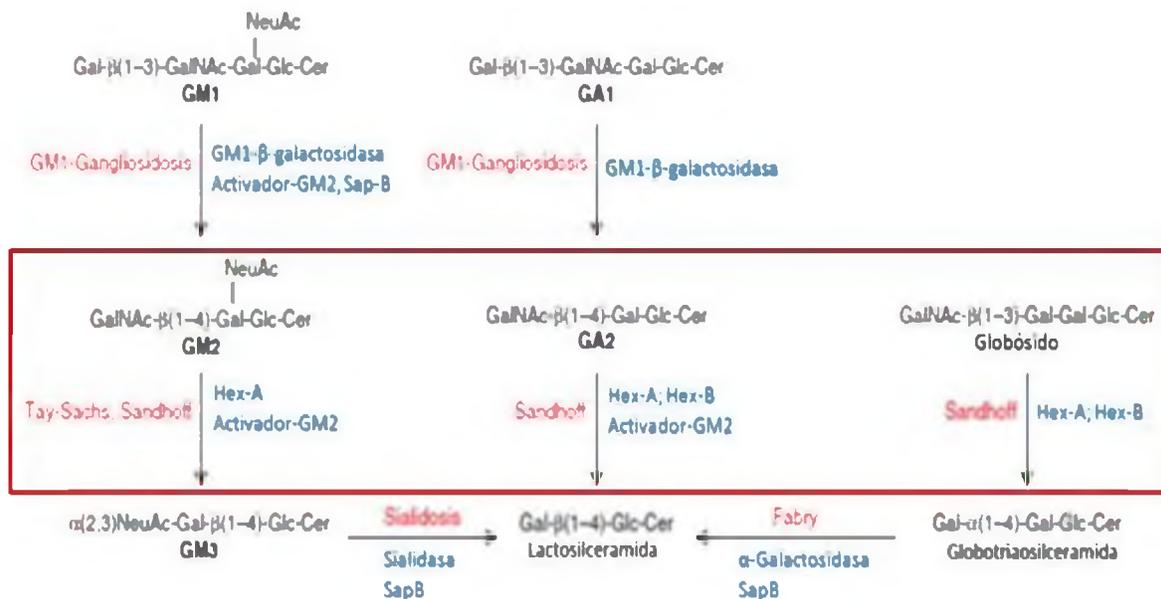
Las gangliosidosis GM2 pertenecen al grupo de enfermedades lisosomales de depósito de lípidos ó esfingolipidosis. La incidencia general de las esfingolipidosis se encuentra entre 1 en 7000 a 8000 nacidos vivos, lo cual las cataloga como enfermedades raras [1]. Las gangliosidosis GM2 son desórdenes autosómicos recesivos, causados por defectos en la actividad catabólica de la enzima encargada de la degradación del gangliósido GM2 (Figura 1) o glicolípidos asociados, produciendo su acumulación en el lisosoma principalmente de las células del sistema nervioso [2].



**Figura 1. Estructura del gangliósido GM2.** Glicoesfingolípidos que constan de una cadena hidrofóbica de ceramida, y una cadena hidrofílica de oligosacáridos (Glc: glucosa, Gal: galactosa, GalNAC: N-acetilgalactosamina), unida a una serie de residuos de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico NANA).

Tres enzimas lisosomales conocidas como  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas (E.C. 3.2.1.52) están relacionadas con el proceso de degradación del gangliósido GM2, las cuales requieren de la presencia de un cofactor conocido como Activador de GM2 [3]. Las hexosaminidasas son enzimas poliméricas formadas por subunidades  $\alpha$  y/o  $\beta$ , las cuales son codificadas por los genes *HEXA* ó *HEXB*, respectivamente. La isoforma heterodimérica  $\beta$ -hexosaminidasa A (Hex-A) está formada por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , y se encarga de degradar el gangliósido GM2 con ayuda del activador GM2. Hex-A remueve el residuo  $\beta$ -N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y  $\beta$ -N-acetilgalactosamina (GalNAC) del extremo terminal de glicopéptidos, glicosaminoglicanos y glicolípidos [4]. La isoforma Hex-B, homodímero formado por dos subunidades  $\beta$ , actúa sobre sustratos no cargados como el glicolípidos GA2 y oligosacáridos con residuos de N-acetilhexosamina [3].

La hexosaminidasa S (Hex-S), homodímero de dos subunidades  $\alpha$ , tiene actividad catalítica secundaria en la degradación de GM2, pero también contribuye en la degradación de glicosaminoglicanos y glicolípidos sulfatados [5, 6]. El activador de gangliósido GM2, codificado por el gen *GM2A*, es un cofactor no enzimático de 17 a 22 kDa, el cual actúa formando un complejo con el gangliósido GM2 y la enzima Hex-A, dando lugar a la hidrólisis del gangliósido GM2. Este activador funciona como una proteína de unión al sustrato solubilizando los monómeros del gangliósido en la membrana (*in vivo*) o en micelas (*in vitro*) y exponiéndolos para la correspondiente acción de la hexosaminidasa (Figura 2) [7].



**Figura 2. Cadena de degradación de algunos esfingolípidos en el lisosoma de la célula.** En el recuadro se señalan los puntos en los cuales actúan las  $\beta$ -hexosaminidasas. Adaptado de Schulze, 2011 [3].

Mutaciones en alguno de estos genes *HEXA*, *HEXB* o *GM2A*, producen las enfermedades de Tay Sachs (variante B), Sandhoff (variante 0), o deficiencia del activador (variante AB) respectivamente (Tabla 1), las cuales pertenecen a un grupo de desórdenes conocidos como Gangliosidosis GM2. La patología de los tres desórdenes es bastante similar, son enfermedades progresivas que rápidamente pueden culminar en la muerte del paciente, usualmente antes de los cuatro años de edad. La neurodegeneración progresiva y el retraso en el desarrollo son causados por la acumulación del gangliósido GM2 en los lisosomas de las neuronas agrandándolas y formando corpúsculos conocidos como cuerpos membranosos citoplasmáticos (CMC) [8]. Estos CMCs también contienen colesterol y fosfolípidos, y su acumulación conlleva a la muerte celular.

**Tabla 1. Características genéticas de Gangliosidosis GM2 y las  $\beta$ -hexosaminidasas.**

<b>Gen</b>	<b>HEXA</b>	<b>HEXB</b>	<b>GM2A</b>
<b>Localización</b>	15q23-q24	5q13	5q31.3-q33.1
<b>Producto</b>	Subunidad alfa de Hex-A y Hex-S	Subunidad beta de Hex-A y Hex-B	Activador GM2
<b>Sensibilidad al calor, pH</b>	Lábil al calor. Ácida	Estable al calor. Básica	Estable al calor. Ácida
<b>Tay Sachs (TS) ó Variante B</b>	Fenotipo más severo los dos alelos están ausentes o mutados	Normal	Normal
<b>TS - pseudovariante AB</b>	Niveles deficientes de Hex-A		
<b>TS clásica infantil aguda</b>	Niveles aumentados de Hex-B		
<b>TS ó variante B1</b>	Mutante	Normal	Normal
	Niveles de Hex-A casi normales		
<b>TS Adulto crónico</b>	Pseudodeficiencia, mutante	Normal	Normal
	Mutación en por lo menos un alelo		
<b>Sandhoff (SD) ó variante 0</b>	Normal	Ambos alelos ausentes o mutados	Normal
		Hex-A y Hex-B deficientes	
		Actividad residual de Hex-S	
<b>Variante AB ó deficiencia del activador</b>	Normal	Normal	Ausente o mutada
	Cantidades incrementadas de las enzimas	Cantidades incrementadas de las enzimas	
<b>Mutaciones conocidas</b>	163	82	6

Existen diferentes formas de presentación de estas enfermedades en cuanto a la edad de aparición y severidad de los síntomas, desde la aguda hasta la crónica. La forma crónica de las enfermedades es la más heterogénea clínicamente, incluye fenotipos severos, donde predominan las alteraciones sobre el sistema nervioso central, incluyendo distonía progresiva, degeneración espinocerebral, afección neuromotora o psicosis. Estos pacientes también presentan convulsiones, ceguera, pérdida de todas las habilidades intelectuales y cognitivas y la muerte temprana [8].

Hasta la fecha se han reportado 163 mutaciones en el gen *HEXA*, 82 para *HEXB* y seis para el activador GM2 (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>). En general, las mutaciones que causan pérdida completa de la actividad de las enzimas dan lugar a una enfermedad devastadora, mientras aquellas que permiten que se presente actividad residual dan lugar a una enfermedad de presentación tardía y un curso más leve, en ocasiones es posible que se dé un estado asintomático. La severidad de la enfermedad puede estar correlacionada con el nivel de la actividad residual, siempre que ésta última se mida bajo condiciones que se aproximen a la hidrólisis *in vivo* del gangliósido GM2 [2, 9].

### 2.1.1. Enfermedad de Tay Sachs

La enfermedad de Tay Sachs (TS, OMIM 272800) o variante B, fue descrita por el oftalmólogo Británico Warren Tay en 1881; y el neurólogo americano Bernard Sachs en 1886. Tay, observó la clásica mancha rojo cereza en la retina de un niño de 1 año de edad con retardo físico y mental, mientras Sachs observó el citoplasma distendido de neuronas en sus pacientes, que describió como una enfermedad letal que involucraba retardo y ceguera, la cual denominó "Idiotéz amaurótica familiar". Sin embargo, no fue hasta 1930 que el bioquímico Alemán Ernst Klenk identificó el material acumulado en el cerebro de estos pacientes describiéndolo como un grupo de glucoesfingolípidos ácidos [2, 9].

Debido al daño o mutaciones encontradas en el gen *HEXA*, los pacientes con la enfermedad de TS presentan valores mínimos o ausentes de actividad enzimática de Hex-A y valores normales o aumentados en la actividad enzimática de Hex-B [2]

La nomenclatura para esta enfermedad, basada en los diferentes fenotipos clínicos y la dominancia de la encefalopatía, fue sugerido por Gravel *et. al.* (2001).

➤ **Aguda (infantil):** los pacientes con esta variante presentan un desarrollo normal entre los tres a seis meses de edad. Las primeras manifestaciones observadas son debilidad muscular, hipotonía, pobre sostén cefálico disminución en la atención, y reacción de sobresalto exagerado al sonido, con estiramiento súbito de las extremidades. Entre los 10 - 12 meses se ve la pérdida total del movimiento y una disminución considerable de la visión, palidez macular y aparición de la mancha rojo cereza en el fondo de ojo. A los 18 meses se presentan convulsiones, mayor deterioro neuronal, pérdida de la capacidad de deglución y masticación, terminando en un completo estado vegetativo. Los niños no superan generalmente los cuatro años de edad.

- **Subaguda (infantil tardía y juvenil):** la presentación de esta variante comienza hacia los dos a seis años de edad con ataxia motora, y anormalidades en el gateo y la postura. Psicosis tipo esquizofrenia, con episodios de depresión, son comunes en algunos casos. Su presentación es heterogénea entre los individuos. Los pacientes mueren entre los 10 a 15 años de edad.
- **Crónica (adulto y crónica):** el inicio de los síntomas se puede dar a cualquier edad desde la infancia hasta la adultez. Esta variante es de evolución neurológica lenta y los pacientes tienen una mayor expectativa de vida con poco o ningún efecto sobre el intelecto.

### 2.1.2. Enfermedad de Sandhoff.

La enfermedad de Sandhoff (SD, OMIM 268800) o variante 0, fue descrita por Sandhoff *et. al.* (1968). SD es causada por mutaciones en el gen *HEXB*, lo cual hace que la deficiencia enzimática se vea reflejada tanto en Hex-A como en Hex-B. Se caracteriza por la acumulación de glicolípidos cargados negativamente (gangliósido GM2), y glicolípidos no cargados (glicolípidos GA2) en cerebro así como globósidos en órganos viscerales [3]. Al igual que TS, ésta es una enfermedad neurodegenerativa, presenta debilidad desde los 6 meses de vida, reacciones de sobresalto, ceguera temprana, deterioro motor y mental progresivo, cara de muñeco, mancha rojo cereza, macrocefalia y compromiso cardíaco. La muerte de estos pacientes ocurre hacia los 3 años de vida [8].

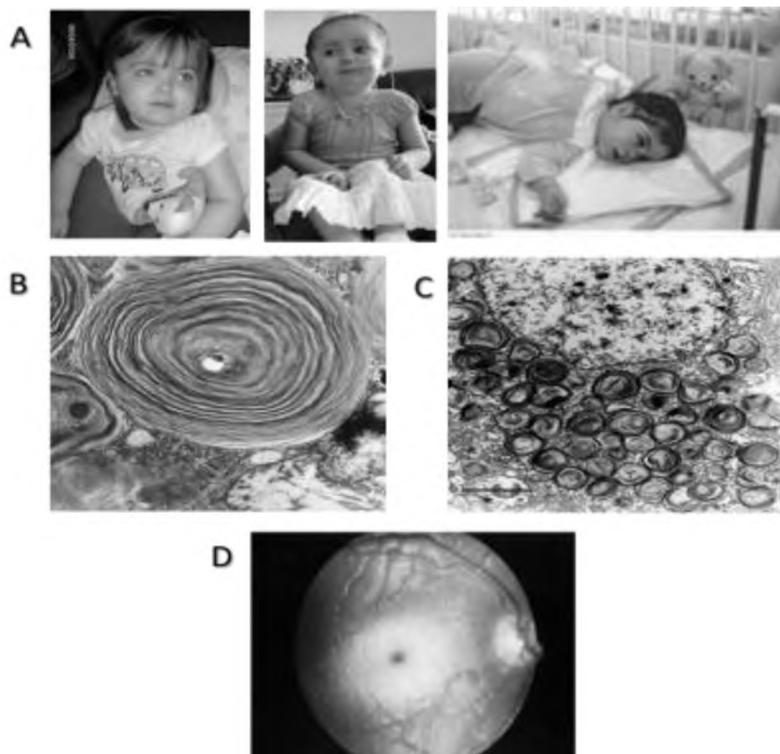
- **Infantil o clásica:** es la forma de presentación más severa. Los síntomas se manifiestan en pacientes entre los 2 y 9 meses de edad, cuando el desarrollo normal comienza a deteriorarse y los músculos se debilitan, perdiendo la habilidad de girar, gatear o sentarse. Progresivamente presentan convulsiones, pérdida de audición y visión, presencia de mancha rojo cereza en el fondo de ojo, demencia y parálisis. La organomegalia y alteraciones óseas aunque no son síntomas frecuentes, pueden llegar a presentarse en algunos pacientes con SD [1] Se ha descrito la presencia de actividad enzimática de Hex-S (dímeros de subunidades  $\alpha$ ) en tejidos de pacientes con esta forma de la enfermedad [2].
- **Juvenil:** es menos severa que la forma infantil. Los síntomas se manifiestan entre los 3 y 10 años de edad y pueden llegar a vivir hasta los 15 años. Pacientes con esta variante presentan autismo, ataxia, regresión de habilidades motoras, pérdida de coordinación, espasticidad, problemas de habla y desórdenes de aprendizaje. La visión puede ser normal. La

expectativa de vida podría llegar a ser mayor si los pacientes cuentan con un cuidado constante [1].

- **Adulta:** los síntomas de esta variante se observan en pacientes de edad avanzada. La sintomatología clínica es similar a la variante crónica de TS, presentando principalmente afección en la función motora de los pacientes [1].

### 2.1.3. Deficiencia del activador GM2 o variante AB

La variante AB (AB, OMIM 272750) está relacionada con la presencia de mutaciones en el gen *GM2A*, el cual codifica para la proteína activadora de GM2. En esta variante los pacientes presentan niveles normales o aumentados de actividad enzimática de Hex-A y Hex-B. Sin embargo, al no expresar correctamente el activador no es posible formar el complejo GM2A/gangliósido GM2, el cual es necesario para que la enzima Hex-A actúe en la degradación del gangliósido, lo cual hace que éste se acumule en la célula. La clínica de esta enfermedad es similar a la descrita para TS y SD [8].



**Figura 3. Manifestaciones y principales síntomas de gangliosidosis GM2.** A. Manifestaciones clínicas de pacientes con gangliosidosis GM2 (<http://denisewilbon.blogspot.com.co>) B. Microscopía electrónica de cuerpos membranosos citoplasmáticos de una célula neuronal de un paciente GM2 [9]. C. Cuerpos citoplasmáticos membranosos (MCB) neuronales (1  $\mu$ m) [2]. D. Fondo de ojo de un paciente Tay-Sachs, mancha “Rojo cereza” [2].

#### 2.1.4. Terapias

Una de las ventajas en el desarrollo de terapias para pacientes con enfermedades de depósito lisosomal es que se trata de enfermedades monogénicas, las cuales son producidas por mutaciones en un gen específico. La mayoría de enzimas lisosomales pueden ser usadas terapéuticamente ya que las células las secretan naturalmente a bajos niveles y pueden ser recapturadas de forma autocrina/paracrina a través de un proceso de internalización celular mediado por receptores de membrana [10]. Las terapias que se encuentran en fases preclínicas y clínicas para el tratamiento de glicosfingolipidosis se resumen en la Tabla 2. Específicamente para las gangliosidosis GM2 se han reportado estudios en diferentes terapéuticas como el trasplante de células neuronales y médula ósea; el desarrollo de chaperonas farmacológicas diseñadas para rescatar enzimas del retículo endoplásmico antes de ser dirigidas a degradación, mejorando su actividad y entregándolas al lisosoma para que cumplan su función biológica [11]. La terapia de inhibición de sustrato permite reducir la biosíntesis de precursores del gangliósido GM2, la cual ha sido probada en individuos con gangliosidosis GM2 de presentación tardía, sin mostrar mejoras en su condición [12]. Ensayos preclínicos usando pirimetamina han demostrado mejorar la actividad leucocitaria de Hex-A en pacientes con presentación tardía de gangliosidosis GM2 [13].

En el caso de la terapia de reemplazo enzimático (TRE) una de las limitantes ha sido el difícil acceso de las proteínas exógenas a través de la barrera hematoencefálica (BHE) para alcanzar el sistema nervioso central. Sin embargo, diferentes investigaciones están encaminadas a producir nuevas proteínas recombinantes empleando diferentes sistemas de expresión, modificando la molécula, o buscando alternativas de paso a través de la BHE [14-17]. De igual forma la terapia génica, dirigida a la corrección neuronal, también está siendo estudiada [18].

Para estudios de patogénesis y evaluación preclínica de las diferentes terapias, se han generado modelos animales tales como el modelo murino de Tay Sachs clásica (deficiencia infantil), un modelo de oveja el cual muestra la acumulación progresiva del gangliósido GM2 presentando la patología y el curso clínico neurológico característico de la enfermedad de Tay Sachs [19]. Cabe anotar que la combinación de terapias para su aplicación conjunta es otra de las alternativas evaluadas para contrarrestar enfermedades de este tipo [10]. De esta forma, la administración de TRE junto al trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCTs), terapias con drogas no esteroideas anti-inflamatorias (NSAIDs)

específicas para el sistema óseo, terapia de reducción de sustrato, terapia de células madre neuronales, y chaperonas farmacológicas han mostrado mejores resultados sobre los pacientes que usarlas de forma independiente [20, 21].

#### **2.1.4.1. Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE)**

La TRE para enfermedades de depósito lisosomal (EDL) fue sugerida por Chistian de Duve en 1964, como una buena alternativa para la reducción de los metabolitos tóxicos acumulados en la célula a través de la administración intravenosa de la enzima exógena deficiente o disminuida en el organismo de individuos afectados [20]. Una de las grandes desventajas de este tipo de terapias es el hecho de no ser efectiva en aquellas enfermedades lisosomales que presentan daño neuronal ya que no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que algunos esfuerzos se concentraron en estudiar la TRE más ampliamente en enfermedades sin implicación neuronal. Sin embargo, comenzando los años 70s, se realizaron estudios clínicos piloto para algunos de estos desórdenes incluyendo Sandhoff ( $\beta$ -hexosaminidasa), Pompe ( $\alpha$  glucosidasa placentaria), Fabry (galactosidasa A de placenta o bazo), y Gaucher tipo 1 ( $\beta$ -glucosidasa placentaria), mostrando que el tiempo de vida media de las enzimas en circulación era de 10 a 20 minutos, y mediante la medición de la actividad residual en tejido demostraron el catabolismo de la enzima exógena administrada. En cada caso la enzima había mostrado previamente *in vitro* su capacidad de hidrolizar el sustrato natural correspondiente [20, 22].

En algunos casos se encontró que la administración de estas enzimas en el organismo generaba anticuerpos tipo IgG (neutralizantes) como respuesta a un estímulo externo del sistema inmune. Sin embargo, esto se manejó disminuyendo la velocidad de infusión de la proteína junto con la incorporación de anti-histaminas o corticoesteroides. Así mismo, la presencia de IgE o de efectos anafilácticos se ha presentado en menos del 1% de los pacientes tratados. Aquellos que presenten estos efectos son sometidos a procesos especiales como la desensibilización y protocolos de incremento de infusión de dosis, para retomar la terapia. Pacientes con la enfermedad de Gaucher que han recibido la terapia por cerca de 20 años, no han reportado eventos adversos severos [20, 23].

**Tabla 2. Opciones de terapia para diferentes glicosfingolipidosis.** Adaptado de Jeyakumar *et.al.* 2005 [10] y Schultz *et.al.* 2011 [24].

Terapia	Ensayos preclínicos*	Ensayos clínicos
Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE)	Varios desórdenes	Gaucher tipo II y III (Aprobada)
		Fabry (Aprobada)
		MPS I (Aprobada)
		Gaucher tipo I (fase 2)
		MPS III (fase 1 y 2)
Transplante de médula ósea (TMO)	SD [25]	Resultado mixto en varios desórdenes
	Gangliosidosis GM1	
Moléculas pequeñas	Gaucher tipo II y III	Gaucher tipo II y III (Aprobada)
	GM1 [26]	
	TS [27]	TS (Fase 3)
	Fabry [28]	Fabry (Fase 2)
Células madre neuronales	TS	-
Terapia Génica (TG)	SD [29]	Gaucher tipo II y III (Fase 2 y 3)
	TS [30, 31]	Gaucher tipo I (fase 3)
	Krabbe	TS (Fase 2 y 3)
	MPS VII [32]	MPS VII (Fase 2)
	Leucodistrofia Metacromática	MPS I (Fase 2)
Chaperonas moleculares	Fabry	Fabry
	TS	
	SD	
	Gangliosidosis GM1 [33]	
	Gaucher tipo II	
Reducción de sustrato (RS)	TS [34]	TS (presentación tardía)
	SD [35, 36]	SD
	Niemann - Pick tipo C1 [37]	Gaucher tipo III
	Gangliosidosis GM1 [38]	Niemann -Pick tipo C
	Fabry	
Terapia anti inflamatoria	Prueba del principio en SD	-
	Fármaco no esteroide en SD	
Terapia anti-oxidante	SD	-
Homeostasis de Calcio	Teórica	-
TMO + RS	SD	-
RS + Anti-inflamatoria	SD	-
Anti-inflamatoria + Antioxidante	SD	-
Neuroesteroides	Niemann - Pick tipo C	-

MPS: mucopolisacaridosis. SD: Sandhoff. TS: Tay Sachs. TRE: terapia de reemplazo enzimático. TMO: transplante de médula ósea. TG: terapia génica. RS: reducción de sustrato. \*Ensayos realizados en modelos animales o células en cultivo.

La TRE ha presentado varios obstáculos dentro de los cuales se encuentra la inhabilidad para producir suficientes cantidades de enzima lisosomal exógena que incluya todas las características necesarias para una buena acción celular como sus glicosilaciones, no lograr que la enzima exógena administrada llegue a tejidos y sitios celulares específicos de la patología como el sistema nervioso central, la carencia de modelos animales eficientes que semejen en un gran porcentaje los síntomas de las enfermedades y de esta manera permitan una evaluación completa de la farmacocinética y farmacodinámica de la enzima administrada [22].

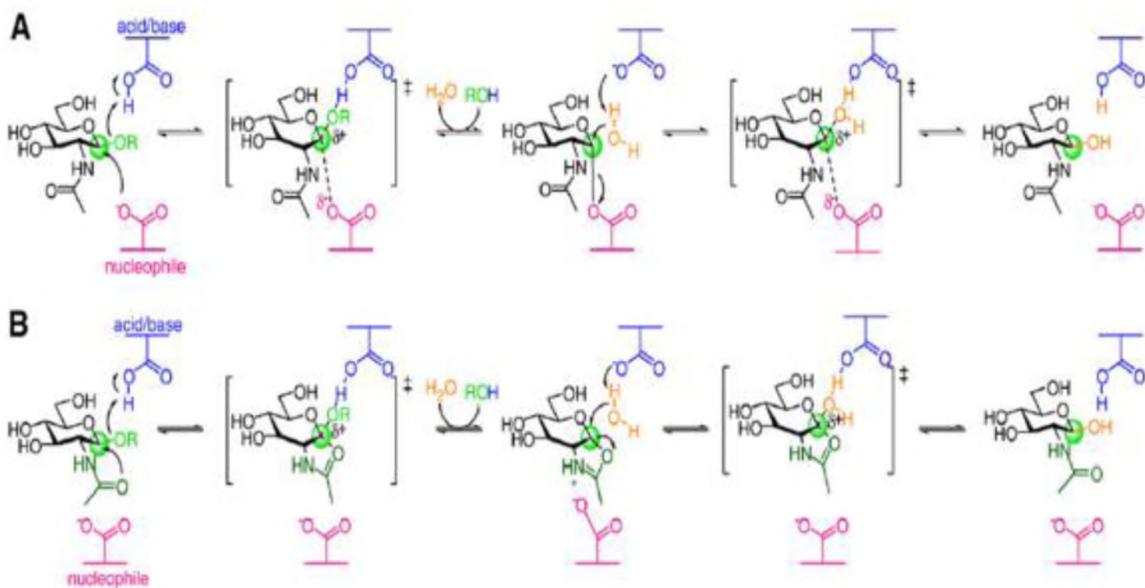
Sin embargo, se están realizando investigaciones para la modificación y mejora de las enzimas producidas con fines terapéuticos como: 1) el uso de enzimas quiméricas fusionadas con moléculas que permitan la entrega de la enzima a receptores adecuados; 2) el uso de 11 aminoácidos del dominio TAT del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) para mediar la endocitosis a la célula receptora mediante su interacción con el heparán sulfato de la superficie celular y entregarla a lisosoma; 3) crear una enzima quimérica fusionada con la porción Fc de un anticuerpo IgG humano para que sea transportada desde la circulación materna a través de la placenta a sitios de acumulación de sustrato en el tejido del feto; 4) tratamiento de la enzima con periodato para eliminar su interacción con receptores de carbohidratos, creando una enzima con mayor vida media en plasma, resultando en un transporte a través de la BHE y una acción catalítica en neuronas [39]. Así mismo se están realizando procesos de evaluación y modificación de diferentes hospederos para la obtención de enzimas heterólogas recombinantes que sean útiles en la aplicación de una TRE [40].

A la fecha la TRE ha sido aprobada para enfermedades como Gaucher, Fabry, Hurler, Hunter, Morquio A, Maroteaux–Lamy y Pompe las cuales han mostrado resultados importantes en las manifestaciones clínicas de los pacientes y por ende en su calidad de vida [23, 41]. Actualmente, se encuentran en estudios clínicos la enzima para leucodistrofia metacromática y Sly.

## **2.2. $\beta$ -D-N-acetilhexosaminidasas**

Las  $\beta$ -hexosaminidasas ( $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas, E.C. 3.2.1.52) son enzimas capaces de catalizar el rompimiento de los residuos  $\beta$ -D-N-acetilglucosamina (GlcNAc) y  $\beta$ -D-N-acetilgalactosamina (GalNAc) del extremo no reductor de las cadenas de oligosacáridos de glicoproteínas, glicolípidos y glicoproteínas [42]. Pertenecen a la familia de las glicosilhidrolasas y se encuentran en organismos tanto procariontes como eucariotes. Han sido clasificadas por el sistema CAZY (Carbohydrate Active Enzymes, <http://www.cazy.org/>) en tres grupos funcionalmente relacionados: GH3, GH20 y GH84. Aunque las enzimas pertenecientes a estos grupos no tienen secuencias homólogas, comparten

algunas características básicas en su estructura y mecanismo catalítico [43]. Las enzimas de los grupos GH20 y GH84 utilizan la vía clásica, en la cual el oxígeno del carbono 2 del grupo acetamida del sustrato actúa como grupo nucleófilo formando un intermediario oxazolinio. Por su parte, las enzimas del grupo GH3 involucran completamente al sustrato y utilizan un carboxilato enzimático en lugar del nucleófilo (Figura 4). Estudios bioinformáticos sobre las enzimas de la familia GH20 han revelado que estas presentan el motivo His/Asn-Xaa-Gly-Ala/Cys/Gly/Met-**Asp-Glu**-Ala/Ile/Leu/Val, el cual es altamente conservado entre ellas. El sitio activo de estas enzimas contiene dos residuos Asp/Glu, que parecen tener importancia en el mecanismo catalítico [43].



**Figura 4. Mecanismo catalítico de las N-acetilhexosaminidasas. A.** Mecanismo de la familia GH3 **B.** Mecanismo de las familias GH20 y GH84. Tomado de Slámova, *et. al.* (2010) [43]

En mamíferos se han identificado diferentes enzimas de la familia  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas las cuales difieren en función y estructura: Hex-A, Hex-B y Hex-S localizadas en lisosoma, y N-acetilglucosaminidasa (O-GlcNAcase), Hex-C y Hex-D localizadas en núcleo y citoplasma [43, 44].

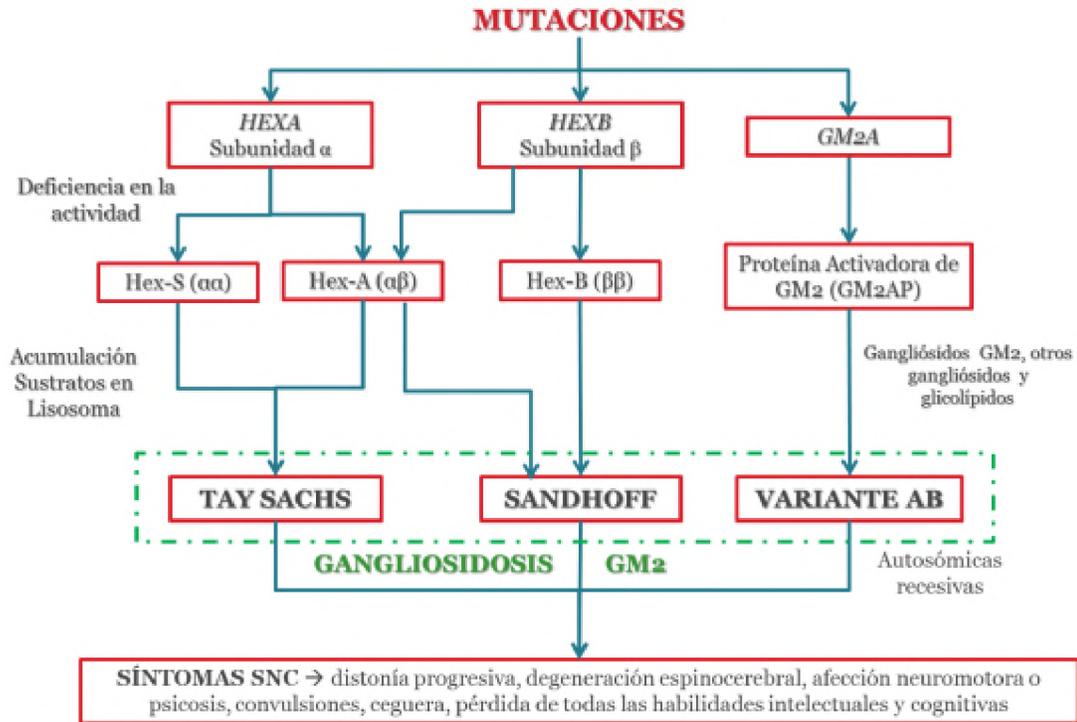
Las enzimas O-GlcNAcase (OGA) pertenecen a la familia GH84 y participan en reversar la acción del péptido N-acetilglucosaminiltransferasa (OGT) en el citoplasma celular. La enzima Hex-D no ha sido estudiada totalmente, pero se ha caracterizado por tener preferencia por sustratos como la N-acetilgalactosamina. La enzima Hex-C fue reportada inicialmente en cerebro pero ha sido encontrada en otros tejidos, así como en fluidos corporales y fibroblastos [44].

## 2.2.1. Hexosaminidasas Lisosomales

### 2.2.1.1. Genes

Las  $\beta$ -N-acetilhexosaminidasas lisosomales (Hex-A, Hex-B, Hex-S) pertenecen al grupo GH20 de las glicosilhidrolasas. Han sido extraídas de tejidos como placenta, hígado, riñón y cerebro. Están formadas por las subunidades  $\alpha$  y/o  $\beta$  y son codificadas por los genes *HEXA* y *HEXB* (Figura 5) [45-47]. Los genes han sido mapeados en 15q24.1 para *HEXA* y 5q13.3 para *HEXB*. El gen *HEXA* codifica para una proteína de 529 aminoácidos, tiene 14 exones con una longitud de 35 Kb, mientras que el gen *HEXB* posee una longitud de 45 Kb, 14 exones y codifica para una proteína de 556 aminoácidos. Cerca de 1600 pares de bases, ubicadas en las regiones codificantes, muestran una identidad del 60%, tanto en su secuencia de nucleótidos como en la cadena de aminoácidos codificada, lo cual sugiere que estos genes están relacionados entre sí y podrían compartir un ancestro común [5, 48].

Mutaciones en uno de estos genes causa la acumulación de esfingolípidos en la célula y tejidos produciendo un grupo de enfermedades conocidas como Gangliosidosis GM2. A la fecha se han identificado cerca de 163 mutaciones para el gen *HEXA* dentro de las cuales se incluyen 93 con cambio de sentido/sin sentido, 32 alteraciones de corte y empalme (splicing), 28 deleciones pequeñas, 7 inserciones pequeñas, 2 inserción/delección pequeñas y 1 delección grande. Para el gen *HEXB*, se han reportado 82 mutaciones: 39 de cambio de sentido/sin sentido, 17 alteraciones de corte y empalme (splicing), 18 deleciones pequeñas, 2 inserción pequeña y 6 deleciones grandes (The Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).



**Figura 5.  $\beta$ -Hexosaminidasas.** Tres genes diferentes codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las hexosaminidasas y para la proteína activadora de GM2. Mutaciones en alguno de estos genes causan la acumulación de metabolitos en la célula generando las Gangliosidosis GM2. GM2 (gangliósido GM2), GAG (glucosaminoglicano), GP (glicoproteínas), GL (glicolípidos). Adaptado de Gravel *et al.* (2001) [2].

### 2.2.1.2. Síntesis y estructura

La síntesis de estas subunidades comienza con la formación de prepolipéptidos (pre-precursor) de gran tamaño que sufren glicosilaciones y procesamientos proteolíticos hasta generar oligopéptidos maduros de aproximadamente 55 kDa para la subunidad  $\alpha$  y dos polipéptidos,  $\beta_a$  y  $\beta_b$ , de aproximadamente 26 y 28 kDa, respectivamente, para la subunidad  $\beta$  [49].

Los prepolipéptidos de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  sufren inicialmente la remoción de 22 y 42 aminoácidos correspondientes al péptido señal en el retículo endoplásmico, dando lugar a las proteínas precursoras. Posteriormente, bajo la acción de la enzima oligosacariltransferasa, los residuos de asparagina (Asp) reciben oligosacáridos ricos en manosa (tres en la subunidad  $\alpha$  y cuatro en la subunidad  $\beta$ ). La adición de estas cadenas de azúcares (N-glicosilación) es requerida para la unión a receptores de fosfomanosil para la entrega de la enzima al lisosoma [5] (Figura 6). La pérdida de un sitio de N-glicosilación en las subunidades no afecta considerablemente la actividad biológica de la proteína. Sin embargo, la pérdida de los tres sitios en la subunidad  $\alpha$  puede causar un mal

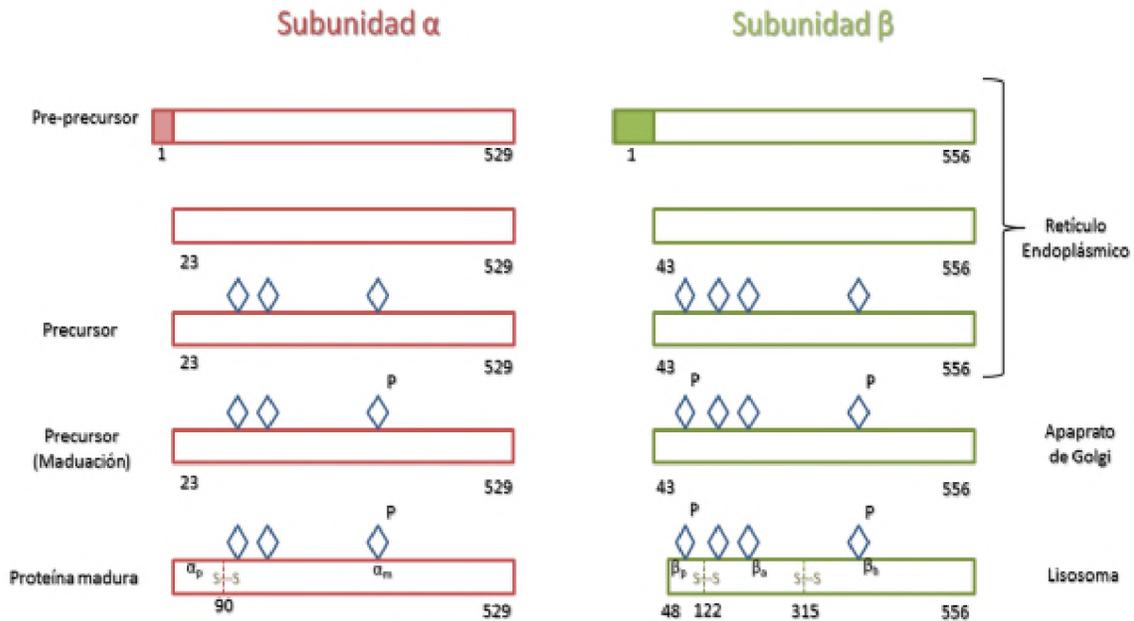
plegamiento de la proteína haciendo que ésta quede atrapada en el retículo endoplasmático [2].

En estudios cristalográficos de la Hex-A se ha demostrado que las N-glicosilaciones se dan en los residuos  $\alpha$ Asn115,  $\alpha$ Asn157 y  $\alpha$ Asn295 de la subunidad  $\alpha$  y en los residuos  $\beta$ Asn84,  $\beta$ Asn142,  $\beta$ Asn190 y  $\beta$ Asn327 de la subunidad  $\beta$ . Posteriormente durante la maduración de los carbohidratos en el Aparato de Golgi, las N-glicosilaciones de los residuos  $\alpha$ Asn115,  $\alpha$ Asn295 and  $\beta$ Asn84 son fosforiladas, lo que permite su reconocimiento por el receptor de manosa-6-fosfato y su direccionamiento al lisosoma [49, 50]. Otras modificaciones, como la disposición de los enlaces disulfuro aún no han sido establecida.

El direccionamiento lisosomal de las  $\beta$ -hexosaminidasas es altamente dependiente de la señal de reconocimiento de manosa-6-fosfato. En el lisosoma, las proteínas precursoras sufren una serie de cortes proteolíticos dentro de su secuencia como parte del proceso de maduración. La subunidad  $\alpha$  es cortada en dos fragmentos uno de 56 kDa ( $\alpha_m$ ) y otro de 6 kDa ( $\alpha_p$ ) unidos por puentes disulfuro; ésta fragmentación ocurre en los aminoácidos  $\alpha$ Lys23- $\alpha$ Gly74 y  $\alpha$ Thr89- $\alpha$ Gln528.

Por su parte, la subunidad  $\beta$  se divide en tres fragmentos que permanecen unidos por puentes disulfuro. Los fragmentos  $\beta_a$  (315 aminoácidos, 28 kDa), y  $\beta_b$  (122 aminoácidos, 19 a 26 kDa) han sido identificados en enzima purificada de placenta, mientras la tercera fracción  $\beta_p$  (48 aminoácidos – 11 kDa) solamente ha sido identificada en cultivos de fibroblastos. Estos cortes ocurren en los aminoácidos  $\beta$ Ala50 a  $\beta$ Gly107,  $\beta$ Thr122 a  $\beta$ Ser311, y  $\beta$ Leu316 a  $\beta$ Met556 [51]. Estudios han demostrado que las subunidades presentan una pequeña heterogeneidad en la carga:  $\beta_a$  tiene un punto isoeléctrico que varía entre 4,5 a 5,0, y  $\beta_b$  presenta punto isoeléctrico entre 5,3 y 6,0. La ausencia de estas modificaciones proteolíticas no afecta la actividad catalítica de la enzima siempre y cuando se encuentren en forma de precursor [49, 51, 52].

La dimerización es un paso esencial en la actividad biológica de estas enzimas, ya que los monómeros por sí solos no son biológicamente activos. Luego del ensamblaje en el retículo endoplásmico, se forman las tres isoenzimas así: dos homodímeros, Hex-B ( $\beta\beta$ ) y Hex-S ( $\alpha\alpha$ ); y un heterodímero Hex-A ( $\alpha\beta$ ) [43]. Sin embargo, han sido reportadas otras isoformas poco abundantes como las isoformas I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub>, obtenidas a partir de hígado y placenta, las cuales se pueden ver incrementadas en pacientes con leucemia; y la isoforma P, la cual se encuentra aumentada en circulación durante el embarazo. Las isoformas I son particularmente dos formas parcialmente procesadas de Hex-A, contienen las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  pero una de ellas pierde dos residuos Ala y Arg en el extremo N-terminal, mientras que la otra sufre procesamientos adicionales [47, 51].



**Figura 6. Procesamiento de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ .** A lo largo de su paso por RE y AG hasta llegar a lisosoma las proteínas sufren una serie de cortes proteolíticos, adición y maduración de oligosacáridos hasta obtener una proteína madura que es dirigida a lisosoma. ◇ Glicosilación madura. P Glicosilación fosforilada.  $\alpha_m$  –  $\alpha_p$ : Fragmentos subunidad  $\alpha$ .  $\beta_a$  –  $\beta_b$  –  $\beta_p$ : Fragmentos subunidad  $\beta$ . S:S: puentes disulfuro. Adaptado de Neufeld, E.F. 1989 [5] y Mahuran, D.J. 1995 [53].

Se ha reportado que la síntesis de las dos subunidades en cultivo celular se da en cantidades iguales pero a diferentes velocidades. La dimerización de las subunidades  $\beta$  se da en 1 hora y ocurre en el retículo endoplasmático; mientras la dimerización de las subunidades  $\alpha$  toma entre 6 a 10 veces más tiempo y su sitio no ha sido totalmente establecido [5]. Se cree que parte de estas subunidades  $\alpha$  no ensambladas son retenidas en el retículo endoplasmático y participan de esta forma en la asociación de subunidades  $\alpha\beta$  para la formación del heterodímero Hex-A [2]. Sin embargo, este proceso es mucho más lento y ha sido atribuido al Aparato de Golgi, dado que ocurre después de la incorporación de fosfato para formar la manosa-6-P. Una vez sintetizados los dímeros son direccionados al lisosoma.

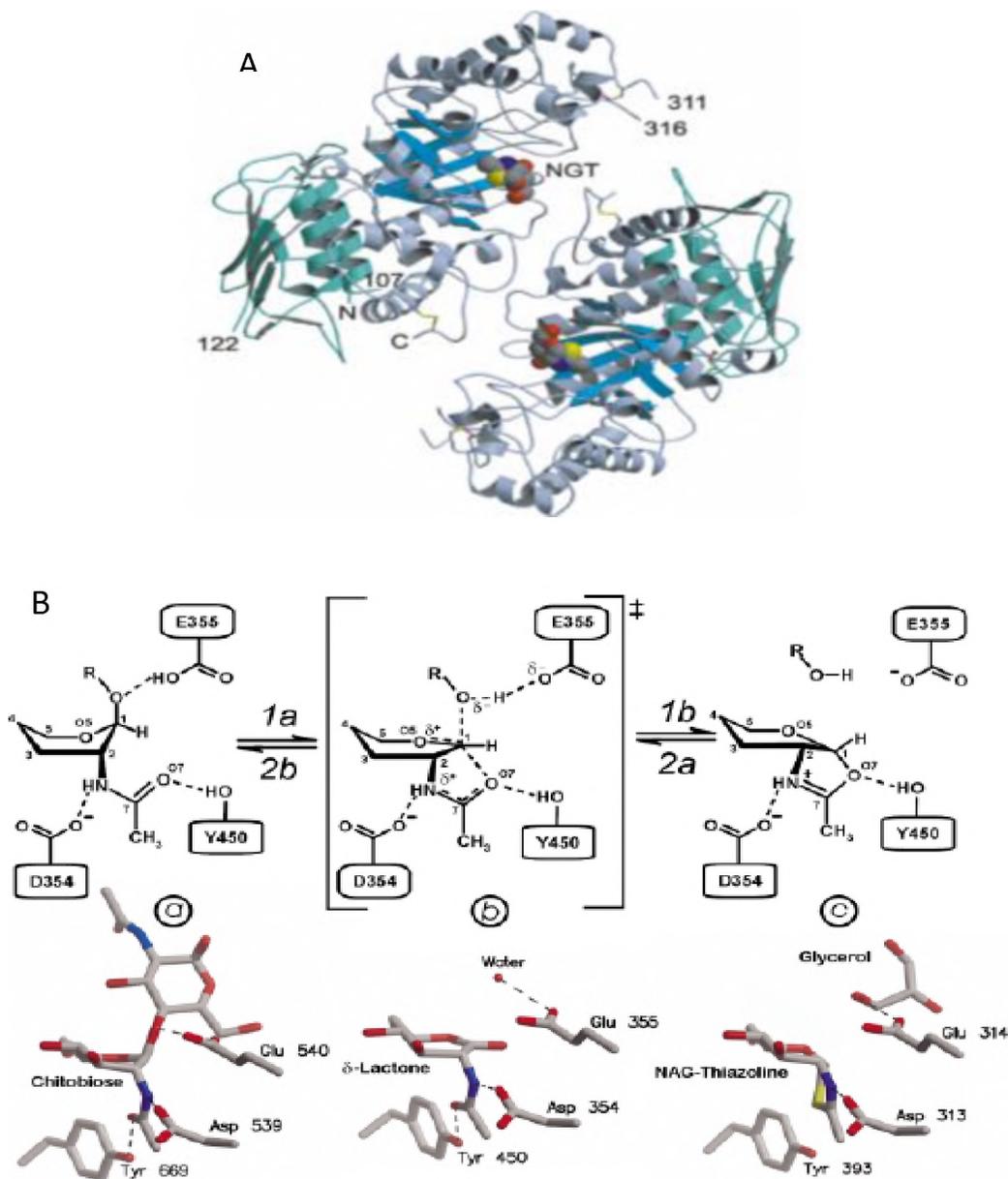
Aunque la dimerización es indispensable para la acción plena de las  $\beta$ -hexosaminidas sobre sus diferentes sustratos, cada subunidad posee su sitio activo individual. El sitio activo de la subunidad  $\beta$  hidroliza sustratos neutros, mientras que la subunidad  $\alpha$  hidroliza además sustratos cargados negativamente [54]. Esto incluye sustratos artificiales, el 4-Metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (MUG, sustrato neutro) y el 4-Metilumbeliferil-6-sulfo-N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida (MUGS, sustrato cargado). Mientras que Hex-B solo actúa sobre el

sustrato neutro MUG, Hex-A y Hex-S son capaces de actuar sobre los dos. Hex-A es aproximadamente 100 veces más activa a través de MUGS que Hex-B [2].

Se han realizado algunos estudios cristalográficos acerca de la estructura de Hex-A y Hex-B a partir de enzimas humanas obtenidas de placenta y de células de insecto de forma recombinante [50, 55, 56]. En Hex-B, cada subunidad beta tiene forma de riñón, y está formada por dos dominios. El dominio I (residuos 50 a 201) consta de seis hebras de láminas  $\beta$  anti-paralelas ancladas a dos  $\alpha$  hélices paralelas contra el dominio II. El dominio II (residuos 202 a 556) es una estructura de barras ( $\beta$ ,  $\alpha$ )<sub>8</sub> que alberga al sitio activo dentro de bucles que se extienden desde el C-terminal de las hebras que constituyen la barra  $\beta$  [56] (Figura 7A). Las subunidades  $\beta$  de Hex-B dimerizan enfrentando los sitios activos de cada subunidad entre sí, creando un espacio en forma de U entre los dos sitios activos proporcionando a cada uno un acceso libre de interacción. La interface formada entre los dominios catalíticos hace que se cubra una parte del monómero adyacente al sitio activo de cada subunidad, así como varios residuos de una subunidad estructuralmente completa; además estabiliza los residuos del sitio activo de la otra subunidad. El bolsillo del sitio activo está formado por Glu491 y Tyr492, Glu491 estabiliza galacto-azúcares. Adicionalmente, Tyr456 y Tyr457 y sus residuos vecinos forman un bolsillo complementario al sitio activo. Tyr456 participa activamente en el proceso de dimerización y forma fuertes interacciones hidrofóbicas con Ile454 y Tyr492 de la otra subunidad. Hex-B es N-glicosilada en Asn84, Asn190, Asn327, y Asn142 [55].

La estructura general de Hex-A fue descrita por Lemieux et. al. en 2006. Las dos subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  son modificadas postraduccionalmente. Para la subunidad  $\alpha$  se describe la formación de dos cadenas polipeptídicas  $\alpha$ Lys23 a  $\alpha$ Gly74 y  $\alpha$ Thr98 a  $\alpha$ Gln528. Para la subunidad  $\beta$  se describen tres polipéptidos  $\beta$ Ala50 a  $\beta$ Gly107,  $\beta$ Thr122 a  $\beta$ Ser311, y  $\beta$ Leu316 a  $\beta$ Met556. La estructura de rayos X concuerda con los dominios descritos anteriormente para la subunidad  $\beta$  de Hex-B. Para la subunidad  $\alpha$  el dominio I consta de los residuos  $\alpha$ Leu23 a  $\alpha$ Pro168, la función de este dominio en Hex-A es aún desconocida. El dominio II por su parte, está relacionado con los residuos  $\alpha$ 165 a  $\alpha$ 529 con una inserción en  $\alpha$ Thr327 a  $\alpha$ Asp347 así como una extensión en el C terminal. Los sitios activos están localizados en la interfase de las subunidades en el dominio II. La unión a sustrato vía puentes de hidrógeno se da en la subunidad  $\alpha$  en los residuos  $\alpha$ Arg178,  $\alpha$ Glu462,  $\alpha$ Asn423,  $\alpha$ Tyr421, y  $\alpha$ Asp322; en la subunidad  $\beta$  con  $\beta$ Arg211,  $\beta$ Glu491,  $\beta$ Asp452,  $\beta$ Tyr450, and  $\beta$ Asp354. Se encontraron residuos que se comparten entre los sitios activos de las dos subunidades como  $\beta$ Tyr456 en la subunidad  $\alpha$ , estabilizando los residuos  $\alpha$ Glu462 y  $\alpha$ Asn423 que participan en la unión de puentes de hidrógeno con el sustrato (Figura 8). Y el residuo  $\alpha$ Tyr427 en

el sitio activo de la subunidad  $\beta$  estabilizando los residuos  $\beta$ Glu491 y  $\beta$ Asp452 [50].



**Figura 7. Estructura de la Hexosaminidasa B (Hex-B).** A. Diagrama de cintas de Hex-B. Dominio I en verde, Dominio II en azul. Los enlaces disulfuro Cys91-Cys137, Cys309-Cys360 y Cys534-Cys551 en café, magenta, y amarillo respectivamente Tomado de Mark et. al. 2003 [55]. B. **Mecanismo catalítico de Hex-B.** Es un mecanismo de doble desplazamiento, en el primer paso (1a y 1b) el ataque nucleofílico mediado por sustrato en el C1 es asistido por la catálisis ácido-base de Glu355 liberando el carbohidrato residual R a través de un intermediario oxazolinio. El segundo paso (2a y 2b) una molécula de agua activada por Glu355 lleva a cabo un ataque nucleofílico en C1 para abrir el anillo oxazolinio reteniendo la configuración inicial en C1. Los pasos del mecanismo son ilustrados por estructuras rayos X. Tomado de Maier et.al 2003 [56].

El mecanismo catalítico es el mismo descrito anteriormente para las glicohidrolasas del grupo GH20. Los residuos  $\alpha$ Glu323 y  $\beta$ Glu355 de la subunidad  $\alpha$ , son los residuos ácido/base encargados de la protonación del átomo de oxígeno glicosídico;  $\alpha$ Asp322 y  $\beta$ Asp354 proveen los grupos carboxilados cargados negativamente que estabilizan la carga positiva del átomo de nitrógeno durante el ataque nucleofílico del ion oxazolinio del oxígeno N-acetamido del carbono 10 del sustrato. Los anillos aromáticos de  $\alpha$ Trp373,  $\alpha$ Trp392, y  $\alpha$ Trp460 en la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ Tyr450 en la subunidad  $\beta$  ayudan a ubicar el átomo de oxígeno carbonílico y el ion oxazolinio intermediario. En el sitio activo los residuos  $\alpha$ Asn423 y  $\alpha$ Arg424 son los encargados de interactuar con el residuo de ácido siálico del gangliósido GM2. Los residuos correspondientes en la subunidad  $\beta$ , el  $\beta$ Asp452 y  $\beta$ Leu453 por el contrario repelen dicho residuo cargado negativamente [50].

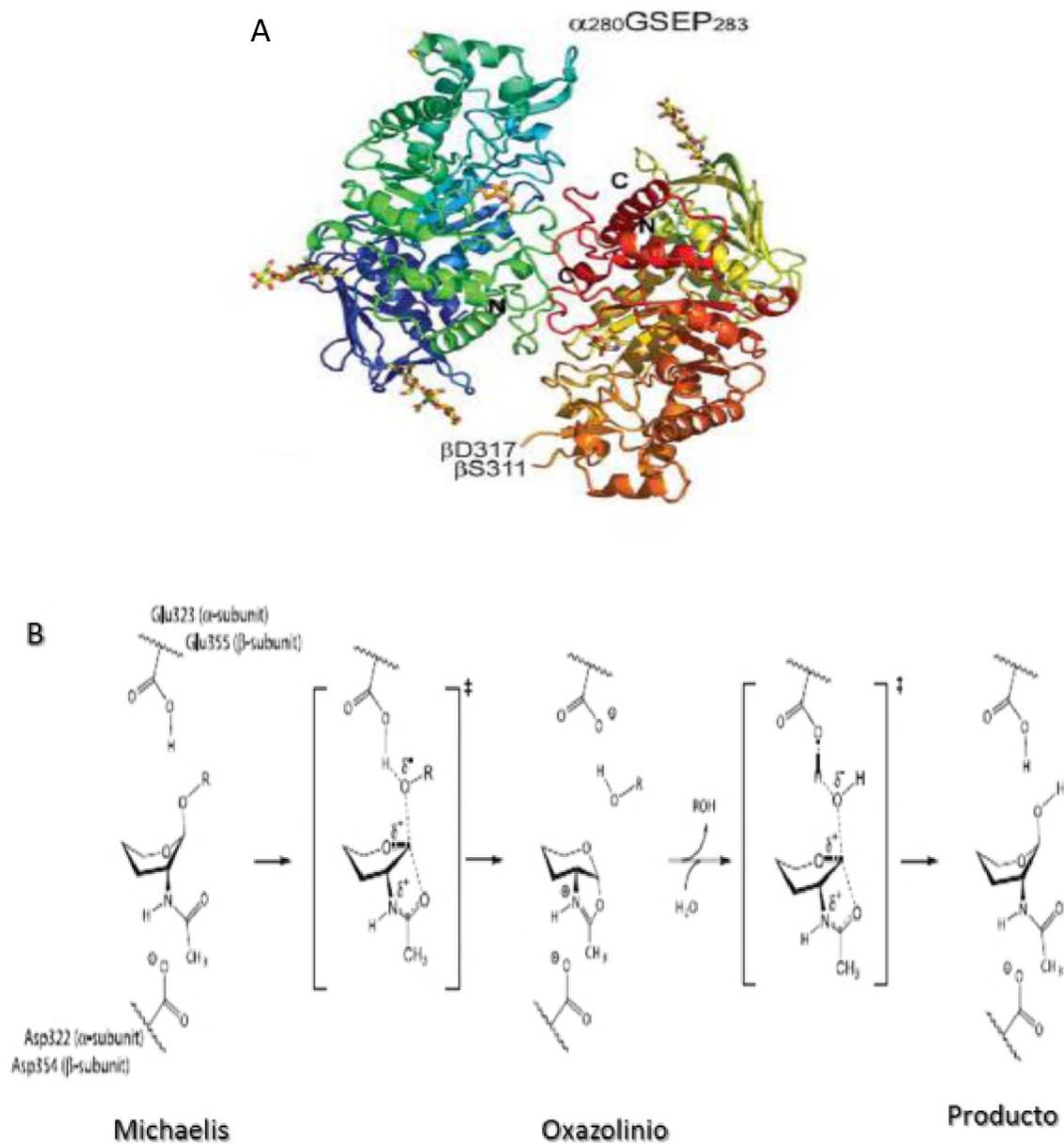
### 2.2.1.3. Hexosaminidasas recombinantes

La mayoría de estudios inmunológicos, biológicos y de caracterización bioquímica, así como ensayos de degradación del gangliósido GM2 *in vivo* e *in vitro* de las  $\beta$ -hexosaminidasas lisosomales humanas se han realizado a partir de enzimas nativas purificadas de tejidos como hígado [45, 47, 57-59], riñón [46], placenta [49, 50, 55, 60] y cerebro [45]. En los últimos años la producción de estas enzimas de forma recombinante ha sido realizada utilizando sistemas de expresión como protozoos modificados derivados de *Leishmania* o *Trypanosoma* [41], sin embargo, se han usado principalmente sistemas de expresión eucariotas como células CHO [17], HeLa [61], NG141 y NG125 [62], células de insecto transfectadas con baculovirus [54, 63], levaduras como *Ogataea minuta* [14, 15] y *Saccharomyces cerevisiae* [64].

## 2.3. SISTEMAS DE EXPRESIÓN

El uso y desarrollo de sistemas de expresión para la producción de proteínas recombinantes con diferentes aplicaciones en investigación, terapia, o industria se ha llevado a cabo por más de tres décadas. Hospederos como bacterias, levaduras, hongos filamentosos, células de insecto, mamífero, o plantas, así como animales transgénicos han sido empleados para este fin [65]. La selección del tipo de sistema de expresión depende principalmente de la finalidad de la proteína heteróloga que se quiera producir. Sin embargo, aspectos inherentes al hospedero como la estabilidad genética, la facilidad en su manipulación, los rendimientos en la producción y la habilidad de realizar modificaciones postraduccionales en la proteína de interés, deben ser tenidos en cuenta (Tabla 3) [40]. Algunas estrategias para mejorar la productividad y eficiencia en la secreción de la proteína de interés incluye el mejoramiento en las velocidades de expresión génica,

optimización de las secuencias, coexpresión de chaperonas, creación de cepas mutantes deficientes de proteasas, entre otros [66].



**Figura 8. Estructura de la Hexosaminidasa A (Hex-A).** **A.** Diagrama de cintas de Hex-A. El extremo N-terminal de la subunidad  $\alpha$  comienza en color azul oscuro y continúa a azul claro y termina en verde en su extremo C-terminal. El extremo N-terminal de la subunidad  $\beta$  con un color amarillo verdoso cambiando a naranja y terminando en rojo en el extremo C-terminal **B.** Mecanismo catalítico de Hex-A. Reacción de catálisis sustrato asistida (ver descripción en el texto) [50].

Los sistemas eucarióticos como levaduras, hongos filamentosos, células de mamífero, y plantas, se prefieren para la producción de proteínas de interés

terapéutico ya que ellos secretan las proteínas al medio de cultivo, y las modificaciones pos-traduccionales son similares a las encontradas en las proteínas humanas [67]. Sin embargo, las levaduras cuentan con características adicionales como su rápido crecimiento, su fácil manipulación, incluyendo la aplicación de ingeniería glicómica en la levadura para obtener proteínas con glicosilaciones más cercanas a las humanas [68].

*Saccharomyces cerevisiae* una levadura ampliamente utilizada en la industria alimenticia (cerveza, vino y pan), fue desarrollada y caracterizada como el primer sistema de expresión en levaduras hacia 1980. Sin embargo, la inestabilidad de los plásmidos, los bajos rendimientos de producción y la hiperglicosilación (residuos manosa 1,3) llevó al desarrollo de nuevos sistemas de expresión como *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Arxula adenovirans* y *Yarrowia lipolytica* entre otros [69].

**Tabla 3. Comparación entre diferentes sistemas de expresión.**

SISTEMA DE EXPRESIÓN	GLICOSILACIÓN	NIVEL DE EXPRESIÓN	ESCALA DE PRODUCCIÓN	COSTO DE PRODUCCIÓN	CAPACIDAD DE ESCALADO
Bacteria	Ninguna	Alto	Corto	Bajo	Alto
Levadura	Manosa	Bajo- Alto	Medio	Medio	Alto
Células insecto	Manosa	Bajo- Alto	Medio	Alto	Medio
Células planta/plantas transgénicas	Fucosa y xilosa	Medio - Alto	Corto -Largo	Bajo	Alto
Células mamífero	Similar a humana	Bajo	Largo	Alto	Bajo

Adaptado de Espejo *et. al.*(2015) [40].

### 2.3.1. Levaduras metilotróficas

En la década de los 70's Koichi Ogata describió un grupo de levaduras que tenían la capacidad de crecer haciendo uso de una sola fuente de carbono y energía, el metanol. Los géneros *Hansenula*, *Candida*, *Pichia* y *Torulopsis* han sido estudiados por poseer esta característica [70-72]. Se ha demostrado que estos cuatro géneros están muy relacionados taxonómicamente entre sí [73]. El interés industrial por este tipo de levaduras se ha incrementado considerablemente con el paso de los años, y en la actualidad son ampliamente utilizadas para la producción de proteínas recombinantes de diferentes organismos incluyendo bacterias, hongos, parásitos y humanos [70, 74]. Adicionalmente, *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris*, por ejemplo, han sido utilizadas en estudios de biogénesis, ensamblaje y degradación de peroxisomas [74, 75].

Las levaduras metilotróficas bajo la inducción con metanol, utilizan enzimas como alcohol oxidasa (AOX, EC 1.1.3.13), dihidroxiacetona sintasa (DAS, EC 2.2.1.3), y catalasa (CAT, EC 1.11.6) [72]. La enzima AOX se encuentra en todas las levaduras metilotróficas, actúa en los peroxisomas, y es producida en grandes cantidades para compensar la baja afinidad de la enzima por el oxígeno [76]. En los procesos de producción de proteínas heterólogas, el promotor AOX es de gran utilidad, ya que es fácilmente regulado e inducible por metanol. Buckholz y Gleeson (1991) reportaron que en *Pichia pastoris* solamente una copia de estos genes permite obtener rendimientos similares a los que se obtienen con 50 copias de genes en *S. cerevisiae* [66].

### **2.3.1.1. Metabolismo de las levaduras metilotróficas**

La vía metabólica de utilización del metanol (MUT) es igual en todas las levaduras metilotróficas, la cual es regulada a nivel transcripcional e involucra un mismo grupo de enzimas [76] (Figura 9). Una parte de esta vía se lleva a cabo en los peroxisomas, organelos citoplasmáticos membranosos en forma de vesícula que contienen oxidاسas y catalاسas encargadas de la detoxificación celular. Estos organelos en presencia de fuentes de carbono como glucosa o glicerol son prácticamente inapreciables, sin embargo, en presencia de metanol pueden aumentar su tamaño ocupando casi el 80% del volumen total de la célula [77]. El primer paso en esta vía es la oxidación del metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ , subproducto del proceso) por acción de la enzima alcohol oxidasa (AOX, EC 1.1.3.13). Este  $H_2O_2$  es tóxico en grandes cantidades para la célula por lo cual es descompuesto en oxígeno y agua por acción de la enzima catalasa (CAT, EC 1.11.1.6). El formaldehído por su parte actúa tanto en la vía disimilatoria como asimilatoria del metanol. En la vía disimilatoria es oxidado fuera del peroxisoma a formato y dióxido de carbono, por dos deshidrogenاسas citoplasmáticas. En la asimilatoria es condensado con xilulosa 5 monofosfato ( $Xu_5P$ ), reacción catalizada por la enzima dihidroxiacetona sintasa (DAS, EC 2.2.1.3) formando constituyentes celulares de tres carbonos como la dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído 3 fosfato (GAP) (Figura 9), [76, 78, 79].

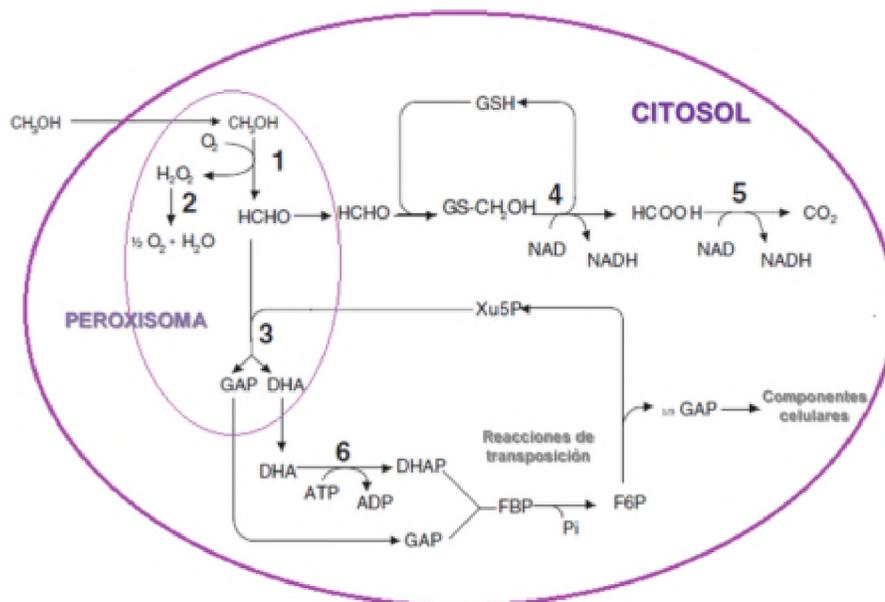
### **2.3.2. *Pichia pastoris***

#### **2.3.2.1. Características generales**

El género *Pichia* (*Komagataella*) pertenece a la familia Saccharomycetaceae, orden Saccharomycetales, clase Saccharomycetes, phylum Ascomycota, reino Fungi. El género *Pichia* se caracteriza por gemación multilateral, homotática, presencia o ausencia de pseudohifas/hifas septadas, y por ascosporas que

pueden ser en forma de sombrero, hemisferoidales, o esféricas con o sin un reborde, es haploide a menos que sea sometida a limitaciones de nitrógeno [80].

Es un organismo eucariótico, unicelular, su crecimiento en medio sólido (macroscópico) se caracteriza por formar colonias cremosas, blancas, y definidas. Microscópicamente, son células gram positivas, redondas con pequeñas yemas desprendiéndose de la célula principal. Tienen una fuerte preferencia por el metabolismo respiratorio, por lo cual no producen grandes cantidades de etanol y pueden de esta forma crecer a altas densidades celulares en medios económicos. El genoma de *Pichia pastoris* posee un tamaño aproximado de 9,4 a 9,8 Mpb, organizado en cuatro cromosomas. Contiene 5313 genes codificantes de proteínas con un contenido G-C de 41,6%. El uso de codones es similar al de *Saccharomyces cerevisiae*, y está demostrado que *P. pastoris* carece del gen *MNN1* que codifica para la  $\alpha$ -1,3-manosiltransferasa [81, 82].



**Figura 9. Metabolismo del metanol.** 1. Alcohol oxidasa; 2 Catalasa; 3 Dihidroxiacetona sintasa; 4. Formaldehído deshidrogenasa; 5. Formato deshidrogenasa; 6. Dihidroxiacetona kinasa, Glutatión (GSH), xilulosa 5 fosfato (Xu5P), fructosa 1,6 bifosfato (FBP). Adaptado de Gellisen et.al 2005 [79].

### 2.3.2.2. Plegamiento de proteínas en *P. pastoris*

En los eucariotas, en general, las proteínas nacientes destinadas para ser secretadas son translocadas en el lumen del retículo endoplasmático (RE), donde el plegamiento y las etapas iniciales de los procesos de maduración postraduccionales como la formación de puentes disulfuro y la adición de las glicosilaciones son realizados [83]. Generalmente las proteínas, especialmente

aquellas que son secretadas, poseen una pro-región necesaria para el correcto plegamiento de la proteína y en algunos casos en procesos de oligomerización. La expresión de proteínas sin la pro-región puede afectar la velocidad de liberación desde el RE haciéndola más lenta, e incluso puede causar el mal plegamiento de la misma. Antes de salir del RE la proteína debe ser correctamente plegada, lo cual ocurre gracias a la acción de chaperonas, co-chaperonas y foldasas, así como del complejo sistema de control de calidad del RE [84]. Una vez se asegura el correcto plegamiento de las proteínas, estas son empacadas en vesículas COP-II y transportadas al aparato de Golgi donde ocurren dos eventos principalmente: i) la pro-región es removida por la acción de endopeptidasas dibásicas como kex2p, furina, o amino peptidasas, y ii) la continuación del proceso de glicosilación. Desde Golgi las proteínas recombinantes son empacadas en vesículas secretoras y luego son dirigidas a la superficie celular [85].

### **2.3.2.3. Glicosilaciones en *Pichia pastoris***

Una de las principales modificaciones pos-traduccionales que sufren las proteínas eucarióticas es la adición de oligosacáridos. Se ha demostrado que este tipo de modificaciones pos-traduccionales juegan un papel importante en la función de muchas proteínas usadas con fines terapéuticos, por tanto, controlar o monitorear su correcta formación puede ser útil para mejorar la función de la proteína recombinante en el hospedero evitando de esta forma reacciones no deseadas [67]. Las glicosilaciones son específicas de tejido, especie, y tipo celular. Se pueden presentar dos tipos de glicosilaciones, i) a través de un enlace N-glicosídico al grupo R de una asparragina en una secuencia Asn-X-Ser/Thr; o (ii) a través de un enlace O-glicosídico en el grupo R de una serina, treonina, hidroxiprolina o hidroxilisina [86].

La heterogeneidad que se presenta en las glicoproteínas puede deberse a pequeñas diferencias en la longitud, el tipo y la identidad del oligosacárido adicionado, así como a la glicosilación parcial o a la no glicosilación de la molécula. Factores como el medio en el cual crecen las células, también puede afectar la naturaleza de la glicosilación [86]. Para las N-glicosilaciones el aminoácido X que se encuentra en la secuencia consenso es bastante importante, ya que si es una prolina, o un aminoácido cargado negativamente como el ácido glutámico o aspártico, ó un residuo hidrofóbico como triptófano o fenilalanina el proceso de N-glicosilación puede ser inhibido. Sin embargo, si el aminoácido sustituido es una lisina, histidina o arginina (residuos cargados positivamente) el proceso de glicosilación puede ser incrementado [85]. Las glicosilaciones en una proteína pueden afectar la cinética de reacción (enzimas), su solubilidad, la vida media en suero, la estabilidad a diferentes temperaturas, la actividad *in vivo*, la

inmunogenicidad, la unión a receptores, y el tiempo de supervivencia *in vivo* (farmacocinética).

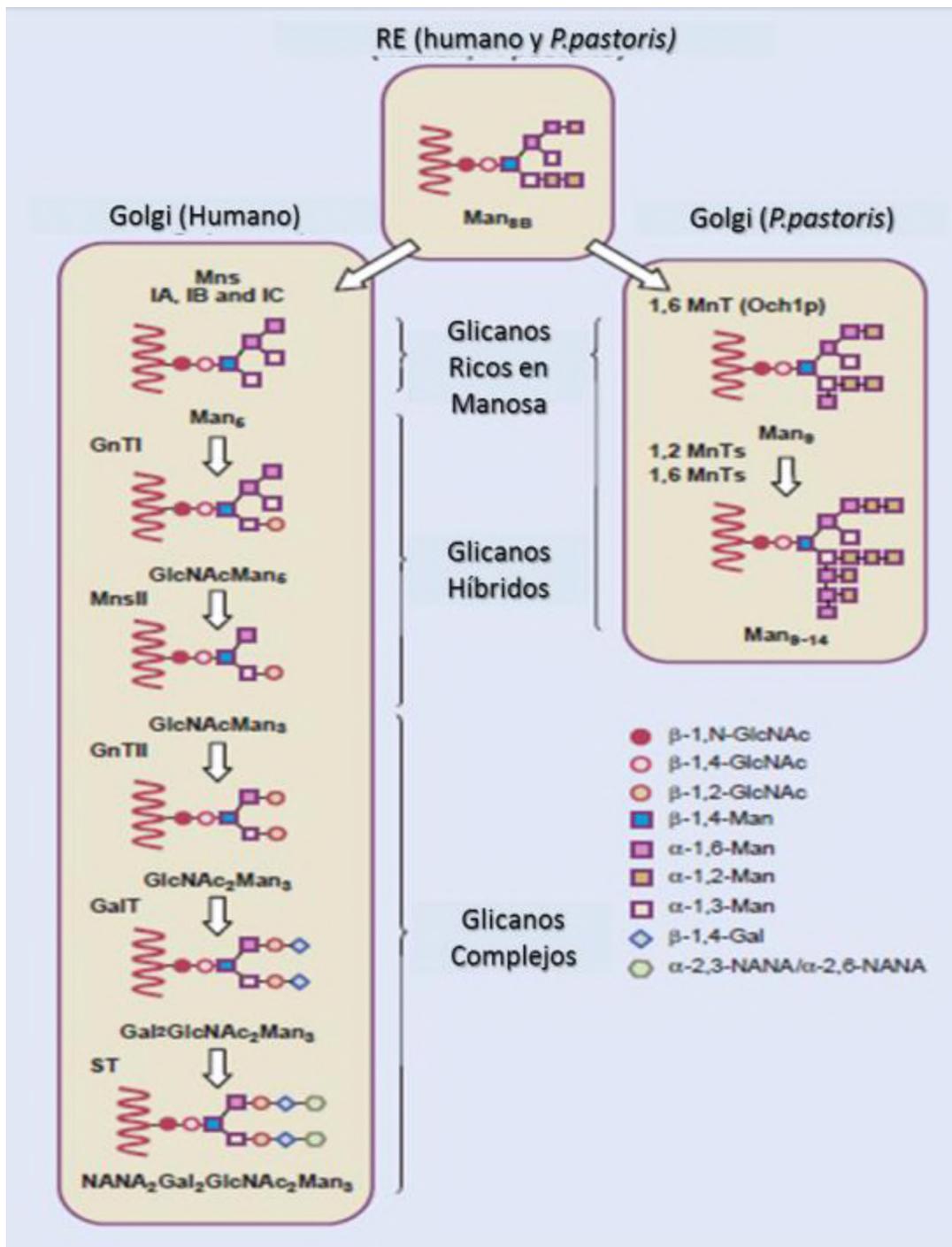
En levaduras y eucariotas superiores utilizan la vía de N-glicosilación más conservada, en la cual la formación de un precursor ligado a lípido Glc3Man9GlcNAc2 es transferida cotranslacionalmente en el RE a residuos Asn sobre el péptido nascente a través de la enzima UDP-GlcNAc:dolichol PGlcNAc-transferasa. *P. pastoris* forma aproximadamente 8-20 residuos de manosa a diferencia de *S. cerevisiae* que forma entre 50 y 150 [87]. Este proceso de biosíntesis de las N-glicosilaciones inicia en el lumen del RE en un proceso que involucra el ensamblaje y localización del oligosacárido en la proteína. La glucosidasa I remueve la glucosa terminal  $\alpha$ -1,2, y la glucosidasa II remueve los residuos  $\alpha$ -1,3, mientras la enzima  $\alpha$ -1,2 manosidasa remueve un residuo de manosa dando lugar a la formación del glicano intermediario Man<sub>8</sub>GlcNAc. Esta parte del proceso es similar tanto en células de mamífero como en levaduras [85, 88]. Una vez la proteína es transportada al aparato de Golgi, el proceso entre células de mamífero y levaduras varía. Mientras las células de mamífero recortan residuos de manosa, enzimas del aparato de Golgi (fucosiltransferasa, N-acetilglucosaminiltransferasa, galactosiltransferasa y sialiltransferasa) se encargan de adicionar residuos de fucosa (fuc), galactosa (gal), ácido N-acetil-neuramínico (NeuAc), ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc), N-acetyl-galactosamina (Gal-NAc), N-acetyl-glucosamina (GlcNAc) y ácido siálico. Por su parte, en las levaduras se adicionan residuos de manosa usando una serie de reacciones catalizadas por la enzima manosiltransferasa, los cuales pueden ser unidos por enlaces  $\alpha$ -1,6 ó  $\alpha$ -1,3 (Figura 10). *P. pastoris* no forma residuos  $\alpha$ -1,3 manosa, los cuales son causantes de la reacción antigénica en el hospedero tratados con proteínas terapéuticas [87, 89].

La producción de proteínas recombinantes que son N-glicosiladas en su estado nativo, son en su mayoría expresadas en hospederos que tengan la habilidad de generar las glicosilaciones humanas. Para la TRE en enfermedades lisosomales, es de gran importancia que las proteínas cuenten con las modificaciones necesarias para ser reconocidas por los receptores de manosa-6-fosfato en el Aparato de Golgi y ser dirigidas en vesículas recubiertas de clatrina al endosoma temprano en donde la enzima es liberada por una disminución en el pH y es procesada proteolíticamente, principalmente en el extremo N-terminal [90].

Enzimas recombinantes como la glucocerebrosidasa para el tratamiento por TRE en la enfermedad de Gaucher es producida en células de mamífero, ya que hospederos como *E. coli* no cuentan con la maquinaria para producir proteínas glicosiladas, lo cual hace que proteínas de este tipo tiendan a ser mal plegadas,

en algunos casos biológicamente inactivas y de baja estabilidad en circulación, y hospederos como las levaduras generan proteínas con glicosilaciones que aunque similares en estructura a las humanas, sus diferencias las hacen más fácilmente reconocibles por células del sistema inmune humano y por tanto más fácilmente eliminadas [67]. Dado que las células de mamífero tienen la propiedad de producir modificaciones pos-traduccionales, éstas se hacen más atractivas al momento de ser utilizadas como herramientas terapéuticas en terapias como la de reemplazo enzimático para enfermedades lisosomales. Muchas de las proteínas aprobadas en este momento para el tratamiento de estas enfermedades han sido producidas en este tipo de células. Sin embargo, muchos estudios han logrado demostrar que es posible producir formas activas de las proteínas de interés en otros sistemas de expresión como plantas y microorganismos (bacterias y levaduras), ya que éstos producen proteínas que presentan características similares a las producidas en células de mamífero, tales como especificidad de sustrato, y estabilidad en su actividad enzimática al ser sometidas a diferentes temperaturas y pH. Adicionalmente, se ha probado que las enzimas recombinantes lisosomales producidas en microorganismos son capturadas por diferentes células y son capaces de reducir los sustratos acumulados dentro del lisosoma [40].

Teniendo en cuenta que los microorganismos son sistemas de expresión más versátiles que las células de mamífero y que han presentado características muy similares a las recombinantes obtenidas de líneas celulares de mamífero, la producción de enzimas recombinantes para el tratamiento de enfermedades lisosomales en microorganismos podría llegar a ser comercialmente ventajosa, más aún teniendo en cuenta que en los últimos años se ha venido utilizando el diseño e ingeniería de estos microorganismos, encaminados al mejoramiento de los procesos de glicosilación, logrando la “humanización” de dichas modificaciones postraduccionales [89]. La humanización de las vías de N-glicosilación en levaduras está siendo aplicada de diferentes formas: 1) la delección de genes específicos de levadura involucrados en la hipermanosilación y de genes específicos de especie responsables de la modificación de las cadenas de azúcares en el extremo no reductor [91]; 2) Introducción de genes que catalizan la síntesis, transporte, y adición de azúcares humanos; 3) producción en *Pichia pastoris* de cadenas de azúcar tipo mamífero, usando librerías combinatorias de dominios de proteínas de transmembrana localizadas en el aparato de Golgi y el RE, y dominios catalíticos de varias glicosiltransferasas y glicosidasas de muchas especies [92], hacer proteínas que contengan cadenas de azúcares bicatenarios sialilados mediante la introducción de muchas enzimas requeridas para la biosíntesis del ácido siálico y la sialiltransferasa dentro de una cepa de levadura diseñada previamente [93].



**Figura 10. Vías de glicosilación en humanos y levaduras** Mns, α-1,2-manosidasa; MnsII, manosidasa II; GnT1, β-1,2-N-acetylglucosaminiltransferasa; GnTII, β-1,2-N-acetylglucosaminiltransferasa II; GalT, β-1,4-galactosiltransferasa; ST, sialiltransferasa; MnT, manosiltransferasa. Adaptado de Gemgross (2004) [67]

#### 2.3.2.4. *P. pastoris* como sistema de expresión

Después de ser descrita en 1969 por Koichi Ogata, y debido a las características como su capacidad de crecimiento a pH bajo, *Pichia pastoris* fue inicialmente utilizada bajo el concepto de producción SCP (single cell protein) para la producción de fuente de proteína o alimento utilizable de piensos para el consumo animal y para el aprovechamiento o reutilización de residuos industriales como el metano para la obtención de metanol. Hacia 1986, científicos de la compañía Phillips Petroleum investigaron y establecieron medios y protocolos para el aislamiento y cultivo de esta levadura a partir del metanol, y obtener así grandes cantidades de biomasa por litro de cultivo para ser utilizados en la dieta animal. Sin embargo, hacia los 90's, debido a la crisis petrolera, Phillips Petroleum Company contactó al Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc (SIBIA) para realizar estudios que permitieran usar esta levadura como una plataforma de expresión de proteínas heterólogas que fueran de interés humano e industrial. En 1993 la compañía petrolera vendió la patente a Research Corporation Technologies (Tucson, AZ) y licenció a Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA) para vender los componentes del sistema [78]

Actualmente *Pichia pastoris* es una de las levaduras metilotróficas más ampliamente utilizada en la producción de proteínas recombinantes de diferentes organismos desde bacterias hasta humanos [87, 94]. Proteínas como  $\alpha$ -amilasas (*Bacillus licheniformes*), fragmentos o dominios de toxinas (*Clostridium botulinum*, *Vibrio cholerae*),  $\beta$ -lactamasas y  $\beta$ -galactosidasas (*Escherichia coli*), invertasa (*Saccharomyces cerevisiae*), lipasas (*Rhizopus oryzae* *Candida rugosa*) proteínas de parásitos  $\alpha$ -manosidasa de *Trypanosoma cruzi*, alérgenos de plantas, han sido expresadas en *Pichia pastoris* [95]. Niveles de producción de algunas proteínas humanas expresadas en esta levadura se presentan a continuación: precursor de insulina (1.5 g/L), interlucina intracelular (4 g/L), albumina sérica humana (4 a 10 g/L), factor de necrosis tumoral (6 a 10 g/L). En términos generales se ha descrito que en promedio *Pichia pastoris* puede producir entre 10 a 30 g/L de proteína recombinante [86].

Las razones del amplio uso de *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas recombinantes incluyen: 1) las técnicas requeridas para su manipulación genética son sencillas y ampliamente conocidas, 2) posee uno de los promotores más fuertes utilizados para el control de la expresión de proteínas heterólogas, el promotor AOX1, 3) su metabolismo favorece un crecimiento netamente respiratorio en lugar del fermentativo, lo que le permite obtener mayores densidades celulares y disminuir la formación de intermediarios metabólicos como el etanol, acetaldehído y ácidos orgánicos, 4) presenta altos niveles de producción

de la proteína recombinante producida (dependiendo de la proteína a expresar), 5) es capaz de realizar diversos procesamientos postraduccionales, como metilaciones, acilaciones, ajustes proteolíticos, puentes disulfuro, N-glicosilaciones, lo cual permite obtener proteínas biológicamente activas, característica importante en la producción de proteínas terapéuticas dadas las implicaciones de estas modificaciones en procesos de señalización y reconocimiento celular, 6) dado que esta levadura no secreta cantidades altas de proteínas endógenas, hace más fácil la purificación de la proteína de interés, 7) elimina contaminación por bacteriófagos y endotoxinas; y 8) la disponibilidad comercial para adquirir el sistema de expresión [76, 78, 86, 87, 95].

#### **2.3.2.4.1. Promotores**

*Pichia pastoris* cuenta con diferentes promotores tanto inducibles como constitutivos para ser usados en la producción de proteínas heterólogas. Dentro de los promotores inducibles se encuentra el promotor AOX1, uno de los más ampliamente utilizados en la producción de proteínas recombinantes. Este promotor es reprimido cuando *P. pastoris* está creciendo en glucosa, glicerol o etanol, y es activado cuando la única fuente de carbono en el medio de cultivo es metanol. Sin embargo, debido a que el metanol es una sustancia altamente inflamable, clasificada como tóxica y de manejo peligroso, no es deseable para el manejo de producciones a gran escala, de proteínas para uso alimentario o farmacéutico [96]. Para ello se han utilizado promotores inducibles como el FLD1 (formaldehído deshidrogenasa), DAS (Dihidroxiacetona sintasa), ICL1 (isocitrato liasa), PHO89 (Putative Na<sup>+</sup>/phosphate symporter), THI11 (Gen de biosíntesis de la Tiamina), los cuales utilizan otro tipo de agentes inductores y otras estrategias para la producción de la proteína recombinante sin el uso de metanol [96].

Otra alternativa es el uso de promotores constitutivos como el promotor GAP (gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa), TEF1 (Factor de elongación traduccional 1), PGK1 (3-fosfoglicerao kinasa), PEX8 (proteína de matriz peroxisomal), YPT1 (GTPasa) [87, 97], los cuales pueden llegar a producir proteínas recombinantes en niveles similares y comparables a los obtenidos con el promotor AOX, como es el caso del promotor GAP [78]. Adicionalmente, se ha reportado que el uso de dos promotores, inducible y constitutivo (AOX y GAP) simultáneamente, puede llegar a duplicar la producción de una proteína heteróloga en *P. pastoris* (Tabla 4) [98]

**Tabla 4. Algunos promotores inducibles y constitutivos de *Pichia pastoris* para la producción de proteínas recombinantes.**

Gen	Producto	Regulación	Nivel de expresión
AOX1	Alcohol oxidasa 1	Inducida por metanol	Fuerte
AOX2	Alcohol oxidasa 2	Inducida por metanol	-5-10% de $P_{AOX1}$
DAS	Dihidroxiacetona sintasa	Inducida por metanol	Fuerte (similar a $P_{AOX1}$ )
FLD1	Formaldehído deshidrogenasa	Inducida por metanol y metilamina	Fuerte (similar a $P_{AOX1}$ )
ICL1	Isocitrato liasa	Inducción y desrepresión por etanol	No comparable con $P_{AOX1}$ o $P_{GAP}$
PEX8	Proteína de matriz peroxisomal	Inducida por metanol u oleato	Débil
PHO89 o NSP	Cotransportador de fosfato acoplado a sodio	Inducida por limitación de fosfato	Fuerte (similar a $P_{GAP}$ )
GAP	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	Constitutiva	Fuerte (similar a $P_{AOX1}$ )
AOD	Oxidasa alternativa	Expresión en glucosa	-40% de $P_{GAP}$
ENO1	Enolasa	Constitutiva	-20-70% de $P_{GAP}$
GPM1	Fosfoglicerato mutasa	Constitutiva	-15-40% de $P_{GAP}$
HSP82	Chaperona citoplasmática (Familia Hsp90)	Constitutiva	-10-40% de $P_{GAP}$
ILV5	Acetohidroxi isomeroeductasa ácida	Constitutiva	-15% de $P_{GAP}$
KAR2	Chaperona residente de retículo endoplasmático (Bip)	Constitutiva	-10-70% de $P_{GAP}$
KEX2	Endopeptidasa involucrada en el procesamiento de proteínas secretadas	Constitutiva	-10% de $P_{GAP}$
PET9	Transportados de ADP/ATP de la membrana interna de la mitocondria	Constitutiva	-10-1700% de $P_{GAP}$
PGK1	Fosfoglicerato kinasa	Constitutiva	-10% de $P_{GAP}$
SSA4	Proteína de choque térmico	Constitutiva	-10-25% de $P_{GAP}$
TEF1	Factor alpha de elongación translacional	Constitutiva y fuerte asociación al crecimiento	Fuerte (similar a $P_{GAP}$ )
THI11	Proteína involucrada en la biosíntesis de tiamina	Completamente reprimida por tiamina	-70% de $P_{GAP}$ en medio sin tiamina
TPI1	Triosa fosfato isomerasa	Constitutiva	-10-80% de $P_{GAP}$
YPT1	GTPasa involucrada en la secreción	Constitutiva	Débil

Adaptado de Vogl *et. al.* (2013), [97].

### **2.3.2.4.1.1. Promotor AOX ( $P_{AOX}$ )**

*Pichia pastoris* tiene dos genes que codifican para la enzima alcohol oxidasa, AOX1 y AOX2, siendo AOX1 el más fuerte y el responsable de aproximadamente el 90% de su producción en la célula. La regulación transcripcional de este gen involucra dos mecanismos uno de represión/desrepresión y uno de inducción [99]. La represión catabólica suprime la expresión del gen cuando hay una fuente de carbono como glucosa, etanol o glicerol presente en el medio, haciendo que los niveles de alcohol oxidasa en la célula sean indetectables. Incluso si se adiciona metanol al medio aún en presencia de otras fuentes de carbono, el promotor permanece reprimido. Una vez las otras fuentes de carbono son agotadas o permanecen a muy baja concentración en los procesos de alimentación en lote, el

promotor alcanza el estado de desrepresión. Sin embargo, en *P. pastoris*, AOX alcanza niveles entre 2 - 4%, y solamente al adicionar el metanol se conduce realmente a la inducción completa del gen [78, 97]. En el caso de la expresión de genes foráneos, si éstos se encuentran asociados a P<sub>AOX</sub> en el momento de la adición de metanol se inducirá igualmente su expresión. Se ha demostrado que los niveles de metanol necesarios en un cultivo a nivel de bioreactor pueden llegar a ser mayores del 30% del total de la proteína soluble [95].

#### **2.3.2.4.2. Vectores de expresión bajo P<sub>AOX</sub>, y fenotipo Mut**

Para la producción de una proteína heteróloga en *P. pastoris* o en cualquier microorganismo utilizado para este fin, es necesario el uso de vectores de expresión. La estructura general de estos vectores en levaduras consta de un promotor, un sitio de múltiple clonación, una secuencia terminadora 3' propia de *P. pastoris* que asegure la transcripción correcta del gen (la más utilizada es la del gen AOX1), un marcador de selección para la levadura y una secuencia de replicación y selección propias de *Escherichia coli* [69].

En el caso de *Pichia sp.*, la mayoría de estos vectores son de carácter integrativo, lo cual indica que deben contener zonas homólogas al genoma de la levadura que les permitan recombinarse al momento de la transformación. Este tipo de vectores no requiere ninguna presión selectiva durante el proceso de producción de la proteína recombinante y además permite tener múltiples copias repetidas integradas al genoma, aproximadamente unas 30 en *P. pastoris* [69]. Estas zonas homólogas son una región del gen AOX1 o el gen de histidinol deshidrogenasa (*HIS4*). Contienen además genes de resistencia a antibióticos como la ampicilina, o kanamicina (*E. coli*) el cual le confiere resistencia a la geneticina (G418), ó el gen *shBle* que le confiere resistencia a bleomicina o zeocina. Adicionalmente, si se espera obtener la proteína de forma extracelular los vectores contienen secuencias que permiten la secreción de la enzima recombinante, como lo son la secuencia del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* o la secuencia del gen de la fosfatasa ácida de *P. pastoris* PHO1 [87].

Existen numerosas cepas de *P. pastoris*, con un amplio rango de genotipos y fenotipos, algunas de ellas con mutaciones en genes que codifican para proteasas, que inhiben la expresión de las mismas, o en determinados genes que le confieran cierta auxotrofía o resistencia a la cepa para ser usados como marcadores de selección. *P. pastoris* GS115, así como KM71 y SMD1168, tienen una mutación en el gen de la enzima histidin-deshidrogenasa (*HIS4*) lo cual les impide sintetizar el aminoácido histidina. Una vez la cepa con esta deficiencia es transformada con los vectores de expresión que contienen este gen, se

complementa el defecto en el hospedero confiriéndole la capacidad de crecer en un medio sin histidina, a diferencia de un microorganismo no transformado [85].

Para transformar la levadura es necesario linealizar el vector ya sea por el gen marcador de selección HIS4 o por el fragmento del promotor AOX1 que contiene el vector. Este ADN linealizado es insertado en el microorganismo y el extremo de ADN libre estimulará la recombinación homóloga con el sitio del ADN genómico que le corresponda, haciendo que el cassette de expresión junto con los demás elementos del vector queden integrados en el genoma de la levadura [79].

*P. pastoris* puede presentar tres fenotipos distintos dependiendo de la manera como se haga la recombinación del gen heterólogo en el genoma, lo cual le confiere diferente capacidad en el consumo del metanol requerido para su crecimiento. Cuando la integración se realiza en el promotor AOX se reporta que aproximadamente entre el 10 – 20 % de los eventos de integración son efectivos haciendo que la cepa transformada presente un fenotipo lento en el cual su capacidad de crecimiento en metanol es reducida, este fenotipo es conocido como Mut<sup>S</sup>, permitiendo un mejor manejo del consumo de oxígeno en cultivo. Este tipo de mutantes son empleados en procesos de obtención de productos recombinantes, ya que demanda concentraciones aceptables de metanol haciendo que el proceso sea fácil de escalar. Por el contrario, si la integración se realiza en el gen *HIS4*, la frecuencia de integración puede darse con una efectividad del 50 a 80%, generando un fenotipo de crecimiento rápido en metanol o Mut<sup>+</sup>. En este mutante los dos genes AOX son funcionales por lo cual es muy sensible a altas concentraciones de metanol, haciendo que el control en cultivo de ésta cepa sea más riguroso y posiblemente con rendimientos más bajos que un mutante Mut<sup>S</sup>. Finalmente, se tiene el mutante Mut<sup>-</sup> en el cual los dos genes AOX no son funcionales, por lo que el microorganismo es incapaz de utilizar el metanol para su crecimiento. Este tipo de mutantes han sido aprovechados por producir a bajas densidades celulares otro tipo de productos recombinantes [98, 100].

#### **2.3.2.5. Condiciones de cultivo para *P. pastoris* bajo el promotor AOX**

Los procesos de producción de proteínas recombinantes pueden realizarse tanto en cultivos en matraz (100 mL) como en volúmenes mayores (biorreactor o tanques de fermentación). A escala de biorreactor se deben controlar factores como composición del medio de cultivo, tipo de cepa, factores como pH, oxígeno disuelto, velocidad de agitación y estrategia de fermentación. Es importante controlar tanto el pH como la temperatura durante el proceso ya que esto puede afectar la estabilidad de la proteína recombinante. Los medios de cultivo utilizados para *Pichia pastoris* son medios minerales que contienen sales, biotina, elementos traza y glicerol o metanol dependiendo de la etapa de cultivo en la cual se

encuentre. La composición del medio afecta el crecimiento y viabilidad de las células de la levadura.

Los procesos de producción generalmente se realizan a través de dos etapas, crecimiento (batch) e inducción (fed-batch). La primera se realiza en medio de cultivo con glicerol. En esta etapa el microorganismo se adapta y crece hasta consumir la totalidad de su fuente de carbono. El glicerol es frecuentemente usado como fuente de carbono ya que presenta un menor efecto represor sobre el  $P_{AOX}$  que la glucosa. Es necesario controlar las condiciones del cultivo a nivel de fermentador ya que es posible llegar a obtener densidades celulares por encima de 100g/L de peso seco, más de 400 g/L de peso húmedo y densidades ópticas mayores a 500 unidades/mL [71, 87].

En la segunda etapa se cambia la fuente de carbono por metanol, activando el  $P_{AOX}$ , para dar paso a la expresión de la enzima alcohol oxidasa para el consumo de metanol y por ende a la expresión del gen de interés clonado bajo el mismo promotor. El metanol utilizado para la etapa de inducción es tóxico para la célula en elevadas concentraciones y a su vez genera subproductos tóxicos al ser metabolizado (formaldehído y formato). Por esta razón, es muy importante controlar la velocidad de adición del metanol al cultivo durante la etapa de inducción, con el fin de asegurar que no se excedan los niveles de metanol en el medio pero que sean suficientes para expresar adecuadamente la proteína de interés.

Hay dos criterios bajo los cuales se recomienda ajustar la velocidad de adición del metanol al cultivo. El primero es tener en cuenta el fenotipo Mut al cual corresponde la cepa que se esté utilizando, ya que las velocidades de asimilación del metanol varían entre una cepa Mut<sup>+</sup> y una cepa Mut<sup>S</sup>. El segundo criterio es usar la lectura de la presión parcial de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (pO<sub>2</sub>), como indicador de la disponibilidad o falta de fuente de carbono en el medio. De esta forma, si los valores de pO<sub>2</sub> aumentan durante el proceso, indicaría que la velocidad de consumo del metanol está siendo mayor que la velocidad de adición del metanol utilizada, por tanto deberían ser ajustadas las velocidades para cumplir con los requerimientos del microorganismo.

Cabe resaltar que es necesario ajustar las condiciones de los procesos de cultivo para la producción de proteínas recombinantes de forma particular, ya que es muy importante lograr que el desarrollo del proceso de producción no afecte ni la viabilidad celular, ni la obtención de la proteína de interés de una forma adecuada.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Producir y caracterizar las enzimas  $\beta$ -hexosaminidasas humanas recombinantes, rhHex-A, rhHex-B y rhHex-S, a partir de la coexpresión de los genes *HEXA* y *HEXB* en la levadura metilotrónica *Pichia pastoris* como sistema de expresión

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Obtener clones de *Pichia pastoris* GS115 transformados con los genes de la subunidad  $\alpha$ ,  $\beta$ , ó coexpresando los dos genes simultáneamente.
2. Evaluar la producción de las enzimas recombinantes rhHex-A, rhHex-B y rhHex-S a diferentes escalas de producción.
3. Evaluar la estabilidad de las isoenzimas rhHex-A, rhHex-B y rhHex-S a diferentes condiciones de pH y temperatura.
4. Evaluar *in vitro* la capacidad de las isoenzimas recombinantes de ser incorporadas en células HEK293 y fibroblastos.



**Objetivo 1: Obtener clones de *Pichia pastoris* GS115 transformados con los genes de la subunidad  $\alpha$ ,  $\beta$ , ó coexpresando los dos genes simultáneamente.**

## **4.2. Elaboración de constructos**

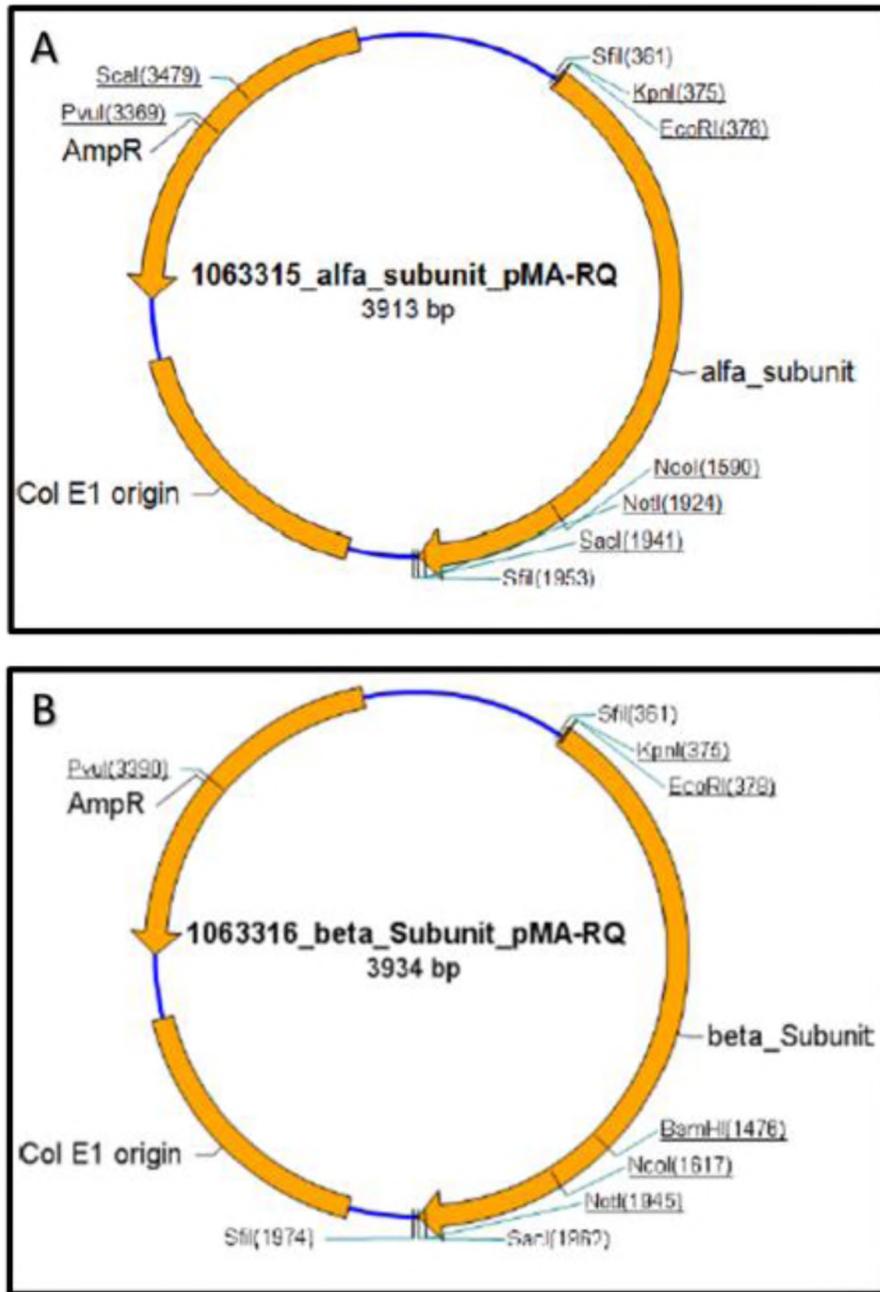
### **4.2.1. Optimización de los genes**

Las secuencias de los genes *HEXA* (GenBank AAH84537) y *HEXB* (GenBank AAH17378) que codifican para las subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , de las enzimas  $\beta$ -hexosaminidasas respectivamente, fueron optimizadas para el uso de codones en *Pichia sp.*, empleando herramientas disponibles por la compañía GeneArt® (Life Technologies Corporation [www.mygeneart.com](http://www.mygeneart.com)). El proceso de optimización incluyó ajustar el uso de codones, remover secuencias repetidas y estructuras secundarias de RNA, eliminar motivos de inestabilidad de RNA y motivos asesinos, remover sitios de corte y empalme en eucariotas superiores, entre otras. Adicionalmente se realizaron las siguientes modificaciones sobre la secuencia: 1) remoción de la secuencia péptido señal nativo; 2) inclusión de una secuencia 5'-catcatcatcatcaccat-3' en el extremo 5', la cual codificaba para un oligopéptido de 6 histidinas (*His6tag*) en el extremo N-terminal; 3) inclusión de las secuencias para las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* en los extremos 5' y 3', respectivamente, las cuales fueron eliminadas dentro del marco abierto de lectura de los genes *HEXA* y *HEXB*.

### **4.2.2. Construcción de los vectores de expresión**

Los genes de las subunidades  $\alpha$  (1572pb) y  $\beta$  (1593pb) fueron extraídas de los plásmidos enviados por el fabricante (Figura 12) mediante digestión enzimática con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* (Fermentas™) que flanquean los extremos 5' y 3' de cada uno de los genes respectivamente. De igual forma, el plásmido pPIC9K fue digerido con las mismas enzimas de restricción. Los productos de digestión fueron analizados en gel de agarosa al 1%; las bandas correspondientes a los genes *HEXA* y *HEXB* y al vector linealizado fueron purificadas empleando el estuche Purelink® Quick gel extraction kit (Life Technologies Corporation).

Las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific). Las ligaciones se realizaron empleando el estuche Rapid DNA ligation Kit (Fermentas™), bajo las instrucciones del fabricante en una relación 1:3 (vector:inserto), (Tabla 5). Los productos de ligación fueron transformados en células electrocompetentes de *E. coli* TOP10. Los constructos obtenidos fueron denominados pPIC9K-alpha (10848 pb) y pPIC9K-beta (10989 pb).



**Figura 12. Plásmidos enviados por Geneart, contienen los genes para A. subunidad  $\alpha$ . B. subunidad  $\beta$ . Los genes están flanqueados por dos enzimas de restricción diferentes en cada extremo, *EcoRI* y *NotI*, las cuales fueron usadas para extraer las secuencias de los genes e insertarlas posteriormente en el plásmido PIC9K.**

**Tabla 5. Ligación de los genes *HEXA* o *HEXB* con el vector pPIC9K.**

Muestra	Cantidad / Concentración final
Vector - 9,3 kb	50 ng
Inserto ( <i>HEXA</i> o <i>HEXB</i> ) - ~ 1.6 kb	30 ng
Rapid ligation buffer (5X)	1X
T4 DNA ligasa	5 U
H <sub>2</sub> O	c.s.p 20 µL

c.s.p.: cantidad suficiente para

### **4.2.3. Transformación de microorganismos**

#### **4.2.3.1. Escherichia coli DH5α**

Células competentes de la cepa *E. coli* DH5α fueron transformadas mediante choque térmico [101] para la amplificación de los plásmidos que contienen los genes optimizados y el vector pPIC9K empleando 1µl de cada uno de los constructos. Las células fueron sembradas en Luria Bertoni (LBA - Extracto de levadura 0.5% p/v, Cloruro de sodio 1% p/v, Triptona 1% p/v, agar bacteriológico 1.5%, pH 7,0) suplementado con ampicilina 100 µg/mL, e incubadas a 37°C durante 16h. Los ADN plasmídicos fueron extraídos y purificados mediante protocolo de lisis alcalina (miniprep) y verificados mediante electroforesis de agarosa y análisis de restricción [101].

Células electrocompetentes *E coli* TOP10 (Life Technologies Corporation) fueron empleadas para la transformación de los productos de ligación de los genes de cada una de las subunidades y el vector linealizado, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante con 2 µL de los respectivos productos de ligación. Las bacterias fueron sembradas en agar LBA e incubadas a 37°C durante 16 h. Las colonias obtenidas fueron verificadas mediante extracción de ADN plasmídico y análisis de restricción con la enzima *Nco1*. (Fermentas™). Los clones portando los constructos pPIC9k-alpha y pPIC9k-beta fueron almacenados a -80°C en glicerol al 15%.

#### **4.2.3.2. Pichia pastoris GS115**

Para la transformación de *P. pastoris* con los vectores de expresión se realizó la purificación del ADN plasmídico a partir de cultivos de *E. coli* TOP10 a escala de 100 mL, transformada con los constructos pPIC9k-alpha o pPIC9k-beta (*maxiprep*). El ADN plasmídico obtenido se linealizó con las enzimas de restricción *Sall* y *PmeI* (Fermentas) para los constructos pPIC9k-alpha y pPIC9k-beta, respectivamente. El producto de la linealización fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y las bandas obtenidas se purificaron empleando el estuche *Purelink® Quick gel extraction kit* (Life Technologies

Corporation). El ADN purificado se precipitó mediante adición de 2 volúmenes de isopropanol y 0,1 volúmenes de acetato de potasio 3 M pH 5,5; se resuspendió en 10 µL de buffer TE (EDTA 1 mM, Tris HCl 10 mM) y almacenado a -20°C.

Células competentes de *P. pastoris* GS115, preparadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Life Technologies Corporation), fueron transformadas mediante electroporación mezclando 40 µL de células competentes y 10 µL del ADN plasmídico previamente preparado. Tres transformaciones se realizaron de manera independiente: pPIC9k-alpha, pPIC9k-beta, y pPIC9k-alpha/pPIC9k-beta. La electroporación se llevó a cabo empleando un electroporador Gene Pulse (BIORAD) con un pulso de 1400V y 200Ω. Inmediatamente después de la electroporación se adicionó 1 mL de sorbitol 1M y las células fueron incubadas sin agitación durante 3 h a 30 °C. Posteriormente, 100 µL fueron sembrados de manera independiente en medio mínimo con dextrosa (MD: YNB 1.34%, Biotina 4x10<sup>-5</sup>%, D-Glucosa 2%) para la selección de transformantes, y medio mínimo con histidina (MDH: YNB 1.34%, Biotina 4x10<sup>-5</sup>%, D-Glucosa 2%, L-Histidina 0.004%) como control de viabilidad. Las cajas se incubaron a 30°C por 2 a 4 días o hasta observar la aparición de colonias. Los clones obtenidos fueron denominados *P. pastoris* GS115/pPIC9k-alpha (rhHex-S), *P. pastoris* GS115/pPIC9k-beta (rhHex-B) y *P. pastoris* GS115/pPIC9k-alpha/beta (rhHex-A). De los clones obtenidos se seleccionaron de manera aleatoria 5 clones por cada transformación, a los cuales se les realizó un banco primario en 30% glicerol y se almacenaron a -80°C.

#### **4.2.4. Confirmación por PCR**

##### **4.2.4.1. Extracción de ADN genómico**

###### **4.2.4.1.1. Inserción de genes**

La inserción de los genes en el genoma del microorganismo fue confirmada por PCR empleando una pareja de cebadores para cada subunidad. 5'-gttcctctgctgctcaacc-3' y 5'-cggacaacaacaactgg-3' para la subunidad α (amplicón de 241 bp); y 5'-tcatcgactccccaagattc-3' y 5'-tggagtgtaaacgtgggaca-3' para la subunidad β (amplicón de 155 bp). La reacción de PCR fue desarrollada bajo las condiciones descritas en la Tabla 6, con 35 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/1 min y 72°C/30 s. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

**Tabla 6. Componentes PCR confirmación inserción de genes alfa y beta**

Componentes	Cantidad / Concentración final
Buffer 1x	5 µL
Primer alpha /beta left	0,4 µM
Primer alpha/beta right	0,4 µM
dNTPs	0,2 µM
Mg <sup>+++</sup>	1,5 mM
Taq polimerasa	1,25 U
ADN	1 µg
H <sub>2</sub> O	c.s.p 50 µL

c.s.p cantidad suficiente para.

#### 4.2.4.2. Determinación de fenotipo por PCR

Para determinar el fenotipo de los clones obtenidos se emplearon los cebadores AOX1 FW 5'-gactggttccaattgacaagc-3' y RW 5'-gcaaatggcattctgacatcc-3' (Life Technologies Corporation) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y según lo reportado por Ayra *et. al.* (1998) [102]. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Los transgenes tienen un tamaño aproximado de 1,6 kb. Los clones con fenotipo Mut<sup>+</sup> deberían mostrar dos bandas: una de 2,2 kb correspondiente al gen nativo de AOX, y otra de ~2,1 kb correspondiente a la sumatoria del transgen 1,6 kb (HEXA o HEXB) más el fragmento de amplificación del gen AOX1 500 pb. Para los clones con fenotipo Mut<sup>S</sup> se debe mostrar solamente la banda de ~2,1kb (transgen 1,6 kb + amplicón AOX 500 pb). La reacción de PCR fue desarrollada bajo las condiciones descritas en la Tabla 7 con 35 ciclos 94°C/1 min, 55°C/1 min y 72°C/2,5 min.

**Tabla 7. Componentes PCR determinación de fenotipo**

Componentes	Cantidad / Concentración final
Buffer 1x	5µL
Primer AOX 5'	0,2 µM
Primer AOX 3'	0,2 µM
dNTPs	0,2 µM
Mg <sup>+++</sup>	1,5 mM
Taq polimerasa	1,25 U
ADN	1 - 10 µg
H <sub>2</sub> O	c.s.p 50 µL

c.s.p. cantidad suficiente para.

**Objetivo 2: Evaluar la producción de las enzimas recombinantes rhHex-A, rhHex-B y rhHex-S a diferentes escalas de producción.**

### **4.3. Evaluación de la expresión de los genes**

#### **4.3.1. Escalas de 10 y 100 mL. Tamizaje de clones**

La selección de los clones obtenidos en el proceso de transformación fue realizada a escala de 10 y 100 mL. Para esto se preparó un inóculo de los clones *P. pastoris* GS115/pPIC9k-alpha (rhHex-S), *P. pastoris* GS115/pPIC9k-beta (rhHex-B), y *P. pastoris* GS115/pPIC9k-alpha/beta (rhHex-A) en medio YPD (Extracto de levadura 1% p/v; Peptona 2% p/v; D-glucosa 2% p/v) durante 48 horas a 28°C y 250 rpm. Posterior a la incubación el inóculo fue adicionado al medio BMG (tampón fosfato de potasio 100 mM pH 6.0; base nitrogenada de levadura (YNB) 1.34%; biotina  $4 \times 10^{-5}$  %; glicerol 1%) e incubado por 24 horas a 28°C y 250 rpm. Una vez terminada la incubación los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos y el pellet se resuspendió en medio BMM (tampón fosfato de potasio 100 mM pH 6.0; YNB 1.34%; biotina  $4 \times 10^{-5}$  %; metanol 0,5 %) e incubadas durante 144 horas a 28°C y 250 rpm. Cada 24 h se adicionó metanol para mantener la concentración final de 0,5% durante el periodo de inducción evaluado. Como control negativo se utilizó un clon de *P. pastoris* transformado con el plásmido pPIC9K, el cual fue cultivado e inducido bajo las mismas condiciones descritas para los demás clones. Para la evaluación del proceso se tomaron alícuotas de 1 mL cada 24 h y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

#### **4.3.2. Escala de biorreactor 1,65 L**

Los clones que mostraron los mayores valores de actividad a escala de 100mL fueron evaluados a 1,65 L en un biorreactor Bioengineering KLF2000 de 3.7 L. Para esto se preparó un pre-inóculo 20mL de medio YPD incubado a 28°C durante 48 h a 250 rpm. El inóculo se preparó adicionando los 20 mL del pre-inóculo a 180 mL de medio MGli (YNB 1,34%; glicerol 1%; biotina  $4 \times 10^{-5}$ ) y se incubó durante 24 h a 28°C y 250 rpm. Los 200 mL de inóculo se emplearon para inocular a 1,45 L de medio salino FM22 modificado, pH 5.0 (Para 1 L: 25.74 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 3 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 8.58 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 0.6 g  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 40 g glicerol; 7.02 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $4 \times 10^{-5}$  % biotina; 1 mL de trazas minerales; 5 mL silicona) [103, 104].

La producción de las proteínas recombinantes se realizó en tres fases, manteniendo como condiciones constantes 28°C de temperatura, pH 5,0 y condiciones limitadas de oxígeno, así: i) un cultivo discontinuo hasta alcanzar una densidad celular de  $40 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa; ii) un lote alimentado con glicerol hasta

alcanzar una densidad de  $60 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa; y iii) un lote alimentado con metanol para inducir la expresión de los genes de interés. La concentración de metanol se mantuvo a una concentración de  $0,5 \pm 0,005 \%$  usando una sonda ALCOSENS (Heinrich Frings GmbH & Co. KG) con alimentación automática. Durante el cultivo la temperatura se mantuvo regulada a  $28^\circ\text{C}$  y el pH a 5,0 con hidróxido de amonio 7%. La fase de inducción se desarrolló bajo condiciones limitadas de oxígeno (oxígeno disuelto OD  $<10\%$ ). Durante la fase de inducción se tomaron alícuotas de 5 mL aproximadamente cada 12 h y se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su posterior análisis.

#### 4.4. Purificación de los extractos crudos de proteína

Las proteínas recombinantes fueron purificadas a partir del medio de cultivo (extracto crudo) gracias a la presencia de la señal de secreción  $\alpha$ -factor en el constructo. Los extractos crudos obtenidos de cada proteína, fueron filtrados secuencialmente a través de papel filtro Whatman # 1 y 42, membranas de  $0.45 \mu\text{m}$  y  $0.22 \mu\text{m}$  (Pellicon XL Filter Module Durapore, Merck Millipore). El permeado fue ultrafiltrado empleando membranas de 10, 30 y 100 kDa (Ultracel® ultrafiltration disc, Merck/Millipore) en una celda Stirred Ultrafiltration Cell (Millipore), de acuerdo a procedimientos realizados en trabajos previos [105]. Los extractos concentrados por ultrafiltración fueron sometidos a purificación mediante diferentes técnicas cromatográficas:

- **Cromatografía de afinidad:** para este proceso se utilizó la columna Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare), con el fin de aprovechar la His6tag presente en el extremo N-terminal de cada una de las subunidades. La purificación se realizó siguiendo instrucciones del fabricante y empleando un equipo de cromatografía de baja presión Biologic LP (Biorad).
- **Cromatografía de intercambio iónico:** los procesos de purificación por intercambio iónico se realizaron en el equipo de cromatografía de baja Presión Biologic LP (Biorad) a un flujo constante de  $5 \text{ mL/min}$ . Las proteínas fueron equilibradas en las soluciones tampón acetato o citrato de sodio  $25 \text{ mM}$  pH 5.5 para rhHex-S; acetato de sodio  $25 \text{ mM}$  pH 5.0 o fosfato de sodio  $10 \text{ mM}$  pH 6.0 para rhHex-B; fosfato de sodio  $10 \text{ mM}$  pH 6.0 para rhHex-A. Las columnas se equilibraron previamente con 10 volúmenes de la solución tampón de equilibrio correspondiente. El extracto crudo concentrado fue adicionado a la columna ( $\sim 5 - 10 \text{ mL}$ ) y la proteína no unida (PNU) fue recolectada en una sola fracción. La elución de las proteínas retenidas se realizó utilizando un gradiente lineal de NaCl  $500 \text{ mM}$  en la solución tampón de equilibrio de cada isoenzima. Los eluidos se recolectaron en fracciones de  $1 \text{ mL}$ .

Los procesos de purificación fueron monitoreados mediante cuantificación de proteína, medidas por actividad enzimática, electroforesis de proteínas SDS-PAGE, y Western blot.

#### **4.5. Análisis para el seguimiento y caracterización de las proteínas recombinantes**

##### **4.5.1. Seguimiento y caracterización de las proteínas recombinantes**

###### **4.5.1.1. Determinación de la densidad celular**

La densidad celular de los cultivos se realizó mediante medición de la densidad óptica (DO) a 610 nm en el espectrofotómetro HACH DR2700, realizando diluciones en base 10 en agua desionizada. Como blanco se empleó el medio de cultivo (BMM o FM22, dependiendo de la escala evaluada). El cálculo de la densidad celular ( $g L^{-1}$ ) se realizó utilizando la curva de peso seco reportada por Córdoba *et. al.*(2003) [106].

$$g L^{-1} = \frac{(0,528 \times DO_{610nm})}{0,619} \times fd$$

Donde:  $DO_{610nm}$  representa la absorbancia a 610 nm y  $fd$  el factor de dilución.

###### **4.5.1.2. Cuantificación de proteínas por el método de ácido bicinonínico (BCA)**

La cuantificación de las proteínas obtenidas en los diferentes procesos fue realizada utilizando el método de ácido bicinonínico (Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en una placa de 96 pozos se mezclaron 25  $\mu L$  de proteína o curva patrón con 200  $\mu L$  de la solución de trabajo (1 parte de solución A y 50 partes de solución B). La placa se incubó por 1 hora a 37°C, y se leyó a 540 nm en un lector de placas Anthos 20/20. La curva patrón fue preparada con albúmina sérica bovina (BSA) en un rango entre 0 – 2  $mg mL^{-1}$ .

###### **4.5.1.3. Determinación de Actividad Enzimática**

Para la determinación de actividad enzimática de las enzimas recombinantes se emplearon los sustratos 4-Metilumbeliferil-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (MUG, Sigma-Aldrich) 2,5 mM disuelto en solución tampón citrato – fosfato 0,01 M pH 4,4; ó 4-metilumbeliferil-6-sulfo-N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (MUGS, Calbiochem) 10 mM disuelto en agua desionizada. La medición se realizó siguiendo el procedimiento

reportado por Shapira *et. al.* (1989), [107] para la determinación de  $\beta$ -hexosaminidasas en leucocitos.

Brevemente, para la medición con el sustrato MUG, 0,004 a 0,01 mg de proteína en un volumen de 50  $\mu$ L fueron mezclados con 200  $\mu$ L de sustrato. En caso de ser necesaria la dilución de la muestra ésta se realizó empleando una solución de albúmina sérica bovina al 0,6%. Para la medición con el sustrato MUGS, 0,02 – 0,03 mg de proteína en un volumen de 100  $\mu$ L fueron mezclados con 25  $\mu$ L de solución tampón citrato-fosfato 0,2 M pH 4.4 (Ácido cítrico 0,1 y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M) y 25  $\mu$ L de sustrato MUGS. En caso de ser necesaria la dilución de la muestra ésta se realizó en agua desionizada. En ambos casos las mezclas se incubaron por 20 minutos a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 1,3 mL de solución tampón glicina – carbonato 0,17 M pH 9,8 (composición por litro: – Glicina 12,6 g,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  18 g). La fluorescencia se midió empleando un fluorómetro Turner a 350/450 nm excitación/emisión, empleando un estándar de 4-metilumbeliferona 1 nM (Sigma-Aldrich) diluido 1/5 en buffer glicina – carbonato.

En todos los casos como blanco de reacción se empleó agua desionizada. Una unidad (U) de actividad fue definida como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 nmol de sustrato por hora. El cálculo de la actividad específica ( $\text{U mg}^{-1}$ ) y la volumétrica ( $\text{U mL}^{-1}$ ), se realizó empleando las siguientes ecuaciones:

$$U \text{ mg}^{-1} = \frac{(F_{mx} - F_b) \times 3}{(F_{std} \times \text{mg}_{mx})} \quad U \text{ mL}^{-1} = \frac{(F_{mx} - F_b) \times 3}{(F_{std} \times \text{mL}_{mx})}$$

Donde:  $F_{mx}$ : fluorescencia muestra;  $F_b$ : fluorescencia blanco;  $F_{std}$ : fluorescencia estándar,  $\text{mg}_{mx}$ : mg de proteína adicionados; y  $\text{mL}_{mx}$ : volumen de muestra en mL.

#### 4.5.1.4. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

Las muestras obtenidas de los procesos de expresión y purificación fueron analizadas mediante electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida al 10 y 8% con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las muestras fueron diluidas 1:1 en solución de carga con  $\beta$ -mercaptoetanol (condiciones reductoras) y sin  $\beta$ -mercaptoetanol (condiciones no reductoras). El corrido electroforético se realizó a 120V 60mA en una cámara Minitprotean3 (BioRad). Los geles obtenidos fueron teñidos con azul de coomassie o nitrato de plata [108].

#### 4.5.1.5. Evaluación de interacciones ante diferentes agentes desnaturizantes

Aproximadamente 50  $\mu$ g de cada una de las hexosaminidasas recombinantes fueron mezclados con diferentes agentes desnaturizantes:  $\beta$ -mercaptoetanol 5%,

urea 8M, triton X-100 1%, citrato 25 y 50mM, fosfato de sodio pH 7,4. Una vez mezclados, cada muestra fue resuelta en geles de poliacrilamida al 8% bajo las condiciones descritas en 4.5.1.4., y teñidas con azul de coomassie.

#### **4.5.1.6. Western-blot**

Western-blot fue realizado para identificar las hexosaminidasas recombinantes purificadas usando anticuerpos específicos, así: anticuerpo monoclonal anti-HEXB (ab140649, Abcam); anticuerpo policlonal de conejo anti-HEXA (sc-134577, Santa Cruz); anticuerpo policlonal de conejo anti-HEXB cadena-A (sc134580, Santa Cruz). Brevemente, 10 µg de cada enzima fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 8%, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham Biosciences). Las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo (TBS 20 mM pH 7.5; Tween 20 0.2 %, leche descremada 5 %) por dos horas a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con solución de lavado (TBS 20mM pH 7.5, Tween 20 0.2%). Luego, los anticuerpos anti-hexosaminidasa fueron adicionados e incubados 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-mouse IgG-HRP y el ensayo fue revelado con solución de diaminobenzidina.

#### **4.5.1.7. Secuenciación de aminoácidos**

Las proteínas recombinantes fueron separadas por electroforesis de proteínas SDS-PAGE [108], transferidas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Millipore) [109], y visualizadas por tinción con azul de coomassie. Las bandas obtenidas fueron cortadas de la membrana y sometidas a secuenciación de Edman [110] en un secuenciador de proteínas Procise 492 controlado por Procise software version 5.1 en el Protein Chemistry Laboratory de la Univesidad Texas A&M.

#### **4.5.1.8. Análisis de proteínas por digestión de fragmentos trípticos por MALDI-TOF**

Las proteínas recombinantes fueron separadas por electroforesis de proteínas SDS-PAGE [108] y teñidas con azul de coomassie. Las bandas obtenidas fueron cortadas, desteñidas y tratadas como se describió previamente [111]. Los péptidos digeridos fueron procesados en un espectrómetro de masas MALDI-TOF (Shimadzu/Kratos). Los resultados fueron analizados mediante Peptide Mapping (Thermo Fisher) y ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/profound.exe>). El análisis por digestión de fragmentos trípticos fue realizado en el Protein Chemistry Laboratory de la Universidad Texas A&M.

#### 4.5.1.9. Cinética enzimática

La cinética de las enzimas recombinantes purificadas fue purificada empleando el sustrato artificial 4-metilumbeliferil-N-acetil-β-D-glucosamina (MUG, Sigma-Aldrich). El ensayo se realizó evaluando concentraciones de sustrato entre 1,0 y 4,0 mM con 0,004 mg de proteína total (proteína mínima requerida para la determinación de actividad) [107]. El ensayo se realizó en placa para fluorimetría de 96 pozos empleando un fluorómetro de placa Twinkle LB 970 (Berthold Technologies) a 350 y 450nm excitación/emisión. La reacción se realizó a 37°C durante 40 minutos tomando lecturas de fluorescencia cada minuto. Las fluorescencias se emplearon para calcular la concentración (mM) del fluoróforo 4-metilumbeliferona (4MU), empleando un estándar de 1 nM de 4MU. El  $K_m$  y  $V_{max}$  para cada enzima se estimaron empleando la herramienta de Estimación de Parámetros del programa COPASI 4,15 (Build 95). La reacción  $4MUG \rightarrow 4MU + G$  fue introducida en el programa y se cargaron los datos de concentración (mM) de 4MU (variable dependiente) en función del tiempo y de la concentración de sustrato (variables independientes), seleccionando el tipo de experimento como "Time Course" y el método de Levenberg-Marquardt para la estimación de los parámetros.

**Objetivo 3. Evaluar la estabilidad de las isoenzimas rhHex-A, rhHex-B y rhHex-S a diferentes condiciones de pH y temperatura.**

#### **4.6. Efecto de pH y temperatura en la estabilidad enzimática de las proteínas recombinantes**

##### **4.6.1. Efecto del pH**

Los pH evaluados fueron 3,5; 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; y 7,5. Para los pH ácidos se utilizó solución tampón citrato de sodio 25 mM y para los básicos se usó fosfato de sodio 25 mM. Cada enzima purificada fue disuelta en el buffer correspondiente y se incubó a 37°C por 1 h. Después de la incubación se midió actividad enzimática usando el sustrato MUGS para rhHex-A, y MUG para rhHex-B y rhHex-S.

##### **4.6.2. Efecto de la temperatura**

La evaluación a diferentes temperaturas se realizó al pH en el cual cada enzima obtuvo su mayor actividad enzimática así: pH 5,0 para rhHex-A; pH 4,0 para rhHex-S, y pH 4,5 para rhHex-B). Las enzimas purificadas fueron incubadas a 4, 37 y 45°C durante 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, y 72 h. Después de la incubación se midió actividad enzimática usando MUGS para rhHex-A, y MUG para rhHex-B y rhHex-S.

##### **4.6.3. Efecto de incubación en suero humano**

Para evaluar la estabilidad de las enzimas al ser incubadas en suero humano de voluntarios sanos, 1 µL de cada una de las proteínas fue mezclado con 49 µL de una mezcla de suero humano de individuos normales, e incubado por 1, 3, 6, y 24 horas a 37°C. Como control se utilizó mezcla de suero humano no enriquecida con enzima recombinante. Después de la incubación se midió actividad enzimática usando MUGS para rhHex-A, y MUG para rhHex-B y rhHex-S.

#### **Objetivo 4. Evaluar *in vitro* la capacidad de las isoenzimas recombinantes de ser incorporadas en células HEK293 y fibroblastos.**

##### **4.7. Evaluación de captura celular utilizando diferentes concentraciones de las enzimas recombinantes purificadas**

Para esta evaluación se utilizaron las líneas celulares HEK293 (ATCC CRL1573), y fibroblastos de piel de un voluntario sano (Donados por el Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana).

Los ensayos de captura celular fueron realizados de acuerdo a procedimientos previamente reportados por Mosquera *et. al.* (2012), [112]. Brevemente, 24 horas antes del ensayo, se cultivaron en placas de 12 pozos (TPP - 3.8cm<sup>2</sup> (área crecimiento) x 22.1mm diámetro/pozo), 1x10<sup>5</sup> células por pozo en medio Dulbecco modificado (DMEM Gibco, Carlsbad, CA), suplementado con suero fetal bovino 15%, penicilina 100 U mL<sup>-1</sup> y estreptomycin 100 U mL<sup>-1</sup>, a 37 °C en una incubadora con suministro de CO<sub>2</sub> durante 24 horas.

Dos horas antes del ensayo de captura el medio de cultivo fue cambiado por medio fresco. Cada enzima recombinante fue adicionada en una concentración final de 10, 50 y 100 nM [112, 113] Luego de 6 h de incubación a 37°C se retiró el medio de cultivo y fue almacenado a 4°C hasta su análisis. Cada pozo fue lavado con 1 mL de solución tampón de fosfato pH 7,2 (PBS 1X, composición por litro 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), y las células fueron lisadas con deoxicolato de sodio 1 % (Sigma-Adrich). Como controles se emplearon células sin adición de la enzima recombinante. La actividad enzimática fue medida tanto en el medio de cultivo como en el lisado celular usando MUGS para rhHex-A, y MUG para rhHex-B y rhHex-S.

##### **4.7.1. Evaluación de endocitosis de las enzimas recombinantes**

Para evaluar si la entrada de las enzimas recombinantes era mediada por un proceso de endocitosis, se siguió el protocolo descrito anteriormente, con 10 nM de cada enzima recombinante, pero incubando las células a 4 y 37°C posterior a la adición de la enzima. Luego de las 6 h de incubación se procesaron los medios de cultivo y el lisado celular como se describió en el numeral anterior.

##### **4.7.2. Evaluación de la entrada por receptores manosa y manosa-6-fosfato (M6P)**

Para evaluar el tipo de receptor empleado por las proteínas recombinantes para su entrada a la célula se realizaron ensayos de captura celular como se describió anteriormente con una concentración final de 50 nM en presencia o ausencia de 5

mM de Manosa (Sigma-Aldrich) o Manosa-6-fosfato (M6P) (Sigma-Aldrich). Como controles se emplearon células con y sin manosa o M6P en ausencia de la enzima recombinante. Luego de las 6 h de incubación el medio de cultivo y las células fueron tratados como se describió previamente.

#### **4.7.3. Evaluación de tráfico intracelular *in-vitro***

El tráfico intracelular para la rhHex-B producida en *P. pastoris* fue evaluado empleando células HEK293 y una enzima marcada con un fluorocromo, mediante microscopía confocal.

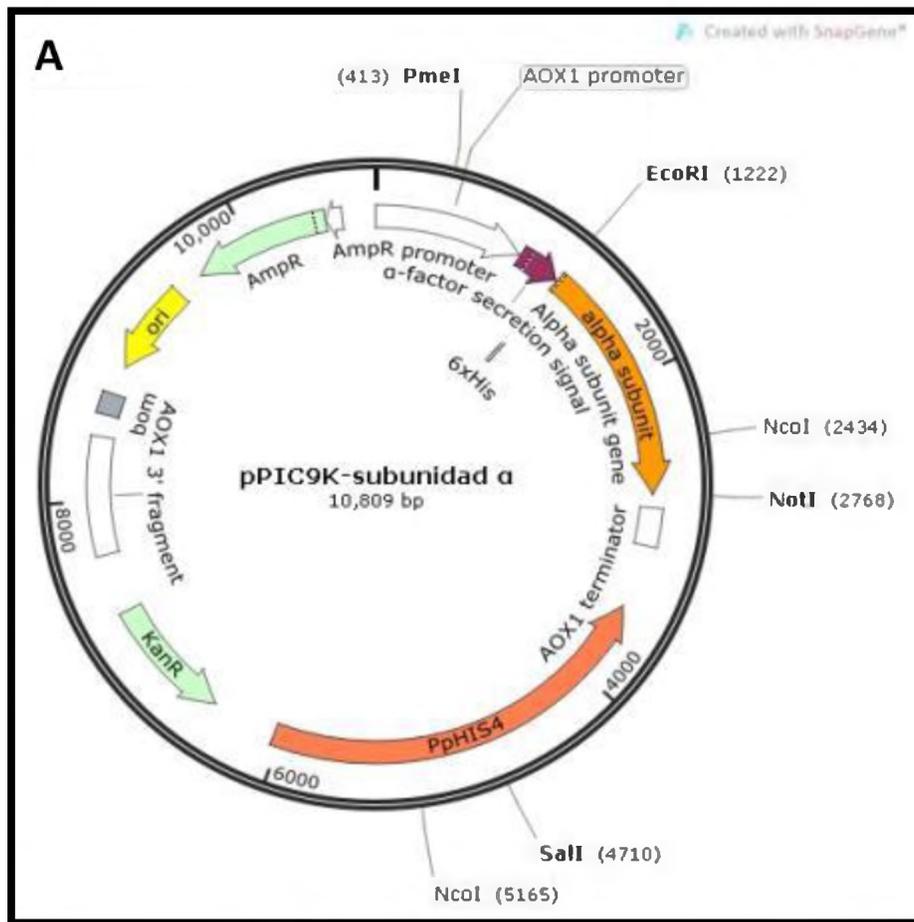
Previo al ensayo, la enzima rhHex-B fue marcada con Alexa Fluor® 568 dye (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante. La enzima marcada fue almacenada a 4°C hasta su posterior uso.

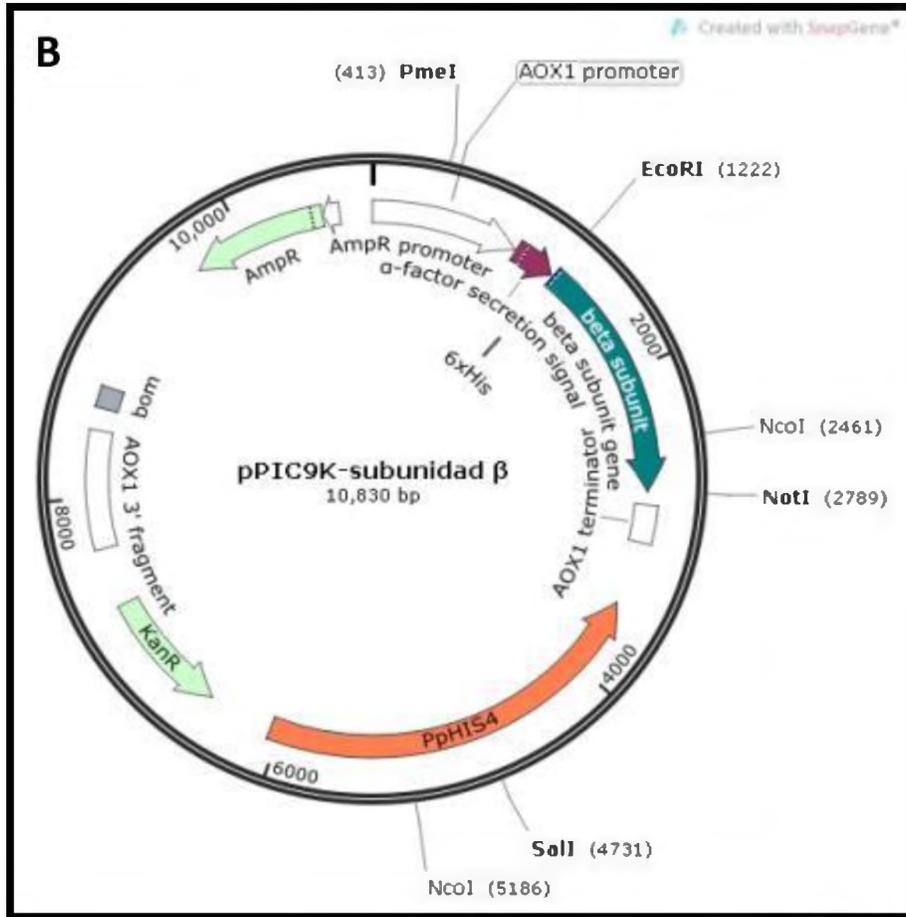
El ensayo de captura se realizó como se describió anteriormente (materiales y métodos 4.7.), en células HEK293 crecidas sobre laminillas de microscopía (Fisher Scientific®) pre-adsorbidas con colágeno tipo II (Sigma®) y transferidas a placas de cultivo de 12 pozos (TPP Techno Plastic Products AG®). La enzima marcada fue adicionada a cada lámina en una concentración final de 50 nM. Pasadas las 6 h del ensayo de captura, los lisosomas de las células fueron marcados utilizando LysoTracker® Green DND-2 (Thermo Fisher Scientific) en medio DMEM en una concentración final de 375 nM. Las células se incubaron 1 hora a 37°C. Finalmente, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% y se realizó el marcaje de los núcleos celulares con DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (Thermo Fisher Scientific). El registro de las imágenes se realizó en el microscopio confocal Olympus FV1000 con el apoyo del programa Fluoview (Olympus®) (Unidad de Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Transformación de la cepa

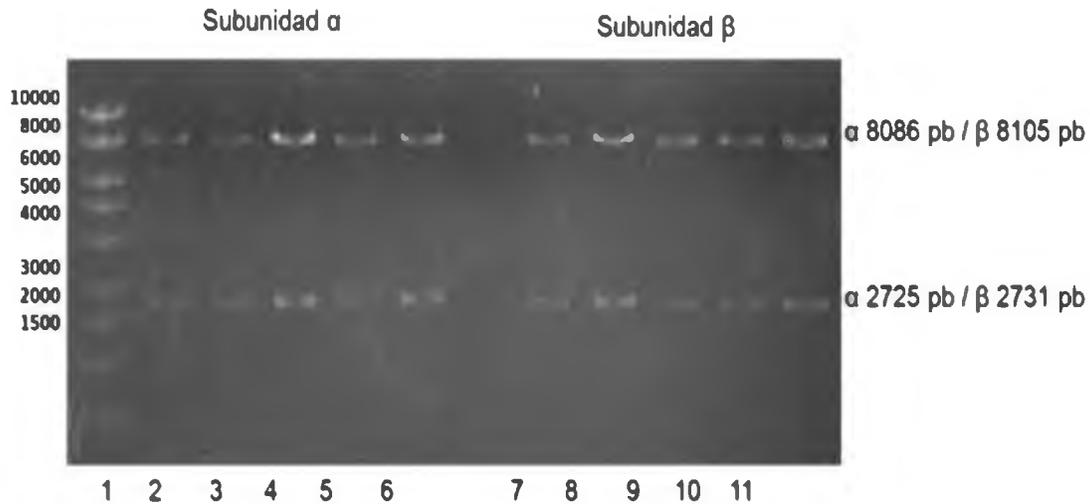
Los clones de *Escherichia coli* portando los constructos pPIC9k-alpha y pPIC9k-beta (Figura 13) fueron verificados inicialmente mediante extracción de ADN plasmídico y análisis de restricción con la enzima *NcoI*, la cual realiza cortes en dos puntos de los constructos obteniéndose bandas de 8088 y 2725 pb para pPIC9k-alpha, y 8105 y 2731 pb para pPIC9k-beta (Figura 14).





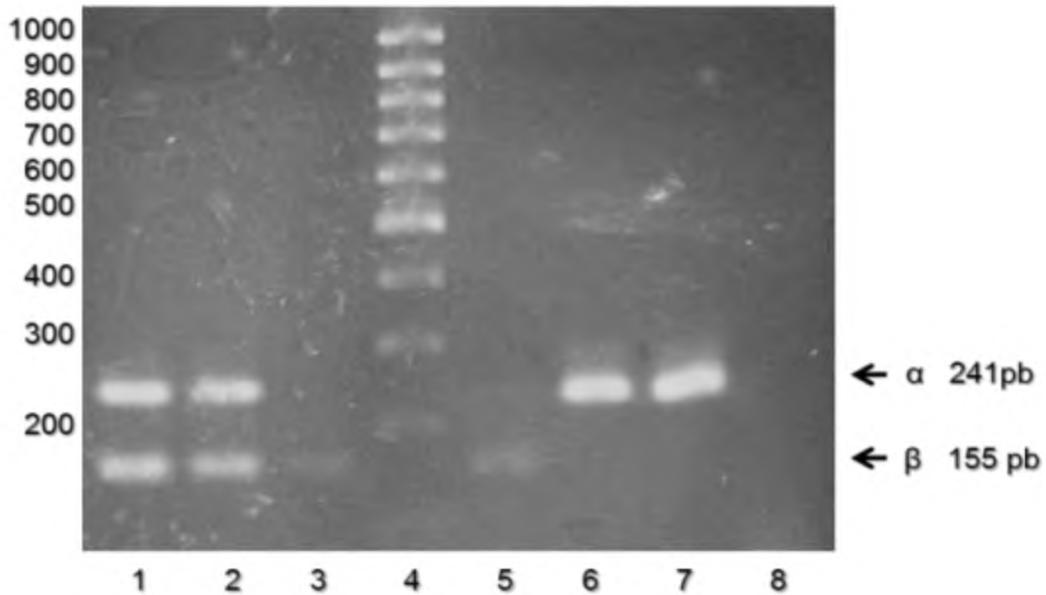
**Figura 13. Constructos.** Los constructos **A.** pPIC9k-alpha y **B.** pPIC9k-beta se realizaron utilizando el plásmido pPIC9K y los genes *HEXA* y *HEXB* optimizados para su expresión en *Pichia pastoris*, tienen un tag de histidinas en N-terminal y la señal de secreción  $\alpha$ -factor.

Una vez verificada la correcta inserción de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , se realizó la extracción y linealización del ADN plasmídico empleando las enzimas *PmeI* y *SalI*, con los cuales se transformaron células competentes de la cepa *Pichia pastoris* *GS115*, tal como se describe en materiales y métodos. La inserción de los genes en el microorganismo fue confirmada por PCR obteniendo las bandas esperadas para los amplicones de cada subunidad (Figura 15).

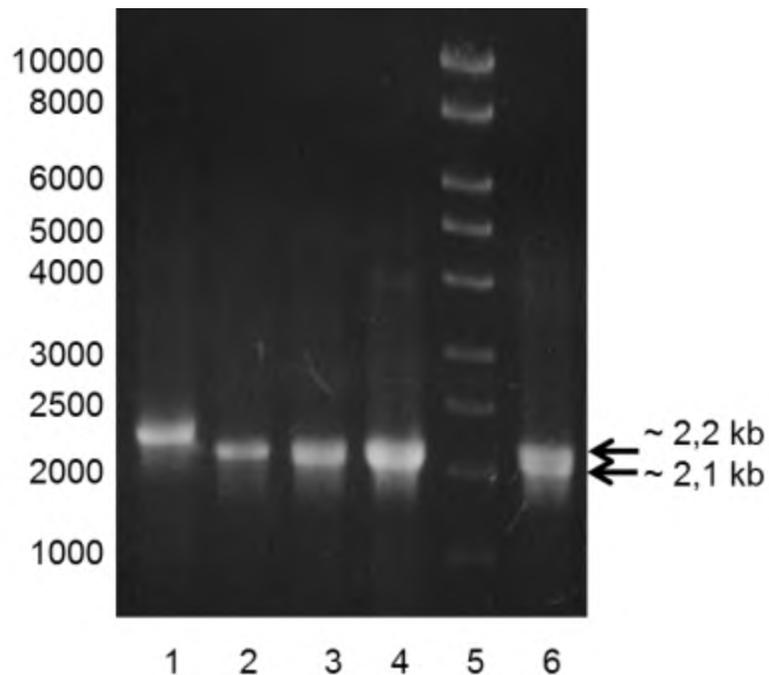


**Figura 14. Verificación constructos pPIC9k-alpha y pPIC9k-beta por análisis de restricción.** Carril 1. Peso molecular. Carril 2 – 6: Clones *Escherichia coli* transformados con pPIC9k-alpha. Carril 7 – 11: Clones *Escherichia coli* transformados con pPIC9k-beta.

Dependiendo de cómo ocurra la recombinación genética en el genoma de la levadura es posible causar una, dos o ninguna delección en los genes AOX, obteniendo los mutantes  $Mut^S$ ,  $Mut^+$  o  $Mut^-$  respectivamente. Estos mutantes presentan diferentes velocidades de crecimiento, así como de consumo de metanol durante la fase de inducción. Los mutantes  $Mut^S$  crecen en metanol a muy bajas velocidades consumen menos metanol que los mutantes  $Mut^+$  [87]. Los mutantes  $Mut^S$  han sido asociados con productividades más altas que la cepa silvestre y que los mutantes  $Mut^+$  [114]. Por su parte los mutantes  $Mut^+$  son capaces de utilizar rápidamente y en grandes cantidades el metanol [85], lo cual debe ser cuidadosamente controlado para que no se vea afectada la producción de la proteína recombinante. La evaluación del fenotipo de los clones obtenidos en este trabajo se realizó mediante PCR. En la Figura 16, se observa una banda a la altura de 2,2kb que corresponde con el peso de la banda obtenida para el control  $Mut^+$ . Adicionalmente, y como era de esperar para mutantes de este tipo, es posible observar una banda adicional muy cercana de ~2,1kb la cual correspondería al tamaño del transgen más el peso del amplicón de AOX. Esto concuerda con lo descrito por el distribuidor de la cepa *P. pastoris* GS115, donde describen que al linealizar constructos con enzimas diferentes a *Bgl*II, se obtienen clones con fenotipo  $Mut^+$ .



**Figura 15. Verificación de inserción de genes por PCR.** Los clones fueron verificados por PCR usando cebadores específicos para cada subunidad. Carril 1 y 2: clones con las subunidades  $\alpha\beta$ . Carril 3 y 5: clones con las subunidad  $\beta$ . Carril 4: patrón de bajo peso molecular. Carril 6 y 7: clones con la subunidad  $\alpha$ . Carril 8: Control negativo.



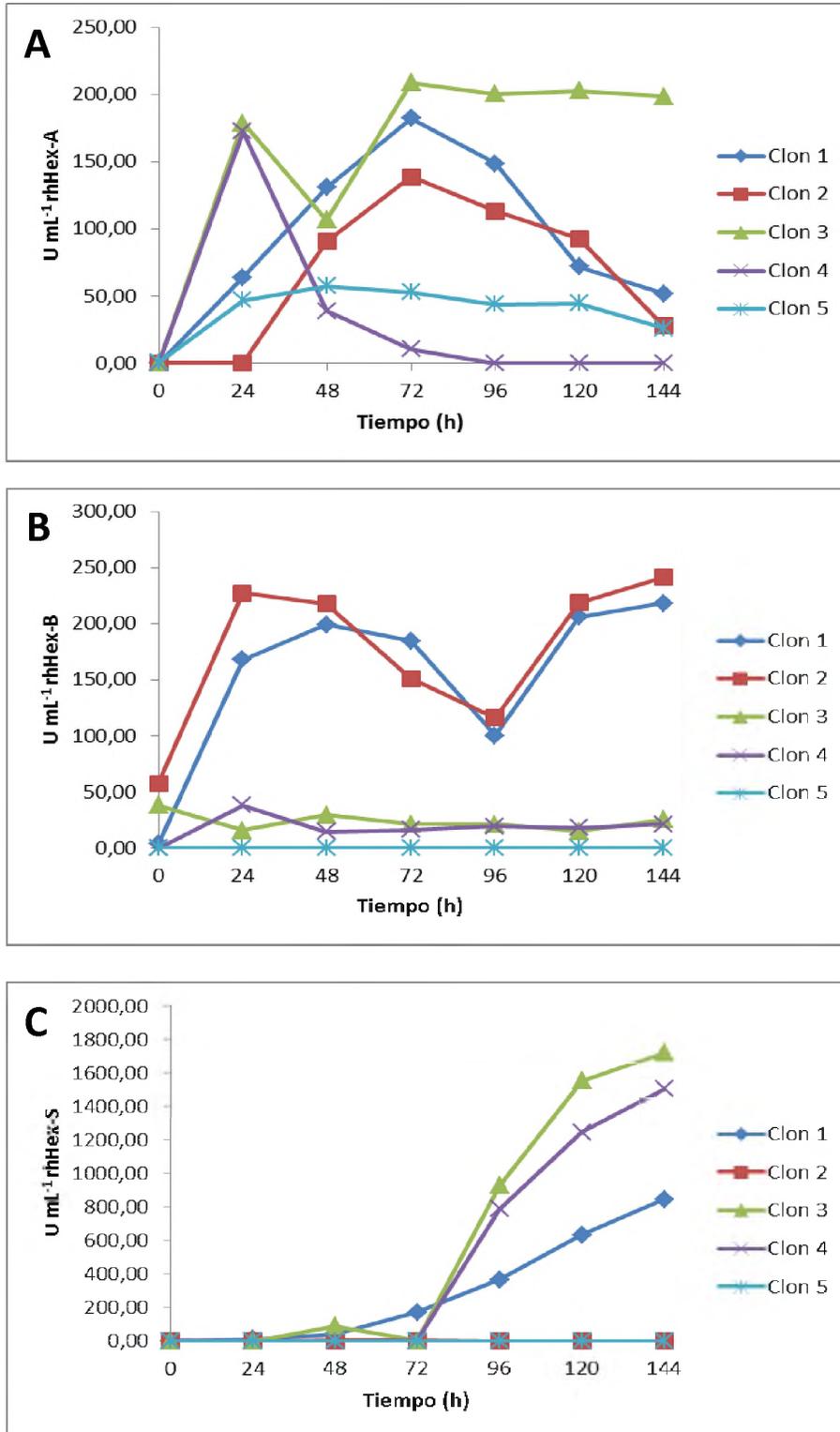
**Figura 16. Determinación del fenotipo por PCR.** La confirmación del fenotipo se realizó por PCR empleando cebadores del gen *AOX*. **Carril 1:** Control  $MUT^s$  *P. pastoris* GS115/His+/Muts/HAS. **Carril 2:** Control  $Mut^+$  GS115/His+/Mut+/B-Gal. **Carril 3:** Clon de rhHex-A subunidades  $\alpha\beta$  **Carril 4:** Clon de rhHex-A subunidades  $\alpha\beta$ . **Carril 5:** Peso molecular. **Carril 6:** Clon de rhHex-S subunidad  $\alpha$ .

## 5.2. Evaluación de la expresión de los genes a 10 mL, 100 mL y 1,65 L

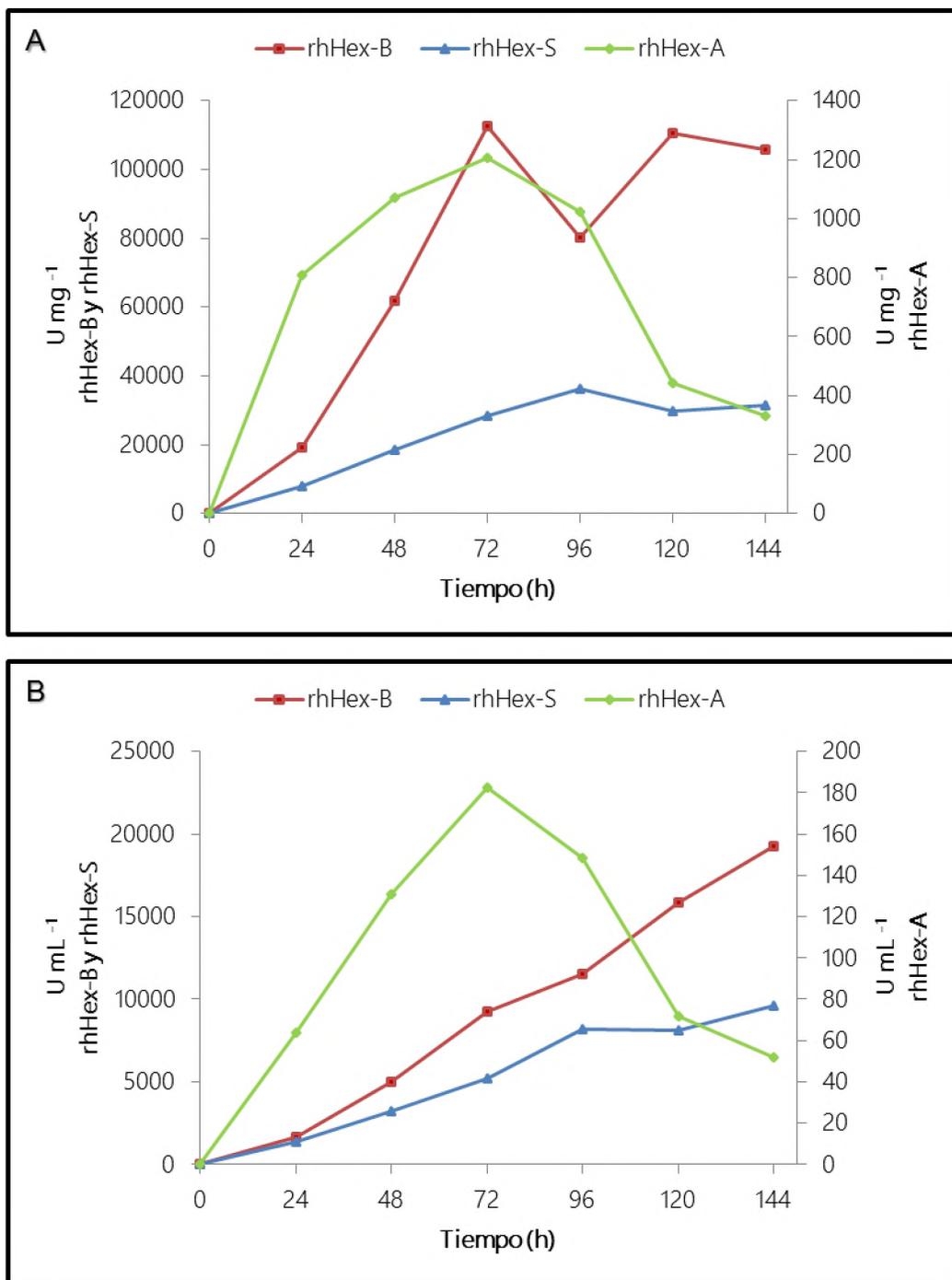
Se seleccionaron cinco clones de *P. pastoris* GS115 para cada una de las enzimas rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S, con el objetivo de ser evaluados a 10 mL (Figura 17). En esta escala la actividad volumétrica más alta fue de 208,7; 218,1; y 1717,5 U mL<sup>-1</sup>, para cada una de ellas, respectivamente. Los clones con la actividad volumétrica más alta para cada enzima recombinante fueron seleccionados para su posterior evaluación a 100 mL y 1,65 L.

A escala de 100mL los máximos valores de actividad volumétrica y específica para rhHex-A, se observaron a las 72 horas de inducción, con 182,2 U mL<sup>-1</sup> y 1207,6 U mg<sup>-1</sup>, respectivamente. Los niveles más altos de actividad específica para rhHex-B fueron observados a las 72 h con valores de 112563,3 U mg<sup>-1</sup>, sin embargo la actividad volumétrica muestra un valor más alto hacia las 144 h de inducción de 19257,3 U mL<sup>-1</sup>. De igual forma para rhHex-S la actividad específica más altas fueron observadas hacia las 96 h de inducción con 36292,06 U mg<sup>-1</sup> y la actividad volumétrica muestra un valor de 8173,7 U mL<sup>-1</sup> a las 96 horas mostrando una tendencia a estabilizarse hacia las 144 h (Figura 18).

Por su parte, *P. pastoris* transformada solamente con el plásmido pPIC9K vacío (sin gen) fue empleada como control negativo, mostrando una actividad máxima total de  $\beta$ -hexosaminidasa de 3,2 U mg<sup>-1</sup>, lo cual es marcadamente menor que lo observado en los clones que expresan cualquiera de las tres isoenzimas recombinantes. Con el fin de confirmar que los valores de actividad correspondían a la inserción de los cDNAs de las hexosaminidasas humanas se realizó la búsqueda en Uniprot y GenBank de secuencias para hexosaminidasas endógenas de *P. pastoris* CBS 7435 (Taxonomy ID 981350), *P.pastoris* DMSZ 70382 (Taxonomy ID 638632), y *P. pastoris* GS115 (Taxonomy ID 644223) sin encontrar ninguna secuencia asociada con alguna actividad hexosaminidasas. Estos resultados muestran que la actividad  $\beta$ -hexosaminidasa detectada en los clones expresando rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S se debió a la presencia de los genes insertados. Adicionalmente, estos resultados muestran la especificidad de los sustratos usados para el seguimiento de la producción de las  $\beta$ -hexosaminidasas humanas recombinantes.



**Figura 17. Evaluación de la expresión clones a 10 mL.** Cinco clones de cada cepa de *P.pastoris* GS115 para la expresión de cada enzima, fueron evaluados a 10 mL. El clon de cada proteína que presentara mayor actividad fue escogido para ser escalado a 100mL. Se presentan los valores de actividad volumétrica medida con el sustrato MUG para rhHex-A (A), rhHex-B (B), y rhHex-S (C).

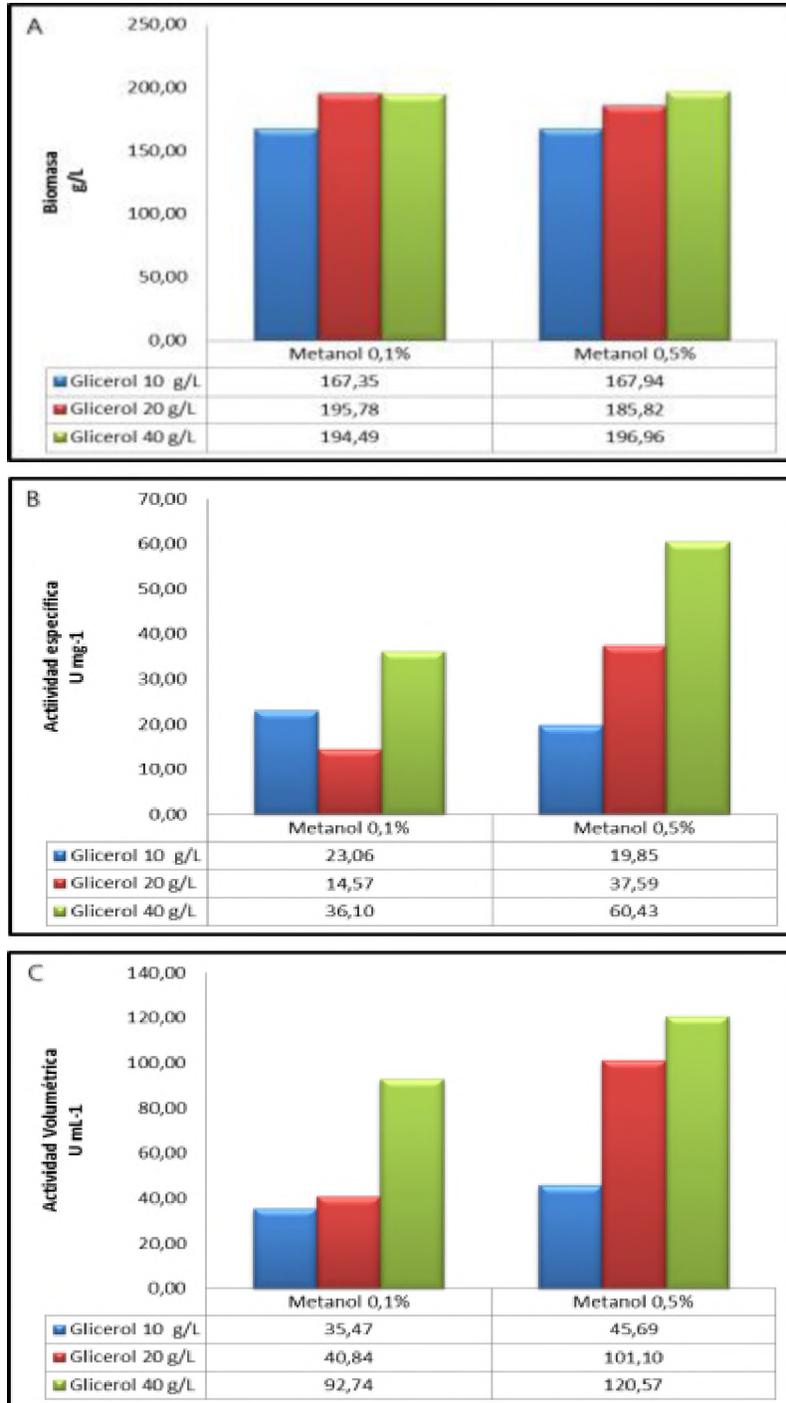


**Figura 18. Expresión de las proteínas rhHexA, rhHexB, y rh HexS a escala de 100 mL. A.** Actividad específica (U mg<sup>-1</sup>). **B.** Actividad volumétrica ((U mL<sup>-1</sup>). La inducción se realizó durante 144 h con 0,5% metanol.

Teniendo en cuenta las horas en las cuales se obtuvo la mayor actividad de cada uno de los clones seleccionados a 100 mL, se realizó el escalamiento a 1,65 L. Como se esperaba los valores de las actividades enzimáticas incrementaron como resultado de controlar cuidadosamente las condiciones de crecimiento e inducción (pH, temperatura, aireación, velocidad de alimentación y agitación), lo cual permitió mejorar la producción de cada una de las proteínas heterólogas [71].

Es bien sabido que las condiciones de producción de una proteína recombinante dependen en gran medida de la cepa utilizada y de la proteína a expresar, por tanto a pesar de haber realizado trabajos previos a escala de biorreactor con otras enzimas lisosomales en el IEIM, fue necesario evaluar diferentes concentraciones de glicerol ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ,  $20 \text{ g L}^{-1}$ , y  $40 \text{ g L}^{-1}$ ) durante la fase de lote, enfrentadas contra 0,1 ó 0,5 % v/v de metanol durante la fase de lote alimentado (inducción), con el fin de definir en cual de ellas era posible obtener una proteína recombinante más activa. Los resultados mostraron que al utilizar las concentraciones de  $40 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol y 0,5 % de metanol se logró obtener una alta densidad celular (biomasa), y valores de concentración de proteína y actividad enzimática más altos (Figura 19).

De esta forma, todos los ensayos en biorreactor fueron realizados bajo las concentraciones de glicerol y metanol descritas previamente, obteniéndose entre 120 a  $200 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa, y una concentración de proteína de 1,6; 1,4; y  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  para los clones de rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S, respectivamente. El oxígeno disuelto fue mantenido por debajo del 10% de acuerdo a los requerimientos del microorganismo. Se ha descrito previamente que las condiciones limitadas de oxígeno contribuyen en la reducción de la lisis celular y al mejoramiento de los rendimientos de producción de enzimas heterólogas en comparación a aquellos con suministro de oxígeno [100]. Adicionalmente, se ha demostrado que en cultivos bajo condiciones limitadas de oxígeno se obtienen rendimientos de producción de proteína más altos que aquellos con suplemento de oxígeno [115]. De igual forma, para el caso de las enzimas lisosomales humanas recombinantes, se demostró previamente que la producción de la enzima recombinante humana iduronato-2-sulfato sulfatasa en la cepa *P. pastoris* GS115 se incrementó bajo condiciones limitadas de oxígeno en comparación con los cultivos realizados bajo condiciones limitadas de sustrato [116].



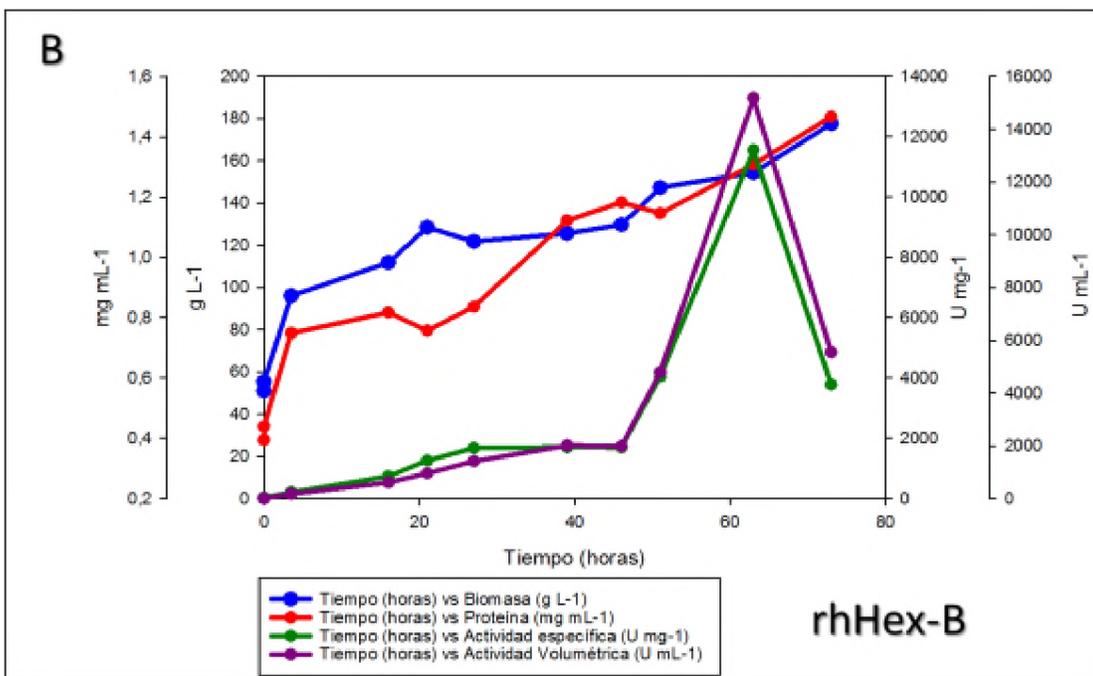
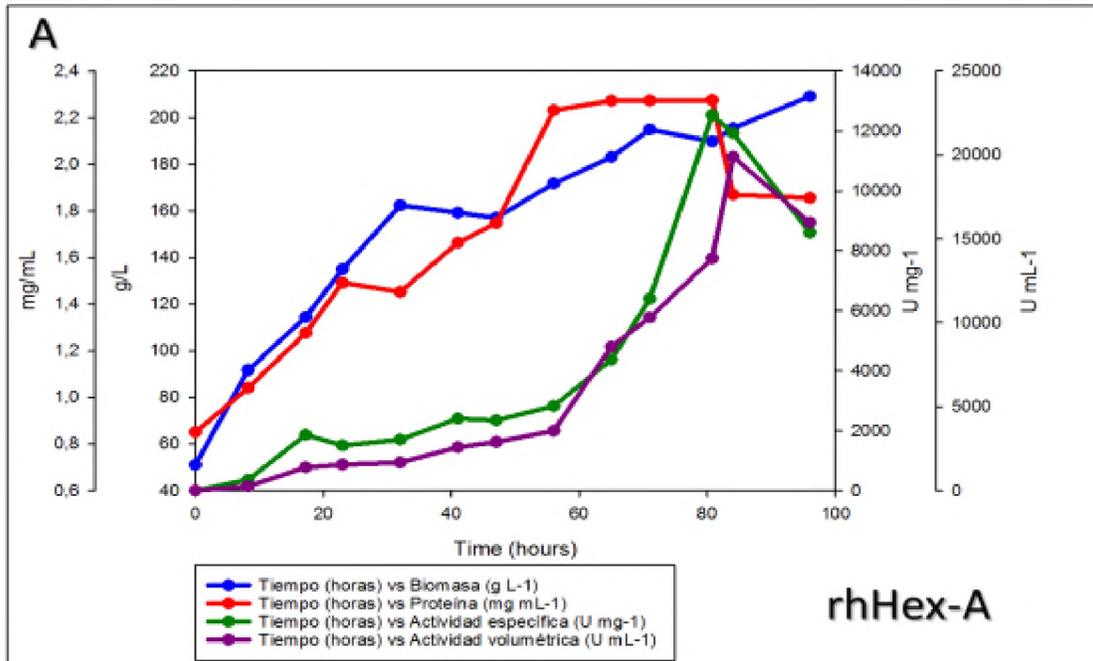
**Figura 19. Evaluación del efecto de las concentraciones de glicerol y metanol en cultivos a escala de bioreactor (1,65 L).** La evaluación de diferentes concentraciones de glicerol (10 g L<sup>-1</sup>, 20 g L<sup>-1</sup>, y 40 g L<sup>-1</sup>) durante la fase en lote, y de metanol (0,1 y 0,5% v/v) durante la fase de inducción, fueron evaluadas inicialmente en cultivos para la producción de rhHex-A. Las condiciones que permitieran tener valores de proteína activa más altos fueron seleccionadas para realizar los posteriores cultivos de rhHex-B y rhHex-S. Se determinaron los valores de **A.** Biomasa (g L<sup>-1</sup>). **B.** Actividad específica (U mg<sup>-1</sup>). **C.** Actividad volumétrica (U mL<sup>-1</sup>). La medición de actividad enzimática en este proceso fue realizada utilizando el sustrato sulfatado MUGS.

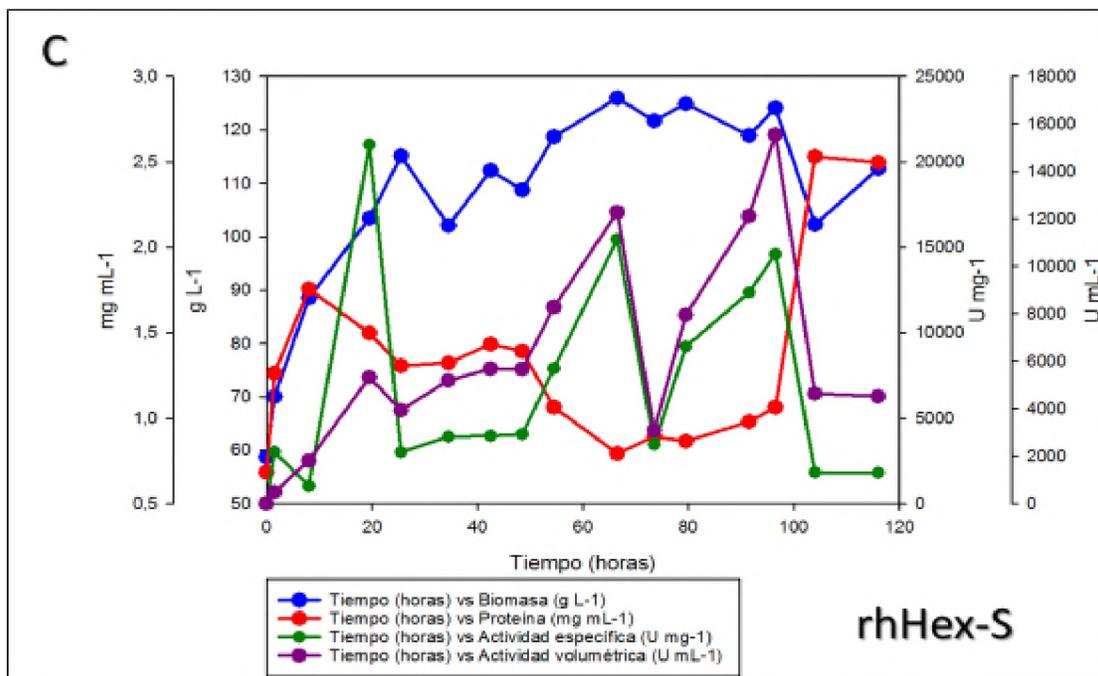
Las actividades específicas y volumétricas más altas a 1,65 L fueron 13124,1 U mg<sup>-1</sup> y 25762,6 U mL<sup>-1</sup> para rhHex-A, respectivamente. Para rhHex-B 12779,4 U mg<sup>-1</sup> y 17330,1 U mL<sup>-1</sup> y para rhHex-S a las 24 horas de inducción una actividad específica de 21.025,9 U mg<sup>-1</sup>. Sin embargo, este último resultado no es consistente con la baja concentración de proteína en la muestra y la actividad volumétrica observada a ese momento de la inducción. Por esta razón, para la enzima rhHex-S se seleccionaron los valores de 14606,0 U mg<sup>-1</sup> y 15556,1 U mL<sup>-1</sup> a las 96 h como los máximos valores obtenidos a esta escala (Figura 20).

Los resultados de actividad fueron determinados con el sustrato no sulfatado (MUG) y son cerca de 25- a 30- veces más altos que los obtenidos con leucocitos de individuos normales (hexosaminidasa total 388,2 +/- 10 U mg<sup>-1</sup>). Akeboshi *et. al.* (2007) [15] reportó actividades de 51000 y 29000 U mg<sup>-1</sup> con el sustrato MUG y MUGS, respectivamente, para la enzima recombinante Hex-A producida en la levadura metilotrófica *Ogataea minuta*. De esta forma, la actividad enzimática para rhHex-A producida en *P. pastoris* a 1,65 L es cerca de 3,9-veces más baja que la reportada para *O. minuta* a 4 L. Sin embargo, los valores de actividad en *P. pastoris* no son del mismo orden de magnitud (10<sup>6</sup> U mg<sup>-1</sup>) que las producidas por *O. minuta*, mostrando el potencial de *P. pastoris* como un sistema de expresión para la Hex-A recombinante.

Por otro lado, solamente existe un reporte de la expresión de Hex-B recombinante en levadura, en la cual la enzima fue producida de forma intracelular en *Saccharomyces cerevisiae* [64]. Esta enzima recombinante Hex-B fue dirigida a las vacuolas y presentó un patrón de glicosilación diferente. Sin embargo, la actividad de Hex-B producida en *P. pastoris* fue ~8.000 veces más alta que la observada para la enzima producida en *S. cerevisiae* (1,6 U mg<sup>-1</sup>) [64].

Finalmente para la enzima recombinante Hex-S Akeboshi *et. al.* (2007) [15] reportaron su presencia durante la producción de Hex-A recombinante debido a que la levadura *O. minuta* fue co-transformada con los genes *HEXA* y *HEXB*. A pesar que la enzima Hex-S recombinante representó el 74% de las tres isoenzimas producidas, los autores no presentaron valores de actividad ni la caracterización de la enzima recombinante, por lo que el presente estudio representa el primer reporte de la producción y posterior caracterización de la enzima recombinante humana Hex-S en una levadura.





**Figura 20. Producción de  $\beta$ -hexosaminidasas a escala de biorreactor (1,65 L). A. rhHex-A, B. rhHex-B, C. rhHex-S.** Los datos mostrados en las gráficas corresponden a la fase de inducción realizada con 0,5% de metanol. Eje izquierdo externo: concentración de proteína determinada por el método de Lowry ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). Eje izquierdo interno: biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ). Eje derecho interno: actividad específica en  $\text{U mg}^{-1}$ . Eje derecho externo: actividad volumétrica en  $\text{U mL}^{-1}$ .

### 5.3. Procesos de purificación de las hexosaminidasas recombinantes

A pesar que los constructos de las  $\beta$ -hexosaminidasas humanas fueron diseñados para tener una cola de histidinas 6x en el extremo N-terminal, después de varios intentos de purificación a través de cromatografía de afinidad en columna de níquel, no fue posible obtener las enzimas recombinantes purificadas. Estos resultados fueron inicialmente asociados con la probable pérdida de la cola de histidinas por procesamiento proteolítico durante la maduración de la enzima [90], lo cual fue confirmado mediante la secuenciación de proteínas por el método de Edman. Por esta razón, las tres  $\beta$ -hexosaminidasas fueron purificadas parcialmente mediante cromatografía de intercambio iónico, de acuerdo a los puntos isoeléctricos reportados para las  $\beta$ -hexosaminidasas humanas obtenidas de diferentes tejidos [46, 57, 60].

Para la purificación los clones de rhHex-A, rhHex-B y rhHex-S fueron cultivados a escala 1,65 L y el cultivo fue recolectado a la hora de máxima producción de acuerdo a los resultados previos. rhHex-A y rhHex-S fueron purificadas por cromatografía de intercambio aniónico a pH 6,0 y 5,5, respectivamente; mientras rhHex-B fue purificada por intercambio catiónico a pH 5,0.

Los resultados mostraron 107,5-; 122,8-; y 95,4- veces de purificación para rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S, respectivamente (Tabla 8). Por su parte, la actividad enzimática específica para las enzimas purificadas fue  $1,35 \times 10^6$ ;  $1,27 \times 10^6$ ; and  $1,39 \times 10^6$  U mg<sup>-1</sup> respectivamente. En la literatura hay información limitada acerca de la purificación de  $\beta$ -hexosaminidasas, la mayoría de los reportes provienen de enzimas obtenidas de tejido (normal o paciente) donde la actividad enzimática se encuentra en niveles normales (por ejemplo, gangliosidosis GM2 variante AB). Conzelman *et.al.* (1978) [58] reportaron una actividad de  $5,5 \times 10^6$  U mg<sup>-1</sup> después de la purificación de Hex-A obtenida a partir hígado humano de un paciente con gangliosidosis GM2 variante AB, por cromatografía de afinidad por concanavalina y DEAE celulosa. Estos mismos autores intentaron purificar Hex-B a partir de hígado, pero no reportaron valores de actividad debido a la baja concentración de proteína obtenida. Tallman *et. al.* (1974) [117] después de seis pasos de purificación de hexosaminidasa a partir de placenta reportaron valores de actividad de  $30,6 \times 10^6$  y  $28,1 \times 10^6$  U mg<sup>-1</sup> para Hex-A y Hex-B respectivamente.

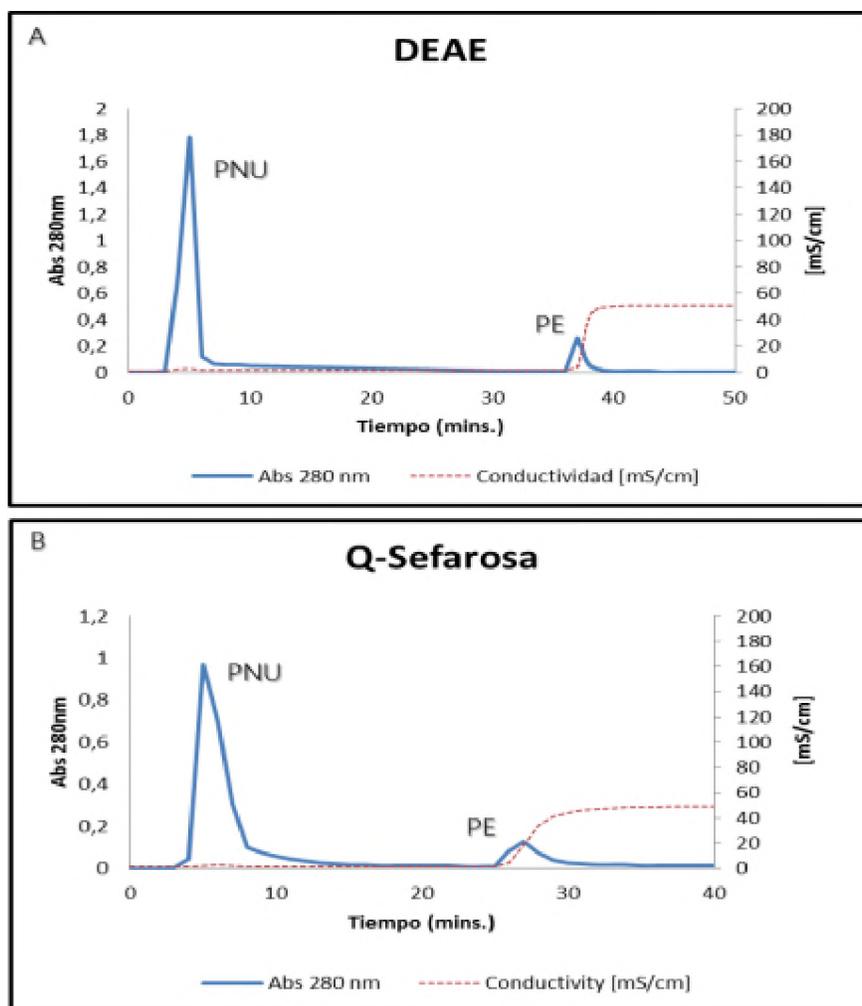
Con respecto a la purificación de  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes, rhHex-B ha sido purificada a partir de células de insecto en un proceso de dos pasos cromatográficos, con una actividad final de  $6,5 \times 10^6$  U mg<sup>-1</sup> [63], mientras que la rhHexA producida en *O. minuta* y purificada por cromatografía de afinidad mostró una actividad final de  $1,4 \times 10^6$  U mg<sup>-1</sup> [14, 15]. De esta forma en este estudio se empleó un solo paso de purificación, mostrando que rhHex-A y rhHex-B producida en *P. pastoris* presentan actividades enzimáticas similares a aquellas reportadas para enzimas recombinantes producidas en otros sistemas de expresión, pero más bajos que los reportados para enzimas nativas.

Por otro lado, la actividad específica de rhHex-S fue 50 veces más alta que la reportada por Potier *et.al* [45] para la enzima purificada a partir de hígado ( $26820$  U mg<sup>-1</sup>), y considerablemente más alta que la purificada a partir de cerebro ( $1494$  U mg<sup>-1</sup>). Finalmente, la actividad específica de la rhHex-S fue 2,2 veces más baja que la reportada por Hepbildikler *et. al.* (2002), [54] ( $3,1 \times 10^6$  U mg<sup>-1</sup>) para la enzima producida en células de insecto.

**Tabla 8. Purificación de las rhHexosaminidasas producidas en *Pichia pastoris***

Muestra	Proteína Total (mg)	Actividad Total U (nmol/h) x 10 <sup>6</sup>	Actividad específica (nmol/mg/h)	Rendimiento (%)	Veces de purificación
<b>rhHex-A</b>					
Extracto crudo	2716,60	34,28	0,01	100	1
Retentato ultrafiltración	150,74	19,36	0,13	56	13
Proteína purificada	12,96	17,59	1,36	51	136
<b>rhHexo-B</b>					
Extracto crudo	1890,00	19,56	0,01	100	1
Retentato ultrafiltración	325,15	6,53	0,02	33	2
Proteína purificada	4,20	5,33	1,27	27	127
<b>rhHexo-S</b>					
Extracto crudo	1605,00	23,33	0,01	100	1
Retentato ultrafiltración	72,73	15,08	0,21	65	21
Proteína purificada	9,60	13,38	1,39	57	139

Por otro lado, debido a que el clon de rhHex-A fue obtenido con el cDNA de las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta$ - en un mismo vector, es posible obtener las tres isoenzimas rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S durante el proceso de producción de rhHex-A. Por esta razón, con el propósito de evaluar la presencia de estas isoenzimas en el extracto del clon de rhHex-A, se emplearon dos cromatografías aniónicas, DEAE y Q-Sepharose, durante el proceso de purificación, las cuales mostraron un patrón de purificación similar entre ellas (Figura 20). Mediciones de las fracciones obtenidas en proteína no unida (PNU) y fracciones de proteína eluída de la columna (PE) con los sustratos MUG y MUGS, demostraron que rhHex-B y rhHex-A fueron detectadas tanto en PNU como en PE (Figura 21A). Estos resultados contrastan con reportes previos en los cuales la Hex-B y Hex-A humanas son obtenidas en fracciones diferentes empleando la columna (DEAE) y condiciones similares a las empleadas en el presente trabajo. De esta forma, Hex-B es obtenida en PNU mientras Hex-A y Hex-S son obtenidas en las fracciones de PE a diferentes niveles de conductividad [46, 60, 117-119].



**Figura 21. Evaluación del perfil de purificación de rhHex-A empleando dos columnas de intercambio aniónico Q-sefarosa o DEAE.** La purificación se realizó utilizando tampón de fosfato 10 mM pH 6,0 y un flujo de 5 mL/min. **A** Perfil de purificación con la columna DEAE sefarosa. **B.** Perfil de purificación con la columna Q-sefarosa. En los dos casos se muestra el pico de proteína no unida a la columna (PNU) y el pico de elución (PE) obtenido al usar un gradiente lineal de 0 a 0,5M NaCl. Posteriormente la actividad  $\beta$ -hexosaminidasa fue medida como se describió en materiales y métodos usando los sustratos MUG y MUGS.

En el presente trabajo para descartar la presencia de rhHex-S en todas las fracciones colectadas durante el proceso de purificación se realizó la medición de actividad empleando el sustrato MUGS con y sin inactivación a 52°C, tomando ventaja de la termolabilidad de rhHex-S (ver Figura 28) y de su afinidad por el sustrato MUGS (Figura 22). Como se observa en la figura 22B, los valores de actividad enzimática fueron similares en las dos temperaturas 37°C y 52°C (con y sin el proceso de inactivación, respectivamente) sugiriendo que la actividad en estas muestras es debida solamente a la presencia de rhHex-A, y que bajo estas condiciones rhHex-S no estaba presente.

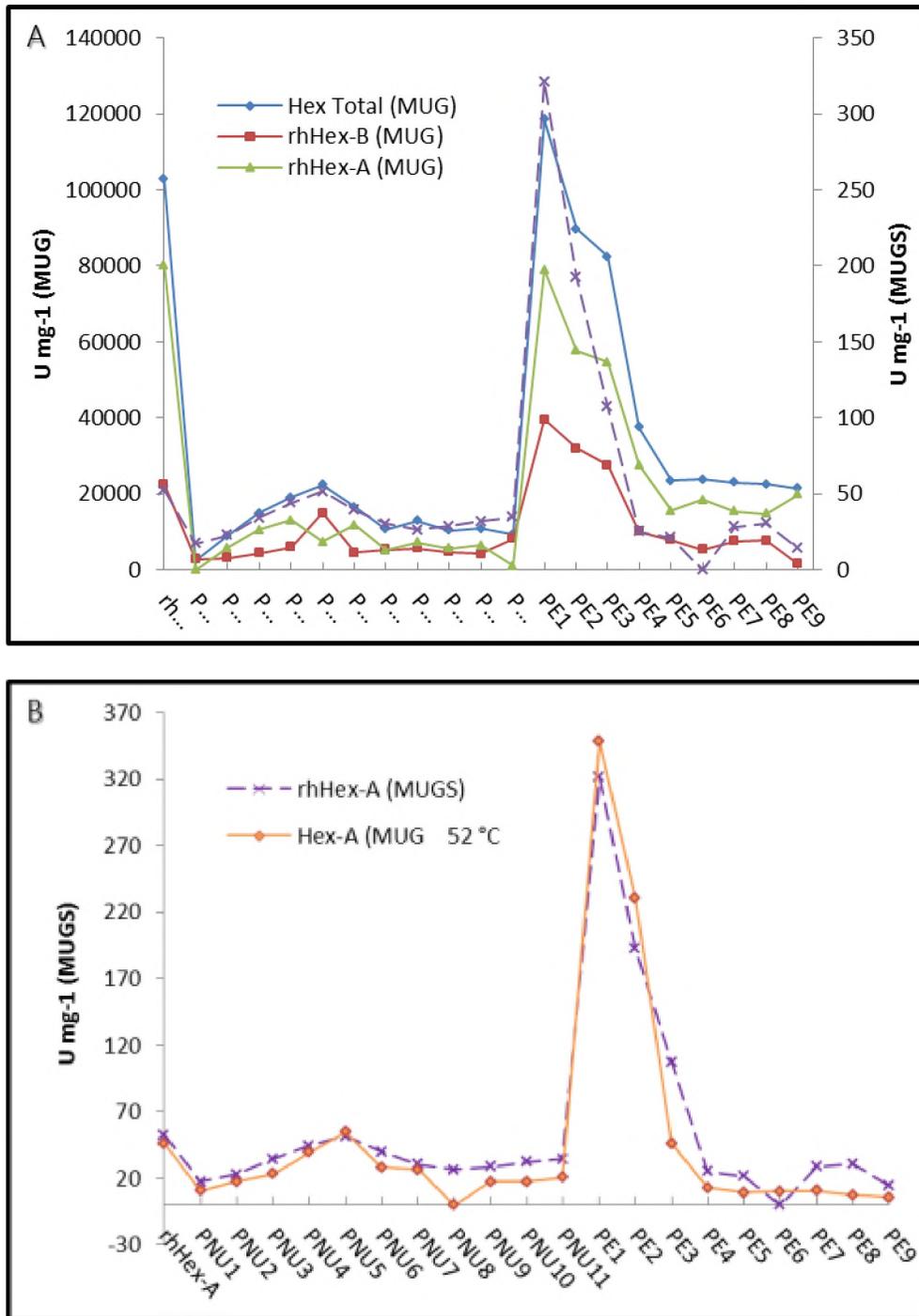
Adicionalmente, se calculó la relación rhHex-A:rhHex-B usando el promedio de los valores de actividad específica obtenidos en las fracciones PE medida con el sustrato MUG. El valor obtenido fue de 2,17 el cual es similar al reportado por Okoshi *et. al.* (1979) [120] quien mostró una relación entre 2,5 y 4,52 para  $\beta$ -hexosaminidasas purificadas de riñón y más alto que el reportado para  $\beta$ -hexosaminidasas purificadas de placenta normal (0.89-1.24) usando una columna DEAE bajo las mismas condiciones usadas en el presente estudio. Adicionalmente, estos resultados son cerca de 3 veces más altos que los reportados para la enzima Hex-A producida en *O. minuta*, la cual representó el 23% de la hexosaminidasa total, basado en la relación de las isoenzimas obtenidas con la columna de DEAE [15].

#### **5.4. Caracterización de las hexosaminidasas recombinantes**

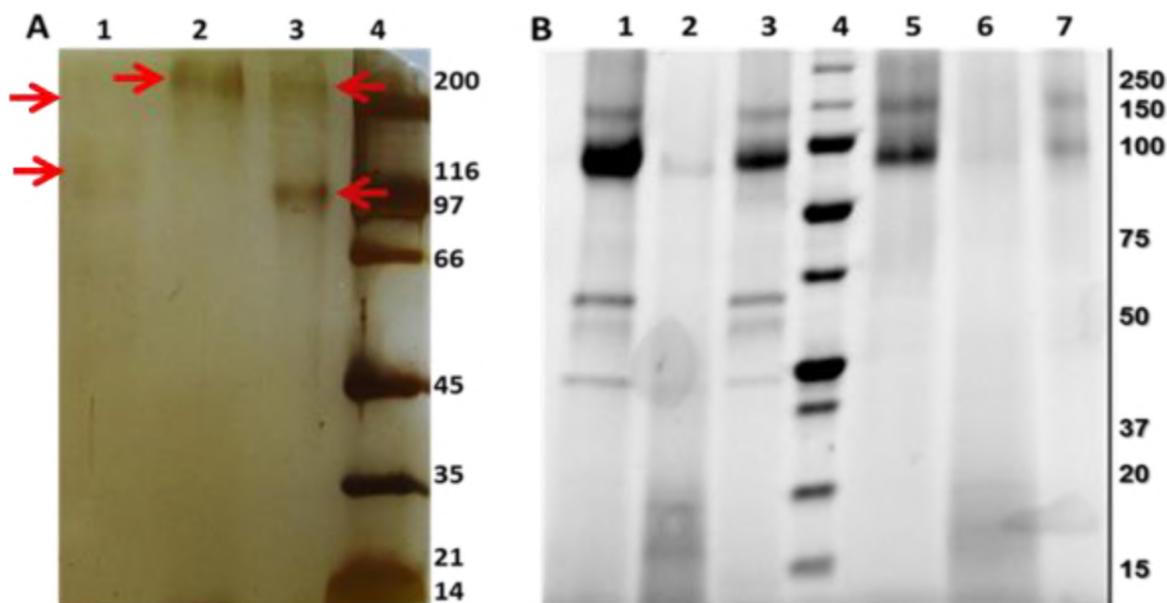
##### **5.4.1. Caracterización por peso molecular**

Para la enzima Hex-A purificada de placenta humana se ha reportado un peso molecular de 112 kDa [50], mientras para la enzima purificada de hígado se han reportado pesos moleculares entre 100 y 110 kDa [47, 57]. Se han descrito resultados similares para la enzima Hex-B purificada de hígado y placenta con pesos moleculares entre 108 y 112 kDa, respectivamente; mientras que para Hex-S obtenida a partir de hígado se reportó un peso de 103 kDa [57]. En contraste, otro reporte para la enzima Hex-S purificada de hígado y cerebro describió un peso molecular de 154 y 152 kDa, respectivamente [45].

En el presente estudio empleando un análisis SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, se observaron bandas de ~200kDa para rhHex-B, y de ~100kDa para rhHex-A y rhHex-S (Figura 23). Este patrón de bandeo fue el más observado, sin embargo, en ocasiones fue posible observar bandas de ~ 66 y 50 kDa, e incluso bandas tenues de menor peso molecular. El alto peso molecular atribuido a las muestras de rhHex-B, y en algunos casos a las otras dos enzimas, podría deberse a la generación de interacciones entre subunidades a través de enlaces no covalentes que puedan evitar la disociación bajo condiciones reductoras y favorecer la formación de agregados de proteína, o de interacciones hidrofóbicas que propicien el plegamiento de las proteínas evitando su interacción con el medio acuoso [121].



**Figura 22. Purificación rhHex-A por DEAE sepharosa. A.** rhHexA: muestra inicial usada para purificación; PNU: proteína no unida (fraccionada) PE: proteína eluida. Muestras fueron analizadas por MUG y MUGS. **B.** rhHex-S fue descartada por inactivación a 52°C y medición con MUGS.



**Figura 23. Electroforesis de  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes purificadas. Panel A.** Muestras resueltas en un gel de poliacrilamida al 8% bajo condiciones reductoras y teñido con nitrato de plata. **Carril 1.** rhHex-S, **Carril 2.** rhHex-B, **Carril 3.** rhHex-A, **Carril 4.** Peso molecular. **Panel B. Muestras resueltas en** Precast gels al 10% (Biorad) y visualizadas en un fotodocumentador (Biorad). **Carril 1.** rhHex-A (reductor), **Carril 2.** rhHex-B (reductor). **Carril 3.** rhHex-S (reductor). **Carril 4.** Peso molecular. **Carril 5.** rhHex-A (no reductor), **Carril 6.** rhHex-B (no reductor). **Carril 7.** rhHex-S (no reductor). Cabe resaltar que las bandas observadas en condiciones reductoras son producto de la banda de alto peso molecular en condiciones no reductoras.

Con el fin de observar las posibles interacciones generadas entre las subunidades se evaluaron las proteínas recombinantes ante agentes desnaturizantes como urea 8M (puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas),  $\beta$ -mercaptoetanol (puentes disulfuro), triton X-100 1% (interacciones hidrofóbicas), incremento de fuerza iónica, y cambio de pH (Figura 24).

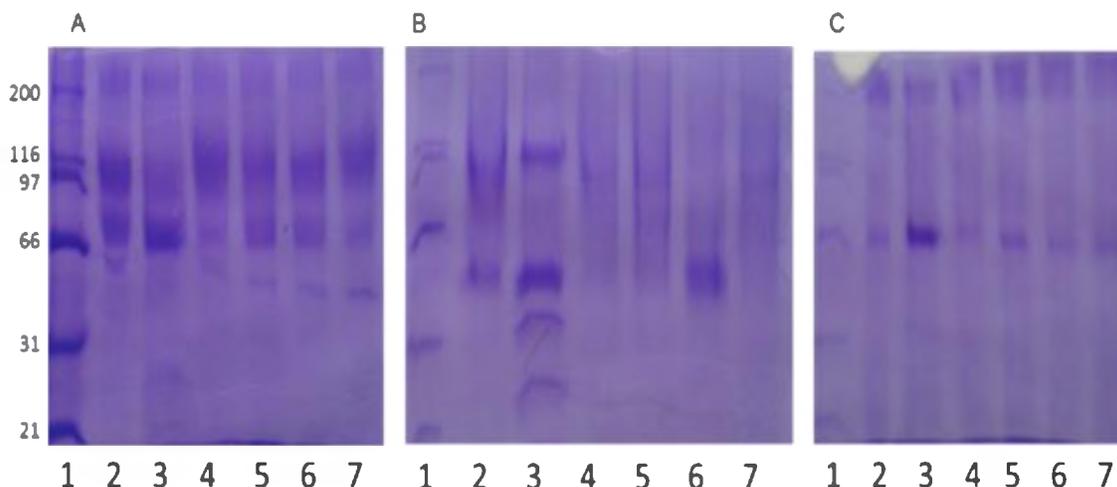
Los resultados con los diferentes agentes desnaturizantes, sugieren que el dímero de rhHex-S (Figura 24 panel B) pareciera estar formado principalmente por interacciones iónicas, ya que al someter la muestra a un aumento de fuerza iónica, de 25 a 50 mM, la banda que aparece a 120 kDa en el carril 2 desaparece favoreciendo la aparición de una banda muy fuerte a la altura de 50 kDa (carril 6).

Adicionalmente la proteína cuenta con interacciones covalentes tipo puentes disulfuro, ya que al tratar la muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol (carril 3, panel B), se evidencian bandas a la altura de 25, 35, 50, y 120 kDa aproximadamente.

Finalmente, el tratamiento con urea y tritón (carril 4 y 5, panel B) tuvo un efecto similar sobre la proteína, minimizando la formación de la banda de 50 kDa y favoreciendo la formación de estructuras más complejas de mayor peso molecular. Debido a que estos dos agentes favorecen la disminución de interacciones hidrofóbicas, estos resultados sugieren que las estructuras de alto peso molecular podrían estar constituidas o favorecidas en gran medida por interacciones de este tipo.

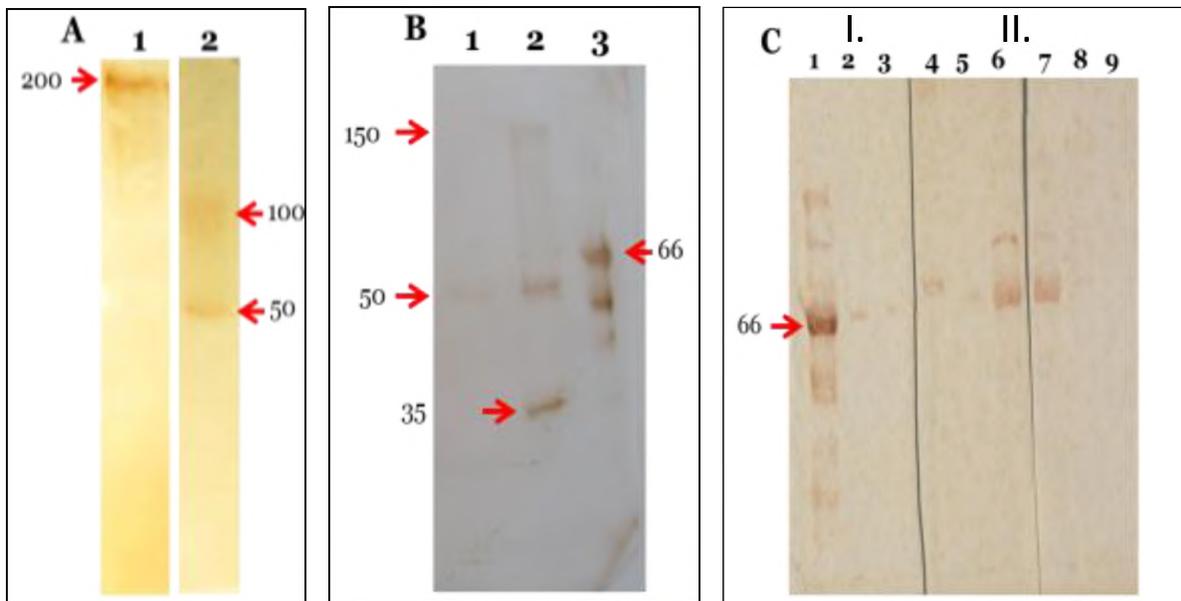
Para el caso de la enzima rhHex-B (Figura 24, panel C), la adición de los agentes desnaturizantes no generó mayores cambios en la estructura, presentándose siempre una banda a la altura de 200 kDa y una por encima de 66 kDa, lo cual sugiere la presencia de interacciones fuertes dentro de la estructura de esta isoenzima. Sin embargo, se observan la presencia de interacciones tipo enlace disulfuro, ya que tras el tratamiento con  $\beta$ -mercaptoetanol la banda de ~66kDa tiende a intensificarse mientras la de ~200 kDa disminuye.

Finalmente, para la enzima rhHex-A (Figura 24, panel A) el patrón de bandeo muestra una combinación entre lo obtenido en rhHex-S (subunidad  $\alpha$ ) y rhHex-B (subunidad  $\beta$ ). En general, los cambios en la estructura ante los diferentes agentes desnaturizantes no son muy marcados, sin embargo, al tratar la enzima con urea 8 M, incremento de fuerza iónica, y cambio de pH (carriles 5, 6 y 7 respectivamente) se favorece la aparición de una banda a la altura de ~50 kDa similar a la observada en los tratamientos de la enzima rhHex-S.



**Figura 24. Evaluación de las interacciones entre las subunidades de las enzimas recombinantes.** Las enzimas recombinantes **A:** rhHex-A; **B:** rhHex-S; **C:** rhHex-B, fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 8% con diferentes agentes de reducción. Carril 1: Peso Molecular, Carril 2: Citrato 25 mM, Carril 3: Citrato 25mM +  $\beta$ -ME 5%, Carril 4: Citrato 25mM + Triton-X-100 1%, Carril 5: Citrato + Urea 8M, Carril 6: Citrato 50 mM pH 5,0, Carril 7: PBS pH 7,4.

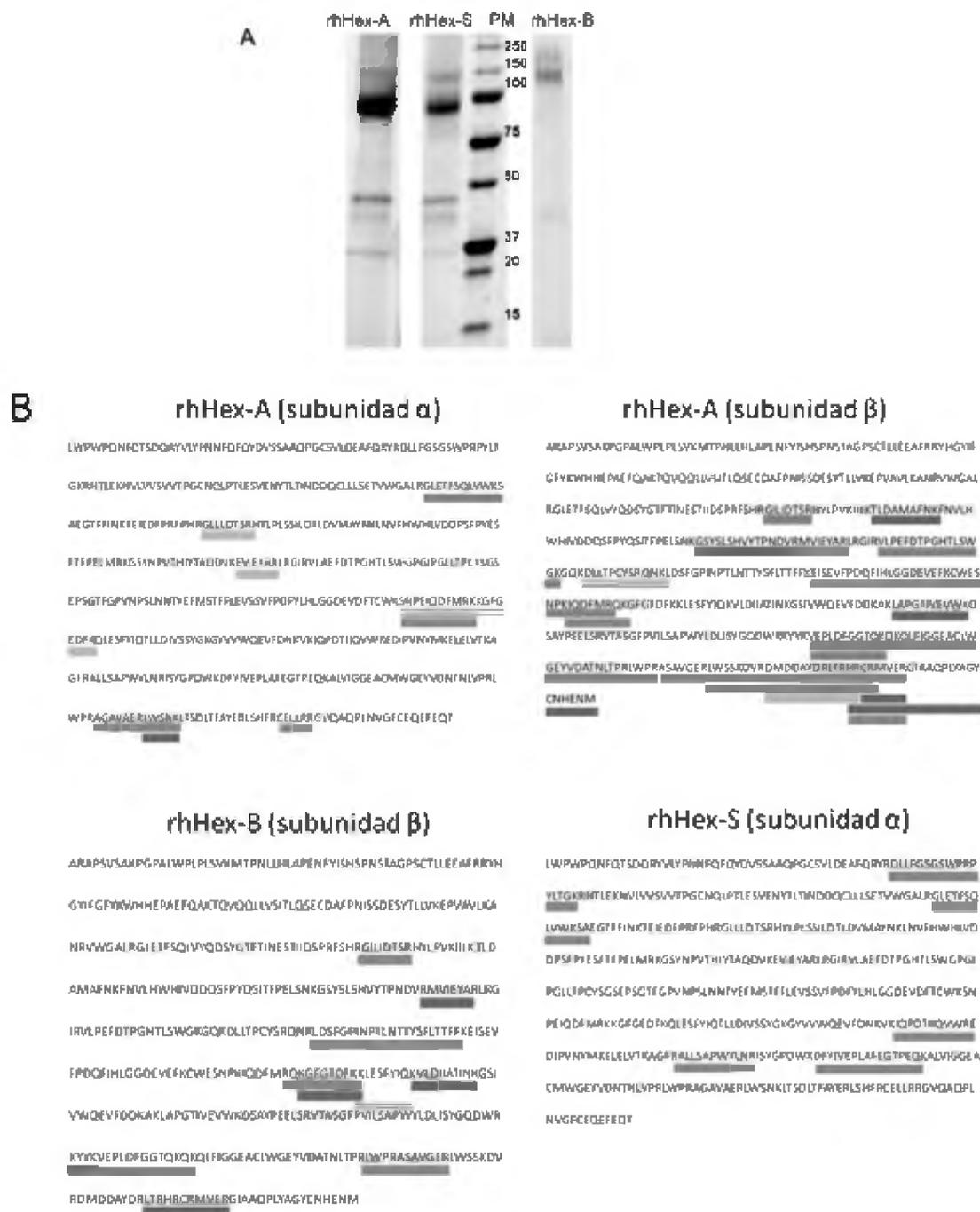
La inmunodetección se realizó mediante western blot usando anticuerpos comerciales (Abcam y Santa Cruz) contra las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . A pesar de haber realizado diversas modificaciones en los tiempos de incubación, concentraciones de proteína y de anticuerpos durante la estandarización de la prueba, las bandas identificadas en estos procesos fueron tenues en los diferentes ensayos. En la Figura 25 se muestran los resultados de tres ensayos diferentes en los cuales se resolvieron 10  $\mu$ g de proteína por pozo en condiciones reductoras. Las bandas identificadas en estos ensayos, muestran que la variabilidad en las interacciones presentes en la proteína favorece el reconocimiento de una o varias bandas en una misma muestra. Por ejemplo, la rhHex-S identificada con el anticuerpo anti-subunidad alfa (Santa Cruz) muestra un bandeo diferente dentro de un mismo ensayo (Panel B, carril 1 y 2) y entre ensayos diferentes (Panel C, carril 5). En todos los casos se utilizó un control positivo de leucocitos humanos de individuos normales, el cual marcaba una banda de reconocimiento a 66 kDa, y algunas bandas de peso molecular más bajo.



**Figura 25. Western blot rhHexosaminidasas.** Los ensayos de western blot fueron realizados con diferentes lotes de proteínas recombinantes. **Panel A.** Inmunodetección con anti-subunidad beta. Carril 1: rhHex-B banda de peso molecular a 200kDa, Carril 2: rhHex-A. Una banda a 100 y otra a 66 kDa aprox. **Panel B.** Inmunodetección con anti-subunidad alfa. Carril 1 y 2: rhHex-S, Carril 3: Leucocitos. Se observan bandas a 150, 66, 50 y 35 kDa. **Panel C.** Carril 1, 6 y 7: Leucocitos, Carril 2, 5 y 8: rhHex-A, Carril 3 y 4: rhHex-S. Carril 9: rhHex-B. Bloque I. (Carriles 1, 2, y 3): incubados con anticuerpo monoclonal anti-HEXA (ab140649, Abcam). Bloque II. (Carriles 4, 5, y 6): incubados con anticuerpo policlonal anti-HEXA (sc-134577, Santa Cruz). Bloque III. (Carriles 7, 8, y 9): incubados con anticuerpo policlonal anti-HEXB (sc134580, Santa Cruz).

Con el objetivo de realizar una identificación adicional de las  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes, las bandas obtenidas para las fracciones purificadas en el SDS-PAGE bajo condiciones reductoras fueron analizadas mediante MALDI-TOF (Figura 26 A). Los fragmentos trípticos de la banda de 100kDa de rhHex-A, mostraron una correspondencia con las secuencias de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de las  $\beta$ -hexosaminidasas lisosomales humanas. Por otro lado, los fragmentos trípticos de rhHexB (200kDa) y rhHex-S (100kDa) sugieren una correspondencia con las subunidades  $\beta$  y  $\alpha$ , respectivamente (Figura 26 B). Adicionalmente, el análisis de las bandas de bajo peso molecular ( $\sim 30$  kDa) observadas en la electroforesis no pudieron ser analizadas, debido a que la cantidad de proteína extraída de las bandas no fue suficiente para ser analizada mediante MALDI-TOF. Esta misma aproximación (huella peptídica por MALDI-TOF) fue usada por González, et. al. 2013, en nuestro laboratorio para verificar la identidad de una lacasa nativa (*Trametes pubenses*), demostrando la utilidad y validez de esta aproximación [122].

Se realizaron dos grupos de alineamientos con el fin de confirmar que los fragmentos trípticos obtenidos correspondían con las secuencias de las hexosaminidasas humanas. El primero fue un alineamiento local de los fragmentos trípticos obtenidos contra todos los organismos de la base de datos BLAST, donde muestra que los fragmentos evaluados están relacionados principalmente con las secuencias de  $\beta$ -hexosaminidasas humanas (Tabla 9). Dentro de estos fragmentos se describen principalmente tres que están descritos como parte de los dominios de la familia de las hexosaminidasas (GH20) y de las subfamilias Hex-A/Hex-B (Tabla 10).



**Figura 26. Análisis de huella peptídica de las proteínas purificadas por MALDI-TOF. A.** Electroforesis SDS-PAGE 10%, las bandas obtenidas fueron cortadas, decoloradas y tratadas para obtener los fragmentos tripticos los cuales fueron procesados por MALDI-TOF. **B.** Mapa de cobertura de secuencias. Los fragmentos señalados en la gráfica fueron analizados en Peptide Mapping y ProFound para buscar la correspondencia con las secuencias de las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta$ -de las  $\beta$ -hexosaminidasas humanas.

**Tabla 9. Alineamientos realizados por pBLAST.**

Secuencia	Descripción Contra Homo sapiens	Cobertura (%)	E-value	Identidad (%)
<sup>§</sup> GLETFSQLV	HEXA protein (Homo sapiens)	100	8e-4	100
EVIEYAR	Hexosaminidase A (Homo sapiens)	100	0,76	100
SNPEIQDFMRKKG GEDFK	HEXA protein (Homo sapiens)	100	5e-11	100
AGAVAERLWSNK	HEXA protein (Homo sapiens)	100	0,013	100
*CELLRR	HEXA protein (Homo sapiens)	100	9,8	100
<sup>§</sup> GILIDTSR	Chain A, Native Human Lysosomal Beta-Hexosaminidase Isoform B	100	0,54	100
<sup>§</sup> TLDAMAFNK	Chain A, Native Human Lysosomal Beta-Hexosaminidase Isoform B	100	0,018	100
GSYSLSHVYTPNDVR MVIEYAR	beta-hexosaminidase beta-subunit (Homo sapiens)	100	4e-15	100
VEPLDFGGTQKQKQ LFIGGEACLWGEYVD ATNLTPLRWPRASA VGERLWSSKDVRD MDDAYDRLTRHRCR MVERG	beta-hexosaminidase subunit beta isoform 2 (Homo sapiens)	100	9e-16	100
VDATNLTPLRWPR SAVGERLWSSKDVR DMDDAYDRLTRHRC RMVER	Hace parte de la secuencia anterior			
DLLFGSGSWPRPYLT GK	N-acetyl-alpha-glucosaminidase prepro-peptide (Homo sapiens)	100	3e-8	100
GLETFSQLVWKS	HEXA protein (Homo sapiens)	100	8e-4	100
IQPDTIIQVWR	HEXA protein (Homo sapiens)	100	0,004	100
ALLSAPWYLNR	hexosaminidase A (Homo sapiens)	100	0,009	100
DFYIVEPLAFEGTPE QK	beta-hexosaminidase subunit alpha preproprotein (Homo sapiens)	100	5e-11	100

rhHexA alpha subunit; **rhHexA beta subunit**; rhHex-S

<sup>§</sup>Secuencias de hexosaminidasas otros organismos

\*Secuencias diferentes a hexosaminidasas

El segundo fue un alineamiento entre las secuencias de los fragmentos trípticos obtenidos para cada proteína y el epítipo contra el cual generaron los anticuerpos (anti-HEXB cadena A: 408-477; anti-HEXA: 377-416) usados en el western blot. En la Tabla 11 se muestra que por lo menos un fragmento de los obtenidos por el análisis de MALDI-TOF, hace parte de la secuencia contra la cual está reportado que fueron producidos los anticuerpos.

**Tabla 10. Descripción de péptidos representativos de los dominios de la familia GH20**

PEPTIDO	DESCRIPCION
VEPLDFGGTQKQKQLFIGGEACLW	Fue Identificado como parte del dominio glicosil hidrolasa GH20 de la superfamilia de hexosaminidasas; subfamilia HexA/HexB-Like, mediante el uso de la herramienta BLAST de la base del NCBI con el código de acceso cd06562. Al hacer el alineamiento de esta secuencia contra la misma base de datos, es reconocida como parte de la secuencia de la subunidad beta de la beta hexosaminidasa de Homo sapiens isoforma 2, con un 100% de identidad, una cobertura del 100% y un E-value de 4e-18 con el código de acceso NP 001278933.1. Con esos mismos valores de identidad, cobertura y E-value reconoce la cadena A de la Beta hexosaminidasa B nativa humana con códigos de acceso 1NOU A y 1O7A A.
GSYSLSHVYTPNDVRMVEIYAR	Fue Identificado como parte del dominio glicosil hidrolasa GH20 de la superfamilia de hexosaminidasas; subfamilia HexA/HexB-Like, mediante el uso de la herramienta BLAST de la base del NCBI con el código de acceso cd06562. Adicionalmente es reconocido como parte del dominio catalítico glicosil hidrolasa familia 20 mediante la herramienta pfam con el código pfam00728.
VEPLDFGGTQKQKQLFIGGEACLW GEYVDATNLTPRLWPRASAVGERL WSSKDVRDMDDAYDRLTRHRCRM VERG	Fue Identificado como parte del dominio glicosil hidrolasa GH20 de la superfamilia de hexosaminidasas; subfamilia HexA/HexB-Like, mediante el uso de la herramienta BLAST de la base del NCBI con el código de acceso cd06562. Adicionalmente el fragmento VEPLDFGGTQKQKQLFIGGEACLW se encuentra dentro de la secuencia del epítipo que es reconocido por el anticuerpo policlonal anti HEXB cadena-A.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante western blot y análisis por MALDI-TOF, brindan una aproximación en la identificación de las  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes producidas en *P. pastoris* y sugieren que estas tienen pesos moleculares diferentes a los reportados para las enzimas nativas y recombinantes producidas en otros hospederos.

**Tabla 11. Identificación de fragmentos trípticos Vs epítipo de anticuerpos.**

Proteína	Fragmento MALDI	Anticuerpo usado	Secuencia identificada por anticuerpo *
rhHex-B	<u>VEPLDFGGTQKQK</u>	anti-HEXB cadena-A	YLDLISYGQDWRKYYK <u>VEPLDFGGTQ</u> KQKQ LFIGGEACLW
rhHexA	<u>VEPLDFGGTQKQKQLFIG</u> <u>GEACLW</u> GEY	anti-HEXB cadena-A	YLDLISYGQDWRKYYK <u>VEPLDFGGTQKQKQ</u> <u>LFIGGEACLW</u>
rhHex-S	<u>ALLSAPWYLN</u> R <u>DFYIVE</u> PLAFEGTPEQK	Anti-HexA	NYMKELELVTKAGFR <u>ALLSAPWYLN</u> RISYGP DWK <u>DFYIVE</u>

\* El fragmento identificado en MALDI para cada proteína dentro de la secuencia del epítipo del anticuerpo está resaltado en rojo y subrayado.

Por otro lado, las tres  $\beta$ -hexosaminidasas fueron evaluadas para determinar algunos de sus parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) empleando el sustrato sintético MUG (Tabla 12). Los datos fueron analizados por el software COPASI, tal como se muestra en materiales y métodos. Los  $K_m$  obtenidos a partir de este análisis para las tres isoenzimas fueron 0,2; 0,5; y 0,4 mM para rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S, respectivamente. Estas constantes muestran que en comparación con los datos reportados para algunas enzimas obtenidas de tejido para este mismo sustrato, las producidas en *P.pastoris* parecen contar con una mejor afinidad por el sustrato. Potier *et. al.* (1979) reportaron para Hex-S un  $K_m$  entre 0,8 y 0,9 mM, Geiger *et. al.* (1977), e Ikonne *et. al.* (1975) reportaron 0,9 y  $9 \times 10^{-4}$  mM respectivamente. Pennybacker *et. al.* (1996) reportaron para Hex-A y Hex-B obtenida de placenta 0,7 y 0,57 respectivamente [45, 57, 59, 61]. Sin embargo, es necesario realizar ensayos adicionales en los cuales se obtengan datos que permitan verificar la acción de estas enzimas recombinantes sobre el sustrato natural y corroborar los datos obtenidos en este ensayo.

**Tabla 12. Datos de cinética  $K_m$  y  $V_{max}$  de las tres hexosaminidasas recombinantes.**

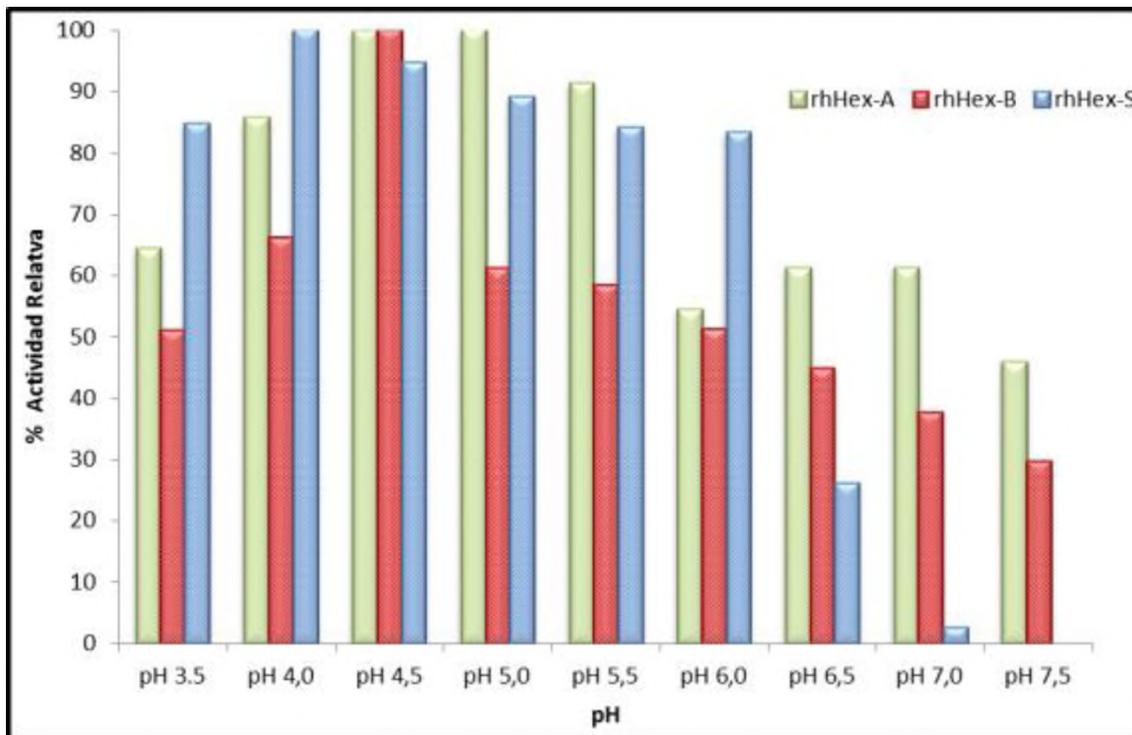
	HexoA	HexoB	HexoS
<b>Km (mmol/L)</b>	<b>0.235</b>	<b>0.548</b>	<b>0.478</b>
DS	0.042	0.094	0.046
C.V. (%)	18.2	17.2	9.7
<b>Vmax (mmol/L/s)</b>	<b>6.06E-05</b>	<b>3.16E-05</b>	<b>7.77E-05</b>
DS	1.43E-06	1.2E-06	1.06E-06
C.V. (%)	2.3	4	2,1

#### 5.4.2. Caracterización por estabilidad a diferentes condiciones

Para las tres  $\beta$ -hexosaminidasas humanas recombinantes se estudió su estabilidad a diferentes condiciones de pH (3,5 a 7,5) y temperatura (4 °C, 37°C y 45°C), así como estabilidad en suero humano. Con respecto a la estabilidad de pH, las enzimas rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S, perdieron 35, 50 y 15 % de actividad respectivamente a pH 3,5 (Figura 27). rhHex-A mostró su mayor estabilidad entre pH 4,5 – 5,0, con una reducción del 10 % a pH 5,5, mientras a pH 4,0 la actividad fue un 85 % de los niveles observados a pH 5,0 (Figura 27). Por otro lado, rhHex-B mostró la actividad más alta a pH 4,5 con una marcada reducción a valores de pH por encima o por debajo de 4,5 (Figura 27).

Finalmente, rhHex-S mostró su mayor estabilidad a pH 4,0 con una reducción cercana al 15% a pH 3,5 y 6,0, y una muy marcada a valores de pH por encima de 6,5 (Figura 27). Existen pocos reportes que muestren el efecto del pH sobre la

actividad enzimática para las  $\beta$ -hexosaminidasas; sin embargo, estos resultados están de acuerdo con lo reportado por Geiger et. al [57] quienes describieron una actividad máxima de pH en un rango de 4,0 a 5,0 para las  $\beta$ -hexosaminidasas extraídas de hígado.

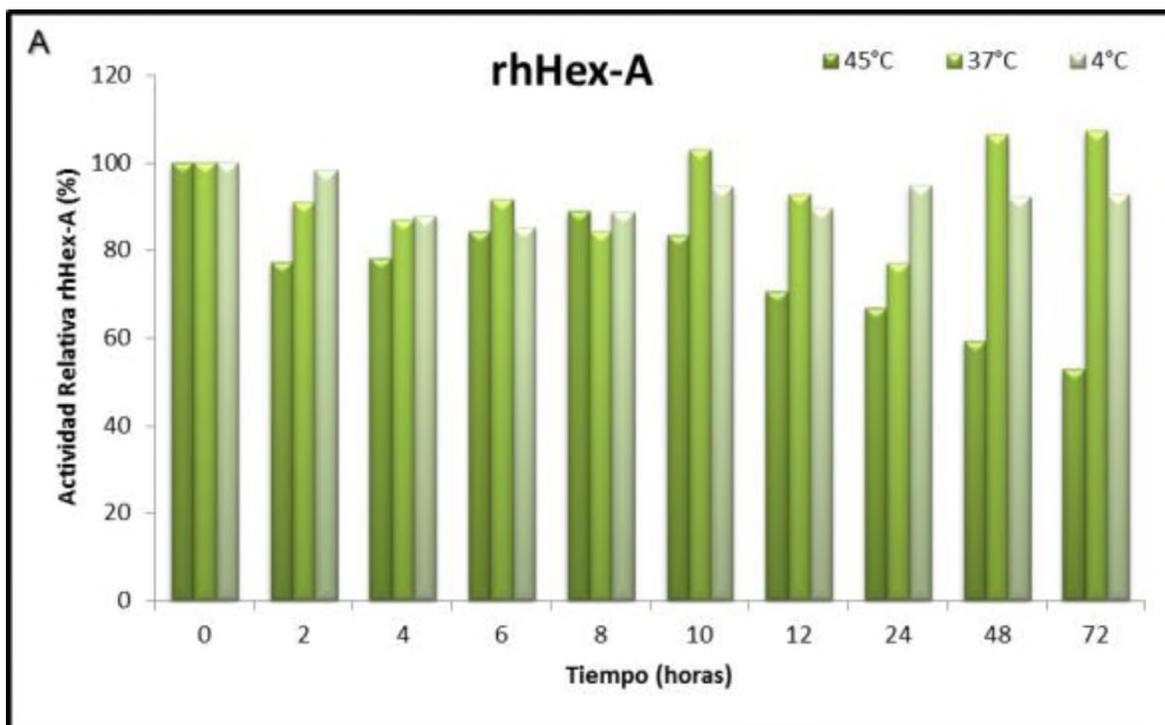


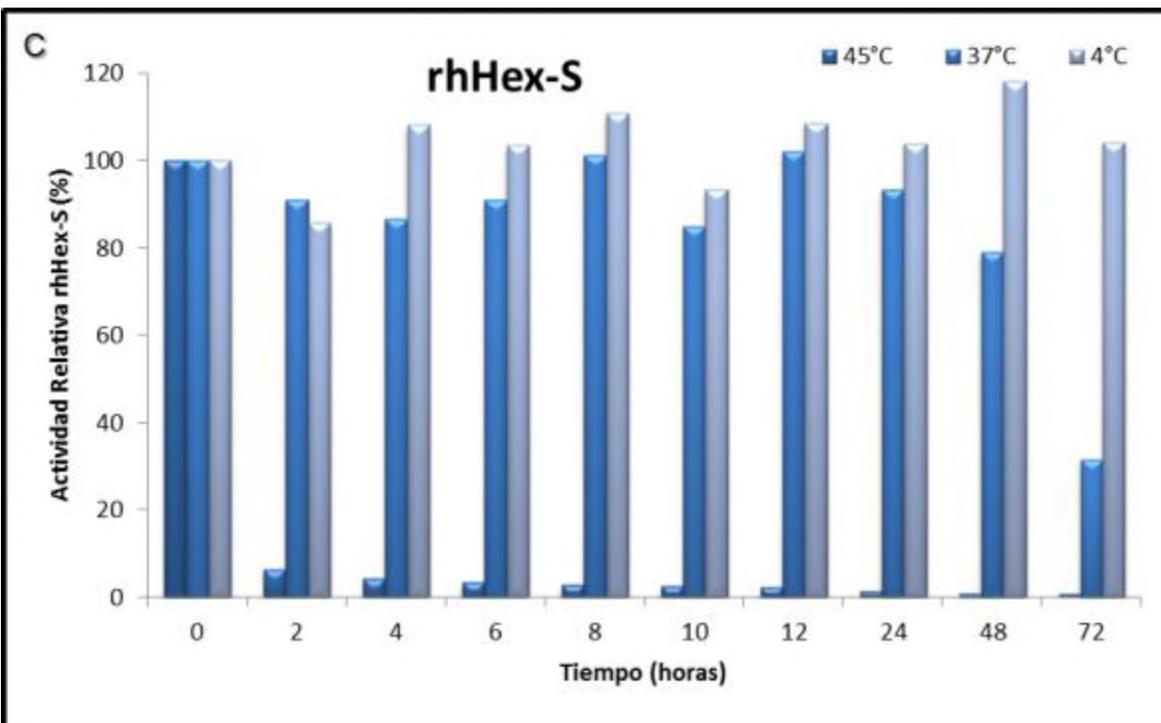
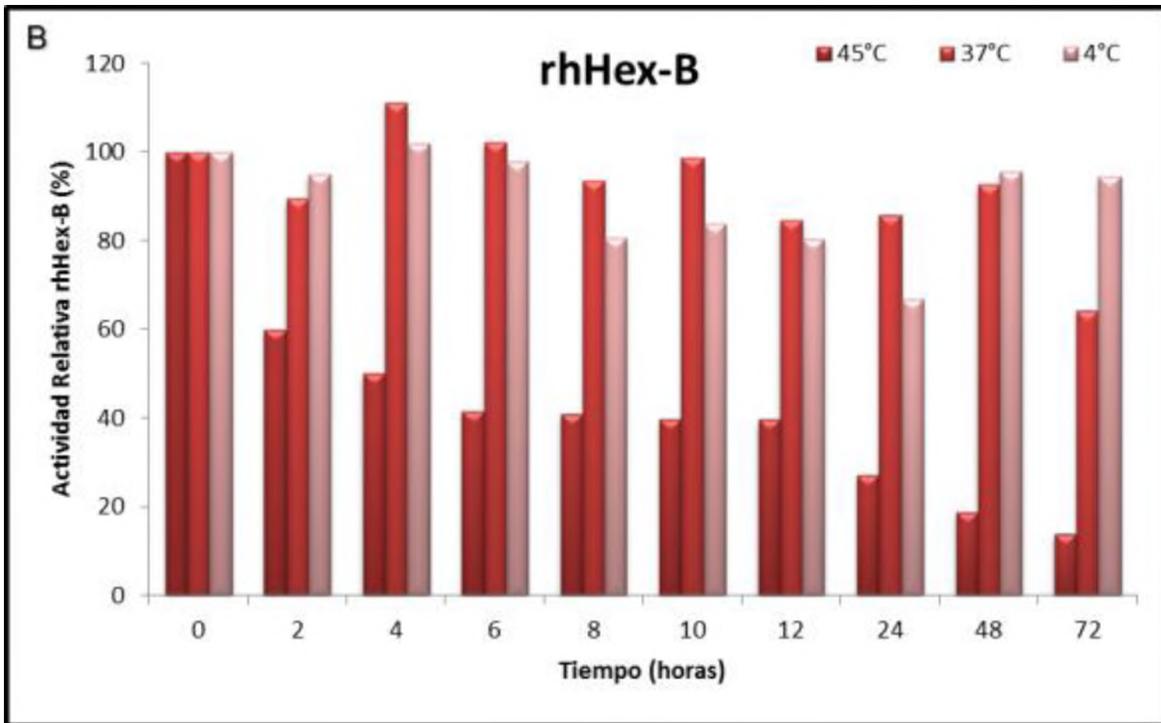
**Figura 27. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de las hexosaminidasas recombinantes.** El efecto de pH se evaluó después de la incubación de cada una de las enzimas durante 1 hora a 37°C, disueltas en soluciones tampón a diferentes pH. Los resultados se muestran como actividad relativa (%) teniendo en cuenta que el 100% se toma como el punto de actividad más alto encontrado durante la evaluación para cada enzima.

La estabilidad a temperatura fue evaluada a lo largo de 72 horas a 4, 37 y 45°C (Figura 28). Bajo estas condiciones rhHex-A no mostró una reducción significativa en la actividad enzimática a 4 y 37°C a lo largo del tiempo evaluado, mientras a 45°C la enzima permaneció estable durante las primeras 8 horas, a partir de las cuales se observó una marcada reducción llegando a valores del 35% de los iniciales después de las 72h de incubación (Figura 28A). La enzima rhHex-B mostró una gran estabilidad a 4 y 37°C, aunque después de las 72h a 37°C la actividad fue reducida en un 40% de los valores iniciales. A 45°C la enzima rhHex-B tuvo una marcada reducción en la actividad enzimática después de 2h de incubación (40 % de los niveles iniciales), alcanzando un 90 % de reducción después de las 72h (Figura 28 B). Finalmente, la enzima rhHex-S mostró una alta estabilidad a 4 y 37°C, con un 80% de reducción después de las 72 horas de

incubación a 37°C. A 45°C rhHex-S mostró la mayor inestabilidad a temperatura de las enzimas estudiadas, con una pérdida del 90% de la actividad enzimática durante las primeras 2h de incubación (Figura 28 C).

Estos resultados sugieren que el perfil de estabilidad de la enzima rhHex-S está de acuerdo con reportes previos que muestran la baja estabilidad de la subunidad alfa [42]. La enzima rhHex-A producida en *P.pastoris* mostró estabilidad importante a 45°C durante 8 h de incubación, lo cual contrasta con la enzima extraída de hígado, la cual perdió un 10% de actividad durante los primeros 10 minutos de incubación a 40°C [57]. Por su parte, rhHex-B producida en *P. pastoris* tiene un perfil levemente diferente a reportes previos de termoestabilidad de la subunidad  $\beta$ . Por ejemplo, Geiger *et. al.* (1977) [57], mostraron que a 40 y 50°C, Hex-B era la más estable entre las  $\beta$ -hexosaminidasas. Adicionalmente, la subunidad beta ha sido reportada como la subunidad intracelular más estable [42]; por esta razón, la inactivación a 52°C es comúnmente usada durante la determinación de actividad enzimática en muestras de plasma de la Hex-A [107]. Sin embargo, se ha reportado que su actividad a 60°C se pierde así como la de Hex-A y HexS [57].

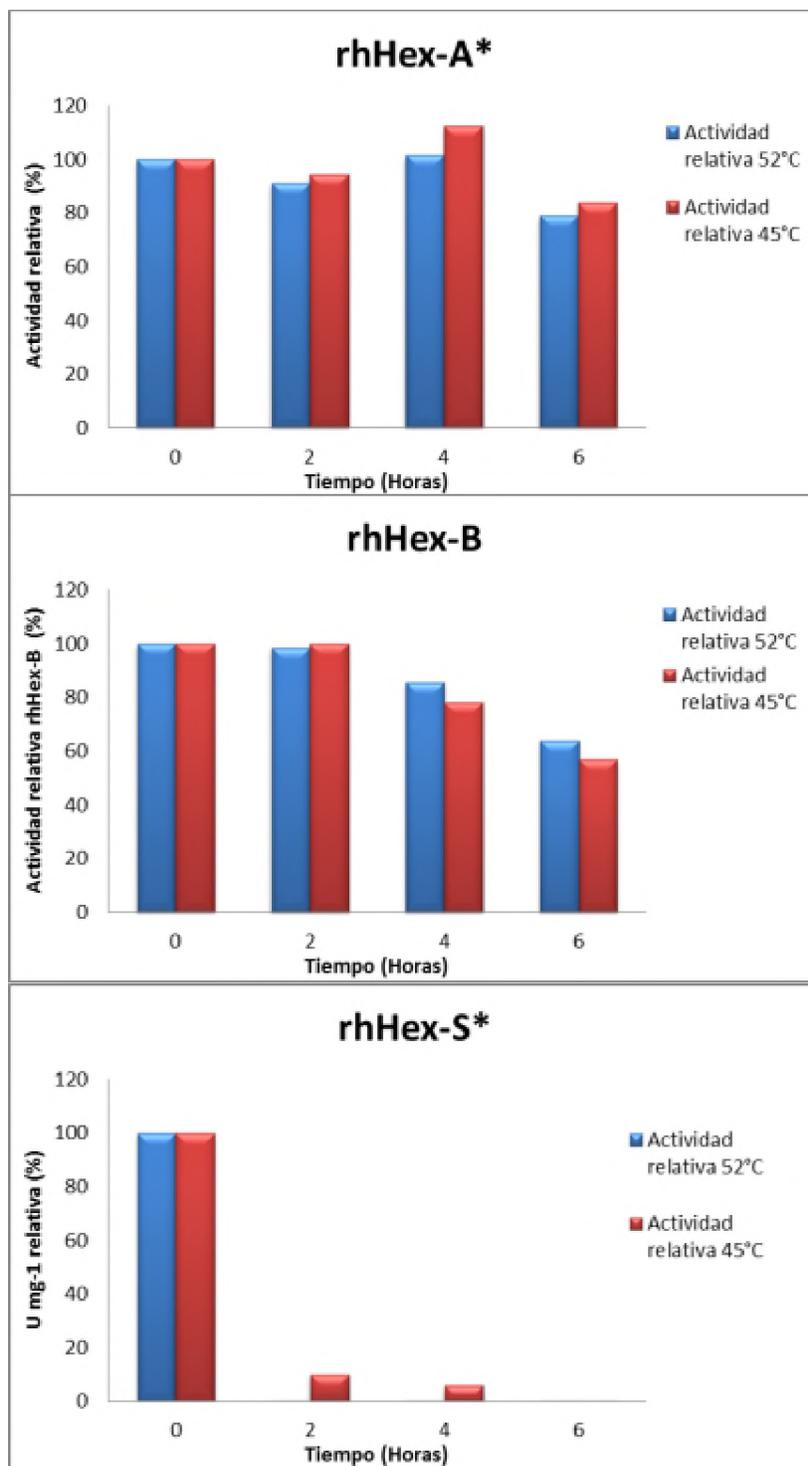




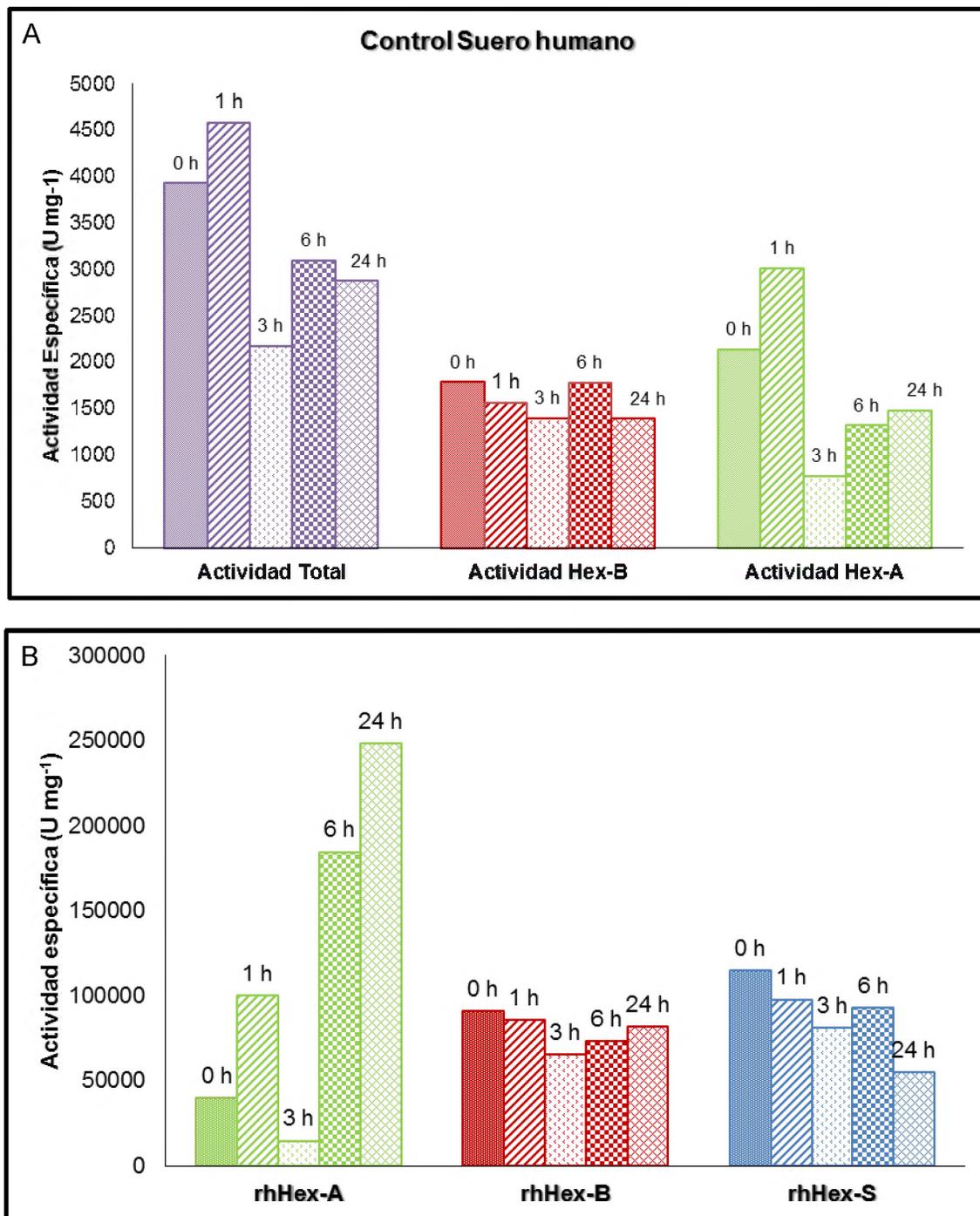
**Figura 28. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las hexosaminidasas lisosomales.** Cada una de las enzimas rhHex-A (A), rhHex-B (B), y rhHex-S (C) fueron evaluados en su actividad enzimática después de ser incubadas a diferentes temperaturas 4, 37, y 45 °C durante 72 h, disueltas en el una solución tampón de citrato al pH en el cual fueron más estables, el cual fue determinado anteriormente. Los resultados se muestran como actividad relativa (%) teniendo en cuenta que el 100% fue el valor de actividad obtenido a las 0 h.

Adicionalmente, las tres isoenzimas recombinantes fueron evaluadas a 52°C para compararlo con la estabilidad a 45°C. Esto debido al comportamiento presentado por rhHex-B, la cual durante el proceso de determinación de actividad enzimática de Hex-A en una muestra debe ser sometida a esta temperatura para la inactivación de las enzimas termolábiles. Así, mismo se verificó el comportamiento de rhHex-A y rhHex-S, después de ser sometidas a incubación a estas dos temperaturas y su medición se realizó con el sustrato sulfatado MUGS. Los resultados muestran en la Figura 29 que rhHex-A mantiene su actividad a lo largo de 4 h de incubación a 45 y 52°C, pero hacia las 6 h pierde un 25 – 30% de su actividad. rhHex-S definitivamente es la enzima más termolábil, pierde totalmente su actividad a las 2 h de incubación. Sin embargo, rhHex-B, mostró que no hay una pérdida adicional de actividad a las 2h de incubación a 52°C respecto a la de 45°C.

Finalmente, la estabilidad de las hexosaminidasas fue evaluada en suero humano. La actividad de las enzimas nativas Hex-A, Hex-B y Hex-S en suero humano fue entre 4000 y 2000 U mg<sup>-1</sup> con una tendencia a disminuir durante las primeras 24 h del ensayo (Fig 30A, control). La adición de las enzimas rhHex-A, rhHex-B, y rhHex-S en suero humano permitió un aumento en la actividad entre 5 a 83 veces con respecto a los niveles observados en el suero sin enriquecer. Los resultados mostraron que para rhHex-B y rhHex-S no mostraron una reducción importante durante las 24 h de incubación. Por su parte, rhHex-A presentó un perfil de actividad inesperado, con un incremento en la actividad de la enzima a lo largo del tiempo (Figura 30B) La razón de este incremento en la actividad enzimática no ha sido entendida aún, y se encuentra está bajo evaluación. Matsuoka *et. al.* (2011) [17] evaluaron la actividad de hexosaminidasas recombinantes Hex-A y Hex-B y una Hex-B modificada (una enzima quimérica con dos características de la subunidad alfa, la afinidad por el sustrato sintético aniónico, y la habilidad de reducir el gangliósido GM2 in vitro) producidas en células CHO de forma recombinante. Los resultados permitieron observar que la enzima Hex-B modificada tenía una mayor estabilidad en plasma murino que las enzimas recombinantes no modificadas [17].



**Figura 29. Efecto de 45 y 52°C sobre las hexosaminidasas recombinantes.** Cada una de las enzimas rhHex-A (A), rhHex-B (B), y rhHex-S (C) fueron incubadas a 45 y 52 °C durante 2, 4 y 6 h, disueltas en una solución tampón de citrato al pH en el cual fueron más estables. Los resultados se muestran como actividad relativa (%) teniendo en cuenta que el 100% fue el valor de actividad obtenido a las 0 h. \*Medición de actividad con el sustrato MUGS.



**Figura 30. Estabilidad de las hexosaminidasas recombinantes en suero humano normal. A.** Se midió la actividad enzimática presente en el suero humano normal sin la adición de hexosaminidasas recombinantes (Control suero humano normal). **B.** Las hexosaminidasas recombinantes fueron incubadas en suero humano normal a 37 °C durante 24 horas, después de la incubación se midió la actividad enzimática fue medida con el sustrato MUG de cada una de las muestras

## 5.5. Captura celular de hexosaminidasas recombinantes

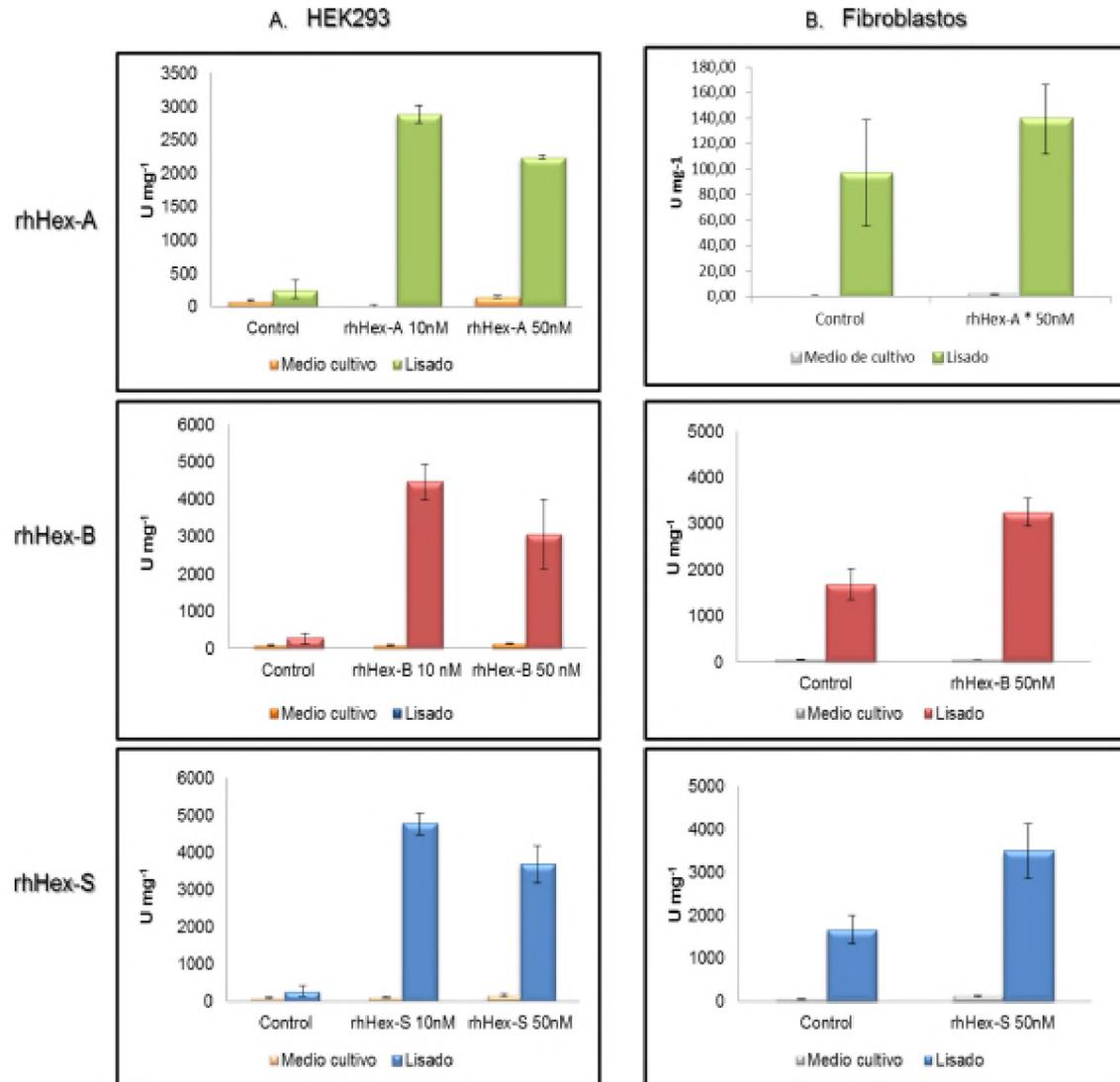
Aunque la enzima Hex-A recombinante humana ha sido producida en la levadura *O. minuta* con altos niveles de actividad [14, 15], este es el primer reporte que muestra la caracterización de  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes producidas en levaduras, bajo las diferentes condiciones descritas. En resumen, estos resultados mostraron que las  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes obtenidas en *P. pastoris* tienen una estabilidad similar a las extraídas de tejido humano (enzimas nativas), lo cual es un aspecto importante para continuar con más estudios que permitan su uso como enzimas terapéuticas en un futuro.

Las enzimas lisosomales son sometidas a modificaciones post-traduccionales durante su tráfico celular desde el retículo endoplásmico hasta el lisosoma o los compartimentos extracelulares [90]. Una de las principales modificaciones es la adición de N-glicanos los cuales tienen Manosa 6 fosfato (M6P) en su extremo N-terminal. Estas N-glicosilaciones son reconocidas por los receptores de M6P (MPR) en el aparato de Golgi para dirigir la enzima hacia el sistema endosoma/lisosoma [90, 123]. Adicionalmente, se han descrito sistemas de marcaje lisosomal alternativos como sortilina que se une a muchos ligandos, y la proteína integral de membrana lisosomal (LAMP-2), los cuales participan en el direccionamiento de  $\beta$ -glucocerebrosidasa a los lisosomas [124].

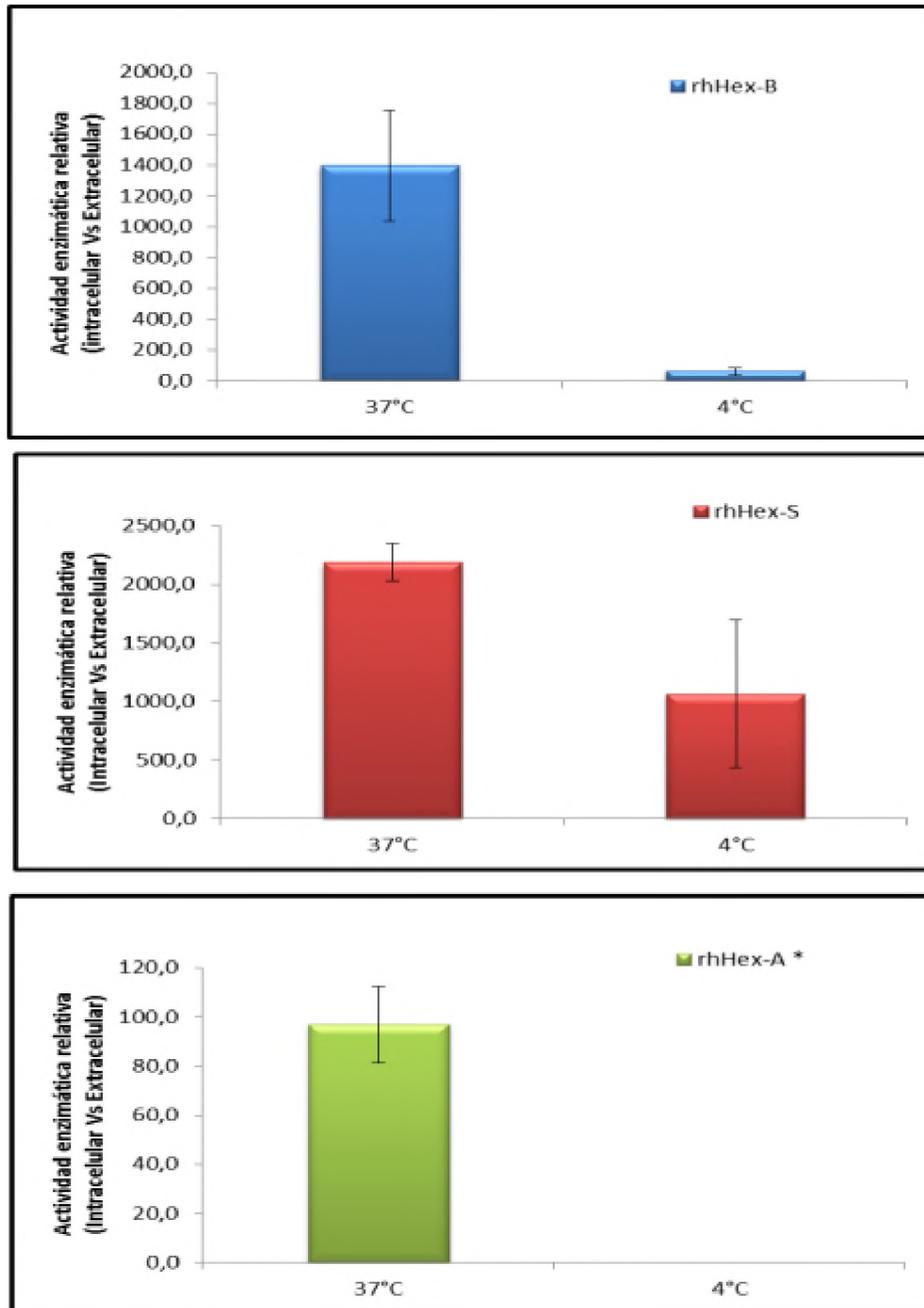
La terapia de reemplazo enzimático convencional para las enfermedades de depósito lisosomal está basada en la capacidad de las enzimas recombinantes lisosomales para ser capturadas y direccionadas al lisosoma donde ellas pueden degradar el sustrato acumulado [20]. La enzima Hex-A recombinante producida en células CHO es capturada por células en cultivo de manera independiente del receptor M6P, y es capaz de reducir los acúmulos de gangliósido GM2 en células Schwann y fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Sandhoff [125]. De forma similar, la enzima Hex-B recombinante producida en células CHO fue capturada por fibroblastos mediante el receptor catión independiente de manosa 6 fosfato (MPR), mientras que en un modelo de ratón la administración intracerebroventricular de la enzima recombinante permitió la reducción de la acumulación de gangliósido GM2 en parénquima [2, 17]. Por otro lado, para la enzima Hex-A producida en *O minuta* fue necesario un tratamiento con alfa manosidasa para exponer los residuos de M6P y de esta forma permitir la captura celular de fibroblastos de pacientes [16, 46]. Una aproximación similar fue necesaria para la enzima alfa-glucosidasa [126] y alfa-galactosidasa A [127] producidas en *Yarrowia lipolytica* y *S. cerevisiae* respectivamente, para lograr la captura celular tanto *in vitro* como *in vivo*.

En este trabajo las tres enzimas recombinantes producidas en *P. pastoris* fueron evaluadas por su capacidad de ser capturadas por cultivos celulares de fibroblastos de piel de individuos normales y células HEK293. Como se muestra en la Figura 31, la actividad de las enzimas se aumentó en el lisado celular posterior a la exposición de las células a cada una de las  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes. La actividad enzimática en el medio de cultivo permaneció similar a la observada en el de células sin tratar (control). Estos resultados sugieren que las enzimas recombinantes producidas en *P. pastoris* pudieran ser capturadas por cultivos celulares sin requerir modificaciones enzimáticas posteriores. Se evaluaron dos concentraciones para cada enzima, 10nM y 50nM, para el caso de las células HEK293, la dosis más baja fue suficiente para observar internalización a la célula. Por su parte en los fibroblastos 10nm no mostró actividad considerable al interior de la célula (datos no mostrados) mientras 50nM mostró una diferencia apreciable en los niveles de actividad al interior de la célula con respecto al medio de cultivo.

Posteriormente, se evaluó si la captura podría ocurrir por vías endocíticas, por lo cual se realizó el ensayo a 4 y 37°C simultáneamente. Es bien sabido que la internalización de los procesos ocurre a temperaturas fisiológicas y una baja temperatura puede afectar o incluso inhibir la vía endocítica de las proteínas [128]. En la Figura 32 se muestra claramente que los niveles de actividad intracelular a 37°C son mayores que los obtenidos con el tratamiento a 4°C (datos mostrados como actividad enzimática relativa obtenida como la diferencia entre la actividad enzimática intracelular Vs extracelular después de la resta de la actividad de las células no tratadas o controles), sugiriendo que un mecanismo alternativo podría ser usado para la captura celular de estas enzimas recombinantes. Resultados similares fueron reportados para GALNS (N-acetilgalactosamina 6 sulfato sulfatasa) producida en *P. pastoris*, la cual mostró inhibición en su captura a 4°C [129], y para la lipasa acida lisosomal producida en *P. pastoris* la cual fue también capturada a través de receptores diferentes a M6P y receptores de manosa [130] y para



**Figura 31 Evaluación de captura celular de las hexosaminidasas recombinantes.** A. Células HEK293. B. Fibroblastos normales. Se evaluaron inicialmente dos concentraciones de cada enzima recombinante 10nM y 50nM. Para el panel B se muestra solamente la concentración a la cual fue posible ver un cambio. Los tratamientos se hicieron por triplicado. La medición de actividad se realizó como se describe en materiales y métodos con el sustrato sintético MUG y MUGS\*.



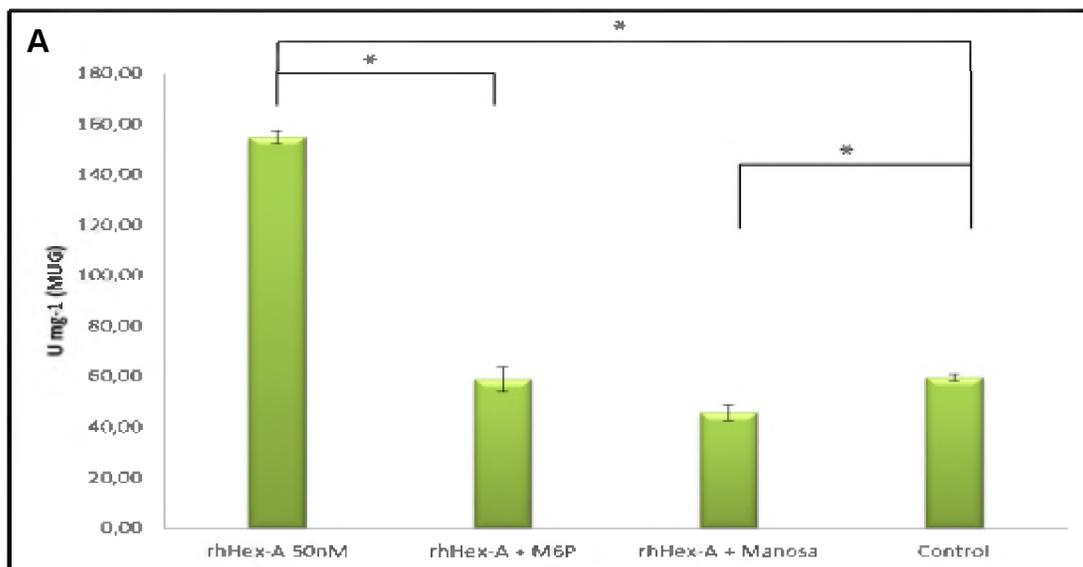
**Figura 32. Evaluación de la captura celular a 4 y 37°C. Fibroblastos normales.** Los resultados se muestran como la diferencia entre la actividad obtenida en el medio de cultivo y el lisado celular, después de la resta de la actividad del control (células no tratadas con enzima recombinante).

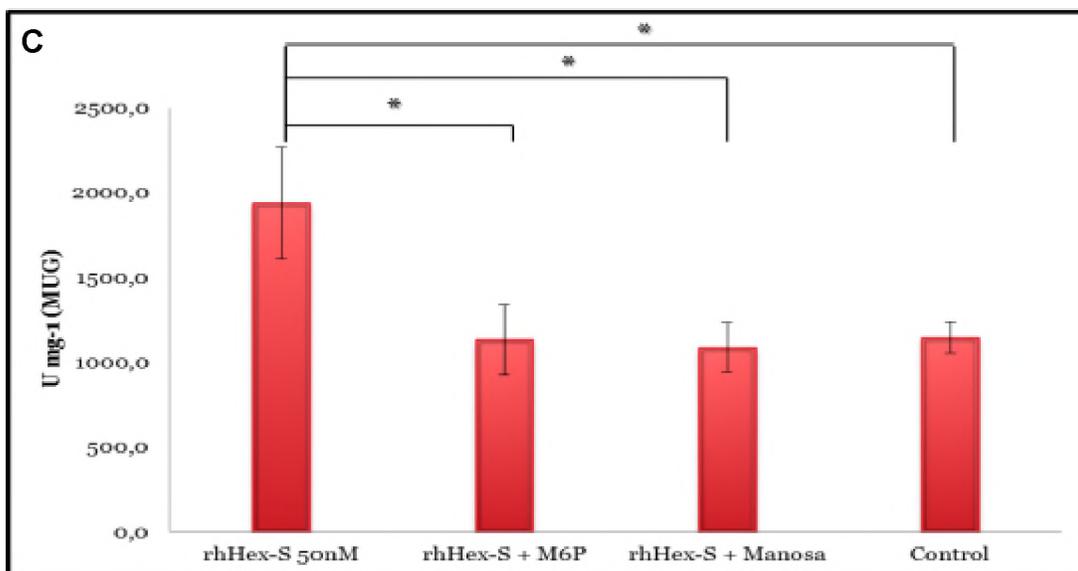
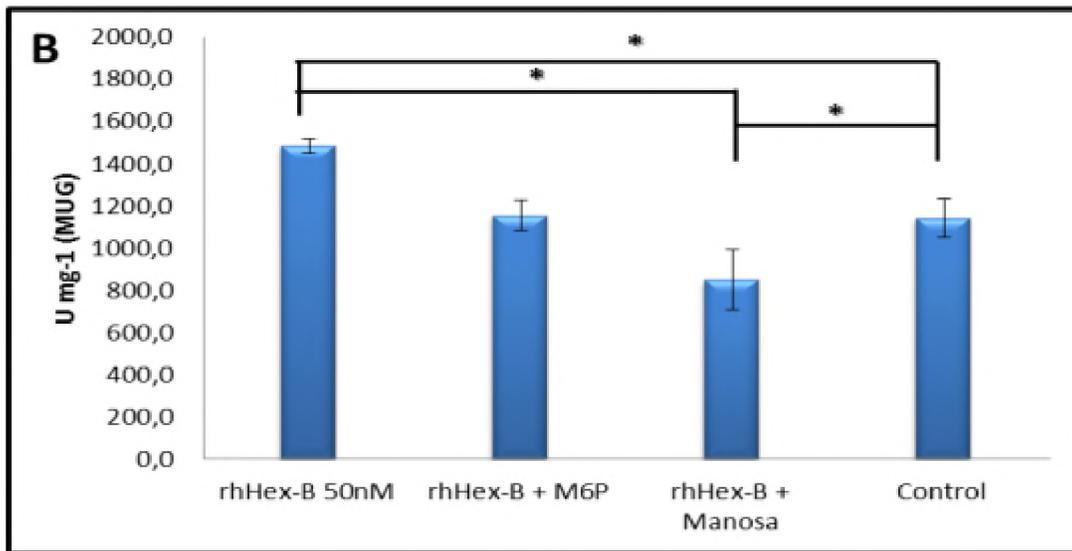
Estos resultados contrastan con lo reportado para Hex-A recombinante [16, 46], alfa glucosidasa [126] y alfa-galactosidasa A [127], producidas en *O. minuta*, *Y. lipolytica*, y *S. cerevisiae* respectivamente, los cuales requirieron un tratamiento previo con una glicosidasa bacteriana para remover los residuos alfa 1,2 – manosa, para exponer los residuos de M6P y permitir la captura celular de las enzimas. Sin embargo, estos resultados concuerdan con los reportados para las

enzimas N.acetilgalactosamina-6-sulfatasa [129, 131] alfa-glucosidasa [132] y lipasa acida lisosomal [130, 133] producidas en *P. pastoris*, las cuales mostraron una captura dosis dependiente sin la necesidad de realizar procesamientos adicionales de las enzimas purificadas.

Análisis de N-glicosilaciones para la lipasa ácida lisosomal producida en *P. pastoris* (phLAL) mostró que estas contenían glicanos ricos en manosa [130] similares a los reportados para otras enzimas recombinantes glicosiladas producidas en levaduras [134]. phLAL fue capturada a través de receptores manosa en una sub-línea de macrófagos de ratón en la cual se permitió que la enzima fuera direccionada al lisosoma [133]. La evaluación *in vivo* mostró que phLAL fuera tomada por células de hígado y bazo de forma similar a lo observado con la enzima beta-glucosidasa ácida con terminaciones de manosa producida en células de mamífero [133]. La presencia de oligosacáridos de manosa sobre phLAL permite una captura preferencial por líneas celulares de tejido hepático sinusoidal y sobre macrófagos viscerales [130].

En este trabajo se evaluó la entrada de las enzimas recombinantes a la célula adicionando manosa y manosa-6-fosfato (M6P) al medio. Los resultados muestran que la entrada en fibroblastos normales podría estar mediada por los dos tipos de receptores (Figura 33), ya que los niveles de actividad enzimática medidos en el lisado celular disminuyeron cuando se incubó con manosa y M6P con respecto a las células tratadas solamente con la enzima. Estudios adicionales podrán ser realizados con el fin de determinar la estructura de las glicosilaciones de las  $\beta$ -hexosaminidasas producidas en este trabajo, las cuales podrían ser similares a las observadas en phLAL sugiriendo que la enzima podría ser capturada a través de receptores manosa.



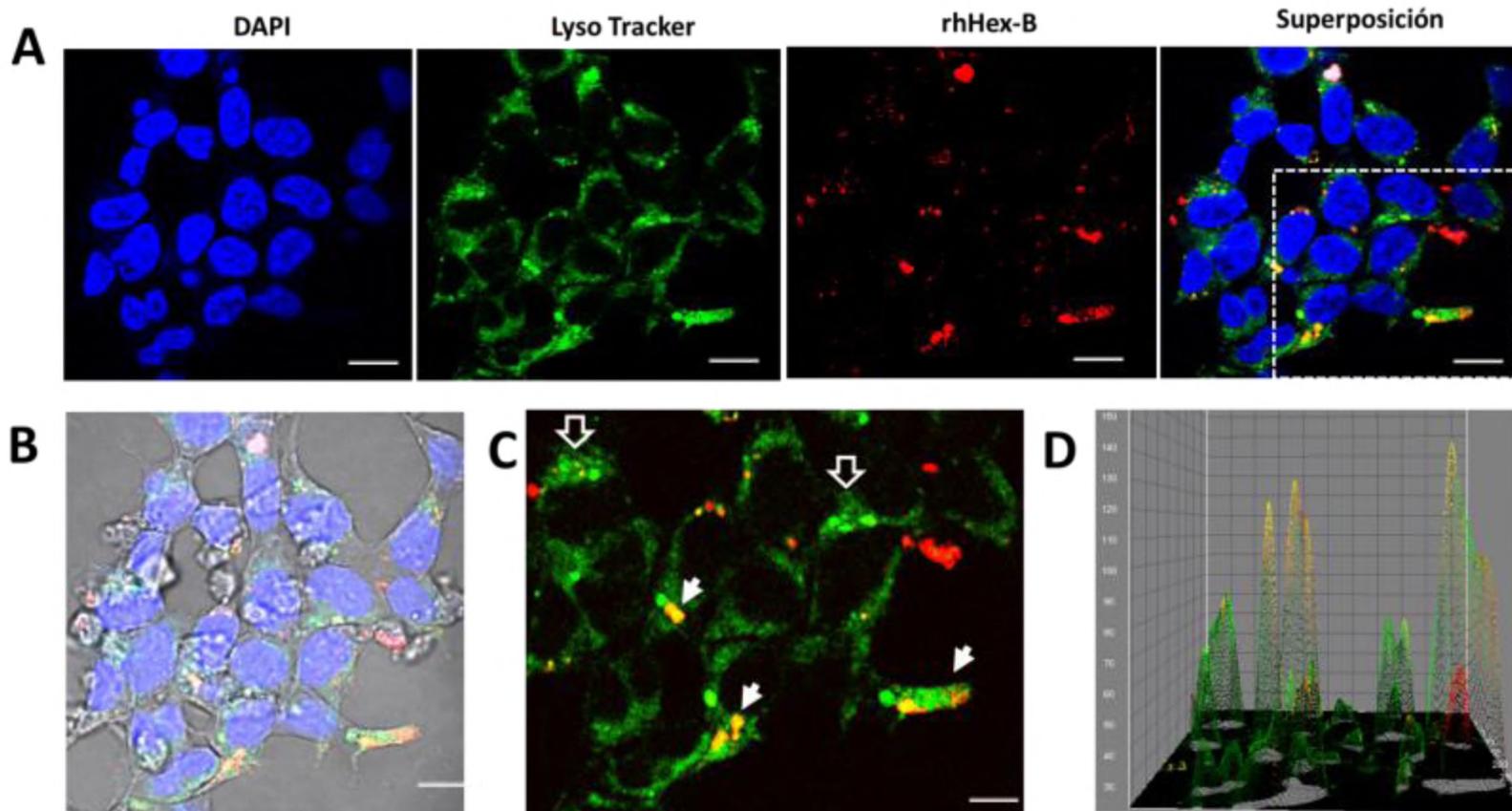


**Figura 33. Evaluación de la entrada por receptores manosa y manosa-6-fosfato (M6P).** A. rhHex-A; B. rhHex-B; C. rhHex-S. La entrada de las enzimas recombinantes a fibroblastos normales fue evaluada mediante la adición de manosa y manosa-6-fosfato durante el proceso de captura celular. Los resultados sugieren que las células están usando los dos tipos de receptores para la internalización de las enzimas recombinantes. Los resultados se muestran como la actividad específica obtenida en el lisado celular posterior a la exposición de los fibroblastos a cada tratamiento. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA y un análisis Posthoc (Tukey) (Anexo).

Finalmente, se realizó el ensayo de tráfico intracelular para la enzima rhHEX-B marcada con AlexaFluor 568 y sobre células HEK293 (Figura 34). Los resultados muestran que, similar a lo observado en los ensayos previos con células HEK293

y fibroblastos, rhHex-B es internalizada por las células en cultivo. De igual forma, una fracción de esta enzima está siendo direccionada a los lisosomas, como se observa tras el análisis de colocalización con el marcador de lisosomas (Figura 34 panel C). Así mismo, en el diagrama de superficie de la imagen se pueden observar estas zonas colocalizadas entre los lisosomas marcados (verde) y la señal producida por la proteína (rojo), lo que confirma que la combinación de señales se está dando en el mismo plano (Figura 34 panel D). Sin embargo, estos resultados también muestran que una fracción importante de la enzima recombinante parece estar ubicada en el citoplasma y en compartimientos vacuolares, posiblemente endosómicos. A pesar que estos últimos compartimientos podrían estar en la vía endosoma/lisosoma, el marcador empleado en este estudio solo permite la visualización de organelos ácidos (lisosomas), por lo que se recomienda evaluar un mayor periodo de incubación y un marcador más general de la vía endosoma/lisosoma.

Finalmente, todos los resultados obtenidos en este trabajo así como los obtenidos para otras enzimas lisosomales producidas en *P. pastoris* [41, 116, 129, 135], representan un valioso aporte para continuar explorando a esta levadura como una importante plataforma para la producción de enzimas lisosomales recombinantes para TRE.



**Figura 34. Captura celular y relocalización de la enzima recombinante en células HEK293. A)** Marcaje fluorescente para núcleo (Azul), Lyso Tracker (verde) y hrHex-B (rojo), Superposición de todos los campos. **B)** Visualización a campo claro de la triple fluorescencia a nivel intracelular. **C)** detalle del patrón de distribución de la enzima exógena en el citoplasma celular. Flechas vacías señalan verde de marcaje de lisosomas. Flechas blancas; señal amarilla colocalización de la proteína con el lisosoma. **D)** Diagrama de superficie tridimensional de la imagen C.

## 6. CONCLUSIONES

- ✓ Se logró la clonación, transformación y coexpresión de los genes *HEXA* y *HEXB* en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* GS115, obteniendo resultados de actividad enzimática similares a los reportados para otros sistemas de expresión. Estos resultados demuestran que *P. pastoris*, constituye una buena alternativa para la producción de enzimas homo y heterodiméricas.
- ✓ Las isoenzimas fueron producidas a escala de 100 mL y 1,65 L obteniéndose valores de actividad entre 25 a 30 veces más altos que los observados en leucocitos de un individuo normal. Sin embargo, es necesario optimizar los procesos de producción de cada isoenzima y continuar el escalado, con el fin de obtener resultados superiores a los reportados con la la levadura *O. minuta* a 4 L.
- ✓ A pesar que la enzima Hex-A ya había sido producida por otros autores en la levadura *Ogataea minuta*, este trabajo presenta por primera vez las características de estabilidad e internalización celular de las tres isoenzimas recombinantes producidas en levadura como sistema de expresión.
- ✓ La estabilidad de las  $\beta$ -hexosaminidasas lisosomales recombinantes producidas en levadura, fue caracterizada por primera vez a diferentes condiciones de pH, temperatura e incubación en suero humano, mostrando que sus características de estabilidad son comparables con las reportadas para enzimas nativas. Es bien conocido que las características de las proteínas pueden variar dependiendo del organismo y del tejido del cual son extraídas, por tanto sus características de estabilidad pueden mejorar como en el caso de rhHex-A, así como disminuir como fue el caso de rhHex-B para una de las condiciones evaluadas. Sin embargo, estos resultados podrían constituir una buena aproximación para enzimas con miras a ser utilizadas a nivel terapéutico.
- ✓ A diferencia de lo reportado para enzimas lisosomales producidas en otros sistemas de expresión, se observó internalización de las enzimas recombinantes en dos líneas celulares, HEK293 y fibroblastos, sin tener que realizar tratamientos adicionales o modificaciones sobre las N-glicosilaciones.
- ✓ Los resultados de captura sugieren que la internalización está mediada por vías endocíticas y a su vez puede estar relacionada con el uso de receptores manosa y/o manosa-6- fosfato. Se recomienda realizar ensayos con células de pacientes con alguno de los desórdenes GM2.
- ✓ Los resultados empleando cultivos celulares sugieren que una proporción de las  $\beta$ -hexosaminidasas producidas en *P. pastoris* son dirigidas a los lisosomas. Adicionalmente, parte de la proteína pareciera estar en el

citoplasma o posiblemente relacionada con otros organelos de la célula. Es necesario entonces realizar ensayos adicionales en los cuales se pueda continuar estudiando el tráfico intracelular de estas enzimas recombinantes. Sin embargo, estos resultados muestran la capacidad de estas enzimas para llegar al lisosoma, lo que podría permitir el diseño de una terapia de reemplazo enzimático basada en enzimas producidas en *P. pastoris*.

En resumen, estos resultados ofrecen información valiosa acerca de la importancia de la producción de  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes en *P. pastoris* como sistema de expresión, así como características fisicoquímicas y de captura celular que permiten pensar en su uso para el desarrollo de una Terapia de Reemplazo Enzimático para las gangliosidosis GM2. Todo esto apunta a la conveniencia de realizar estudios adicionales que permitan completar la características fisicoquímicas, su localización *in-vitro*, y el perfil de biodistribución, así como sus efectos sobre los niveles de sustrato natural GM2 tanto *in-vitro* como *in-vivo*.

Es aconsejable además profundizar en la interacción de las subunidades  $\alpha$  y/o  $\beta$  de cada una de las hexosaminidasas, con miras a mejorar los procesos biotecnológicos y obtener de esta forma mejores niveles de producción de una determinada isoforma.

## 7. RECOMENDACIONES

- Evaluar los patrones de glicosilación de cada una de las  $\beta$ -hexosaminidasas recombinantes
- Comparar la cinética enzimática de las enzimas recombinantes con la cinética de leucocitos humanos
- Realizar ensayos de captura celular en células de pacientes con Tay Sachs y/o Sandhoff y evaluar el efecto de localización celular y degradación de los sustratos acumulados.
- Realizar ensayos de captura celular en tiempos superiores a 6 h (i.e. 12, 18, 24 horas) y visualizar la localización de la proteína recombinante mediante microscopía confocal.
- Evaluar otro tipo o tipos de marcadores que permitan evaluar en qué parte del tráfico celular endosoma / lisosoma se encuentra la proteína, ya que es evidente que una parte parece mostrar colocalización con lisosoma y otra parte parece estar localizada a lo largo de citoplasma celular.
- Realizar un estudio profundo de las interacciones entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  para la formación de los homodímeros y/o heterodímeros bajo condiciones que permitan optimizar su producción e incrementar su estabilidad.

## 8. REFERENCIAS

1. Kolter, T..Sandhoff, K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **1758**: 2057-2079, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.027>.
2. Gravel, R.A., Kaback, M.M., Proia, R.L., Sandhoff, K..Suzuki, K., The GM2 gangliosidoses. , in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. , Scriver CR, et al., Editors. McGraw-Hill: New York. 3827-77. 2001.
3. Schulze, H..Sandhoff, K. Lysosomal Lipid Storage Diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **3**, 2011.
4. Gieselmann, V. Lysosomal storage diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **1270**: 103-136, 1995. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)00075-2](http://dx.doi.org/10.1016/0925-4439(94)00075-2).
5. Neufeld, E.F. Natural history and inherited disorders of a lysosomal enzyme beta-hexosaminidase. Review. *J Biol Chem*. **264**: 10927-30, 1989.
6. Tutor, J.C. Biochemical characterization of the GM2 gangliosidosis B1 variant. Review. *Braz J Med Biol Res*. **37**: 777-83., 2004
7. Yadao Franeli, Hechtman Peter.Kaplan Feige. Formation of a ternary complex between GM2 activator protein, GM2 ganglioside and hexosaminidase A. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1340**: 45-52, 1997.
8. Sandhoff, K..Harzer, K. Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *The Journal of Neuroscience*. **33**: 10195-10208, 2013. doi: 10.1523/jneurosci.0822-13.2013.
9. Tropak, M..Mahuran, D.J., Tay-Sachs Disease, in *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, J.W. Sons, Editor. 2010.
10. Jeyakumar, M., Dwek, R.A., Butters, T.D..Platt, F.M. Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain. *Nat Rev Neurosci*. **6**: 713-725, 2005. doi: [http://www.nature.com/nrn/journal/v6/n9/supinfo/nrn1725\\_S1.html](http://www.nature.com/nrn/journal/v6/n9/supinfo/nrn1725_S1.html).
11. Tropak M.B..D., M. Lending a helping hand, screening chemical libraries for compounds that enhance beta-hexosaminidase A activity in GM2 gangliosidosis cells. Review *FEBS J*. **19**: 4951-61, 2007.
12. Shapiro, B.E., Pastores, G.M., Gianutsos, J., Luzy, C..Kolodny, E.H. Miglustat in late-onset Tay-Sachs disease: a 12-month, randomized, controlled clinical study with 24 months of extended treatment. *Genet Med*. **11**: 425-433, 2009.
13. Clarke, J.T.R., Mahuran, D.J., Sathe, S., Kolodny, E.H., Rigat, B.A., Raiman, J.A..Tropak, M.B. An open-label Phase I/II clinical trial of pyrimethamine for the treatment of patients affected with chronic GM2 gangliosidosis (Tay–Sachs or Sandhoff variants). *Molecular Genetics and Metabolism*. **102**: 6-12, 2011. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.09.004.
14. Akeboshi, H., Kasahara, Y., Tsuji, D., Itoh, K., Sakuraba, H., Chiba, Y..Jigami, Y. Production of human  $\beta$ -hexosaminidase A with highly phosphorylated N-glycans by the overexpression of the *Ogataea minuta* MNN4 gene. *Glycobiology*. **19**: 1002-1009, 2009.
15. Akeboshi H, Chiba Y, Kasahara Y, Takashiba M, Takaoka Y, Ohsawa M, Tajima Y, Kawashima I, Tsuji D, Itoh K, Sakuraba H.Y., J. Production of recombinant beta-hexosaminidase A, a potential enzyme for replacement therapy for Tay-Sachs and Sandhoff diseases, in the methylotrophic yeast *Ogataea minuta*. . *Appl Environ. Microbiol*. **15**: 4805-12, 2007.

16. Tsuji, D., Akeboshi, H., Matsuoka, K., Yasuoka, H., Miyasaki, E., Kasahara, Y., Kawashima, I., Chiba, Y., Jigami, Y., Taki, T., Sakuraba, H., Itoh, K. Highly Phosphomannosylated Enzyme Replacement Therapy for GM2 Gangliosidosis. *Ann Neurol.* **69**: 691-701, 2011.
17. Matsuoka, K., Tamura, T., Tsuji, D., Dohzono, Y., Kitakaze, K., Ohno, K., Saito, S., Sakuraba, H., Itoh, K. Therapeutic Potential of Intracerebroventricular Replacement of Modified Human B-Hexosaminidase B for GM2 gangliosidosis. *Mol Ther.* **19** 1017–1024, 2011.
18. Martino S, Marconi P, Tancini B, Dolcetta D, De Angelis M.G., Montanucci P, Bregola G, Sandhoff K, Bordignon C, Emiliani C, Manservigi R.A., O. A direct gene transfer strategy via brain internal capsule reverses the biochemical defect in Tay-Sachs disease. *Hum Mol Genet.* **14**: 2113-2123, 2005
19. Torres, P.A., Zeng, B.J., Porter, B.F., Alroy, J., Horak, F., Horak, J., Kolodny, E.H. Tay-Sachs disease in Jacob sheep. *Molecular Genetics and Metabolism.* **101**: 357-363. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.08.006.
20. Desnick, R., Schuchman, E. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* **13**: 307-335, 2012.
21. Platt, F.M., Lachmann, R.H. Treating lysosomal storage disorders: Current practice and future prospects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* **1793**: 737-745, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.08.009>.
22. Desnick, R. Enzyme replacement and enhancement therapies for lysosomal diseases. Review. *J Inher Metab Dis.* **27**: 385-410, 2004.
23. Burrow, T.A., Hopkin, R.J., Leslie, N.D., Tinkle, B.T., Grabowski, G.A. Enzyme reconstitution/replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Current Opinion in Pediatrics.* **19**: 628-635, 2007. doi: 10.1097/MOP.0b013e3282f161f2.
24. Schultz, M.L., Tecedor, L., Chang, M., Davidson, B.L. Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends in Neurosciences.* **34**: 401-410, 2011. doi: 10.1016/j.tins.2011.05.006.
25. Norflus, F., Tiffit, C.J., McDonald, M.P., Goldstein, G., Crawley, J.N., Hoffmann, A., Sandhoff, K., Suzuki, K., Proia, R.L. Bone marrow transplantation prolongs life span and ameliorates neurologic manifestations in Sandhoff disease mice. *The Journal of Clinical Investigation.* **101**: 1881-1888, 1998. doi: 10.1172/jci2127.
26. Elliot-Smith, E., Speak, A.O., Lloyd-Evans, E., Smith, D.A., Spoel, A.C.v.d., Jeyakumar, M., Butters, T.D., Dwek, R.A., d'Azzo, A., Platt, F.M. Beneficial effects of substrate reduction therapy in a mouse model of GM1 gangliosidosis. *Molecular Genetics and Metabolism.* **94**: 204-211. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.02.005.
27. Maegawa, G.H.B., Tropak, M., Butner, J., Stockley, T., Kok, F., Clarke, J.T.R., Mahuran, D.J. Pyrimethamine as a potential pharmacological chaperone for late-onset forms of GM2 gangliosidosis. *Journal of Biological Chemistry,* 2007. doi: 10.1074/jbc.M609304200.
28. Marshall, J., Ashe, K.M., Bangari, D., McEachern, K., Chuang, W.-L., Pacheco, J., Copeland, D.P., Desnick, R.J., Shayman, J.A., Scheule, R.K., Cheng, S.H. Substrate Reduction Augments the Efficacy of Enzyme Therapy in a Mouse Model of Fabry Disease. *PLoS ONE.* **5**: e15033, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0015033.
29. Bourgoin, C. Widespread distribution of [beta]-hexosaminidase activity in the brain of a Sandhoff mouse model after coinjection of adenoviral vector and mannitol. *Gene Ther.* **10**: 1841-1849, 2003.
30. Cachón-González, M.B., Wang, S.Z., Lynch, A., Ziegler, R., Cheng, S.H., Cox, T.M. Effective gene therapy in an authentic model of Tay-Sachs-related diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **103**: 10373-10378, 2006. doi: 10.1073/pnas.0603765103.

31. Guidotti, J.E. Adenoviral gene therapy of the Tay-Sachs disease in hexosaminidase A-deficient knock-out mice. *Hum. Mol. Genet.* **8**: 831-838, 1999.
32. Bielicki, J., McIntyre, C., Anson, D.S. Comparison of ventricular and intravenous lentiviral-mediated gene therapy for murine MPS VII. *Molecular Genetics and Metabolism.* **101**: 370-382. doi: 10.1016/j.ymgme.2010.08.013.
33. Matsuda, J. Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **100**: 15912-15917, 2003.
34. Platt, F.M., Neises, G.R., Reinkensmeier, G., Townsend, M.J., Perry, V.H., Proia, R.L., Winchester, B., Dwek, R.A., Butters, T.D. Prevention of Lysosomal Storage in Tay-Sachs Mice Treated with N-Butyldeoxynojirimycin. *Science.* **276**: 428-431, 1997. doi: 10.1126/science.276.5311.428.
35. Jeyakumar, M., Butters, T.D., Cortina-Borja, M., Hunnam, V., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A., Platt, F.M. Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **96**: 6388-6393, 1999. doi: 10.1073/pnas.96.11.6388.
36. Andersson, U., Smith, D., Jeyakumar, M., Butters, T.D., Borja, M.C., Dwek, R.A., Platt, F.M. Improved outcome of N-butyldeoxygalactonojirimycin-mediated substrate reduction therapy in a mouse model of Sandhoff disease. *Neurobiology of Disease.* **16**: 506-515, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2004.04.012>.
37. Zervas, M., Somers, K.L., Thrall, M.A., Walkley, S.U. Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Current Biology.* **11**: 1283-1287, 2001. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00396-7.
38. Kasperzyk, J.L., d'Azzo, A., Platt, F.M., Alroy, J., Seyfried, T.N. Substrate reduction therapy reduces ganglioside content in postnatal cerebrum-brainstem and cerebellum in a mouse model of GM1 gangliosidosis. *J. Lipid Res.* **46**: 744-751, 2005.
39. Grubb, J.H., Vogler, C., Sly, W.S. New Strategies for Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Storage Diseases. *Rejuvenation Research.* **13**: 229-236, 2010. doi: 10.1089/rej.2009.0920.
40. Espejo-Mojica, Á.J., Alméciga-Díaz, C.J., Rodríguez, A., Mosquera, Á., Díaz, D., Beltrán, L., Díaz, S., Pimentel, N., Moreno, J., Sánchez, J., Sánchez, O.F., Córdoba, H., Poutou-Piñales, R.A., Barrera, L.A. Human recombinant lysosomal enzymes produced in microorganisms. *Molecular Genetics and Metabolism.* **116**: 13-23, 2015. doi: 10.1016/j.ymgme.2015.06.001.
41. Espejo, A.J., Malaver, L.F., Rodríguez, A., Cuaspa, R.d.P., Alméciga-Díaz, C.J., Barrera, L.A. Recent Patents in Diagnosis and Treatment for Inborn Errors of Metabolism. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery.* **4**: 111-130, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/187221410791196588>.
42. Zwierz, K., Zalewska, A., Zoch-Zwierz, W. Isoenzymes of N-acetyl-B-hexosaminidase. Review. *Acta Biochi Pol.* **46**: 739-751, 1999.
43. Slámová K, Bojarová P, Petrásková L.V., K.  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase: what's in a name...? . *Biotechnol Adv.* **28**: 682-93, 2010 doi: doi:10.1016/j.biotechadv.2010.04.004. .
44. Gutternigg M, Rendić D, Voglauer R, Iskratsch T.IB., W. Mammalian cells contain a second nucleocytoplasmic hexosaminidase. . *Biochem J.* **419** 83-90, 2009. doi: 10.1042/BJ20081630.
45. Potier, M., Teitelbaum, J., Melancon, S.B., Dallaire, L. Purification and some properties of liver and brain  $\beta$ -N-Acetyl-hexosaminidase S. *Biochim Biophys Acta.* **566**: 80-87, 1979.

46. Srivastava, S.K., Wiktorowicz, J.E., Awasthi, Y.C. Interrelationship of hexosaminidases A and B: Confirmation of the common and the unique subunit theory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **73**: 2833-2837, 1976.
47. Dewji, N.N. Purification and characterization of beta-N-acetylhexosaminidase I2 from human liver. *Biochem J*. **234**: 157 - 162, 1986.
48. Proia R.L., S. Organization of the gene encoding the human beta-hexosaminidase alpha-chain. *J Biol Chem*. **262**: 5677-81, 1987
49. Mahuran, D.J., Neote, K., Klavins, M.H., Leung, A., Gravel, R.A. Proteolytic Processing of Pro-a and Pro-B Precursors from Human B-Hexosaminidase. Generation of the mature a and BaBb subunits. *J. Biol. Chem.* **263**: 4612-4618, 1988.
50. Lemieux, M.J., Mark, B.L., Cherney, M.M., Withers, S.G., Mahuran, D.J., James, M.N.G. Crystallographic Structure of Human b-Hexosaminidase A: Interpretation of Tay-Sachs Mutations and Loss of GM2 Ganglioside Hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **359**: 913-929, 2006.
51. Mahuran, D.J. Characterization of human placental beta-hexosaminidase I2. Proteolytic processing intermediates of hexosaminidase A. *J Biol Chem*. **265**: 6794-6799, 1990
52. Mahuran, D.J., Tsui, F., Gravel, R.A., Lowden, J.A. Evidence for two dissimilar polypeptide chains in the B2 subunit of hexosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **79**: 1602-1605, 1982.
53. Mahuran, D.J.  $\beta$ -hexosaminidase: Biosynthesis and processing of the normal enzyme, and identification of mutations causing Jewish Tay-Sachs disease. *Clinical Biochemistry*. **28**: 101-106, 1995. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0009-9120\(95\)00003-R](http://dx.doi.org/10.1016/0009-9120(95)00003-R).
54. Hepbildikler, S.T., Sandhoff, R., Kolzer, M., Proia, R.L., Sandhoff, K. Physiological Substrates for Human Lysosomal B-Hexosaminidase S. *J. Biol. Chem.* **277**: 2562-2572, 2002.
55. Mark, B.L., Mahuran, D.J., Cherney, M.M., Zhao, D., Knapp, S., James, M.N.G. Crystal Structure of Human  $\beta$ -Hexosaminidase B: Understanding the Molecular Basis of Sandhoff and Tay-Sachs Disease. *J Mol Biol*. **327**: 1093-1109, 2003.
56. Maier Timm, Strater Norbert, Schuette Christina G., Klingenstein Ralf, Sandhoff Konrad.Wolfram., S. The X-ray Crystal Structure of Human B-Hexosaminidase B Provides New Insights into Sandhoff Disease. *J. Mol. Biol.* **328**: 669-681, 2003.
57. Geiger, B., Arnon, R., Sandhoff, K. Immunochemical and Biochemical Investigation of Hexosaminidase S. *Am J. Hum Genet.* **29**: 508-522, 1977.
58. Conzelmann, E., Sandhoff, K., Nehr Korn, H., Geiger, B., Arnon, R. Purification, Biochemical and Immunological Characterisation of Hexosaminidase A from Variant AB of Infantile GM2 Gangliosidosis *Eur J. Biochem.* **84**: 27 - 33, 1978.
59. Ikonne, J.U., Rattazzi, M.C., Desnick, R.J. Characterization of Hex S, the Major Residual B-Hexosaminidase Activity in Type 0 GM2 Gangliosidosis (Sandhoff-Jatzkewitz Disease). *Am. J. Hum. Genet.* **27**: 639 - 650, 1975.
60. Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C., Yoshida, A., Beutler, E. Studies on Human  $\beta$ -D-N-Acetylhexosaminidases. I. Purification and properties. *J Biol Chem*. **249**: 2043-2048, 1974.
61. Pennybacker, M., Liessem, B., Moczall, H., Tiffit, C.J., Sandhoff, K., Proia, R.L. Identification of Domains in Human B-Hexosaminidase That Determine Substrate Specificity. *J Biol Chem*. **271**: 17377-17382, 1996.
62. Fernandes, M.J.G., Yew, S., Leclerc, D., Henrissat, B., Vorgias, C.E., Gravel, R.A., Hechtman, P., Kaplan, F. Identification of Candidate Active Site Residues in Lysosomal b-Hexosaminidase A. *J. Biol. Chem.* **272**: 814-820, 1997.
63. Boose, J.A., Tiffit, C.J., Proia, R.L., Myerowitz, R. Synthesis of a Human Lysosomal Enzyme B-Hexosaminidase B, Using the Baculovirus Expression System *Protein Expr. Purif.* **1**: 111-120, 1990.

64. Prezant, T.R. Expression of human lysosomal beta-hexosaminidase in yeast vacuoles. *Biochem Biophys Res Commun.* **170**: 383-90, 1990.
65. Rai Meena.Padh Harish. Expression systems for production of heterologous proteins *Current Science.* **80**: 1121-1128, 2001.
66. Schmidt, F.R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **65**: 363-372, 2004. doi: 10.1007/s00253-004-1656-9.
67. Gerngross, T.U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotech.* **22**: 1409-1414, 2004. doi: 10.1038/nbt1028.
68. Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M., Porro, D., Recombinant Protein Production in Yeasts, in *Recombinant Gene Expression*, A. Lorence, Editor. Humana Press. 329-358. 2012. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9\\_17](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_17).
69. Çelik, E., Çalık, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology advances.* **30**: 1108-1118, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011>.
70. Mishra, S., Baranwal, R., Yeast Genetics and Biotechnological Applications, in *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, T. Satyanarayana and G. Kunze, Editors. Springer Netherlands. 323-355. 2009. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4\\_16](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_16).
71. Cereghino, G.P., Cereghino, J., Ilgen, C., Cregg, J.M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 329-332, 2002.
72. Hollenberg, C.P., Gellissen, G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Current Opinion in Biotechnology.* **8**: 554-560, 1997. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80028-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80028-6).
73. Lee, J.-D., Komagata, K. Taxonomix study of methanol - assimilating yeasts. *The Journal of General and Applied Microbiology.* **26**: 133-158, 1980. doi: 10.2323/jgam.26.133.
74. Negruta Oana, Csutak Ortansa, Stoica Ilenana, Rusu Elena.Tatiana, V. Methylotrophic yeasts: diversity and methanol metabolism *Romanian Biotechnological Letters.* **15** 5369-5375, 2010.
75. Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G., Gellissen, G. Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **77**: 513-523, 2007. doi: 10.1007/s00253-007-1209-0.
76. Hartner, F., Glieder, A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microbial Cell Factories.* **5**: 39, 2006.
77. van der Klei, I.J., Yurimoto, H., Sakai, Y., Veenhuis, M. The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* **1763**: 1453-1462, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.016>.
78. Cereghino, J.L., Cregg, J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews.* **24**: 45-66, 2000. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x.
79. Gellissen, G., Kunze, G., Gaillardin, C., Cregg, J.M., Berardi, E., Veenhuis, M., van, d.K.I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS yeast research.* **5**: 1079-96, 2005. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.06.004.
80. Mack, M., Wannemacher, M., Hobl, B., Pietschmann, P., Hock, B. Comparison of two expression platforms in respect to protein yield and quality: *Pichia pastoris* versus *Pichia angusta*. *Protein Expression and Purification.* **66**: 165-171, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2009.03.010>.

81. De Schutter, K., Lin, Y.-C., Tiels, P., Van Hecke, A., Glinka, S., Weber-Lehmann, J., Rouze, P., Van de Peer, Y., Callewaert, N. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotech.* **27**: 561-566, 2009. doi: [http://www.nature.com/nbt/journal/v27/n6/supinfo/nbt.1544\\_S1.html](http://www.nature.com/nbt/journal/v27/n6/supinfo/nbt.1544_S1.html).
82. Fickers, P. *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Current Research in Microbiology and Biotechnology. Review Article.* **2**: 354-363, 2014.
83. Puxbaum, V., Mattanovich, D., Gasser, B. Quo vadis? The challenges of recombinant protein folding and secretion in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* **99**: 2925-2938, 2015. doi: 10.1007/s00253-015-6470-z.
84. Aridor, M. Visiting the ER: The endoplasmic reticulum as a target for therapeutics in traffic related diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **59**: 759-781, 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.06.002>.
85. Daly, R., Hearn, M.T.W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition.* **18**: 119-138, 2005. doi: 10.1002/jmr.687.
86. Demain, A.L., Vaishnav, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances.* **27**: 297-306, 2009. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>.
87. Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.-G., Ilangovan, K., Suzara, V.V., Düzgüneş, N., Renugopalakrishnan, V. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **142**: 105-124, 2007.
88. Herscovics, A., Orlean, P. Glycoprotein biosynthesis in yeast. *The FASEB Journal.* **7**: 540-50, 1993.
89. Chiba, Y., Jigami, Y. Production of humanized glycoproteins in bacteria and yeasts. *Current Opinion in Chemical Biology.* **11**: 670-676, 2007. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.08.037>.
90. Kornfeld, S. Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J.* **1**: 462-468, 1987.
91. Hamilton, S.R., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., Davidson, R.C., Li, H., Mitchell, T., Nett, J.H., Rausch, S., Stadheim, T.A., Wischnewski, H., Wildt, S., Gerngross, T.U. Production of Complex Human Glycoproteins in Yeast. *Science.* **301**: 1244-1246, 2003. doi: 10.1126/science.1088166.
92. Choi, B.-K., Bobrowicz, P., Davidson, R.C., Hamilton, S.R., Kung, D.H., Li, H., Miele, R.G., Nett, J.H., Wildt, S., Gerngross, T.U. Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 5022-7, 2003
93. Hamilton, S.R., Davidson, R.C., Sethuraman, N., Nett, J.H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T.A., Li, H., Choi, B.-K., Hopkins, D., Wischnewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R.R., Hoopes, J., Wildt, S., Gerngross, T.U. Humanization of Yeast to Produce Complex Terminally Sialylated Glycoproteins. *Science.* **313**: 1441-1443, 2006. doi: 10.1126/science.1130256.
94. Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., Puxbaum, V., Sauer, M., Mattanovich, D. *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research. *Future Microbiology.* **8**: 191-208, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.12.133>.
95. Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J., Higgins, D.R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* **16**: 23-52, 2000. doi: 10.1385/MB:16:1:23.

96. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., Schwab, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **98**: 5301-5317, 2014. doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.
97. Vogl, T., Glieder, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *New Biotechnology*. **30**: 385-404, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.010>.
98. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. **22**: 249-270, 2005. doi: 10.1002/yea.1208.
99. Balamurugan, V., Reddy, G.R., Suryanarayana, V.V.S. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins—Vaccines. *Indian Journal of Biotechnology*. **6**: 175-186, 2007.
100. Potvin, G., Ahmad, A., Zhang, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochem Eng J*. **64**: 91–105, 2012.
101. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Short Protocols in Molecular Biology: A compendium of methods from Current Protocols in Molecular Biology. 4th ed, ed. J.W. Sons. 1999.
102. Ayra-Pardo, C., Martínez, G.C., De la Riva, G.A. Single-Step Screening Procedure for *Pichia pastoris* Clones by PCR. *Biotechnol. Appl*. **15**: 173-175, 1998.
103. Stratton, J., Chiruvolu, V., Meagher, M., High Cell-Density Fermentation, in *Pichia Protocols*, D.R. Higgins and J.M. Cregg, Editors. Humana Press: Totowa, New Jersey. 107-120. 1998.
104. Sinha J, Plantz BA, Inan M, Meagher, M. Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-tau. *Biotechnol Bioeng*. **89**: 102-12, 2005.
105. Gaitan, I.J., Medina, S.C., González, J.C., Rodríguez, A., Espejo, Á.J., Osmá, J.F., Sarria, V., Alméciga-Díaz, C.J., Sánchez, O.F. Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the laccase produced by *Trametes pubescens*. *Bioresource Technology*. **102**: 3632-3635, 2011.
106. Córdoba-Ruiz, H.A., Poutou-Piñales, R.A., Echeverri-Peña, O.Y., Algecira-Enciso, N.A., Landázuri, P., Sáenz, H., Barrera-Avellaneda, L.A. Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol*. **8**: 1786-1792, 2009.
107. Shapira, E., Blitzer, M.G., Miller, J.B., Africk, D.K., Biochemical Genetics. A Laboratory Manual, ed. N.Y.O.U. Press. New York Oxford. 1989.
108. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685, 1970.
109. Mozdzanowsky, J., Hembach, P., Speicher, D.W. High yield electroblotting onto polyvinylidene difluoride membranes from polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. **13**: 59-64, 1992.
110. Edman, P. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chem. Scand*. **4**: 283-293, 1950.
111. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V., Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. **1**: 2856 - 2860, 2006.
112. Mosquera, A., Rodríguez, A., Soto, C., Leonardi, F., Espejo, A., Sánchez, O.F., Alméciga-Díaz, C.J., Barrera, L.A. Characterization of a recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *E. coli* for enzyme replacement therapy of Morquio A disease. *Process Biochem*. **47**: 2097-2102, 2012.

113. Dvorak-Ewell, M., Wendt, D., Hague, C., Christianson, T., Koppaka, V., Crippen, D., Kakkis, E., Vellard, M. Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA In-vitro and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. *PLoS ONE*. **5**: e12194, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0012194.
114. Cregg, J., Tschopp, J., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W., Buckholz, R., Madden, K., Kellaris, P., Davis, G., Smiley, B., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G., Thill, G. High-Level Expression and Efficient Assembly of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. *Nat. Biotechnol.* **5**: 479-485, 1987.
115. Trentmann, O., Khatri, N.K., Hoffmann, F. Reduced Oxygen Supply Increases Process Stability and Product Yield with Recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog.* **20** 1766-1775, 2004.
116. Rodríguez-López, A., Díaz, D., Beltrán, L., Sánchez, J., Moreno, J., Díaz, S., Pimentel, N., Mosquera, A., Soto, C., Pardo, A., Velásquez, O., Hernández, A., Leonardi, F., Espejo, A., Córdoba, H., Sánchez, O., **Alméciga-Díaz, C.**, Barrera, L. Production of active recombinant Human sulfatases Iduronate-2-sulfate and N-acetylgalactosamine-6-sulfate in microorganisms. *J Inborn Errors Metab Screening.* **2**: 76, 2014.
117. Tallman, J.F., Brady, R.O., Quirk, J.M., Villalba, M., Gal, A.E. Isolation and Relationship of Human Hexosaminidases. *J Biol Chem.* **249**: 3489-399, 1974.
118. McCurdy, V.J., Rockwell, H.E., Arthur, J.R., Bradbury, A.M., Johnson, A.K., Randle, A.N., Brunson, B.L., Hwang, M., Gray-Edwards, H.L., Morrison, N.E., Johnson, J.A., Baker, H.J., Cox, N.R., Seyfried, T.N., Sena-Esteves, M., Martin, D.R. Widespread correction of central nervous system disease after intracranial gene therapy in a feline model of Sandhoff disease. *Gene Therapy.* **22**: 181-189, 2015.
119. Bradbury, A.M., Cochran, J.N., McCurdy, V.J., Johnson, A.K., Brunson, B.L., Gray-Edwards, H., Leroy, S.G., Hwang, M., Randle, A.N., Jackson, L.S., Morrison, N.E., Baek, R.C., Seyfried, T.N., Cheng, S.H., Cox, N.R., Baker, H.J., Cachón-González, M.B., Cox, T.M., Sena-Esteves, M., Martin, D.R. Therapeutic Response in Feline Sandhoff Disease Despite Immunity to Intracranial Gene Therapy. *Molecular Therapy.* **21**: 1306-1315, 2013.
120. Okochi T, Seike H, Higashino K, Hada T, Watanabe S, Yamamura Y, Ito F, Matsuda M, Osafune M, Kotake T.T., S. Alteration of hexosaminidase isozymes in human renal carcinoma. *Cancer Res.* **39**: 1829-34, 1979.
121. Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C., Metabolic disorders in sphingolipidoses, in *Biochemistry of brain*, S. Kumar, Editor.: Pergamosn 2- 47. 1980.
122. Gonzalez, J.C., Medina, S.C., Rodriguez, A., Osma, J.F., Alméciga-Díaz, C.J., Sánchez Oscar F. Production of *Trametes pubescens* Laccase under Submerged and Semi-Solid Culture Conditions on Agro-Industrial Wastes. *PLoS ONE*. **8**: e73721, 2013.
123. Braulke, T., Bonifacino, J.S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1793**: 605-14, 2009. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.016.
124. Coutinho, M.F., Prata, M.J., Alves, S. A shortcut to the lysosome: The mannose-6-phosphate-independent pathway. Minireview. *Mol Genet Metab.* **107**: 257-266, 2012.
125. Ohsawa, M., Kotani, M., Tajima, Y., Tsuji, D., Ishibashi, Y., Kuroki, A., Itoh, K., Watabe, K., Sango, K., Yamanaka, S., Sakuraba, H. Establishment of immortalized Schwann cells from Sandhoff mice and corrective effect of recombinant human beta-hexosaminidase A on the accumulated GM2 ganglioside. *J Hum Genet.* **50**: 460-7, 2005. doi: 10.1007/s10038-005-0278-0.
126. Tiels, P., Baranova, E., Piens, K., De Visscher, C., Pynaert, G., Nerinckx, W., Stout, J., Fudalej, F., Hulpiau, P., Tännler, S., Geysens, S., Van Hecke, A., Valevska, A., Vervecken, W., Remaut, H., Callewaert, N. A bacterial glycosidase enables mannose-6-phosphate

- modification and improved cellular uptake of yeast-produced recombinant human lysosomal enzymes. *Nat Biotechnol.* **30**: 1225-1231, 2012.
127. Chiba, Y., Sakuraba, H., Kotani, M., Kase, R., Kobayashi, K., Takeuchi, M., Ogasawara, S., Maruyama, Y., Nakajima, T., Takaoka, Y., Jigami, Y. Production in yeast of alpha-galactosidase A, a lysosomal enzyme applicable to enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Glycobiology.* **12**: 821-8, 2002.
128. Jiao, C.-Y., Delaroche, D., Burlina, F., Alves, I.D., Chassaing, G., Sagan, S. Translocation and Endocytosis for Cell-penetrating Peptide Internalization. *J. Biol. Chem.* **284**: 33957-33965, 2009.
129. Rodríguez-López, A., Alméciga-Díaz, C.J., Sánchez, J., Moreno, J., Beltran, L., Díaz, D., Pardo, A., Ramírez, A.M., Espejo-Mojica, A.J., Pimentel, L., Barrera, L.A. Recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Scientific Reports.* **6**: 1-13, 2016. doi: 10.1038/srep29329.
130. Du, H., Levine, M., Ganesa, C., Witte, D.P., Cole, E.S., Grabowski, G.A. The role of mannosylated enzyme and the mannose receptor in enzyme replacement therapy. *Am J Hum Genet.* **77**: 1061-74, 2005. doi: 10.1086/498652.
131. Almeciga, C.J., Rodríguez-López, A., Sánchez, J., Moreno, J., Diaz, D., Beltran, L.M., Espejo, A.J., Ruiz, F.O., Barrera, L.A. Production of an active recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase enzyme in *Pichia pastoris*. *Mol Genet Metab.* **111**: S19, 2014.
132. Chen, Y., Jin, M., Egborge, T., Coppola, G., Andre, J., Calhoun, D.H. Expression and characterization of glycosylated and catalytically active recombinant human alpha-galactosidase A produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* **20**: 472-84, 2000. doi: 10.1006/prev.2000.1325.
133. Du, H., Schiavi, S., Levine, M., Mishra, J., Heur, M., Grabowski, G.A. Enzyme therapy for lysosomal acid lipase deficiency in the mouse. *Hum Mol Genet.* **10**: 1639-48, 2001.
134. Laukens, B., De Visscher, C., Callewaert, N. Engineering yeast for producing human glycoproteins: where are we now? *Future Microbiology.* **10**: 21-34, 2015.
135. Tomatsu, S., Sawamoto, K., Alméciga-Díaz, C.J., Shimada, T., Bober, M.B., Chinen, Y., Yabe, H., Montañó, A.M., Giugliani, R., Kubaski, F., Yasuda, E., Rodríguez-López, A., Espejo-Mojica, A.J., Sánchez, O.F., Mason, R.W., Barrera, L.A., Mackenzie, W.G., Orii, T. Impact of enzyme replacement therapy and hematopoietic stem cell transplantation in patients with Morquio A syndrome. *Drug Design, Development and Therapy.* **9**: 1937-1953, 2015. doi: dx.doi.org/10.2147/DDDT.S68562.

## 9. ANEXO

### 9.1. Análisis estadístico rhHex-A:

ANOVA para comparar tratamientos:

#### Descriptives

Actividad esp

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					rh Hex A	2		
M-6-P	3	58,8967	3,46500	2,00052	50,2891	67,5042	55,43	62,36
Manosa	3	45,6867	2,31500	1,33657	39,9359	51,4374	43,37	48,00
Control	3	59,7100	1,43252	,82706	56,1514	63,2686	58,52	61,30
Total	11	72,9255	40,91907	12,33756	45,4356	100,4153	43,37	156,50

#### Test of Homogeneity of Variances

Actividad esp

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
,467	3	7	,714

#### ANOVA

Actividad esp

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16698,023	3	5566,008	852,932	,000
Within Groups	45,680	7	6,526		
Total	16743,703	10			

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Actividad\_esp

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	rh Hex A	M-6-P	95,75333*	2,33198	,000	88,0341	103,4726
		... Manosa	108,96333*	2,33198	,000	101,2441	116,6826
		Control	94,94000*	2,33198	,000	87,2208	102,6592
	M-6-P	rh Hex A	-95,75333*	2,33198	,000	-103,4726	-88,0341
		... Manosa	13,21000*	2,08578	,002	6,3057	20,1143
		Control	-,81333	2,08578	,978	-7,7176	6,0909
	Manosa	rh Hex A	-108,96333*	2,33198	,000	-116,6826	-101,2441
		... M-6-P	-13,21000*	2,08578	,002	-20,1143	-6,3057
		Control	-14,02333*	2,08578	,001	-20,9276	-7,1191
	Control	rh Hex A	-94,94000*	2,33198	,000	-102,6592	-87,2208
		... M-6-P	,81333	2,08578	,978	-6,0909	7,7176
		Manosa	14,02333*	2,08578	,001	7,1191	20,9276
Dunnnett t (2-sided) <sup>a</sup>	rh Hex A	Control	94,94000*	2,33198	,000	87,9847	101,8953
	... M-6-P	Control	-,81333	2,08578	,961	-7,0344	5,4077
	Manosa	Control	-14,02333*	2,08578	,001	-20,2444	-7,8023

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

a. Dunnnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.

### Actividad\_esp

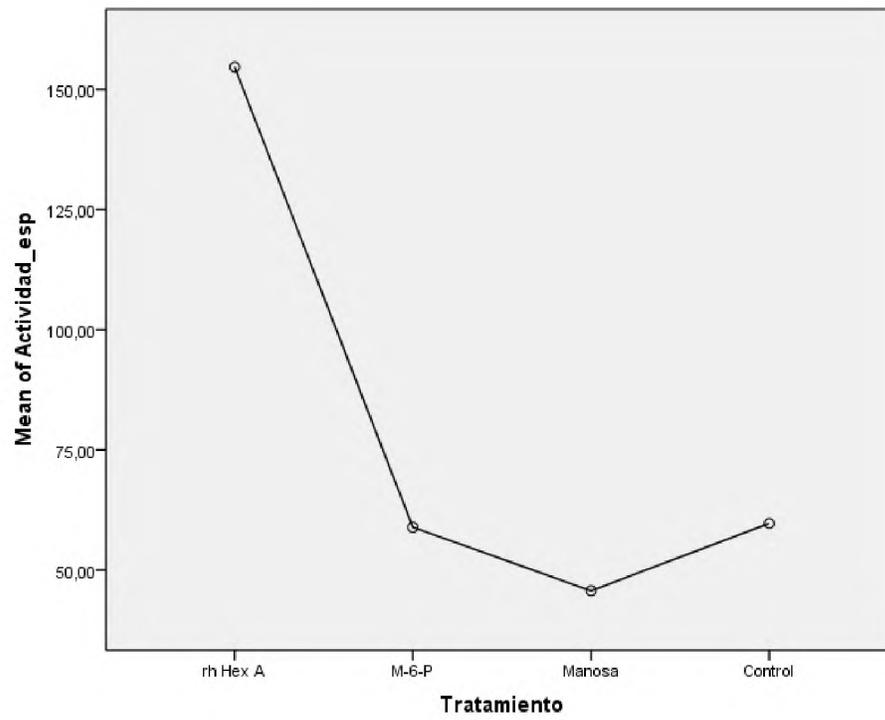
Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Tukey HSD <sup>a,b</sup>	Manosa	3	45,6867	
	M-6-P	3		58,8967
	... Control	3		59,7100
	rh Hex A	2		154,6500
	Sig.		1,000	,982

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,667.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Plot de medias



## 9.2. Análisis estadístico rhHex-B:

ANOVA para comparar tratamientos:

### Descriptives

Actividad esp

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					rh Hex B	3		
Manosa	3	850,5167	142,92626	82,51851	495,4682	1205,5652	691,80	969,05
M-6-P	3	1155,4100	70,65766	40,79422	979,8866	1330,9334	1099,55	1234,84
Control	3	1143,7433	92,40044	53,34742	914,2079	1373,2787	1070,33	1247,50
Total	12	1158,8708	248,08321	71,61545	1001,2463	1316,4954	691,80	1518,61

### Test of Homogeneity of Variances

Actividad esp

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,266	3	8	,158

### ANOVA

Actividad esp

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	606643,527	3	202214,509	22,994	,000
Within Groups	70354,540	8	8794,318		
Total	676998,067	11			

### Multiple Comparisons

Dependent Variable:Actividad esp

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	rh Hex B	Manosa	635,29667*	76,56943	,000	390,0944	880,4990
		M-6-P	330,40333*	76,56943	,011	85,2010	575,6056
		Control	342,07000*	76,56943	,009	96,8677	587,2723
	Manosa	rh Hex B	-635,29667*	76,56943	,000	-880,4990	-390,0944
		M-6-P	-304,89333*	76,56943	,017	-550,0956	-59,6910
		Control	-293,22667*	76,56943	,021	-538,4290	-48,0244
	M-6-P	rh Hex B	-330,40333*	76,56943	,011	-575,6056	-85,2010
		Manosa	304,89333*	76,56943	,017	59,6910	550,0956
		Control	11,66667	76,56943	,999	-233,5356	256,8690
	Control	rh Hex B	-342,07000*	76,56943	,009	-587,2723	-96,8677
		Manosa	293,22667*	76,56943	,021	48,0244	538,4290
		M-6-P	-11,66667	76,56943	,999	-256,8690	233,5356
Dunnett t (2-sided) <sup>a</sup>	rh Hex B	Control	342,07000*	76,56943	,005	121,5759	562,5641
	Manosa	Control	-293,22667*	76,56943	,013	-513,7207	-72,7326
	M-6-P	Control	11,66667	76,56943	,997	-208,8274	232,1607

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

a. Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.

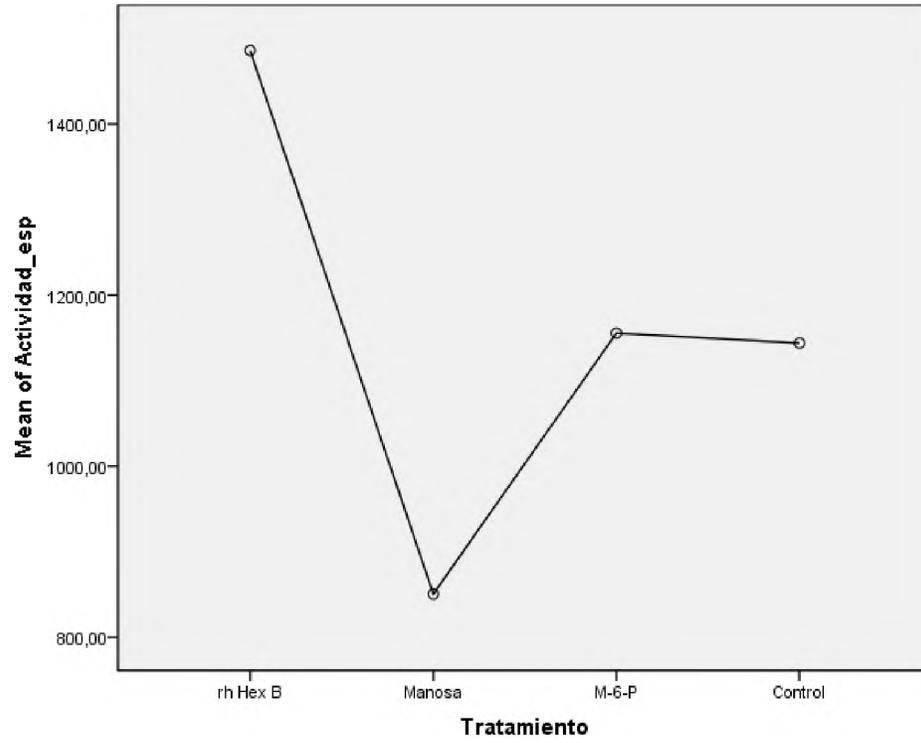
**Actividad esp**

Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	
Tukey HSD <sup>a</sup>	Manosa	3	850,5167		
	Control	3		1143,7433	
	M-6-P	3		1155,4100	
	rh Hex B	3			1485,8133
	Sig.		1,000	,999	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Plot de medias



### 9.3. Análisis estadístico rhHex-S:

ANOVA para comparar tratamientos:

#### Descriptives

Actividad esp

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					rh Hex_S	3		
M-6-P	3	1131,2433	204,63350	118,14520	622,9055	1639,5811	955,26	1355,79
Manosa	3	1084,4000	146,60624	84,64315	720,2099	1448,5901	941,28	1234,26
Control	3	1143,7433	92,40044	53,34742	914,2079	1373,2787	1070,33	1247,50
Total	12	1324,0725	412,00051	118,93430	1062,2999	1585,8451	941,28	2290,05

#### Test of Homogeneity of Variances

Actividad esp

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,557	3	8	,274

#### ANOVA

Actividad esp

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1508118,700	3	502706,233	11,200	,003
Within Groups	359069,928	8	44883,741		
Total	1867188,629	11			

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable:Actividad esp

	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	rh Hex_S	M-6-P	805,66000*	172,98120	,007	251,7133	1359,6067
		... Manosa	852,50333*	172,98120	,005	298,5567	1406,4500
		Control	793,16000*	172,98120	,008	239,2133	1347,1067
	M-6-P	rh Hex_S	-805,66000*	172,98120	,007	-1359,6067	-251,7133
		... Manosa	46,84333	172,98120	,993	-507,1033	600,7900
		Control	-12,50000	172,98120	1,000	-566,4467	541,4467
	Manosa	rh Hex_S	-852,50333*	172,98120	,005	-1406,4500	-298,5567
		... M-6-P	-46,84333	172,98120	,993	-600,7900	507,1033
		Control	-59,34333	172,98120	,985	-613,2900	494,6033
	Control	rh Hex_S	-793,16000*	172,98120	,008	-1347,1067	-239,2133
		... M-6-P	12,50000	172,98120	1,000	-541,4467	566,4467
		Manosa	59,34333	172,98120	,985	-494,6033	613,2900
Dunnnett t (2- sided) <sup>a</sup>	rh Hex_S	Control	793,16000*	172,98120	,005	295,0327	1291,2873
	... M-6-P	Control	-12,50000	172,98120	1,000	-510,6273	485,6273
	Manosa	Control	-59,34333	172,98120	,972	-557,4706	438,7840

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

a. Dunnnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.

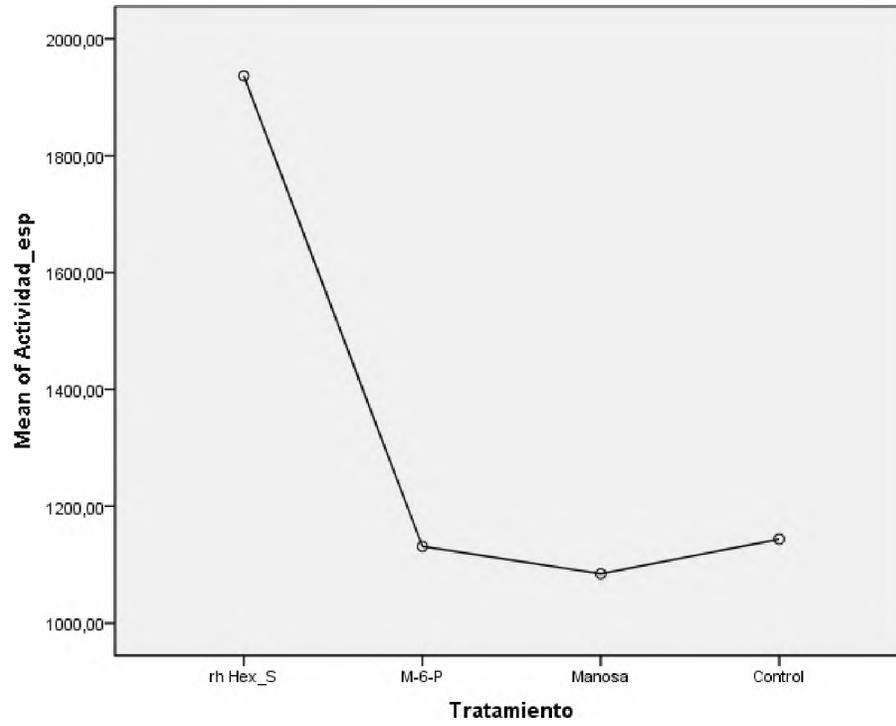
#### Actividad esp

	Tratamiento	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD <sup>a</sup>	Manosa	3	1084,4000	
	M-6-P	3	1131,2433	
	... Control	3	1143,7433	
	rh Hex_S	3		1936,9033
	Sig.			,985

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Plot de medias



## 10.PRODUCTOS ACADÉMICOS GENERADOS DURANTE LA FORMACIÓN DOCTORAL

### 10.1. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS ORIGINALES

- Rodríguez-López, A., Alméciga-Díaz, C.J., Sánchez, J., Moreno, J., Beltran, L., Díaz, D., Pardo, A., Ramírez, A.M., **Espejo-Mojica, A.J.**, Pimentel, L., Barrera, L.A. 2016. Recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*. **6**: 1-13.
- **Espejo-Mojica Angela J.** Mosquera Angela Rodríguez-López Alexander Díaz Dennis Beltrán, Laura Hernandez Liliana Alméciga-Díaz Carlos J Barrera Luis A. 2016. Characterization of recombinant human lysosomal beta-hexosaminidases produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **En proceso de publicación**
- **Espejo-Mojica AJ**, Alméciga-Díaz CJ, Rodríguez A, Mosquera Á, Díaz D, Beltrán L, Díaz S, Pimentel N, Moreno J, Sánchez J, Sánchez OF, Córdoba H, Poutou-Piñales RA, Barrera LA. 2015. Human recombinant lysosomal enzymes produced in microorganisms. *Mol Genet Metab*. 116(1-2):13-23.
- Tomatsu S, Sawamoto K, Alméciga-Díaz CJ, Shimada T, Bober M, Chinen Y, Yabe H, Montaña A, Giugliani R, Kubaski F, Yasuda E, Rodríguez-López A, **Espejo-Mojica A**, Sánchez O, Mason R, Barrera LA, Mackenzie W, Orie T. 2015. Impact of Enzyme Replacement Therapy and Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Morquio A Syndrome. 2015. *Drug Design, Development and Therapy* 9:1937–1953
- Mosquera A, Rodríguez A, Vargas C, Leonardi F, **Espejo A**, Sánchez OF\*, Alméciga-Díaz CJ\*, Barrera L. 2012. Characterization of a recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *E. coli* for enzyme replacement therapy of Morquio A disease. *Process Biochem*. 47(12): 2097–2102.
- Gaitán, IJ., Medina, S., Gonzáles, JC., Rodríguez, A., **Espejo, AJ.**, Osma, J., Sarria, V., Alméciga-Díaz, CJ\*, Sánchez, OF.\* 2011. Evaluation of Toxicity and Degradation of a Chlorophenol mixture by the Laccase produced by *Trametes pubescens*. *Bioresour Technol*. 102 (3): 3632-3635
- **Espejo, A.**, Malaver, LF., Rodríguez, A., Cuaspa, R., Alméciga-Díaz, CJ\*, Barrera LA\*. 2010 Recent Patents in Diagnosis and Treatment for Inborn Errors of Metabolism. *Recent Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*. 4(2): 111-130.

## 10.2. PRESENTACIONES EN CONGRESOS

- Espejo-Mojica Angela J., Ramírez Aura, Beltrán Laura, Rodríguez-López Alexander, Díaz Dennis, Mosquera Angela, Alméciga-Díaz Carlos J.\*, Luis A. Barrera1\*. *In Vitro* Uptake and kinetic characterization of Recombinant human beta-hexosaminidases. X Latin American Congress of Inborn Errors of Metabolism and Neonatal Screening. Noviembre 17-20, 2015. Santiago, Chile. Presentación Oral.
- Espejo-Mojica Ángela J., Alméciga-Díaz Carlos J.\*, Rodríguez Alexander, Mosquera Ángela, Díaz Dennis, Beltrán Laura, Díaz Sergio, Pimentel Natalia, Moreno Jefferson, Sánchez Jhonnathan, Sánchez Oscar F., Córdoba Henry, Poutou-Piñales Raúl A., Barrera Luis. 2015. Expresión de proteínas humanas recombinantes en microorganismos como plataforma para la producción de agentes terapéutico. XIII Congreso de la Investigación en la Pontificia Universidad Javeriana. Septiembre 22 y 25. Bogotá D.C. Presentación Oral.
- Espejo-Mojica A, Mosquera-Arévalo A, Rodríguez-López A, Alméciga-Díaz CJ, Barrera LA. 2014. Human lysosomal  $\beta$ -N-acetylglucosaminidases produced in *Pichia pastoris* GS115: a feasible source for enzyme replacement therapy. 10th Annual Lysosomal Disease Network's WORLD Symposium. February 11 – 13, San Diego, CA, USA. Mol Gen Metab, 112(2) S42. Póster.
- Espejo Mojica Angela, Mosquera Arévalo Angela, Díaz Sergio, Díaz Dennis, Rodríguez López Edwin Alexander, Alméciga Díaz Carlos Javier, Barrera Avellaneda Luis Alejandro. Recombinant production of human lysosomal B-hexosaminidases using two strains of *Pichia* sp. as an expression system. IX Congreso Latinoamericano de Errores Innatos del Metabolismo y Pesquisa Neonatal. Medellín, Colombia. Diciembre 1-4 2013.
- Angela Johana Espejo Mojica. Angela Rocío Mosquera Arévalo. Edwin Alexander Rodríguez López. Carlos Javier Alméciga Díaz. Luis Alejandro Barrera Avellaneda. Producción recombinante de  $\beta$ -hexosaminidasas lisosomales humanas usando *Pichia pastoris* como sistema de expresión. V Congreso Internacional de Microbiología en la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C. Mayo 7 -10 de 2013

- Espejo-Mojica A, Mosquera A, Díaz S, Rodríguez A, Alméciga-Díaz CJ, Barrera L. 2013. Production of human recombinant alpha-N-acetylglucosaminidase enzymes in two *Pichia pastoris* strains. 9th Annual Lysosomal Disease Network's WORLD Symposium. February 12 – 15, Orlando, FL, USA. Poster. Mol Gen Metab, 108(2) S38-39.