

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PRODUCCIÓN DE IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA (IDS) EN DOS CEPAS DE *Pichiapastoris*BAJO CONDICIONES LIMITADAS DE OXÍGENO Y SUSTRATO.

LUISA NATALIA PIMENTEL VERA

**TRABAJO DE GRADO
PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE:**

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

Línea de investigación:

**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES COMO MODELOS DE
TERAPIA DE REEMPLAZO ENZIMÁTICO**

Grupo de investigación:

INSTITUTO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO (IEIM)

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL
BOGOTÁ D.C.
MAYO 2013**

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PRODUCCIÓN DE IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA (IDS) EN DOS CEPAS DE *Pichiapastoris*BAJO CONDICIONES LIMITADAS DE OXÍGENO Y SUSTRATO.

LUISA NATALIA PIMENTEL VERA

APROBADO

INGRID SCHULER Ph.D.
Decana académica Facultad de Ciencias

JANETH ARIAS M.Sc.
Directora carrera Microbiología Industrial

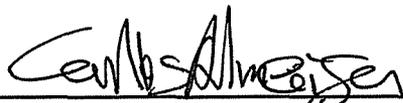
EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE PRODUCCIÓN DE IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA (IDS) EN DOS CEPAS DE *Pichia pastoris* BAJO CONDICIONES LIMITADAS DE OXIGENO Y SUSTRATO.

LUISA NATALIA PIMENTEL VERA

APROBADO



ALEXANDER RODRIGUEZ LOPEZ L. Q.
Director



CARLOS JAVIER ALMECIGA-DÍAZ QF. Ph.D.
Director



RAUL ALBERTO POUTOU PIÑALES. Ph D.
Evaluador

NOTA DE ADVERTENCIA

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

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones recibidas, a mis padres German y Fabiola por el apoyo y el amor que me han brindado en todo momento. Y por permitirme estar aquí cumpliendo mis sueños.

Al Dr. Luis Alejandro Barrera al permitirme ser parte del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo

A mis directores Javier Alméciga QF.Ph.D y Alexander Rodríguez L. Q. Por todas las cosas que lograron enseñarme durante este proceso, además de su compañía, paciencia y ayuda durante mi estadía en el IEIM.

A Angelita, joko, Dennis y a todos los compañeros del IEIM por la colaboración, y los ratos agradables compartidos, en especial a Jhonny quien confió en mi desde el primer momento hasta el día de hoy y en quien encontré el mejor compañero y amigo que pude haber tenido a lo largo de este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO	10
1. MARCO TEORICO	12
1.1 Mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o síndrome de Hunter	12
1.2 Expresión de proteínas recombinantes en <i>Pichiapastoris</i>	12
1.3 Optimización del gen	15
2. OBJETIVO GENERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
3. METODOLOGIA	17
3.1 Clones de <i>Pichiapastoris</i>	17
3.2 Determinación fenotípica de los clones	17
3.2.1 Medio solido	17
3.2.2 PCR	17
3.3 Evaluación de expresión de IDS en clones <i>IDS_{nat}</i> e <i>IDS_{opt}</i> a escala de 100mL	19
3.4 Evaluación de expresión de IDS a escala de bioreactor empleando estrategias de cultivo limitadas por oxígeno y sustrato	19
4. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE EXPRESIÓN DE CLONES <i>P.PASTORIS</i> <i>IDS_{NAT}</i> E <i>IDS_{OPT}</i> A DIFERENTES ESCALAS	21
4.1 Determinación de biomasa	21
4.2 Determinación de proteínas extracelulares	21
4.3 Determinación de actividad específica y volumétrica de IDS	21
4.4 Determinación de tasa de crecimiento y de tasa de producción	22
4.5 Determinación de los rendimientos biomasa/producto, actividad específica/biomasa, biomasa/sustrato y producto/sustrato	23
4.6 Determinación de las productividades de biomasa y de proteína	23
4.7 Determinación de proteasas	23

5. RESULTADOS23

5.1 Confirmación del fenotipo de los clones de *P.pastoris*IDS_{nate} IDS_{opt}24

5.2 Evaluación de la producción IDS en los clones de *P.pastoris* CON IDS_{nato}IDS_{opta} escala de 100mL25

5.3 Evaluación de la producción IDS en los clones de *P.pastoris*con IDS_{nato}IDS_{opta} escala a escala de 1,65L27

6. DISCUSION34

7. CONCLUSIONES39

8. RECOMENDACIONES40

REFERENCIAS41

ANEXOS45

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1.** Componentes de la PCR para la confirmación del fenotipo**18**
- Tabla 2.** Condiciones de la PCR para la confirmación del fenotipo**18**
- Figura 1** Fenotipificación por medio solido **24**
- Figura 2.** Identificación de fenotipo para clones de *IDSnat*/*IDSopt* mediante PCR. Electroforesis en gel de agarosa. **25**
- Figura 3.** Seguimiento de los cultivos a escala de 100 mL para los clones de *P. pastoris* GS115 con *IDSnat* (A) o *IDSopt*(B).**26**
- Figura 4.** Cultivo a 1,65L de *IDSnat* limitado por oxígeno y sustrato.**28**
- Figura 5.** Cultivo a 1,65L de *IDSopt* limitado por oxígeno y sustrato. **30**
- Figura 6.** Tasas de crecimiento (h^{-1}) ytasas de producción (mg prot/g biom) de los diferentes cultivos realizados a 1,65L.**31**
- Figura 7.**Rendimiento Biomasa/ sustrato (X/S);Rendimiento Producto/sustrato (P/S) yRendimiento Actividad específica/g biomasa de los diferentes cultivos realizados a 1,65L**32**
- Figura 8.** Productividad de la biomasa y productividad de la proteína en los diferentes cultivos realizados a 1,65 L.**33**
- Figura 9**Unidades proteolíticas (UP/L) vs Biomasa (g/L)**34**

RESUMEN

Debido a que la terapia de remplazo enzimático es una estrategia prometedora en el ámbito de tratamientos para los errores innatos del metabolismo, se han estudiado las mejores estrategias para la producción de proteínas heterólogas, utilizando diversos sistemas de expresión como lo son las bacterias, levaduras y células de animales o plantas. En el caso de las levaduras una de las más empleadas ha sido *Pichiapastoris*, la cual ha mostrado grandes ventajas frente a los demás sistemas en cuanto a su productividad. Sin embargo, factores relacionados con las condiciones de cultivo y el empleo de secuencias génicas optimizadas tienen efectos importantes sobre la producción de la enzima recombinante. En este sentido, en el presente proyecto se caracterizaron los niveles de producción de la enzima iduronato 2-sulfato sulfatasa humana recombinante (IDS) producida en *P. pastoris* GS115, bajo condiciones limitadas de oxígeno y sustrato, empleando tanto un gen nativo como optimizado. Los resultados obtenidos en el presente trabajo constituyen información importante en el desarrollo de una terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Hunter.

JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO

La Mucopolisacaridosis II (MPSII o enfermedad de Hunter) pertenece a un grupo de trastornos de almacenamiento lisosomal conocidos como mucopolisacaridosis, los cuales se caracterizan por la alteración en el catabolismo lisosomal de los glicosaminoglicanos (GAG) (1,2). Para el caso específico de la MPS II esta es causada por la deficiencia de una de las enzimas encargadas de la degradación de los GAG heparán y dermatán sulfato (1,2). La enzima deficiente en los pacientes con MPS II es la iduronato 2 sulfato sulfatasa (IDS), cuya herencia es ligada al cromosoma X (3). Actualmente, la terapia de reemplazo enzimático (TRE) se ha utilizado para el tratamiento de pacientes con MPS II, empleando una proteína recombinante producida en células de mamífero (4). Sin embargo, aún es necesario continuar con la búsqueda de alternativas para la producción de esta proteína recombinante, debido a los altos costos e inconvenientes asociados con la producción en células de mamífero.

En el IEIM durante los últimos años se ha trabajado en la producción de las sulfatasas IDS y N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa humana recombinante en *Escherichiacoliy Pichiapastoris*(1,5). *P.pastoris* presenta ventajas importantes como sistema de expresión de proteínas recombinantes tales como la fácil manipulación a nivel molecular, altos niveles de expresión de proteínas extracelulares y la realización de modificaciones postraduccionales propias de organismos eucariotas superiores como glicosilación y formación de puentes disulfuro, entre otras (6).

A pesar de que los resultados han mostrado la posibilidad de producir la proteína humana recombinante IDS en *Pichiapastoris*, aún es necesario continuar evaluando las condiciones necesarias para obtener los niveles de enzima necesarios con miras a su uso en TRE. La producción de una proteína recombinante en *P. pastoris* se ve afectada por las condiciones de cultivo tales como la concentración del sustrato, oxígeno disuelto y la agitación, entre otras (7). Adicionalmente, el empleo de genes optimizados en cuanto al uso de codones y la

presencia de secuencias que puedan tener un efecto negativo sobre la síntesis de la proteína recombinante, como el no poseer RNAs de transferencia que reconozcan dichas secuencias, es otro factor a considerar durante la producción de estas proteínas en *P. pastoris* (8). Para el caso específico de IDS el efecto de su producción en *P. pastoris* bajo condiciones limitadas de oxígeno y sustrato (metanol), así como del uso de un gen optimizado no han sido aún evaluados. Por tanto este proyecto evaluó el uso de estrategias de cultivo limitadas por oxígeno y sustrato, así como el uso de un gen optimizado *en comparación con* uno nativo y su efecto en la producción de la enzima humana recombinante IDS en el sistema *P. pastoris* GS115, como un paso preliminar para el desarrollo de una TRE para la enfermedad de Hunter.

1. MARCO TEORICO

1.1 MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO II (MPS II) O SINDROME DE HUNTER

La MPS II es una enfermedad causada por la deficiencia de la enzima lisosomal iduronato-2-sulfato sulfatasa (IDS). Esta enzima es la encargada de catalizar la degradación de los GAG dermatán y heparán sulfato, lo cual resulta en la acumulación lisosomal de estos sustratos sin degradar en las células de los órganos y tejidos (1,2,3). La pérdida de la funcionalidad de la IDS es consecuencia de mutaciones en el gen, localizado en el cromosoma Xq28, que codifica para esta enzima, (1,2).

Los pacientes con la enfermedad de Hunter presentan una afección multisistémica, con características clínicas que incluyen problemas esqueléticos, estatura baja, engrosamiento de los rasgos faciales, anomalías articulares y óseas, problemas en el sistema respiratorio y cardiaco, y en algunos casos compromiso neurológico, con alteraciones en el comportamiento y retraso mental. Actualmente, la terapia de reemplazo de enzimas (ERT) se ha utilizado para el tratamiento de pacientes con MPS II (4), y para estudios funcionales y estructurales es necesario grandes cantidades de esta. Por esto fue necesario expresar esta enzima en un sistema adecuado como la levadura metilotrófica *P.pastoris*, que con sus características se convierte en un sistema promisorio de expresión de proteínas recombinantes humanas(9).

1.2 EXPRESION DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN *Pichiapastoris*

Pichiapastoris se ha convertido en una de las levaduras más estudiadas por ser uno de los sistemas más útiles para la expresión de proteínas heterólogas (10). Este sistema es de particular interés industrial debido a su capacidad para secretar proteínas, para llevar a cabo modificaciones postraduccionales, incluyendo glicosilación y formación de enlaces disulfuro; su capacidad de crecer a altas densidades celulares en medios definidos y su fuerte preferencia por el metabolismo respiratorio que por uno fermentativo, además de poseer un genoma

conocido y relativamente sencillo de manipular (10). Más de 500 proteínas recombinantes se han expresado en *P. pastoris* con niveles de expresión de hasta el 80% de proteína secretada (10).

Un gran número de proteínas heterólogas se han producido en la levadura metilotrófica *Pichiapastoris* usando el promotor del gen que codifica para la enzima alcohol oxidasa (AOX), inducible por metanol y encargada de permitirle a la célula asimilar el metanol como fuente de carbono (11, 13). *P. pastoris* cuenta con dos copias del gen de la enzima AOX, designados como AOX1 y AOX2 (13). El promotor AOX1 regula el 85% de la producción de la alcohol oxidasa mientras que el promotor AOX2 es menos activo (14,7). El sistema de expresión de *P. pastoris* hace uso de estos dos promotores para regular la expresión de proteínas heterólogas utilizando el metanol como inductor (13,7). Durante la recombinación genética, que sucede al incorporar un casete de expresión que contiene el transgen dentro del genoma de la levadura se pueden generar tres fenotipos diferentes dependiendo del locus de inserción: i) el que es capaz de utilizar rápidamente y en grandes cantidades el metanol (Mut^+), ii) el que lo utiliza lentamente (Mut^S) y iii) aquel que no utiliza el metanol como fuente de carbono (Mut^-) (7,10).

Las condiciones de cultivo y la fisiología de la levadura tienen un impacto importante en los rendimientos finales y productividad de la proteína heterólogas. Varios estudios han mostrado que las variaciones en la concentración del metanol influyen drásticamente en el consumo y las tasas de producción (11). Dado que el metanol es altamente tóxico para la célula, es necesario mantenerlo en concentraciones bajas, alrededor de 0,5% v/v, para alcanzar un alto rendimiento de biomasa y producción de proteína (12).

Debido a que el metanol, como inductor de la expresión del transgen es un sustrato con alta demanda de oxígeno, el consumo elevado de oxígeno en cultivos de *P. pastoris* provoca problemas en su transferencia (16), por lo que condiciones limitaciones de oxígeno puede afectar de forma negativamente la expresión de la proteína (7). Sin embargo, se han encontrado que es posible obtener elevados

niveles de producción de proteínas recombinantes tanto en condiciones elevadas de oxígeno disuelto como bajo condiciones limitadas de oxígeno (17). Adicionalmente un cultivo bajo condiciones limitadas de oxígeno puede aumentar la pureza de la proteína de interés con relación a la cantidad de proteína total liberada al medio en comparación (17). Por otro lado en cultivos donde se mantiene la concentración de metanol limitada, se puede mantener una tasa de crecimiento específico constante (18). Como en este caso la concentración de metanol residual en el medio es cercana a cero durante la fase de inducción, se pueden reducir al mínimo las desviaciones en la tasa de alimentación de este y también reducir algunas otras complicaciones que se deriven de la acumulación excesiva del metanol; la principal ventaja de este aspecto es que al mantener una tasa de crecimiento constante, mejora la reproducibilidad del proceso (18).

El fenotipo Mut^S suele ser el más utilizado para la producción de proteínas recombinantes ya que con él se reducen los problemas operativos, observados en cepas Mut⁺ con respecto a los requerimientos mayores de metanol y oxígeno disuelto (7). Adicionalmente, las cepas con fenotipo Mut^S alcanzan mayores niveles de expresión de la proteína que los observados con cepas Mut⁺ (16), y son menos sensibles que las cepas Mut⁺ a concentraciones de metanol (7). Sin embargo, las cepas Mut^S presentan tiempos de prolongados de inducción para lograr el máximo de producción y bajas tasas de crecimiento (7). Para ambos fenotipo el uso de fuentes de carbono adicionales pueden minimizar estos problemas. Por ejemplo, para cepas Mut^S, debido a la utilización lenta de metanol, la coadministración de glicerol y metanol se emplea comúnmente en la fase de inducción (14,15). En este caso el glicerol funciona como sustrato para el crecimiento celular y, mientras que la función del metanol es de inductor de la proteína de interés (14,15).

1.3 OPTIMIZACION DEL GEN

El código genético es degenerado, para cada aminoácido, existe más de una tripleta o codón que lo codifica, y la frecuencia uso de estos codones varía según la especie u organismo (8). El uso de codones se ha identificado como un factor importante en la expresión génica, debido a que los codones preferidos se correlacionan con codones afines a los tRNAs disponibles en la célula (8). Generalmente, mientras mayor sea el número de codones extraños presentes en un gen, menor es la probabilidad de que la proteína heteróloga se exprese en niveles elevados (8). Una estrategia común para superar este inconveniente es la de cambiar los codones en el gen de modo que concuerden con el uso de codones de la célula hospedera, pero sin alterar la secuencia de aminoácidos de la proteína (8). De hecho, en sistemas de expresión de proteínas como *P.pastoris* esta técnica ha sido ampliamente utilizada reportándose aumentos de hasta diez veces con respecto a los obtenidos con el gen nativo (no modificado) (10).

2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las condiciones de cultivo y el uso un gen optimizado sobre los niveles de producción de la enzima iduronato-2-sulfato sulfatasa (IDS) en una cepa MUT^s de *Pichiapastoris* GS115.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Confirmar el fenotipo de los clones de *Pichiapastoris* IDS, con el gen optimizado y el gen nativo.
- Cuantificar la producción de IDS recombinante a escala de 100mL empleando un clones con el gen IDS nativo y optimizado.
- Evaluar la producción de la proteína recombinante Iduronato 2- sulfato sulfatasa (IDS) en una cepa de *Pichiapastoris*Mut^s con el gen nativo u optimizado bajo condiciones limitadas de oxígeno o sustrato a escala de 1,65 L.

3. METODOLOGIA

3.1 CLONES DE *Pichiapastoris*

Para la expresión de IDS en se utilizó la cepa *Pichiapastoris*GS115 (*his4*⁻) (Invitrogen, San Diego Ca. U.S.A.). Esta cepa fue previamente transformada por electroporación con el plásmido pPIC9 portando el gen nativo (*IDS_{nat}*) u optimizado (*IDS_{opt}*) (Rodríguez A. *et al*, datos sin publicar, 19). Las cepas GS115/*His*⁺/*Mut*^s/HSA y GS115/*His*⁺/*Mut*⁺/B-Gal (Invitrogen) fueron usadas como control de fenotipos (20).

3.2 DETERMINACIÓN FENOTIPICA DE LOS CLONES

3.2.1 MEDIO SÓLIDO

Los clones de *P. pastoris*GS115 portadores de los genes *IDS_{nat}* e *IDS_{opt}* se sembraron, al igual que los controles de fenotipo, en agar medio mínimo con dextrosa (YNB al 1.34% y biotina al $4 \times 10^{-5}\%$) por estría y se incubaron por 48h a 28 °C, luego de las 48 h se hicieron repiques en medio mínimo (YNB al 1.34% y biotina al $4 \times 10^{-5}\%$) enriquecido con metanol al 0.5% v/v., en el cual se sembró por estría una colonia de cada clon.

Los clones se incubaron a 30°C durante 96 h. Pasada la incubación se comparó la morfología, y el tiempo de crecimiento de los clones IDS contra lo observado para los controles de fenotipo, con el objetivo de clasificar los clones como *Mut*⁺ ó *Mut*^s(20).

3.2.2 PCR

El fenotipo de los clones IDS se confirmó mediante reacción de PCR empleando el método reportado por el fabricante de la cepa (Invitrogen). Para este fin los microorganismos (clones IDS y controles de fenotipo), fueron cultivados en 40 mL de medio YPD durante 48 h. Posteriormente se tomaron 0,3 g de biomasa, la cual fue empleada para la extracción de ADN genómico siguiendo el protocolo de

extracción con fenol cloroformo (Anexo 1). La integridad del ADN genómico fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) y la cuantificación se realizó a 260 nm empleando un Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

Para la reacción de PCR se emplearon los cebadores Forward 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' y Reverse 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3', y La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera:

Tabla 1. Componentes de la PCR para la confirmación del fenotipo

Compuesto	Concentración Final	Volumen
ADN genómico	1 µg	---
Buffer		2,5 µL
Mg ⁺²		1,5 µL
dNTP's		0,5 µL
Primer AOX1 5'		1 µL
Primer AOX1 3'		1 µL
taqPol		0,2 µL
Agua desionizada		Hasta 25 µL

La reacción de PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones estandarizadas en el laboratorio:

Tabla 2. Condiciones de la PCR para la confirmación del fenotipo.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclo
Denaturación	94°C	2 min	1 X
Denaturación	94°C	1 min	
Hibridación	55°C	1 min	35 X
Extensión	72°C	1 min	
Extensión Final	72°C	7 min	1X

Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 0,8% (p/v). Para el caso de una cepa Mut⁺ se espera obtener bandas con tamaños de 2000 y 2200 pb aproximadamente, mientras que para una cepa Mut^s se espera obtener una banda de 2000 pb (20).

3.3 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE IDS EN CLONES *IDS_{nat}* e *IDS_{opt}* A ESCALA DE 100ML

Previamente, se había realizado la evaluación de la producción de la enzima IDS en los clones con los genes de *IDS_{nat}* e *IDS_{opt}* a escala de 10 mL (Rodríguez A. et al datos sin publicar y (19)). A partir de los datos de actividad específica y volumétrica se seleccionó el clon con fenotipo Mut^s que presentara los mayores valores de actividad IDS y se empleó para su evaluación a escala de 100 mL. Para este fin se tomó un vial de este clon y se inoculó en 10 mL de caldo YPG (Extracto de levadura 1%p/v, Peptona 2%p/v, Glucosa 2%), incubando a 28°C, 290 rpm por 24h. Posteriormente, estos 10 mL se inocularon en 90 mL de caldo BMG (fosfato de potasio al 100mM, YNB al 1.34%, Biotina al $4 \times 10^{-5}\%$ y Glicerol al 1%) y se incubaron por 48h a 28°C. Transcurridas las 48h de crecimiento se centrifugó el medio y se re suspendieron las células en 100 mL de medio BMM (fosfato de potasio al 100mM, YNB al 1.34%, Biotina al $4 \times 10^{-5}\%$) con una concentración de metanol de 0,5%. El cultivo se incubó durante 120h a 290 rpm y 28 °C. Cada 24 h se adicionaron 500 µL de metanol puro para mantener una concentración de 0.5% v/v en el medio de cultivo. Alícuotas de 1 mL fueron tomadas cada 24 h para los respectivos análisis. Este ensayo se realizó por triplicado.

3.4 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE IDS A ESCALA DE BIOREACTOR EMPLEANDO ESTRATEGIAS DE CULTIVO LIMITADAS POR OXIGENO Y SUSTRATO

Los clones *IDSopt* e *IDSnat* evaluados a 100mL se evaluaron a escala de 1,65L en bioreactor Bioengineering® KFL2000 de 3,7 L. Para esto se utilizó un vial de cada uno de los clones y se inocularon en 10 mL de medio YPD (pre-inoculo x2). Pasada la incubación a 28 °C y 280 rpm por 48 horas, este pre-inóculo se empleó para inocular dos Erlenmeyer con 90 mL de medio MGli (Glicerol 1%, YNB al 1,34% y Biotina al $4 \times 10^{-5}\%$). Luego de 24 horas de incubación, los 200 mL del inoculo se mezclaron con 1450 mL de medio salino (KH_2PO_4 25,74 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/L; K_2SO_4 8,58 g/L; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,60 g/L; Glicerol 4%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,02 g/L), para obtener un volumen final de trabajo de 1,65L. Finalmente se adicionaron 1,5 mL de solución de trazas minerales ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,0 g; NaI 0,08 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3,0 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, H_3BO_3 0,02 g; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; CoCl_2 0,5 g, ZnCl_2 7,0 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,0 g; Biotina 0,2 g; 1,0 mL H_2SO_4 concentrado), 1 mL de antiespumante de silicona y 3 mL de Biotina al $4 \times 10^{-5}\%$. El cultivo se realizó durante 96h y durante todas las etapas del cultivo el pH del cultivo se mantuvo en 5,0 ajustándolo con hidróxido de amonio, mientras que la temperatura fue de 28 °C y la agitación en valores entre 600-900 rpm dependiendo de los requerimientos de oxígeno del microorganismo. El cultivo de las dos cepas se dividió en tres etapas: 1) un cultivo en lote hasta alcanzar una concentración de biomasa alrededor de 40 g/L, 2) un lote alimentado con glicerol al 40% hasta obtener una concentración de 60 g/L, y 3) una fase de inducción mediante cultivo en lote alimentado con metanol, cuya concentración dependió de las condiciones experimentales. En los cultivos limitados por oxígeno, la concentración de metanol se mantuvo en un valor de 0,5% v/v empleando una bomba peristáltica de flujo variable y un sensor de metanol con control automático, mientras que el oxígeno disuelto se mantuvo cercano a 0%. Por otro lado, para los cultivos bajo condiciones limitadas de sustrato la concentración del metanol se controló en valores cercanos a 0,03% v/v (límite de cuantificación del sensor de metanol), mientras que el oxígeno disuelto se intentó mantener en valores por encima del 10%. Alícuotas de 5 mL se tomaron cada 6 y 12 horas.

4. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS DE EXPRESIÓN DE CLONES *P.PASTORIS* IDS_{NAT}E IDS_{OPT}A DIFERENTES ESCALAS

4.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

Para determinar la concentración de biomasa presente en cada uno de los muestreos a escala de 100 mL y 1,65L, se determinó la densidad óptica (DO) a 620 nm haciendo diluciones seriadas a partir de las muestras tomadas. Con estos valores, se calculó la concentración de biomasa (g/L) empleando la curva de calibración reportada por Córdoba, 2003 (21):

$$\text{Concentración biomasa g/L: } \frac{0,619 \times DO}{0,528 \times fd} R^2: 0,99$$

4.2 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES

Para la cuantificación de las proteínas extracelulares, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 min a 4°C. La proteína presente en el sobrenadante se cuantificó por el método de Follin-Lowry (Anexo 2), empleando una curva de calibración con BSA entre 0,187; y 2,4 mg/mL.

4.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA Y VOLUMETRICA DE IDS

La actividad específica se calculó empleando el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferona (Moscerdam Substrates). La reacción de actividad enzimática se realizó empleando el protocolo descrito por Poutou RA, 2006 (22) (Anexo 3). Una unidad de actividad enzimática se definió como los nmoles de 4-metilumbeliferona liberados por hora. La actividad específica se calculó empleando la siguiente ecuación:

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

En donde A representa la fluorescencia de la muestra, B la fluorescencia del blanco, C la fluorescencia del estándar de 1 nmol de 4-metilumbeliferona y D la concentración de proteína de la muestra (mg/mL).

4.4 DETERMINACIÓN DE TASA DE CRECIMIENTO Y DE TASA DE PRODUCCIÓN

La tasa de crecimiento (h^{-1}) **(a)** fue calculada teniendo en cuenta el cambio de la concentración de biomasa en el tiempo y la tasa de producción (mg de proteína/g de biomasa/h) **(b)** fue calculada teniendo en cuenta el cambio de la concentración de proteína en el tiempo.

$$(a) \quad \frac{dX}{dt} = \frac{X_{k+1} - X_{k-1}}{X_k * \Delta t}$$

$$(b) \quad \frac{dP}{dt} = \frac{P_{k+1} - P_{k-1}}{X_k * \Delta t}$$

en donde X es biomasa (g/L), P es proteína (mg/L), k es el momento de toma de muestra, k-1 es la muestra anterior, k+1 es la muestra siguiente y Δt es el tiempo en entre k-1 y k+1 en h.

4.5 DETERMINACIÓN DE LOS RENDIMIENTOS BIOMASA/PRODUCTO, ACTIVIDAD ESPECÍFICA/BIOMASA, BIOMASA/SUSTRATO Y PRODUCTO/SUSTRATO.

El rendimiento producto/biomasa ($Y_{P/X}$) dado como g de proteína/g de biomasa, se calculó con la ecuación (c), el rendimiento actividad específica/biomasa ($Y_{AE/X}$) expresado como actividad específica/g de biomasa se calculó con la ecuación (d), en donde AE es la actividad específica para los rendimientos biomasa/sustrato ($Y_{X/S}$) y producto/sustrato ($Y_{P/S}$)

$$(c) \quad Y_{P/X} = \frac{P_k}{X_k}$$

$$(d) \quad Y_{AE/X} = \frac{AE_k}{X_k}$$

La tasa de consumo se calculó con la ecuación (e), en donde $\Delta S/\Delta t$ corresponde a la pendiente de consumo recuperada del programa controlador de metanol. Estas velocidades de consumo fueron empleadas para calcular los rendimientos empleando las ecuaciones (f) y (g).

$$(e) \quad \frac{dS}{dt} = \frac{\Delta S}{X_k * \Delta t}$$

$$(f) \quad Y_{X/S} = \frac{dX}{dS}$$

$$(g) \quad Y_{P/S} = \frac{dP}{dS}$$

4.6 DETERMINACIÓN DE LAS PRODUCTIVIDADES DE BIOMASA Y DE PROTEÍNA

Las productividades se calcularon relacionando los g de biomasa o mg proteína obtenidos en 1,65 L de cultivo en el tiempo de inducción y están dados en g de biomasa/h y mg de proteína/h respectivamente.

4.7 DETERMINACIÓN DE PROTEASAS

Para los cuatro cultivos realizados, se determinó la concentración de enzimas proteolíticas presentes, las cuales tienen la capacidad de degradar toda clase de proteínas suspendidas en el medio. Para esto se utilizó una solución de caseína usando el protocolo descrito en el anexo 4 y la siguiente ecuación:

UP/L → Unidades proteolíticas por litro

$$\frac{UP}{L} = \frac{Dop_{280\text{ nm}} * 10}{30 * 0.5} 10^3$$

5. RESULTADOS

5.1 CONFIRMACIÓN DEL FENOTIPO DE LOS CLONES DE *PICHIA PASTORIS*IDS $_{nat}$ E IDS $_{opt}$

Para la evaluación de los clones con IDS $_{nat}$ se analizaron 6 clones, previamente generados en el instituto, mientras que para IDS $_{opt}$ el clon empleado en el presente trabajo fue el seleccionado en el trabajo de Diaz S *et al* (19), por presentar los mayores valores de actividad enzimática, pero al que no se le había logrado establecer correctamente su fenotipo. Luego de la siembra en medio MD y MM se observaron las características de las colonias, en cuando su tamaño y color. Mediante comparación con los controles de fenotipo se determinó de los clones IDS $_{nat}$ evaluados tan sólo el clon Bgl II 1 presentaba un fenotipo Mut s , mientras que el clon con IDS $_{opt}$ presentó un fenotipo Mut s .

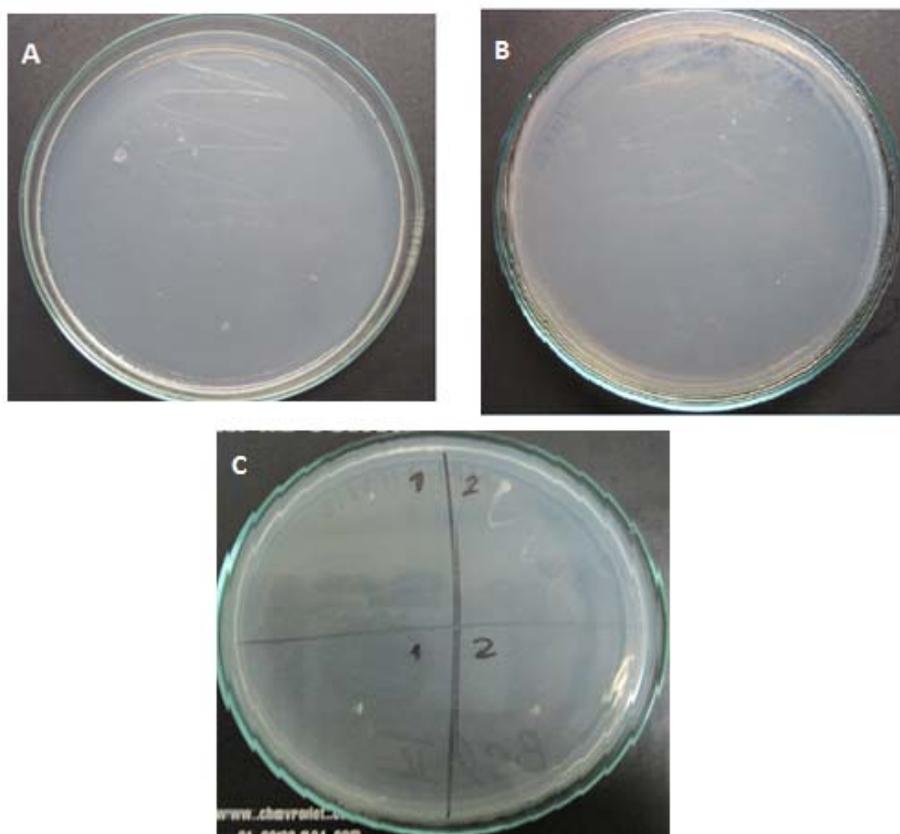


Figura 1. A): ClonIDS $_{opt}$ Mut s . B): ClonIDS $_{nat}$ Mut s . C): 1 Control HAS Mut s , 2. Control β gal Mut $^+$.

La segunda confirmación del fenotipo de estos clones se llevó a cabo mediante PCR (Figura 2). Para los clones Bgl II 1 e IDS opt se observa una banda intensa a una altura de 2000pb aproximadamente correspondiente a la integración del gen en el promotor de *AOX1* presente en el genoma de *P. pastoris*, clasificando los clones como Mut^S.

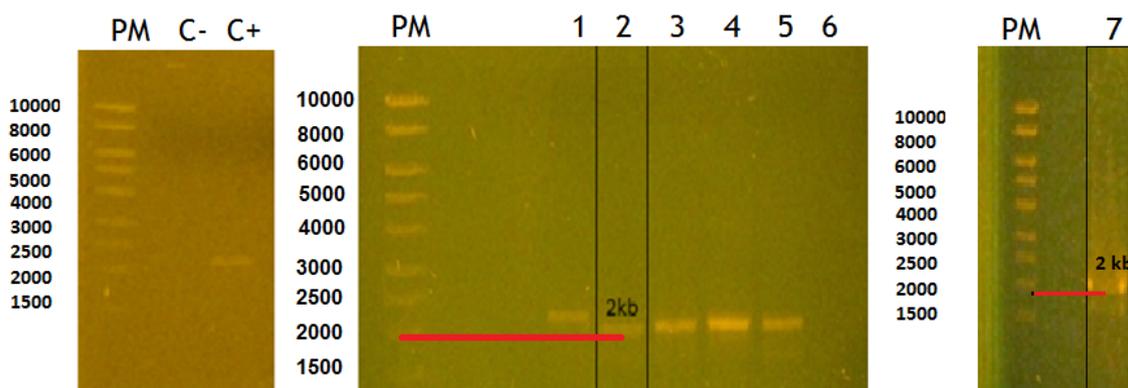


Figura 2. Identificación de fenotipo para clones de IDS nat /IDS opt mediante PCR. Electroforesis en gel de agarosa.

PM: Peso molecular **C-:** Control Negativo **C+:** Control Positivo(Mut^S) **2:** Clon Bgl II 1 (nativo) **7:** Clon IDS opt . Los carriles 1,3,4,5,6 son los demás clones IDS nat evaluados que no presentaron fenotipo Mut^S

5.2 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN IDS EN LOS CLONES DE *P.pastoris* CON IDS nat O IDS opt A ESCALA DE 100ML

En la *figura 3* se observan los cultivos a 100mL realizados con el clon IDS nat e IDS opt . La *figura 3A* muestra los parámetros evaluados para el clon IDS nat el cual al final de la etapa de inducción mostró una biomasa de 13,5 g/L, y una concentración máxima de proteína de 0,28 mg/mL alcanzada a las 120 h de cultivo. Las actividades específica y volumétrica presentaron su valor máximo a las 48 h de inducción, con valores de 1,0 U/mg y 0,22 U/mL, respectivamente. Sin embargo, se observó una fuerte caída a las 72 h de cultivo, incrementándose nuevamente para las 96 h, alcanzando valores de 0,7 U/mg y 0,21 U/mL,

respectivamente. Por su parte, para el cultivo del clon de *IDSopt* a escalada de 100 mL (*figura 3B*), la concentración máxima de biomasa se dio a las 96 h con un valor de 17,43 g/L, mientras que el máximo valor de la concentración de proteína se observó al final de cultivo con un valor de 0,72 mg/mL. Las actividades enzimáticas específica y volumétrica presentaron el valor máximo a las 96 h de inducción con valores 0,51 U/mg y 0,21 U mL los cuales fueron, para el caso de la actividad específica, 2 veces menores que los observados con el clon de *IDSnat*.

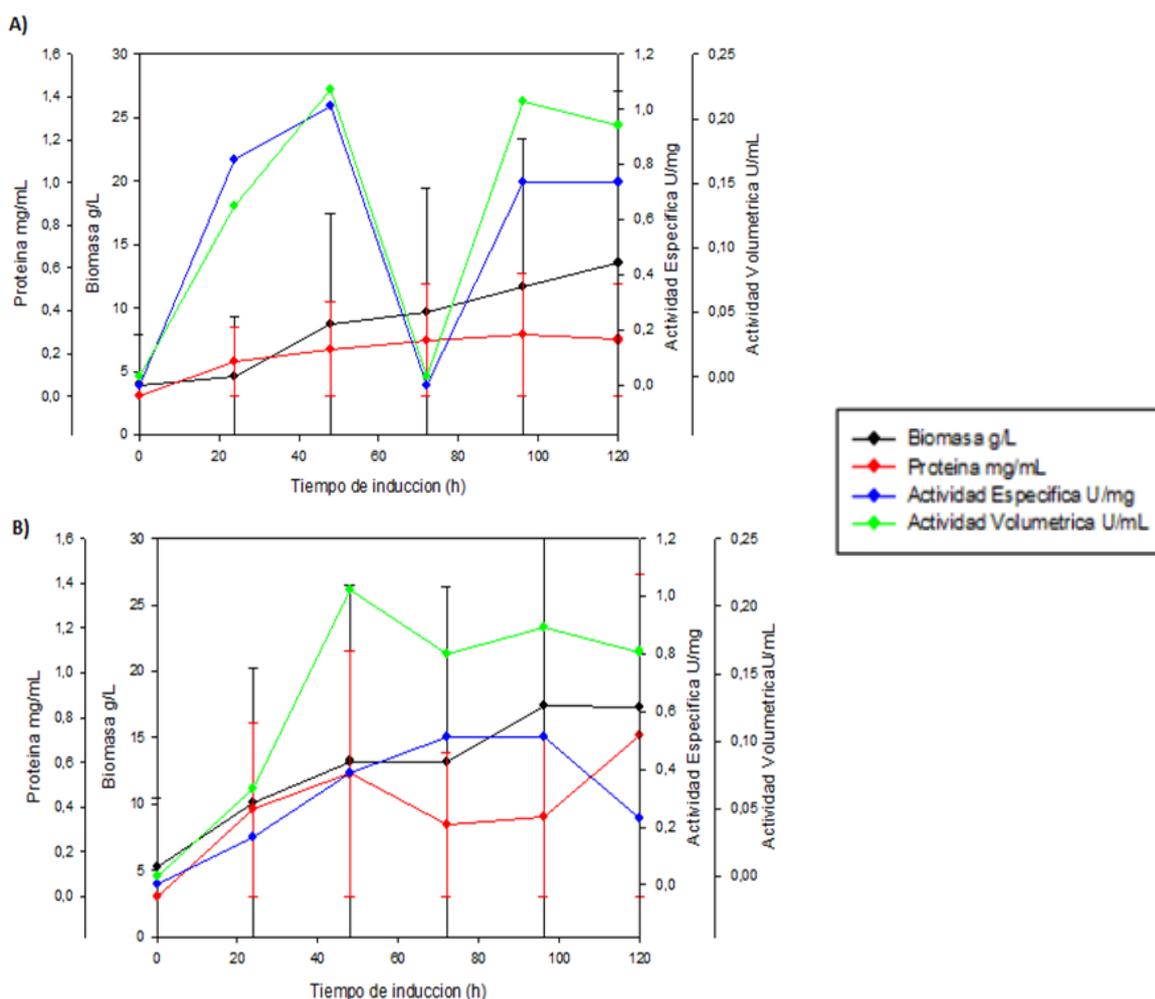


Figura 3. Seguimiento de los cultivos a escala de 100 mL para los clones de *P. pastorisGS115* con *IDSnat* (A) o *IDSopt*(B).

5.3 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN IDS EN LOS CLONES DE *P.pastoris* CON *IDS_{nat}* O *IDS_{opt}* A ESCALA A ESCALA DE 1,65L

En la *figura 4* se observan los resultados de biomasa, concentración de proteína, actividad específica, actividad volumétrica, %OD y % metanol para los cultivos de *IDS_{nat}* realizados a 1.65L. La *figura 4A* muestra el cultivo de *IDS_{nat}* realizado bajo condiciones limitadas de oxígeno, el cual se logró mantener entre valores de 0,0 y 2,8 % durante las 96 h de inducción. Con respecto a la concentración de metanol para esta cultivo esta se mantuvo en valores cercanos al 0,5% v/v durante gran parte de la etapa de inducción, aunque debido a inconvenientes técnicos la concentración de metanol alcanzó un valor de 1,3% hacia la mitad de la fase de inducción. Es de notar que un poco después de comenzar a incrementarse el metanol también con él, se incrementó el oxígeno aunque de forma retardada y este volvió a niveles bajos cuando el metanol regreso a 0,5%. La biomasa alcanzo su máxima concentración a las 96 h de inducción con un valor de 296 g/L. Por su parte, la concentración de proteína un valor máximo de 1,5 mg/mL a las 80 h de inducción, disminuyendo a 1,1 mg/mL al finalizar el cultivo. Con respecto a los valores de actividad enzimática, se observó que los máximos valores se alcanzaron hacia las últimas horas de cultivo, con valores de 0,04 U/mg y 1,14 U/mL, 96 h respectivamente.

La *figura 4B* muestra los resultados del cultivo de *IDS_{nat}* realizado bajo condiciones limitadas de sustrato, con concentraciones de metanol entre 0,04 y 0,06 % v/v durante la gran mayoría del cultivo. Bajo estas condiciones la biomasa alcanzó su máxima concentración a las 96 h de inducción con un valor de 316 g/L, mientras que la concentración de proteína alcanzó valores de 0,65 mg/mL a las 70 h de inducción, disminuyendo a valores de 0,43 mg/mL al finalizar el cultivo. Bajo estas condiciones, no se observó un aumento en los valores de actividad enzimática durante ninguna hora de la fase de inducción.

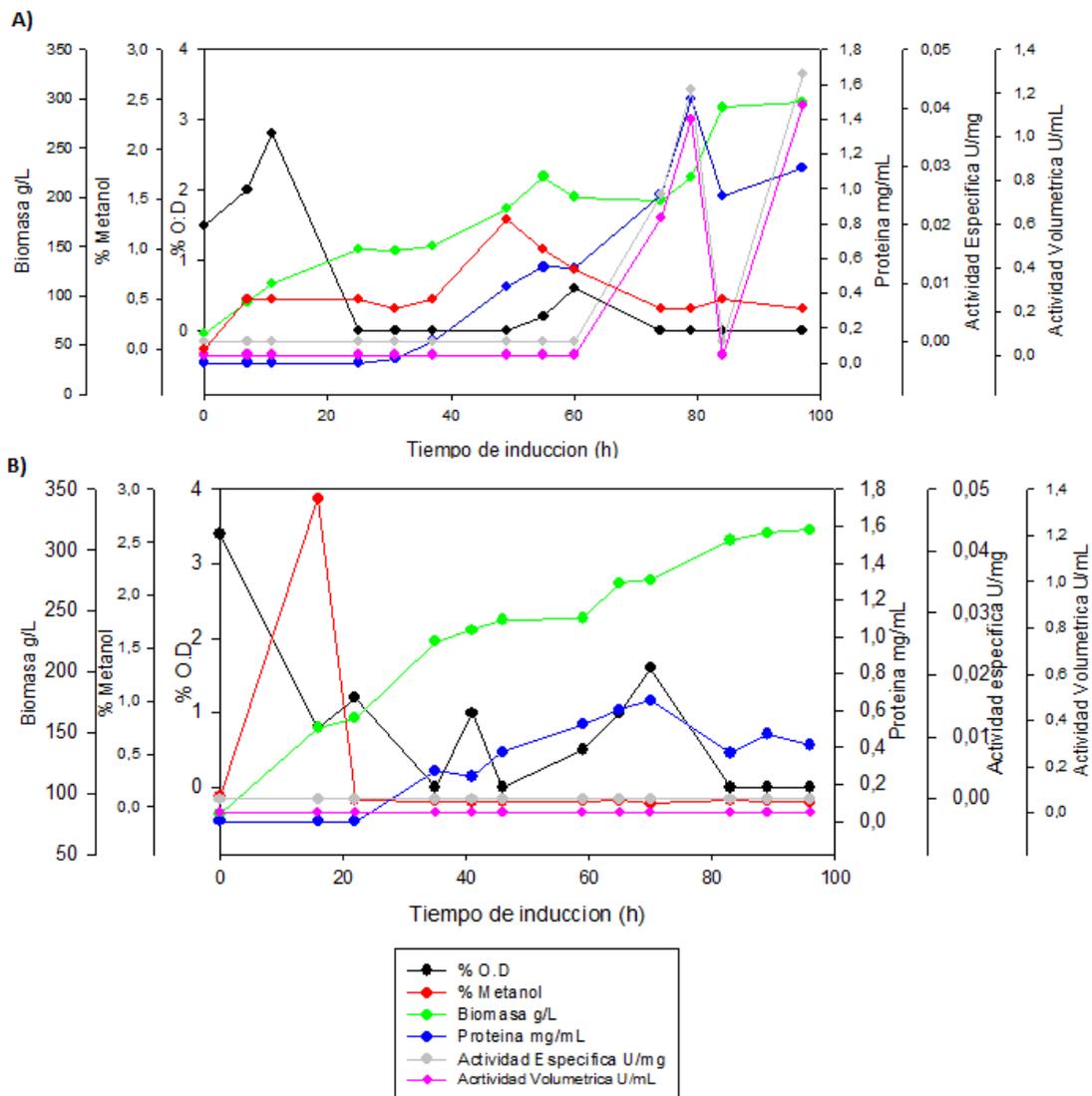


Figura 4. A) Cultivo a 1,65L de IDSnat limitado por oxígeno. **B)** Cultivo IDSnat limitado por sustrato.

En la *figura 5* se observan los resultados de biomasa, proteína, actividad específica, actividad volumétrica, %OD y %Metanol para los cultivos con clones de IDSoptrealizados a 1.65L. La *figura 5 A* muestra los resultados del cultivo realizado bajo condiciones limitadas de oxígeno, en el cual se logró mantener el oxígeno disuelto entre valores 0,6 y 3 % durante las 96 h de inducción, y a partir de las 20 h de inducción la concentración de metanol logró mantenerse estable con valores alrededor del 0,5% hasta la finalización del cultivo. Bajo estas

condiciones la biomasa aumento de forma constante durante la etapa de inducción hasta alcanzar una concentración máxima de 188 g/L al final del cultivo. De igual forma, la producción de proteína extracelular presentó un aumento a lo largo del tiempo obteniéndose una concentración máxima de proteína de 0,68 mg/mL a las 80 h de inducción. Con respecto a los valores de actividad específica y volumétrica, los máximos valores se alcanzaron a las 55 y 65 h de cultivo con valores de 1,58 U/mg y 0,13 U/mL, respectivamente.

La *figura 5 B* muestra los resultados del cultivo del clon con *IDSopt* realizado bajo condiciones limitadas de sustrato (metanol), el cual se logró mantener entre un 0,0 -0,04 % durante las 96 h de inducción. Debido a una falla en el programa de adquisición del sensor de metanol, los datos de concentración de metanol durante las primeras 30 h de inducción no se muestran. A pesar que el objetivo para este cultivo era mantener la concentración de oxígeno disuelto en valores por encima del 10%, se observó un pico de 42,8 % a las 26 h y luego un rápido descenso llegando a una concentración de 1,0% a las 44h, la cual se mantuvo constante hasta el final del cultivo. La biomasa alcanzó un valor de 240 g/L a las 96h de cultivo, mientras que la concentración de proteína que presentó una concentración máxima de 0,7 mg/mL a las 75 h de inducción. Los mayores valores de actividad específica y volumétrica se alcanzaron a las 26 y 75 h de cultivo, con valores de 0,87 U/mg y 0,36 U/mL, respectivamente.

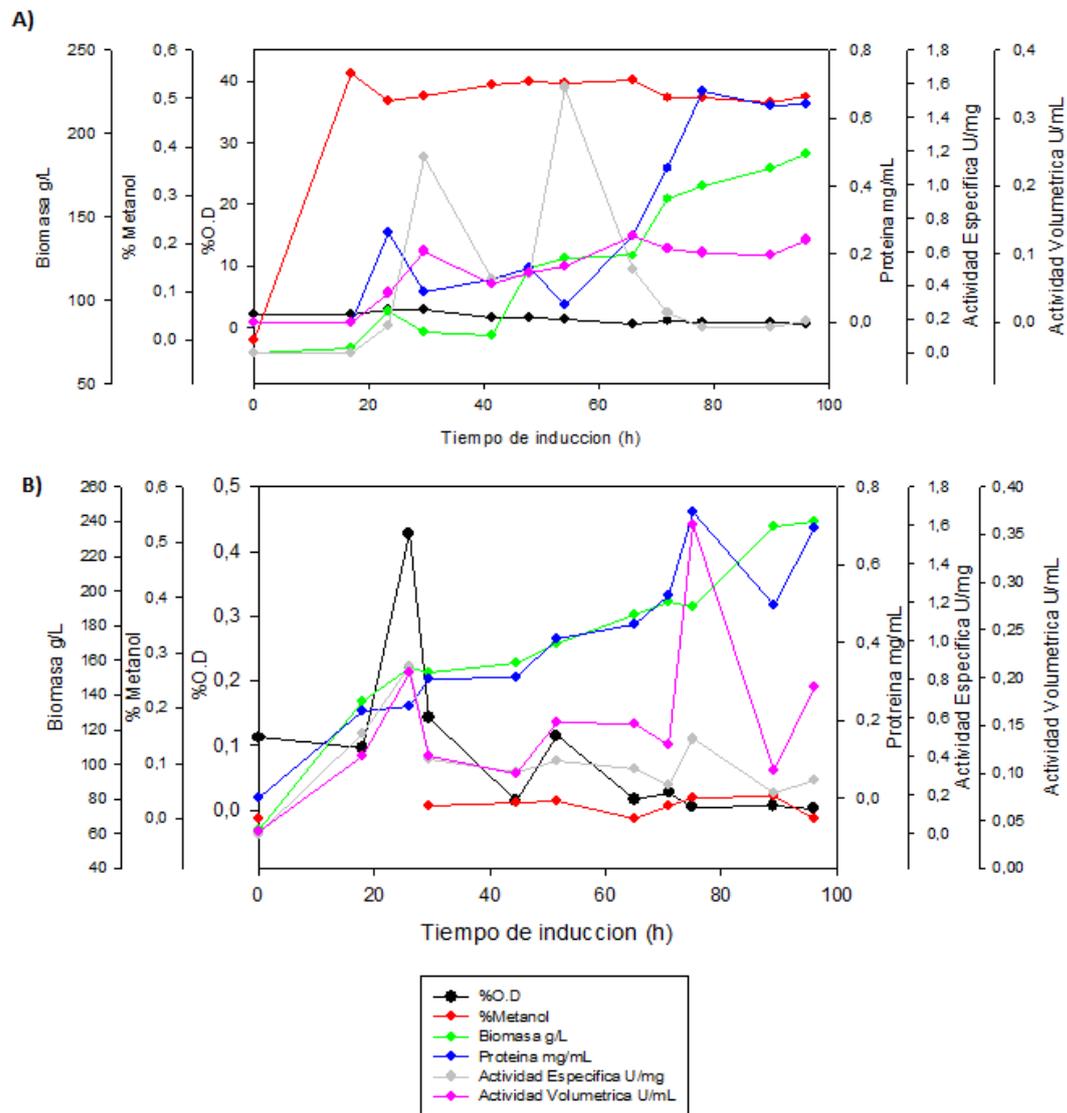


Figura 5. A) Cultivo a 1.65L de IDSo_{pt} limitado por oxígeno. **B)** Cultivo IDSo_{pt} limitado por sustrato.

De acuerdo con las tasas de crecimiento de los cultivos realizados a 1.65L (*figura 6A*) y el rendimiento biomasa/sustrato (*figura 7A*) se puede observar que el valor más alto de rendimiento biomasa/sustrato fue para el clon de IDSnat bajo condiciones limitadas de oxígeno a las 79 h. Con respecto a la tasa de producción (*figura 6B*) y Rendimiento producto/sustrato (*figura 7B*) también existe la misma

tendencia, siendo nuevamente el cultivo IDSnat limitado por oxígeno el que obtiene el mayor rendimiento Producto/sustrato a las 79 h, seguido del cultivo del clon IDSopt limitado por oxígeno.

En cuanto al rendimiento actividad específica/biomasa (*figura 7C*), para los cultivos realizados con el clon de IDSnat no se observaron valores de rendimiento ya que no se pudieron calcular debido a la poca o nula actividad enzimática que se presentó en ellos, mientras que para los cultivos realizados con el clon IDSopt, los mayores rendimientos actividad específica/biomasa se obtuvieron en el cultivo limitado por oxígeno.

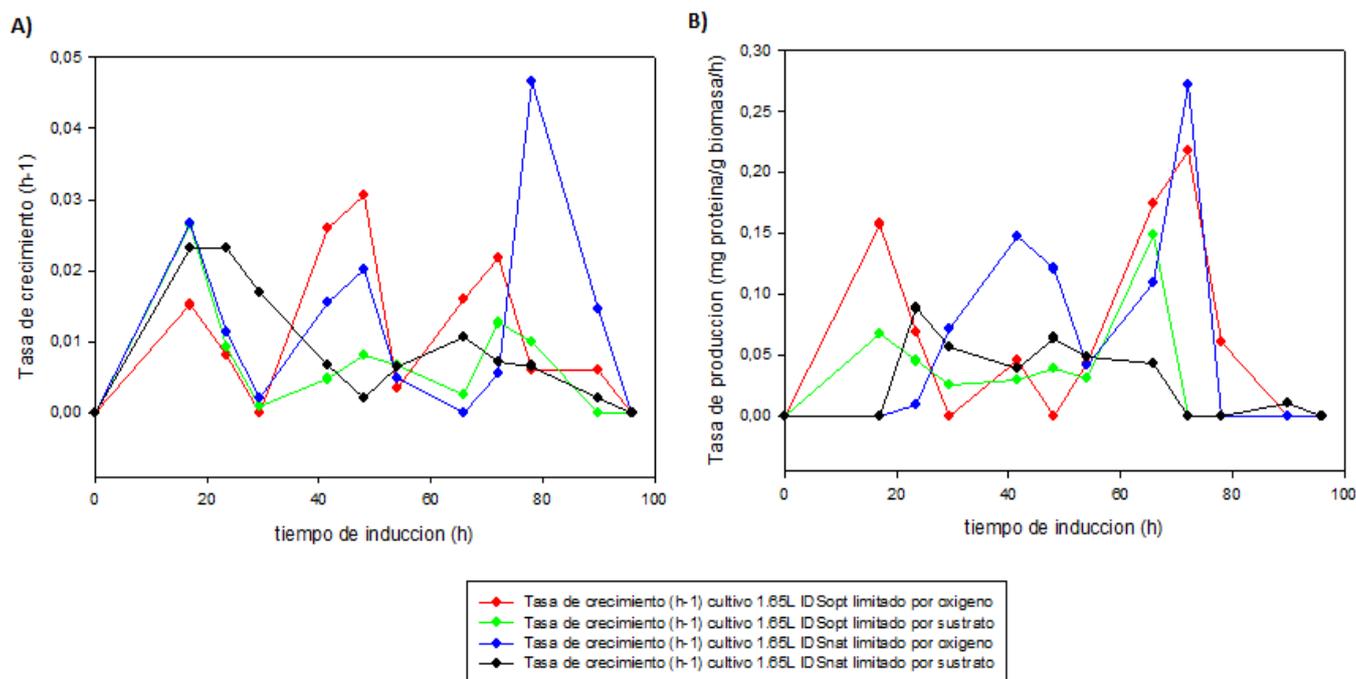


Figura 6. A) tasas de crecimiento (h^{-1}) de los diferentes cultivos realizados. **B)** Tasas de producción (mg prot/g biom) de los diferentes cultivos realizados a 1,65L.

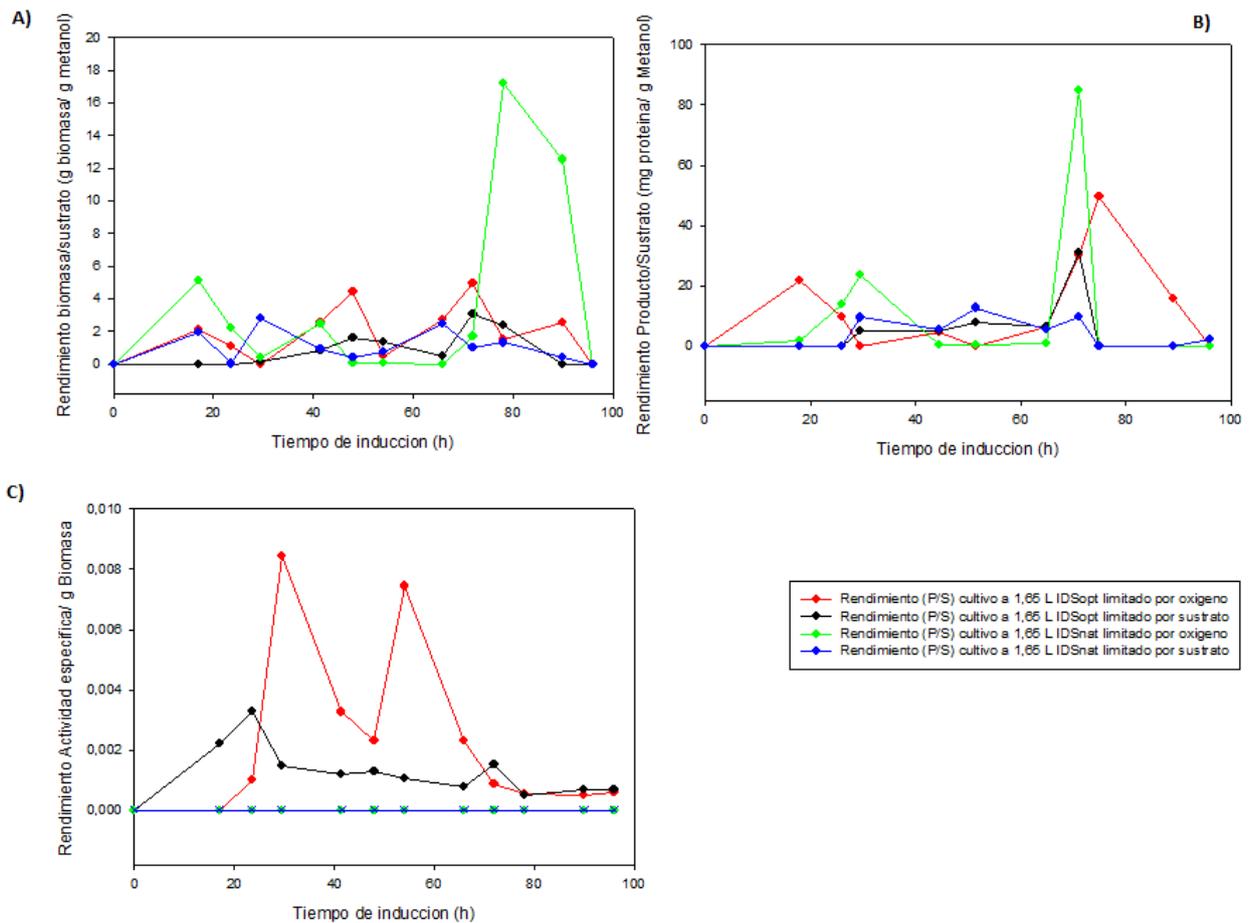


Figura 7. A) Rendimiento Biomasa/ sustrato (X/S) de los diferentes cultivos realizados a 1,65 L. **B)** Rendimiento Producto/sustrato (P/S) de los diferentes cultivos realizados a 1.65 L. **C)** Rendimiento Actividad específica/g biomasa de los diferentes cultivos realizados a 1,65 L

En las *Figura 8 A y 8 B*, se muestran las gráficas integradas de productividad de biomasa y productividad de proteína para cada uno de los cultivos realizados a 1,65L, en las que se puede observar que los cultivos que presentaron la mayor productividad de biomasa fueron *IDSnat* limitado por oxígeno y limitado por sustrato, mientras que la mayor productividad de proteína se obtuvo en el cultivo *IDSnat* limitado por oxígeno.

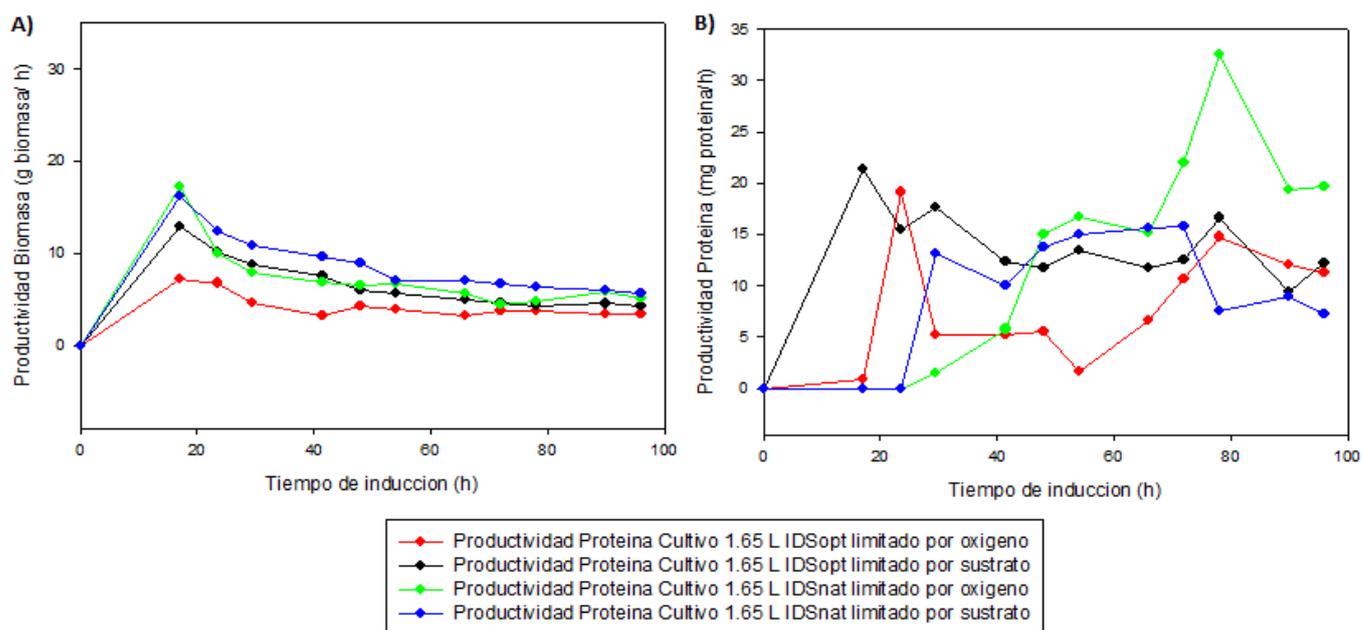


Figura 8. A) Productividad de la biomasa en los diferentes cultivos realizados a 1,65 L. **B)** Productividad de la proteína en los diferentes cultivos realizados a 1,65 L.

En la *figura 9* se presenta la gráfica integrada de Unidades proteolíticas por litro y la biomasa de cada uno de los cultivos realizados. Se puede observar que los cultivos que presentaron mayor cantidad de biomasa durante las 96 horas que fueron *IDSnat* limitado por oxígeno y limitado por sustrato están asociados a una mayor actividad proteolítica a lo largo del cultivo siendo estas de 1634 UP/L a las 96 horas y 1635 UP/L a las 55 horas respectivamente mientras que la actividad proteolítica de los cultivos de *IDSopt* limitados por oxígeno y sustrato fueron de 1093 UP/L a las 96 horas 1161 UP/L a las 95 horas respectivamente, asociadas también a una menor densidad celular.

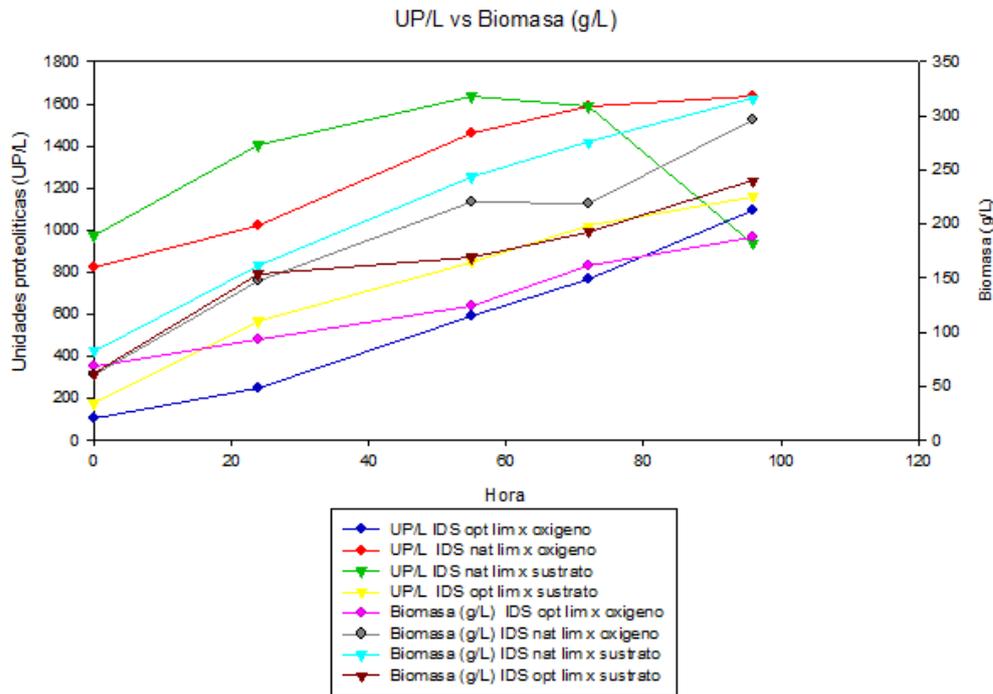


Figura 9. Unidades proteolíticas (UP/L) y Biomasa (g/L)

6. DISCUSION

El desarrollo de una terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Hunter requiere la producción de elevados niveles de la enzima recombinante para ejecución de las diferentes etapas preclínicas y clínicas asociadas al desarrollo de un producto farmacéutico. En este sentido, es de gran importancia evaluar los diferentes factores que pueden afectar la producción de la enzima recombinante. Por tanto, este trabajo evaluó el efecto del uso de una secuencia optimizada, así como de las condiciones de cultivo (limitado por sustrato u oxígeno) sobre los niveles de producción en *P. pastoris* GS115 de la enzima recombinante humana IDS.

Una de las condiciones principales de este trabajo fue el uso de una cepa *P. pastoris* Mut^S. La mayoría de las investigaciones sobre la producción de enzimas recombinantes en *P. pastoris* se han realizado con cepas con fenotipo Mut⁺. En

general, esta cepa se caracteriza por una tasa de crecimiento más alta que las cepas de Mut^s y también se han reportado para mostrar productividades más altas (23). Sin embargo, se ha demostrado que las cepas Mut^s son superiores a las cepas Mut⁺ en términos de producción de proteínas recombinantes (23). Tener un sistema controlado de metanol es necesario para evitar las variaciones bruscas en la concentración de metanol residual siendo esencial para el desarrollo de un proceso de producción robusto y reproducible, este sistema es más necesario para el fenotipo Mut⁺ debido a su tasa de consumo de metanol elevada (24). Por el contrario, debido a que las cepas Mut^s realizan el metabolismo del metanol exclusivamente con el producto del gen AOX2, su tasa de consumo de metanol es menor (24), lo cual significa un menor gasto de oxígeno para llevar a cabo este metabolismo. Teniendo en cuenta estas cualidades para la cepa Mut^s, se seleccionaron los clones con este fenotipo para realizar la evaluación del efecto de la limitación por sustrato u oxígeno sobre la producción de la proteína. Según los resultados de fenotipificación obtenidos mediante medio sólido y PCR (*figuras 1 y 2*) se puede concluir que a pesar de ser el medio sólido un método donde se observan las diferencias metabólicas de cada una de las cepas a pequeña escala, no es muy confiable comparándolo con el método de PCR ya que puede tener más interferentes que pueden alterar los resultados como la temperatura de incubación, la calidad de los componentes y la proporción en la que se encuentran en el medio. Por esta razón reforzar estos resultados con los obtenidos por PCR reducen el error que pueda haber en el primer paso.

Luego de comprobar el fenotipo Mut^s para los clones *IDS_{nat}* e *IDS_{opt}* se evaluó la producción de la enzima recombinante a escala de 100mL durante 120 horas para. Los resultados obtenidos muestran que entre los 2 clones utilizadas el que presentó la mayor producción de proteína fue la cepa *IDS_{opt}* con concentraciones finales de 0,72 mg/mL, la cual fue 2,6 veces mayor que lo observado con la cepa con el gen *IDS_{nat}*. Esta última cepa fue la que presentó los mayores valores de actividad específica, siendo 1,9 veces mayores que los observados con el clon *IDS_{opt}*. Sin embargo, al analizar los datos de actividad volumétrica se puede observar que las dos cepas presentaron valores de actividad similares, sugiriendo

producciones similares de la proteína IDS recombinante. De esta forma, la reducción en los valores de actividad enzimática específica para el clon IDS_{opt} puede ser el resultado de un aumento en la concentración de proteínas totales. En resumen, estos resultados sugieren que a escala de 100 mL el uso de una secuencia optimizada no tiene un efecto significativo en los niveles de producción de la enzima recombinante. Al comparar estos resultados con el trabajo realizado por Landázuri *et al*/2009(9), quien evaluó la producción de la enzima IDS humana recombinante a escala de 100 mL obteniendo una actividad de 4,21 U/mg en una cepa IDS portando el gen nativo, se puede observar que la optimización del gen en este caso no fue exitosa presentando una actividad específica casi 8 veces menor que la obtenida por la cepa nativa en el trabajo de Landázuri y 2 veces menor que la obtenida por la cepa nativa en este trabajo.

Varios reportes han demostrado que la expresión de las proteínas recombinantes se ve beneficiada por el uso de codones optimizados (25,26). Por ejemplo, Zhao *et al* 2009 emplearon *P.pastoris* para la producción de la enzima acetaldéhidó deshidrogenasa 2 humana, observaron que al usar un gen con los codones optimizados para *P. pastoris* los niveles de expresión eran 5 veces mayores que los obtenidos empleando el gen nativo (25). O Bai *et al* 2011 que evaluó la optimización de codones basado en los genes altamente expresados de *P. pastoris* para la producción de la glicoproteína P (Pgp), donde los niveles de expresión de levadura y el rendimiento de la proteína purificada a partir de *P. pastoris* fueron aproximadamente tres veces más alto para Opti-Pgp que para la proteína de tipo nativa (26). Este incremento en la expresión de la proteína recombinante, se debe al aumento de la traducción de la proteína debido que la secuencia presenta los codones que pueden ser reconocidos por los aminoacil-tRNA's intracelulares frecuentes disponibles en la célula (19). A pesar de que las investigaciones muestran que la optimización de codones tiene un efecto significativo en la producción de la enzima recombinante, para el caso de los resultados obtenidos en este trabajo a escala de 100mL no se observó este efecto. Sin embargo, es importante resaltar que las condiciones de cultivo afectan directamente la producción y la actividad de la enzima, ya que a 100mL es difícil

controlar las variables como el oxígeno disuelto, la alimentación de metanol y la temperatura. La falta de control sobre estas variables pudo haber tenido un efecto adverso en la producción de la proteína con el uso de una secuencia optimizada.

Finalmente, las cepas de *P. pastoris*IDS nat e IDS $optse$ evaluaron a escala de bioreactor con un volumen efectivo de trabajo de 1,65 L bajo condiciones limitadas de oxígeno o sustrato. El primer aspecto importante a destacar es que para el caso del clon IDS opt los valores de actividad enzimática a escala de bioreactor fueron mayores que los observados a escala de 100 mL, mostrando las ventajas del control de variables como la aireación y la concentración de sustrato. Con respecto a las condiciones de cultivo, los resultados mostraron que las mejores condiciones evaluadas en este trabajo para la producción de IDS humana recombinante activa se obtuvieron en el cultivo con el clon IDS opt bajo condiciones limitadas de oxígeno (*figura 5 A*). Bajo estas condiciones, los niveles de actividad fueron de hasta 1,57 U/mg, A pesar de que el cultivo con el clon IDS nat también presentó los mayores valores de actividad enzimática bajo condiciones limitadas de oxígeno, estos valores fueron menores a los observados mediante el uso del gen optimizado. Estos resultados también sugieren que la variable más sensible a limitar es el sustrato, ya que en los dos casos (nativo y optimizado) se presentaron los valores de actividad enzimática más bajos.

Se ha demostrado que el cultivo de *P. pastoris*Mut^s bajo condiciones limitadas de oxígeno puede aumentar de manera significativa la producción de la enzima recombinante proteínas (10). Los resultados del presente trabajo concuerdan con lo reportado por Charoenrat *et al* 2005, quienes durante la producción de β -glucosidasa en *P. pastoris*, encontraron que la actividad de esta fue mucho mayor durante un proceso limitado por oxígeno que cuando el proceso estuvo limitado por sustrato (metanol), con valores de actividad específica de β -glucosidasa de 13 U/mg y 8 U/mg de proteína, respectivamente (27).Berdichevskiy *et al* 2011 también utilizó las condiciones limitadas de oxígeno en la producción de anticuerpos en *P. pastoris* donde observaron que este proceso no sólo limitó la tasa de consumo de oxígeno máximo en *P. pastoris* sino también, permitió la extensión de la fase de

inducción que condujo a un aumento de la concentración de anticuerpo monoclonales intactos en un 95% (28).

Los resultados de los cultivos del clon IDS*nat* limitado por oxígeno y limitado por sustrato mostraron que a pesar de haberse producido la mayor cantidad de biomasa con valores de 296 g/L y 316 g/L y de proteína 1,5 mg/mL y 0,65 mg/mL respectivamente, las actividades que se obtuvieron fueron 34 veces menores que las obtenidas con el uso del clon con el gen optimizado. Estos resultados sugieren que la elevada biomasa generada durante estos los cultivos pudo influir de manera negativa sobre la producción de la enzima, si bien se sabe que durante el empleo de levaduras como *P. pastoris* para expresar proteínas heterólogas uno de los problemas que se presenta muy a menudo es la degradación proteolítica de estas por proteasas extracelulares o intracelulares que se liberan al medio luego de una lisis celular (10). Es de suponer en estos cultivos que la cantidad de biomasa pudo haber generado proteasas provenientes de la lisis celular que degradaron la proteína de interés reduciendo al mínimo los valores de actividad de esta y al mismo tiempo se seguían generando proteínas normales del metabolismo de la levadura asociadas a su crecimiento, lo cual pudo haber generado niveles altos en la concentración de proteínas al final del cultivo. Lo anterior se pudo comprobar mediante una determinación de proteasas en los cuatro cultivos realizados, donde se comparó la cantidad de biomasa producida contra las unidades proteolíticas dando como resultado que los cultivos de IDS*nat* limitado por oxígeno y sustrato quienes presentaron mayor cantidad de biomasa también obtuvieron unidades proteolíticas elevadas siendo estas de 1634 UP/L a las 96 horas y 1635 UP/L a las 55 horas en comparación a los cultivos de IDS*opt* que fueron de 1093 UP/L a las 96 horas 1161UP/ a las 95 horas respectivamente (*figura 9*).

Asociado a esto podemos resaltar los resultados de productividad de biomasa (*figura 8A*) donde se observa que en los cultivos IDS*nat*, se presentan los niveles más altos a las primeras horas de inducción, los cuales posteriormente disminuyeron. En este caso se puede sugerir que el glicerol residual usado

durante la fase de lote alimentado pudo causar el aumento rápido de la biomasa durante las primeras horas de inducción al igual que la represión del promotor AOX1 que pudo haber disminuido la producción de la proteína de interés (29), lo cual también se puede observar al analizar la productividad de la proteína (*figura 8 B*) donde se presenta una tendencia contraria a la vista en la productividad de la biomasa.

Los resultados obtenidos por los cultivos de la cepa *IDSnat* pueden compararse con el trabajo realizado por Córdoba-Ruiz *et al* (1), los cuales son mayores que los reportados en el presente trabajo. Sin embargo, es importante destacar que las condiciones de cultivo empleadas fueron distintas a las evaluadas en el presente trabajo, tales como el uso de diferentes fuentes de carbono (glicerol, ribosa, xilosa o sorbitol) y concentraciones de glicerol como, un dato importante que se logra extraer de estos resultados fue que la biomasa con la que se inicia la fase de inducción puede impactar de manera significativa en los valores de actividad enzimática. De esta forma cultivos con una biomasa alrededor de los 10 g/L en el momento de la inducción lograron valores de actividad enzimática de hasta 29,5 U/mg mientras que cuando la biomasa se encontraba alrededor de los 25 g/L no se obtuvo actividad específica. En el presente trabajo se empleó una biomasa inicial para la fase de inducción de 40 g/L logrando valores de actividad 19 veces menores que el máximo valor reportado por Córdoba-Ruiz *et al* (1). Estos resultados muestran la necesidad de evaluar el efecto de la concentración de biomasa inicial en el momento de comenzar la fase inducción, con el clon portando el gen optimizado y cultivado bajo condiciones limitadas de oxígeno.

Con respecto a los resultados de rendimiento biomasa/sustrato y proteína/sustrato (*figura 7A, 7B*) a pesar de que se evidenció que el sustrato inductor está siendo usado tanto para el crecimiento de la levadura como para la producción de proteínas se puede observar claramente que en los cultivos limitados por sustrato (concentraciones de metanol alrededor de 0,04%), estos rendimientos son menores que los obtenidos en comparación con los obtenidos con una concentración de metanol del 0,5%. Se han reportado que para los diferentes tipos

de proteínas la concentración de metanol óptima varía en un rango entre 0,1% y 3,0% (30). Por otro lado se reportó que al expresar la A33scFv la concentración más alta de esta se obtuvo a una concentración de 0,5 % de metanol (30), lo que sugiere que las condiciones limitadas de sustrato no sean las óptimas para poder conseguir una alta concentración de la proteína activa.

7. Conclusiones

1. Se confirmó el fenotipo de los clones *IDS_{nat}* e *IDS_{opt}* empleados en el presente estudio, encontrándose que se trata de clones Mut^s, y que el uso de la técnica de PCR puede representar una mejor alternativa para clasificar el fenotipo de la cepa al evitar la subjetividad asociada al método mediante cultivo.
2. Se cuantificó la producción de IDS recombinante a escala de 100mL empleando clones con el gen nativo y el gen optimizado y se pudo observar que a esta escala el uso de una secuencia optimizada no tiene un efecto significativo en los niveles de producción de la enzima recombinante.
3. A escala de bioreactor los mayores valores de actividad enzimática se observaron bajo condiciones limitadas de oxígeno y mediante empleo de la secuencia IDS optimizada, logrando valores de actividad enzimática de 1,57 U/mg, que fueron 34 veces mayores que los obtenidos con el uso del gen nativo.

8. RECOMENDACIONES

- Evaluar los demás clones *IDSopt* obtenidos en el trabajo de Díaz *et al* 2010 a escala de 1,65 L utilizando condiciones limitadas por oxígeno.
- Evaluar la co-expresión de SUMF1 con *IDSopt* en *P.pastoris*.
- Seguir utilizando el gen optimizado para la producción de IDS recombinante humana en *P.pastoris*.

REFERENCIAS

1. Córdoba-Ruiz HA, Poutou-Piñales RA, Echeverri-Peña OY, Algecira-Enciso NA, Landázuri P, Sáenz H, et al. Laboratory scale production of the human recombinant iduronate 2-sulfate sulfatase-Like from *Pichiapastoris*. *African Journal of Biotechnology* 2009;8(9):1786-1792.
2. Vafiadaki E, Cooper A, Heptinstall LE, Hatton CE, Thornley M, Wraith JE. Mutation analysis in 57 unrelated patients with MPS II (Hunter's disease). *ArchDisChild* 1998;79(3):237-241.
3. Sosa AC, Espejo AJ, Rodríguez EA, Lizaraso LM, Rojas A, Guevara J, et al. Development of a sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantification of iduronate-2-sulfate sulfatase. *J ImmunolMethods* 2011;368(1-2):64-70.
4. Valayannopoulos V , Wijburg F. Therapy for the mucopolysaccharidoses. *Rheumatology* 2011;(50):49-59.
5. Alméciga Díaz, CJ, Paramo, MA, Espejo, AJ, Echeverri, OY, Barrera LA. Effect of Elongation Factor 1 promoter and SUMF1 over invitro expression of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *MolBiol rep* 2008; 36(7):1863-70.
6. Cereghino G, Cereghino J, Ilgen C, Cregg J. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichiapastoris*. *Current Opinion in Biotechnology* 2002; **13**, 329–332.
7. Daly R, Milton T. W. Hearn. Expression of heterologous proteins in *Pichiapastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 2005; 18: 119–138.
8. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *TRENDS in Biotechnology*; 2004. 22 (7).
9. Landázuri P, Poutou-Piñales RA, Acero-Godoy J, Córdoba-Ruiz HA, Echeverri-Peña OY, Sáenz H, Delgado JM, Barrera LA. Cloning and shake flask expression of hrIDS-Like in *Pichiapastoris*. *Afr J Biotechnol*2009; 8,2871-2877

10. Potvin G, Ahmad A, Zhang Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichiapastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*. 2010. Article in for protein expression, *J. R. Soc.* 2009 6 S467–S476 press.
11. Ramon R, Cos O, Ferrer P, Montesinos JL, Valero F. Substrate feeding strategies in *Pichiapastoris* fed-batch cultivation processes: Analysis of key parameters influencing recombinant protein production. *Microbial Cell Factories* 2006;5:S13.
12. Jiménez ER, Sánchez K, Roca H, Delgado JM. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichiapastoris* cultures producing high level of dextranase. *BiotechnolTech* 1997;11(7):461-466.
13. Zhang W, Hywood Potter KJ, Plantz BA, Schlegel VL, Smith LA, Meagher MM. *Pichiapastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: Growth kinetics and production improvement. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2003;30(4):210-215.
14. Arnau C, Ramon R, Casas C, Valero F. Optimization of the heterologous production of a Rhizopusoryzae lipase in *Pichiapastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *EnzymeMicrobTechnol* 2010;46(6):494-500
15. Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F. Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichiapastoris* fed-batch cultures. *J Biotechnol* 2005;117(1):321-335.
16. Arnau C, Casas C, Valero F. The effect of glycerol mixed substrate on the heterologous production of a Rhizopusoryzae lipase in *Pichiapastoris* system. *BiochemEng J* 2011;57(1):30-37.
17. Khatri NK, Hoffmann F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichiapastoris*. *BiotechnolBioeng* 2006;93(5):871-879.
18. Barrigón JM, Montesinos JL, Valero F. Searching the best operational strategies for Rhizopusoryzae lipase production in *PichiapastorisMut+*

- phenotype: Methanol limited or methanol non-limited fed-batch cultures?. *Biochemical Engineering Journal* 2013; (75) 47– 54
19. Díaz S, Rodríguez A, Alméciga C, Pouotu R, Córdoba H, Barrera L. Avance en la producción de IDS recombinante en *Pichiapastoris*: efecto de la optimización del gen.
 20. Invitrogen. Pichia Expression kitA manual of method for expression of recombinant protein in *Pichiapastoris*. Cat No. K1710-01 California. Invitrogen.
 21. Cordoba, H. Estudio de la producción a nivel de laboratorio de la enzima iduronato 2-sulfatasa humana recombinante (IDS-2hr) en *Pichiapastoris*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, 2003.
 22. Poutou RA. *Expresión de Sulfatasas Humanas en Escherichiacoli y Pichiapastoris*, Tesis Doctoral. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., 2006, 162p
 23. Krainer F, Dietzsch C, Hajek T, Herwig C, Spadiut O, Glieder A. Recombinant protein expression in Pichiapastoris strains with an engineered methanol utilization pathway. *Microbial Cell Factories* 2012. 11 (22).
 24. Cos O, Resina D, Ferrer P, Montesinos J, Valero F. Heterologous production of *Rhizopusoryzae* lipase in *Pichiapastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. *Biochemical Engineering Journal*. 2005; 26 (2-3)
 25. YuFeng Z, MingKe L, YuanXin W, ZiSheng Z, CunWen W. Efficient expression of codon-adapted human acetaldehyde dehydrogenase 2 cDNA with 6×His tag in *Pichiapastoris*. *China Ser C-Life Sci*, 2009; 52(10): 935-941.
 26. Bai J, Swartz DJ, Protasevich II, Brouillette CG, Harrell PM. A Gene Optimization Strategy that Enhances Production of Fully Functional P-Glycoprotein in *Pichiapastoris*. *PLoS ONE* 2011; 6(8).
 27. Charoenrat T, Ketudat-Cairns M, Stendahl-Andersen H, Sven-Olof M. Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for

- Pichiapastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess BiosystEng* 2005; 27: 399–406.
28. Berdichevsky M, d'Anjou M, Mallem M, Shaikh S, Potgieter T. Improved production of monoclonal antibodies through oxygen-limited cultivation of glycoengineered yeast. *Journal of Biotechnology* 2011; 155, 217– 224.
 29. Çelik E, Çalık P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advance* 2012; 30(5), 1108-1118.
 30. Minjie G, Zhongping S. Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylophilic *Pichiapastoris*. *Chin.J.Chem.Eng.*; 2013, 21 (2): 216-226

Anexo 1

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE AND GENOMICO.

1. Colocar 0,3 g de biomasa en un vial de 1,5 mL.
2. Congelar el vial con N₂ líquido y extraer la biomasa congelada en un mortero.
3. Macerar hasta formar un polvo
4. Agregar 500 µL de buffer de lisis (100mM Tris-HCL; 100 mM NaCl; 10mM EDTA)
5. Recuperar el macerado en un vial y adicionar 1 vol de Fenol:Cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1)
6. Mezclar por 10 min a T° ambiente
7. Centrifugar a 13000 rpm a 4°C por 15 min
8. Recuperar el sobrenadante y agregar 1 vol de isopropanol
9. Adicionar 1/10 vol de Na Acido 3M pH 5.0
10. Mezclar a T° ambiente por 5 min
11. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min
12. Recuperar el pellet y lavar con 500 µL de etanol al 70%
13. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min
14. Recuperar el pellet y resuspender en 100 µL de Buffer TE y 5 µL de RNAsa.

Anexo 2

MÉTODO DE FOLLIN-LOWRY

1. Agregar 10 μ L de cada muestra en un tubo de vidrio.
2. Adicionar 100 μ L de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 1 % y 100 μ l de reactivo de cobre.
3. Mezclaron los tubos y dejar en incubación a temperatura ambiente durante 10 min.
4. Adicionaron 400 μ l de reactivo de Folin.
5. Mezclar e incubar en baño serológico por 5 minutos a 55 °C
6. Incubación durante 5 minutos a 4 °C.
7. Leer absorbancias a 610 nm en espectrofotómetro

Anexo 3

PROTOCOLO ACTIVIDAD IDURONATO 2-SULFATO SULFATASA (22)

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

Sustrato:

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

Buffer sustrato:

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

10 mM Acetato de Plomo

Buffer PiCi:

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

LEBT (Enzimas lisosomales de bovino)

Anexo 4

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA:

1. Tomar 1 ml de cada una de las muestras en estudio o de la dilución de las mismas.
2. Agregar a cada una 1 ml de la solución de caseína al 1% (p/v).
3. Preparar el blanco mezclando 1 ml de agua destilada y 1 ml de la solución de caseína al 1% (p/v).
4. Incubar las muestras a 37°C durante 30 minutos.
5. Agregar a cada muestra 1 ml de la solución de ácido tricloroacético al 15% (p/v).
6. Colocar las muestras a 4°C durante 5 minutos para detener la reacción.
7. Centrifugue 20 minutos a 5000 r.p.m.
8. Lea el sobrenadante en espectrofotómetro de luz U.V a 280 nm