

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Químico Farmacobiólogo



**Producción de interferón α de humano y β -galactosidasa
de bacteria en la levadura *Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

P R E S E N T A

Izamar Zuñiga Acosta

Tijuana, B.C.

Abril de 2016.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 001

Tijuana, B. C., a 04 de abril de 2016

C. Izamar Zuñiga Acosta
Pasante de: Químico Farmacobiologo
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra

quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema "Producción de interferón α de humano y β -galactosidasa de bacteria en la
levadura *Saccharomyces cerevisiae*"

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO
- III.- MÉTODO PROPUESTO
- IV.- IMPLEMENTACIÓN
- V.- PRUEBAS Y RESULTADOS
- VI.- CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO

Rosa E. Mares A.

Dra. Rosa Elena Mares Alejandre
Co-Directora de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Co-Director de Tesis

Dr. José Luis González Vázquez

Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

El presente trabajo de investigación fue realizado en el LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC, bajo la co-dirección de los profesores DR. MARCO ANTONIO RAMOS IBARRA y DRA. ROSA ELENA MARES ALEJANDRE, con el financiamiento del CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT): Fondo Sectorial SEP-CONACYT para Investigación en Ciencia Básica (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para Investigación en Salud (Apoyo 161544), otorgado al Dr. Ramos.

Dedicatoria

A mis queridos padres

Con todo mi cariño y admiración, sabiendo que jamás existirá una forma de agradecerles una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo, solo deseo que comprendan que este logro mío es suyo, que mi esfuerzo es inspirado en ustedes y que son mi único ideal. Muchísimas gracias por apoyarme siempre en todo, los amo.

Agradecimientos

Después de todos los obstáculos y dificultades por las que pase, quisiera agradecer a todas esas personas que me apoyaron y alentaron a lo largo de este proyecto, que siempre creyeron y confiaron en mí a pesar de que a veces ni yo misma lo hacía.

Al Dr. Marco por siempre apoyarme en todo, por sus consejos, enseñanzas y conocimientos, por alentarme a pesar de mis fracasos y por transmitirme esa sed de perseverancia y dedicación. Muchas gracias por siempre estar disponible para mí y este proyecto y por la confianza que me brindo, por ser mi asesor de tesis. Tiene un lugar muy especial en mi corazón.

A la Dra. Rosy por su apoyo durante este tiempo compartido, por sus consejos, por compartir sus experiencias conmigo, por siempre mostrarme una sonrisa y alentarme a seguir. Por permitirme ser parte de su vida tanto personal como profesional. La aprecio muchísimo!! Gracias por ser mi madrina.

A mis papis queridos por la oportunidad de existir, por su comprensión y confianza. Por ser más que mis padres, mis amigos, por siempre escucharme cuando teníamos nuestros momentos los sábados por la tarde en la mesa y platicábamos largo tiempo después de comer. A ti papi, muchísimas gracias por tu apoyo, sacrificio y dinero invertido en mi educación, sabes que te adoro. A ti mami por ser siempre mi amiga y confidente y por siempre alentarme a salir adelante, te quiero muchísimo.

A mi novio tan querido, Daniel, por apoyarme en todo momento, por alentarme a terminar esta etapa de mi vida y por ser mi compañero durante ella. Porque eres un ejemplo de dedicación y perseverancia. Por siempre estar al pendiente de mí y por aguantarme cuando hago mis berrinches. Te quiero muchisimoooo!

A mis hermanas del alma, Marisol, Alondra y Mia por siempre estar ahí cuando las necesito y por todos los momentos tan divertidos que hemos pasado juntas, gracias por siempre estar al pendiente de este proyecto y por ese abrazo reconfortante en los momentos tristes.

A mis abuelitos adorados por siempre estar al pendiente de mí. Los quiero mucho.

A mis gordos queridos, Alexis y Analleli, por preocuparse por mí en todo momento, por escucharme cuando necesitaba platicar con alguien, por su amistad incondicional, por brindarme su confianza. Muchas gracias por su apoyo, saben que son muy importantes para mí, las amo.

A mi BFF Eri, por tantos años de amistad, por preocuparse y estar pendiente de este proyecto, en cada oportunidad que tenía me preguntaba que como iba con mi tesis. Por escucharme hablar sobre ella y alentarme, aunque no entendías algunas cosas. Tu amistad significa mucho para mí.

A todos los que forman parte del laboratorio de Biotecnología, Kat, Vale, Aldo, Álvaro, Richy, Mig, Miguel, Jorge, Karlita, Pablo, mil gracias por preocuparse por este proyecto y brindarme su ayuda cuando lo necesite, por todos los momentos académicos y personales que hemos compartido, nunca olvidare los pasteles de cumpleaños después de los seminarios, cuando todos nos volvíamos locos al consumir azúcar y todos hablábamos al mismo tiempo. Los aprecio muchísimo.

A mis sinodales, Dra. Rosy, M.C. Alejandra y Maestra Alexis porque a pesar de sus múltiples ocupaciones dedicaron parte de su tiempo en la revisión de esta tesis, muchas gracias por sus consejos y recomendaciones.

Y muchas gracias en general a todas las personas que estuvieron apoyándome durante esta etapa, de verdad aprecio mucho su amistad.

CONTENIDO

Dedicatoria	3
Agradecimientos.....	4
Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	8
Abreviaturas.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Producción de proteínas recombinantes de interés biotecnológico y biofarmacéutico	10
1.2. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes	11
1.2.1. Sistemas de expresión en procariotas.....	11
1.2.2. Sistemas de expresión de eucariotas	11
1.2.3. Criterios de selección de un sistema de expresión	12
1.3. <i>S. cerevisiae</i> como sistema eucariótico de expresión de proteínas	13
1.3.1. Aspectos genéticos.....	14
1.3.2. Aspectos metabólicos.....	14
1.3.3. Aspectos fisiológicos	15
1.4. Aplicaciones biofarmacéuticas del interferón α de humano.....	15
1.5. Aplicaciones biotecnológicas de β -galactosidasa de bacteria.....	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo general	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1. Reactivos biológicos y químicos	20
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos	20
3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos.....	20
3.1.3. Estuches comerciales y sistemas de purificación.....	20
3.1.4. Células y medios de cultivo	21
3.1.5. Plásmidos comerciales	21
3.1.6. Equipo y programas computacionales	23
3.2. Construcción de los plásmidos de expresión de HUIFNA	23
3.2.1. Diseño de oligonucleótidos.....	23
3.2.2. Amplificación de las secuencias HUIFNA	24
3.2.3. Digestión de los productos de PCR y el plásmido pYES2/CT.....	24
3.2.4. Ligación de los fragmentos HUIFNA en el plásmido pYES2/CT	24
3.2.5. Transformación de <i>E. coli</i> y selección de transformantes.....	25
3.2.6. Purificación e identificación de plásmidos recombinantes	25

3.2.7.	Secuenciación automática de ADN.....	26
3.3.	Transformación de levaduras.....	26
3.3.1.	Preparación de células electrocompetentes	26
3.3.2.	Protocolo de electroporación y selección de transformantes	26
3.3.3.	Identificación molecular del ADN plasmídico en levadura	27
3.4.	Análisis de expresión de la proteína recombinante HUIFNA	27
3.4.1.	Condiciones de cultivo e inducción de la expresión	27
3.4.2.	Obtención de fracciones de proteínas intra- y extracelulares	28
3.4.3.	Análisis de las fracciones de proteínas intra- y extracelulares	28
3.4.4.	Separación y electro-transferencia de proteínas.....	28
3.4.5.	Inmuno-detección con anticuerpos anti-etiquetas moleculares.....	28
3.5.	Expresión y producción de la proteína recombinante β -galactosidasa.....	29
3.5.1.	Condiciones de cultivo e inducción de la expresión proteica	29
3.5.2.	Análisis de expresión de β -galactosidasa mediante inmuno-detección	29
3.6.	Cinética de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción β -galactosidasa.....	30
3.6.1.	Cinética de crecimiento celular.....	30
3.6.2.	Cinética de consumo de galactosa	30
3.6.3.	Cinética de producción de β -galactosidasa	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
4.1.1.	Obtención de los plásmidos de expresión de la proteína HUIFNA.....	32
4.1.2.	Obtención de cepas de levadura productoras de HUIFNA	34
4.1.3.	Obtención de una cepa de levadura productora de β -galactosidasa	36
4.1.4.	Análisis de producción de β -galactosidasa	37
4.1.5.	Rendimientos de producción.....	39
5.	CONCLUSIONES	40
6.	BIBLIOGRAFÍA	41
7.	ANEXOS	43

Índice de figuras

Figura 1-1. Células de <i>S. cerevisiae</i>	13
Figura 1-2. Esquema general de las funciones de la enzima β -galactosidasa.....	17
Figura 3-1. Representación esquemática del plásmido pYES2/CT/LacZ.....	22
Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pYES2/CT.....	22
Figura 4-1. Análisis de los productos de <i>PCR</i> del gen codificante para la proteína HUIFNA (FL y PM).....	32
Figura 4-2. Representación esquemática de la secuencia nucleotídica obtenida después de la inserción de las variantes de HUIFNA (FL y PM) en el plásmido pYES2/CT.....	33
Figura 4-3. Análisis de los productos de <i>PCR</i> obtenidos a partir de extractos plasmídicos de las células de levadura portadoras de los plásmidos de expresión de HUIFNA (YFL y YPM) y sus respectivos controles (CFL y CPM).....	35
Figura 4-4. Análisis de expresión de la β -galactosidasa recombinante en extractos proteicos de levaduras portadoras del plásmido pYES2/CT/LacZ.....	36
Figura 4-5. Cinéticas de crecimiento celular (biomasa, línea negra), consumo de sustrato (galactosa, línea roja), producción de β -galactosidasa (producto, línea azul).....	37
Figura 4-6. Representación esquemática de los rendimientos relativos de las cinéticas de crecimiento celular (negro), consumo de sustrato (rojo), y producción de proteína recombinante (azul).....	39

Índice de tablas

Tabla 3-1. Oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar las secuencias codificantes para la proteína HUIFNA.....	23
Tabla 4-1. Resultados de las cinéticas de crecimiento celular, consumo de sustrato (galactosa) y producción de β -galactosidasa. La cuantificación de proteínas celulares totales también se muestra (n = 3, media \pm D.E.).....	38

Abreviaturas

°C	Grados Celsius o centígrados
Amp	Ampicilina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DNSA	Ácido dinitrosalicílico
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
FL	<i>Full-length</i> , secuencia completa
g, mg, µg, ng	Gramos, miligramos, microgramos y nanogramos
Gal	Galactosa
Glu	Glucosa
His	Histidina
HUIFNA	Interferón α de humano
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
KU	Kilounidades
L, mL, µL	Litros, mililitros, microlitros
Leu	Leucina
LB	Medio Luria-Bertani
M, mM, µM	Molar, milimolar, micromolar
Min	Minutos
MPM	Marcador de peso molecular
Ni	Níquel
NTA	Ácido nitrilotriacético
ONPG	<i>o</i> -Nitrofenil-galactopiranosido
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Péptido maduro
Raf	Rafinosa
SC	Medio completo sintético
SDS	Docecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Seg	Segundos
T	Temperatura
Trp	Triptófano
U	Unidades
Ura	Uracilo
V	Volts
YNB	Base de nitrógeno de levadura

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Producción de proteínas recombinantes de interés biotecnológico y biofarmacéutico

Una proteína recombinante es aquella que se produce mediante la inserción del gen codificante, expresión heteróloga, y purificación por métodos bioquímicos en un organismo diferente al de origen; p. ej., bacterias, virus, hongos, levaduras o células de mamífero. Desde su descubrimiento, las proteínas recombinantes se han convertido en herramientas muy útiles en diferentes campos de la biología y medicina, debido al creciente impacto generado en diversas áreas de aplicación, aunado a los bajos costos de producción y el alto grado de pureza [Palomares *et al.*, 2004].

A la fecha, más de 230 proteínas recombinantes han sido aprobadas para su aplicación en humanos como productos farmacoterapéuticos [BIOPHARMA[®]]. Esto ha generado una revolución en la industria farmacéutica y el sector salud, ya que la aplicación de proteínas recombinantes como biofármacos ofrece una mejor acción terapéutica con menores efectos secundarios, dirigidos específicamente contra ciertas enfermedades que anteriormente eran consideradas como incurables, beneficiando tanto al productor como al consumidor [Gamboa y Trujillo, 2009].

Gracias al desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, varias proteínas recombinantes han sido producidas y comercializadas exitosamente. La primera proteína recombinante obtenida fue la insulina humana [Keen *et al.*, 1980], aprobada por la FDA en 1982 y comercializada como Humulin[®]. Otra proteína recombinante generada en la misma época fue la somatotropina humana (también conocida como hormona del crecimiento), producida 1981 y aprobada por la FDA en 1985 [Ayyar, 2011]. Estos biofármacos representan dos ejemplos clásicos e históricos del potencial terapéutico de las proteínas recombinantes.

Además del impacto en el sector médico-farmacéutico, la producción de proteínas recombinantes ha favorecido otros sectores industriales; por ejemplo, la enzima α -amilasa

(útil para la hidrólisis de almidón), que es ampliamente utilizada en la industria alimentaria y textil, ya que puede ser estable a valores de pH elevados (9-11) [Wang *et al.*, 2006].

1.2. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Hasta el día de hoy, se han desarrollado una amplia variedad de sistemas de expresión, utilizando modelos tanto procarióticos como eucarióticos, para la producción de proteínas recombinantes, desde virus, bacterias, hongos y levaduras, hasta líneas celulares de mamífero, insecto y plantas [Basile y Peticca, 2009]. Los sistemas más utilizados son los microorganismos, con un 55% (del cual aproximadamente el 39% corresponde a *Escherichia coli* y 15% a levaduras), seguidos de células de mamífero, con un 35% (específicamente células de ovario de hámster chino, CHO) [Rader, 2008].

1.2.1. Sistemas de expresión en procariotas

El sistema procariótico más utilizado es la bacteria *E. coli*, ya que ofrece la ventaja de proliferar rápidamente y en gran número; además, sus requerimientos nutrimentales (medio de cultivo) son muy económicos [Lee y Lee, 2003; Francis y Page, 2010]. Sin embargo, el empleo de esta bacteria también muestra desventajas, como su capacidad de acumular y agregar polipéptidos mal plegados (formando cuerpos de inclusión insolubles en el citosol), su ineficiencia para secretar proteínas hacia el medio de cultivo, y su inhabilidad para realizar modificaciones post-traduccionales [Francis y Page, 2010].

Otra de las bacterias utilizada a menudo es *Bacillus subtilis*, ya que ofrece la ventaja de secretar proteínas; sin embargo, también secreta una gran cantidad de proteasas. Aunado a esto último, existe una menor cantidad de vectores de expresión y exhibe una menor estabilidad genética de los plásmidos hospedados. Otras bacterias, como *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Lactobacillus*, también han sido utilizadas con fines de producción de proteínas recombinantes [Walsh y Headon, 1995].

1.2.2. Sistemas de expresión de eucariotas

Otros organismos comúnmente utilizados para la producción de proteínas recombinantes son las levaduras, ya que ofrecen la ventaja de: (1) crecer a una alta densidad

celular; (2) secretar grandes cantidades de proteína; (3) realizar modificaciones post-traduccionales; y (4) secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo.

Durante varios años, *Saccharomyces cerevisiae* fue considerada como único hospedero; pero hoy en día, otras levaduras como *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* y *Yarrowia lipolytica* [Madzak *et al.*, 2000]. Por su organización celular eucariótica, las levaduras promueven la maduración proteínica eficiente, característica de células animales y vegetales [Eckart y Bussineau, 1996]. Además, en el caso de *S. cerevisiae*, no produce endotoxinas y es utilizada en la industria alimentaria.

Las células de mamífero representan un sistema de expresión más avanzado, el cual se emplea generalmente para la producción de proteínas recombinantes cuyo patrón de glicosilación es relevante para la función. Habitualmente, este sistema es considerado el último recurso para proteínas complejas; p. ej. Factores de coagulación o anticuerpos [Hesse y Wargner, 2000]. En la actualidad, un alto porcentaje de las proteínas recombinantes aprobadas para consumo humano son producidas en este tipo de sistema; principalmente en células CHO o HEK (embrionarias de riñón humano) [Palomares *et al.*, 2004]. Desafortunadamente, este sistema presenta como desventaja el alto costo de los medios de cultivo. Otras líneas celulares han sido utilizadas para diferentes estudios, como las células COS (fibroblastos de tejido de riñón), Vero (células del epitelio de riñón), HeLa (células de cáncer cérvico-uterino), y NSO (células de mieloma murino), entre otras [Dukkipati *et al.*, 2008].

1.2.3. Criterios de selección de un sistema de expresión

Para la selección adecuada de un sistema de expresión y producción de proteínas recombinantes se recomienda observar las siguientes consideraciones: (1) el origen biológico (humano, animal, vegetal, etc.); (2) las propiedades químicas y biológicas (secuencia nucleotídica, peso molecular, punto isoelectrico, modificaciones post-traduccionales, etc.); (3) la estabilidad proteica (susceptibilidad a cambios de pH y temperatura); (4) los efectos tóxicos para la célula hospedera; (5) el destino celular deseado (intra- o extra-celular); (6) el grado de pureza requerido; (7) su aplicación posterior (biomedicina, alimentos, etc.); y (8) el proceso de producción (tipo de cultivo, escala, etc.) [Guerrero *et al.*, 2004].

1.3. *S. cerevisiae* como sistema eucariótico de expresión de proteínas

Por mucho tiempo, la levadura de *S. cerevisiae* ha sido considerada como un organismo eucariótico modelo para la producción de proteínas recombinantes con fines biomédicos e industriales, ya que es considerado como un organismo *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) por la FDA [Nasser *et al.*, 2003]. A diferencia de los otros sistemas de expresión, *S. cerevisiae* tiene la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales a proteínas de secreción, reduciendo los costos de post-producción [Schmidt, 2004]. Además, es resistente a valores bajos de pH, a concentraciones elevadas de azúcar y etanol, y a valores altos de presión osmótica, características biofísicas que la condicionan fisiológicamente para aplicaciones industriales [Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007]. La Figura 1-1 muestra una micrografía electrónica de barrido de *S. cerevisiae*.

Un factor importante a destacar en *S. cerevisiae* es su alta capacidad secretora. Para tomar ventaja de esta capacidad, es importante incorporar una secuencia señal, nativa o sintética, en el extremo amino-terminal de la proteína recombinante de interés; p. ej., la secuencia líder del factor de apareamiento alfa (MAT α), la cual ha favorecido altos niveles de secreción inducida de varias proteínas heterólogas [Chigira *et al.*, 2008]. Adicionalmente, se ha reportado que la sobre-expresión de chaperonas y enzimas del plegamiento benefician el incremento de la secreción de proteínas recombinantes; p. ej. la sobre-expresión de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) [Robinson *et al.*, 1994].

Por otro lado, el control específico de la expresión es posible mediante sistemas de regulación basados en secuencias promotoras que responden a estímulos medio-ambientales; p. ej., MET3, regulado negativamente por metionina; PHO5, regulado negativamente por fosforo inorgánico; CUP1, activado por iones cobre (Cu⁺²); y ambos GAL1 y GAL10, activados

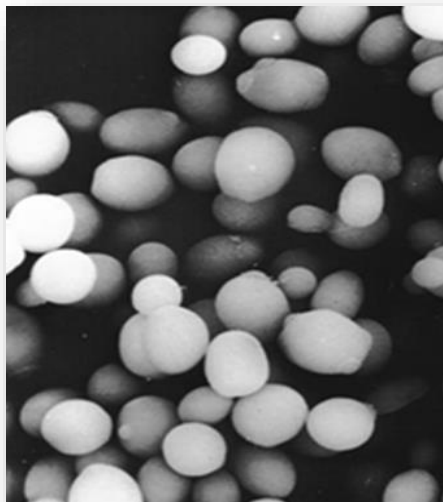


Figura 1-1. Células de *S. cerevisiae*.

por galactosa y reprimidos por glucosa [Cepononyte *et al.*, 2008]. Aún más, algunas secuencias promotoras que inducen la expresión constitutiva también han mostrado potencial aplicativo; p. ej., TEF1 y TPI1 [Liu *et al.*, 2012].

1.3.1. Aspectos genéticos

El aislamiento de esta especie se obtuvo en 1938 por el microbiólogo Emil Mirak. Originalmente fue designada como EM93 y posteriormente clasificada como *S. cerevisiae*. Después de varias cruces genéticas entre la cepa EM93 y otras cepas, se aisló la cepa S288c, la cual fue utilizada como modelo para secuenciación del genoma [Mortimer y Jhonston, 1986]. En 1996, se reportó el genoma completo de *S. cerevisiae*: 12,068 kb contenidas en 16 cromosomas lineales; alrededor del 70% son marcos de lectura abiertos (6183 secuencias codificantes para proteína) y 4% son intrones; 11% del proteoma codificado está comprometido en el metabolismo, 3% a la replicación del ADN, y 7% a la transcripción y traducción. Además, también contiene un plásmido circular, denominado 2 μ , que tiene una longitud de 6318 pb. A diferencia de sus equivalentes bacterianos, el plásmido 2 μ solo se replica una vez durante la fase S del ciclo celular, ya que es regulado por el mismo mecanismo que controla la replicación del ADN genómico. Esta característica ha sido considerada a favor en el diseño de vectores de expresión en levadura [Foster *et al.*, 2003].

1.3.2. Aspectos metabólicos

S. cerevisiae es un microorganismo que puede desarrollarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Aunque su principal fuente de carbono y energía es la glucosa, también puede metabolizar otros azúcares y glicerol. En condiciones aeróbicas, la glucosa se cataboliza (vía glucolisis, ciclo de Krebs, y cadena de fosforilación oxidativa) rindiendo CO₂ y ATP; sin embargo, en condiciones anaeróbicas, la glucosa se cataboliza (vía glucolisis y una vía fermentativa) rindiendo como producto final etanol [Kappeli, 1986].

En cultivo, *S. cerevisiae* puede crecer en un medio mínimo suplementado con glucosa como fuente de carbono; sin embargo, para aumentar la velocidad de crecimiento es recomendable utilizar un medio rico que contenga extracto de levadura y peptona, los cuales proporcionan varios de los metabolitos que la levadura tiene que sintetizar cuando se encuentra en un medio mínimo. Además, se pueden utilizar diferentes sustratos como fuente

de carbono; p. ej., rafinosa y galactosa, para aliviar la represión de glucosa e inducir la expresión de un promotor dependiente del activador Gal4p, como lo son GAL1 y GAL10 [Bergman, 2001].

1.3.3. Aspectos fisiológicos

La composición de los medios de cultivos de *S. cerevisiae* han mostrado diferentes efectos sobre la tasa de crecimiento específico, formación de producto y tamaño celular [Boender *et al.*, 2011]. El rendimiento de biomasa es un factor muy importante en los procesos industriales, específicamente cuando el producto es dependiente de esta. No obstante, en otros procesos es imperante mantener el rendimiento de biomasa al mínimo, con el fin de lograr la máxima conversión de la fuente de carbono en productos extracelulares, como el etanol. Por lo tanto, la composición del medio de cultivo es un factor relevante para la optimización del proceso de fermentación a gran escala (industrial).

El rendimiento de biomasa está determinado por varios factores, entre los que figuran: (1) el requerimiento de energía para el crecimiento celular; (2) las presiones de oxígeno y CO₂; (3) la generación de subproductos del metabolismo (etanol y acetaldehído); y (4) la temperatura [Verduyn, 1991; Salgeiro *et al.*, 1988]. Actualmente, los procesos industriales están dirigidos hacia el control fisiológico de los cultivos, con el fin de reducir la producción de compuestos tóxicos. Además, el desarrollo de protocolos de optimización de algunos parámetros, como la temperatura, el pH del medio y la fuente de carbono, están siendo aplicados para garantizar altos rendimientos de biomasa [Vieira *et al.*, 2013].

1.4. Aplicaciones biofarmacéuticas del interferón α de humano

Los interferones (IFN) son una familia multigénica de citocinas inducibles producidas por el sistema inmunológico de varios mamíferos en respuesta a estímulos virales, bacterianos, antígenos y mitógenos. Los IFN se clasifican en dos grupos: tipo I (conocidos como virales) y tipo II (conocidos como inmunes). Los IFN tipo I (IFN- α , IFN- β , e IFN- ω) son considerados la primera línea de defensa contra los agentes infecciosos y la progresión tumoral. Los IFN tipo II (IFN- γ) son inducidos por estímulos antigénicos y mitogénicos [Asmana, 2014; Gull *et al.*, 2013].

El clúster génico de los IFN tipo I, localizado en el brazo corto del cromosoma 9 (*locus* 9p21), consiste de 26 genes: 13 IFN- α , 1 IFN- β , 1 IFN- ω , y 11 pseudogenes; todos ellos carentes de intrones. Con respecto a los productos de expresión de los 13 genes IFN- α , se han descrito un total 28 variantes polipeptídicas, los cuales difieren en 1-4 residuos de aminoácidos (con un rango de peso molecular de 19-20 kDa); pero comparten el mismo receptor y ejercen el mismo efecto biológico. El subtipo principal es IFN- α 2, del cual se han descrito 3 isotipos: IFN- α 2a, IFN- α 2b, e IFN- α 2c, siendo el isotipo IFN- α 2b el más predominante [Gull *et al.*, 2013].

IFN- α exhibe tres funciones biológicas muy importantes: actividad anti-viral, anti-proliferativa e inmuno-moduladora. La acción anti-viral se basa principalmente en la inhibición de la biosíntesis de proteínas del virus dentro de la célula diana; en tanto, como agente anti-proliferativo inhibe la replicación celular, y como inmuno-modulador activa a células T citotóxicas y células NK (*Natural Killer*). IFN- α de humano se utiliza como tratamiento estándar para leucemia de células pilosas, melanoma folicular, carcinoma renal, sarcoma de *Kaposi* asociado al SIDA, y leucemia mieloide crónica, entre otros tumores [Asmana, 2014], así como para infecciones virales, incluyendo hepatitis crónica por VHC (Virus de la Hepatitis C) [Keppeke *et al.*, 2016].

Desde la generación de las primeras formulaciones de IFN- α recombinante, las demandas de producción han aumentado, lo que ha captado la atención de la industria farmacéutica. En la actualidad, se ha logrado obtener altos niveles de producción de IFN- α de humano recombinante con un mayor grado de pureza [EL-Baky *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013]. IFN- α de humano recombinante sigue siendo ampliamente utilizado como tratamiento individual o en combinación, con otros agentes terapéuticos, para combatir enfermedades proliferativas e infecciones virales, por lo que es de interés biofarmacéutico [Asmana, 2014; Keppeke *et al.*, 2016].

1.5. Aplicaciones biotecnológicas de β -galactosidasa de bacteria

La enzima β -galactosidasa de *E. coli* es una enzima tetramérica que contiene cuatro subunidades idénticas de 1,024 residuos de aminoácidos. Su función principal es hidrolizar el disacárido lactosa en sus monosacáridos, glucosa y galactosa, para su asimilación (en

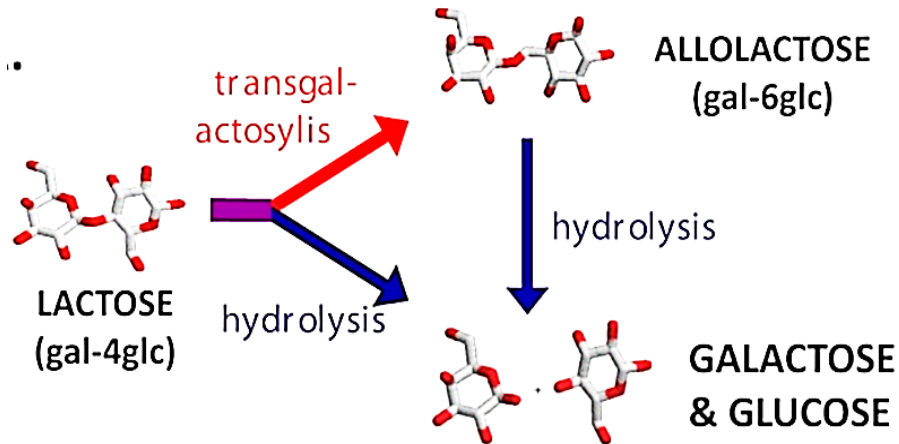


Figura 1-2. Esquema general de las funciones de la enzima β -galactosidasa.

Las reacciones de hidrólisis (azul) y de trans-galactosilación (roja) se indican con flechas coloreadas. La producción de alolactosa es transitoria, debido a que se puede hidrolizar inmediatamente por acción enzimática [Wheatley *et al.*, 2013]. Donde gal-4glc representa la unión 1-4 entre galactosa y glucosa, y gal-6glc la unión 1-6 entre ambos monosacáridos.

humanos, la lactasa es un enzima de la familia β -galactosidasa). Alternativamente, también puede catalizar la trans-galactosilación: de lactosa a alolactosa (Figura 1-2) [Wheatley *et al.*, 2013]. En la bacteria, este paso es de gran importancia, ya que alolactosa se une al represor LacI, regulando así la cantidad de enzimas del metabolismo de lactosa.

En humanos, el intestino delgado secreta pequeñas cantidades de lactasa, la cual permite la degradación de la lactosa presente en la leche y otros productos lácteos. Sin embargo, una pequeña parte de la población es intolerante a la lactosa por una insuficiencia enzimática. Cuando esto sucede, la lactosa pasa al intestino grueso, donde la microbiota del colon la descomponen en ácido láctico, hidrogeno, dióxido de carbono y metano, y se manifiesta como diarrea, dolor intestinal y flatulencia [Sibley, 2004]. Para evitar esos problemas, la lactosa debe estar presente en pequeñas cantidades en los productos lácteos de consumo humano. Por lo anterior, la industria de productos lácteos requiere de enzimas con capacidad de hidrólisis de la lactosa. Actualmente, el uso de enzimas bacterianas con actividad β -galactosidasa ha despertado gran interés biotecnológico, ya que hidrolizan específicamente enlaces β -(1,4)-galactosídicos, dejando el resto de los componentes de la leche inalterados [Pivarnik *et al.*, 1995].

Por otro lado, la hidrólisis enzimática de la lactosa presente en el suero de la leche (lactosuero) puede generar un jarabe de dulce, el cual se utiliza en la elaboración de otros productos lácteos, confitería, panadería y bebidas [Pivarnik *et al.*, 1995]. La reutilización o bioconversión del lactosuero (obtenido durante el procesamiento de quesos y cuya disposición al medio ambiente produce varios inconvenientes) puede ser una alternativa viable para superar un prevalente problema ambiental.

Además, la β -galactosidasa puede ser utilizada para sintetizar galacto-oligosacáridos, los cuales son azúcares no digeribles (por el humano) que pasan al colon y son fermentados por bacterias benéficas, otorgándoles una capacidad prebiótica [Splechtna *et al.*, 2007]. Aunque la enzima β -galactosidasa puede ser producida por numerosas bacterias, las levaduras son consideradas como un hospedero importante desde el punto de vista industrial, ya que ofrecen la ventaja de ser consideradas seguras para su uso en la producción de alimentos y bebidas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Establecer un procedimiento estándar para la expresión inducida de las proteínas recombinantes interferón α de humano y β -galactosidasa de bacteria en células de *Saccharomyces cerevisiae*, que permita la detección, purificación y producción de proteínas de interés biomédico y biotecnológico en un sistema eucariótico simple.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Obtener los plásmidos recombinantes pYES2/CT/HUIFNA-PM y pYES2/CT/HUIFNA-FL para la expresión en levadura de las variantes peptídicas madura y completa (respectivamente) de la proteína interferón α .
- 2.2.2. Obtener células de levadura transformadas con los plásmidos recombinantes mediante electroporación, crecimiento en medio selectivo, y confirmación de la presencia intracelular de cada plásmido.
- 2.2.3. Determinar la expresión de la proteína recombinante interferón α mediante inmunodetección con anticuerpos dirigidos con epítopes moleculares.
- 2.2.4. Obtener células de levadura transformadas con el plásmido recombinante pYES2/CT/LacZ mediante electroporación y crecimiento en medio selectivo.
- 2.2.5. Determinar la expresión de la proteína recombinante β -galactosidasa mediante inmunodetección y análisis de actividad.
- 2.2.6. Determinar los parámetros de crecimiento celular, consumo de sustrato, y producción de una proteína recombinante mediante un ensayo cinético de 72 horas de expresión de la β -galactosidasa en células de levadura.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos biológicos y químicos

3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Los reactivos fueron obtenidos de distintos proveedores. *Biorad*: Agarosa y otros reactivos para electroforesis, 4X Laemmli sample buffer, azul brillante de *Coomassie* R-250, y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED). *IBI Scientific*: Tris-base, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, glicerol, y dodecil sulfato de sodio (SDS). *Sigma*: Reactivo de Bradford, ampicilina, tetraciclina, bromuro de etidio, CaCl₂, NaCl, KCl, Yeast Nitrogen Base (YNB), Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplement w/o histidine, leucine, tryptophan and uracil (DOM), leucina, histidina, triptófano, glucosa, reactivo CelLytic™ Y, *Tween*® 20, o-nitro-fenil β -D-galactósido (*ONPG*), imidazol, cloroformo, acetona, urea, y sorbitol. *JT Baker*: Na₂HPO₄ y Na₂CO₃. Otros: Galactosa (*Amresco*), glicina. (*MP Biomedicals*), metanol (*Spectrum*), etanol (*Fermont*), 2-mercaptoenanol (*Thomas Scientific*), persulfato de amonio (*Fisher Biotech*). Los componentes de los medios de cultivo para bacterias: agar bacteriológico, extracto de levadura, triptona, y peptona se obtuvieron de *Becton Dickinson*.

3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos

La enzima *Pfu* Ultra HF ADN polimerasa (2.5 U/ μ L) y su amortiguador 10X fueron adquiridos de *Agilent*. La enzima T4 ADN ligasa (400,000 U/mL) y su amortiguador 10X, el amortiguador 10X NEB2, la mezcla de deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), y las endonucleasas HindIII y XbaI fueron obtenidos de *New England Biolabs*. La mezcla 2X *Taq PCR Master Mix* fue adquirida de *Qiagen*. Los anticuerpos monoclonales anti-hexahistidinas y anti-V5 (GKPIPPLLGLDST), y el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina fueron adquiridos de *Sigma*.

3.1.3. Estuches comerciales y sistemas de purificación

Los estuches *QIAquick*™ PCR Purification Kit y *QIAprep*™ Spin Miniprep Kit, y las columnas para mini-purificación *Ni-NTA Spin Column* fueron adquiridos de *Qiagen*. El

estuche *CellLytic® Y Plus Kit* fue obtenido de *Sigma*. El estuche comercial *AP Conjugate Substrate Kit* fue comprado a *Biorad*. Las columnas para ultrafiltración *Microsep™ Advance Centrifugal Devices* fueron adquiridas de *Pall Life Sciences*.

3.1.4. Células y medios de cultivo

La cepa ER2738 [*F' proA⁺B⁺ lacI^a Δ(lacZ)M15 zzf:Tn10(Tet^R)/ fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5*] de *E. coli* fue obtenida de *New England Biolabs*. Las bacterias fueron cultivadas en medio LB líquido (10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl) o sólido (LB líquido suplementado con 17 g/L de agar bacteriológico). Cuando fue requerido, el medio LB fue suplementado con ampicilina [0.150 mg/mL] (LB/Amp). Las bacterias fueron recuperadas post-transformación en medio 2X YT (16 g/L de triptona, 10 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl). Los medios fueron preparados siguiendo protocolos estándar de laboratorio [Sambrook *et al.*, 2001].

La cepa INVSc1 [*MATa his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52*] de *S. cerevisiae* fue adquirida de *Thermo Fisher Scientific*. Las levaduras fueron cultivadas en medio YPD (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glucosa), o sintético SC carente de uracilo (6.7 g/L de *YNB*, 1.4 g/L de *Drop Out Medium*, 60 mg/L de leucina, 20 mg/L de histidina, 20 mg/L de triptófano) suplementado con una fuente de carbono (SC/Glu-Ura: 20 g/L de glucosa; SC/Raf-Ura: 20 g/L de rafinosa; SC/Gal-Ura: 20 g/L de galactosa). Cuando fue requerido, el medio líquido fue suplementado con 20 g/L de agar bacteriológico para obtener medios sólidos.

3.1.5. Plásmidos comerciales

El plásmido pYES2/CT, obtenido de *Invitrogen*, es un vector de expresión inducible de proteínas recombinantes en la levadura *S. cerevisiae* (Figura 3-1). pYES2/CT es un vector *shuttle* que contiene: (i) el origen de replicación para el bacteriófago f1 y el promotor del bacteriófago T7; (ii) el origen de replicación bacteriana ColE1 (pUC) y el gen codificante para la β-lactamasa, el cual confiere resistencia a ampicilina; y (iii) el origen de replicación 2μ de levadura y el gen codificante para la orotidina-5'-fosfato decarboxilasa (URA3), el cual complementa la auxotrofia a uracilo. Además, para la inducción proteica, contiene el

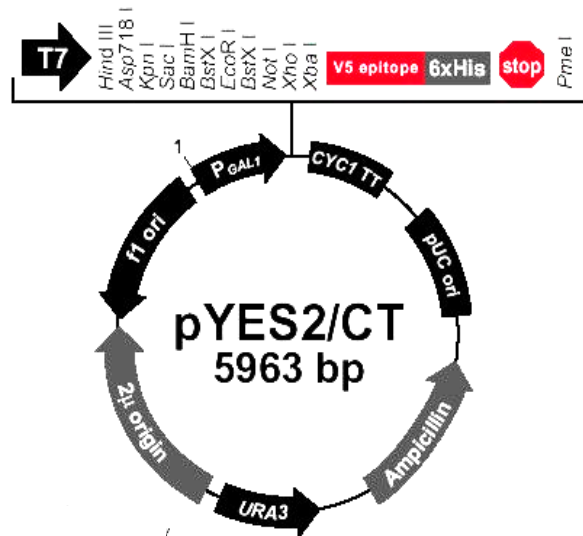


Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pYES2/CT.

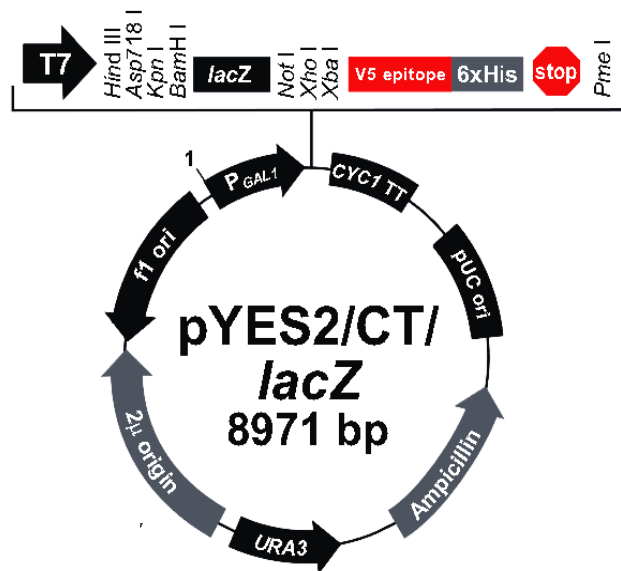


Figura 3-1. Representación esquemática del plásmido pYES2/CT/LacZ.

promotor GAL1 (inducible por galactosa) y el terminador CYC1, separados por un sitio de clonaciones múltiples (MCS). El plásmido pYES2/CT/LacZ, obtenido de *Invitrogen*, es un vector de expresión inducible de la proteína recombinante β -galactosidasa en la levadura *S. cerevisiae* (Figura 3-2). pYES2/CT/LacZ fue construido mediante la ligación de un fragmento de 3.1 kb, conteniendo el gen *lacZ*, en los sitios BamHI y NotI de pYES2/CT.

Cabe destacar que la β -galactosidasa se expresa en fusión (C-terminal) con el epítipo V5 y un hexámero de histidinas (6xHis).

3.1.6. Equipo y programas computacionales

Termociclador *Gadient Thermal Cycler Multigene de Labnet International Inc.*, incubadora para bacterias *Incubator Shaker Series 25 de New Brunswick Scientific Co.*, incubadora para levaduras *Incubated Shaker MaxQ 4450 de Thermo Scientific*, electroporador *Electro Cell Manipulator™ ECM® 630 de BTX Harvard Apparatus*, termobloque *VWR® Digital Dry Block Heater de VWR International*, centrífuga *Allegra™ X-22R de Beckman Coulter*, microcentrífuga refrigerada *Biocentrifuge Fresco de Heraeus*, microcentrífuga *MiniSpin® Plus de Eppendorf*, fotodocumentadores *GelDoc™ 2000 y GelDoc™ EZ de Biorad*, homogenizador *Disruptor Genie de Scientific Industries Inc.*, lector de microplacas *Microplate Reader 680 de Biorad*, espectrofotómetro *SmartSpec™ Plus Spectrophotometer de Biorad*, programas computacionales *MS Excel de Microsoft®*, *GraphPad Prism® v4.03 de GraphPad Software Inc.*, y *SnapGene v2.8 de GSL Biotech LLC*.

3.2. Construcción de los plásmidos de expresión de HUIFNA

3.2.1. Diseño de oligonucleótidos

La secuencia genómica codificante para la proteína interferón α_2 (IFNA2) de humano (NCBI Acc. NM_000605, Anexo 1) fue utilizada como molde para el diseño de iniciadores. Los oligonucleótidos sintéticos fueron adquiridos de la compañía *Operon Technologies*. La Tabla 3-1 muestra las características de los oligonucleótidos utilizados.

Tabla 3-1. Oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar las secuencias codificantes para la proteína HUIFNA.

Nombre	Secuencia (5' → 3') ¹	Adaptador
HUIFNAF1	catcataagccttatggccttgacctttgcttta	HindIII
HUIFNAF2	catcataagccttatgtgtgatctgcctcaaaccac	HindIII
HUIFNAR1	ccgccgtctagatttccttacttcttaaactttcttgc	XbaI

¹La secuencia de reconocimiento por la endonucleasa se muestra subrayada.

3.2.2. Amplificación de las secuencias HUIFNA

Los fragmentos HUIFNA-FL y HUIFNA-PM fueron amplificados mediante reacciones de *PCR* usando ADN genómico de humano como molde (obtenido de la reserva de productos biológicos del laboratorio de biotecnología, FCQI-UABC), oligonucleótidos específicos como iniciadores (Tabla 3-1), y *Pfu* ADN polimerasa como enzima de alta fidelidad. Las amplificaciones se realizaron en mezclas de reacción de 50 μ L de solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN polimerasa conteniendo 0.2 mM de dNTPs, 10 μ mol de cada oligonucleótido (FL: HUIFNAF1 y HUIFNAR1; PM: HUIFNAF2 y HUIFNAR1), 10 ng de ADN genómico de humano, y 2.5 U de *Pfu* ADN polimerasa.

Las condiciones de termociclado fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización inicial (94 °C durante 2 min), 35 ciclos de amplificación exponencial (94 °C durante 20 seg, 55 °C durante 20 seg, 72 °C durante 30 seg), y 1 ciclo de elongación final (72 °C durante 7 min). Al finalizar, los productos de *PCR* fueron mantenidos a 12 °C hasta retirarlos del equipo. Un décimo del volumen de reacción fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y visualizados utilizando bromuro de etidio como agente intercalante fluorogénico, Los productos de *PCR* fueron purificados usando el estuche comercial *QIAquick™ PCR Purification Kit*, siguiendo el protocolo estándar recomendado por el fabricante.

3.2.3. Digestión de los productos de PCR y el plásmido pYES2/CT

Los productos de *PCR* (HUIFNA-FL y HUIFNA-PM) y el plásmido pYES2/CT fueron digeridos con las endonucleasas HindIII y XbaI. Las digestiones se realizaron en mezclas de reacción de 20 μ L de solución amortiguadora 1X NEB2 conteniendo 1-2 μ g de muestra de ADN y 10-20 unidades enzimáticas. Las reacciones fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C. Los productos de digestión fueron purificados utilizando el estuche comercial *QIAquick™ PCR Purification Kit*, siguiendo el protocolo estándar recomendado por el fabricante.

3.2.4. Ligación de los fragmentos HUIFNA en el plásmido pYES2/CT

Los fragmentos HUIFNA-FL y HUIFNA-PM fueron sub-clonados en el vector PYES2/CT usando ADN ligasa del bacteriófago T4. Las ligaciones se realizaron en mezclas

de reacción de 10 μL de solución amortiguadora 1X para ADN ligasa conteniendo 7 μL de los productos de *PCR* digeridos, 1 μL del plásmido pYES2/CT digerido, y 400 U de T4 ADN ligasa. Las reacciones se incubaron en refrigeración (14-16 °C) durante la noche.

3.2.5. Transformación de *E. coli* y selección de transformantes

Las células de *E. coli* ER2738 competentes para transformación por choque térmico fueron preparadas siguiendo un protocolo estándar de tratamiento con CaCl_2 [Sambrook *et. al.*, 2001]. Microtubos conteniendo 100 μL de suspensión celular fueron suplementados con 2 μL de cada ligación, agitados levemente, y mantenidos en hielo durante 30 min. El choque térmico fue realizado mediante cambios súbitos de temperatura: 1.5 min a 42 °C (termobloque) y 5 min en hielo. Posteriormente, las células fueron recuperadas mediante la adición de 1 mL de medio 2X YT e incubadas durante 1 h a 37 °C. Las transformantes estables fueron seleccionadas mediante sembrado en medio LB/Amp sólido. Las cajas con medio sembrado fueron incubadas durante la noche a 37 °C. Para identificar células portadoras de plásmidos recombinantes, 7 unidades formadoras de colonia fueron amplificadas mediante crecimiento en medio LB/Amp líquido e incubación a 37 °C con agitación (300 rpm) durante toda la noche. Estos cultivos fueron utilizados para purificar plásmidos.

3.2.6. Purificación e identificación de plásmidos recombinantes

El ADN plasmídico de cada cultivo fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAprep™ Spin Miniprep Kit*, siguiendo el protocolo estándar recomendado por el fabricante. La identificación de los plásmidos recombinantes se llevó a cabo mediante un análisis de restricción con la endonucleasa HindIII. Las digestiones se realizaron en mezclas de reacción de 10 μL de solución amortiguadora 1X NEB2 conteniendo 3 μL de muestra de ADN plasmídico y 10 unidades enzimáticas. Las reacciones fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C. Los fragmentos de restricción fueron analizados mediante electroforesis en el gel de agarosa al 1% y visualizados utilizando bromuro de etidio como agente intercalante fluorogénico.

3.2.7. Secuenciación automática de ADN

La secuencia nucleotídica de los plásmidos recombinantes y fragmentos clonados fue verificada mediante secuenciación automática de ADN, utilizando los servicios de la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

3.3. Transformación de levaduras

3.3.1. Preparación de células electrocompetentes

Las células de *S. cerevisiae* INVSc1 competentes para transformación por choque eléctrico fueron preparadas siguiendo un protocolo estándar de tratamiento con sorbitol. Brevemente, una unidad formadora de colonia fue inoculada en 20 mL de medio YPD. El cultivo se incubó a 30 °C, con agitación vigorosa (300 rpm), durante 24 h. Enseguida, los paquetes celulares de 10 mL de cultivo fueron cosechados mediante centrifugación (5,000 Xg, 5 min, 4 °C), lavados con 2 mL de agua destilada fría (estéril) y con 0.25 mL de solución 1 M de sorbitol frío (estéril), y resuspendidos en 50 µL de solución 1 M de sorbitol.

3.3.2. Protocolo de electroporación y selección de transformantes

Los plásmidos fueron transfectados en las células de levadura electrocompetentes mediante un protocolo estándar de electroporación. En un microtubo, se prepararon mezclas conteniendo 1 µg del plásmido y 50 µL de células. Las mezclas se mantuvieron en hielo durante 5 min y se transfirieron a celdas de electroporación de 2 mm. El choque eléctrico fue ejecutado utilizando las siguientes condiciones: 25 µF de capacitancia, 200 ohms de resistencia, y 2.5 kV de voltaje. Inmediatamente después del pulso de eléctrico, las células fueron recuperadas en 1 mL de solución 1 M de sorbitol frío (estéril) e incubadas a 30 °C durante 15 min, con agitación suave (100 rpm). Las transformantes URA⁺ fueron seleccionadas en medio SC/Glu-Ura sólido. A partir de la suspensión de células recuperadas, una alícuota de 0.1 mL fue sembrada en la superficie del medio selectivo e incubada durante 48 h a 30 °C. Las unidades formadoras de colonias capaces de crecer en ausencia de uracilo (URA⁺) fueron consideradas como estables.

3.3.3. Identificación molecular del ADN plasmídico en levadura

La presencia episomal de los plásmidos (dentro de las levaduras transformadas) fue verificada mediante amplificación de los respectivos insertos. Una unidad formadora de colonia portadora del plásmido de interés fue inoculada en medio SC/Glu-Ura e incubada durante 24 h a 30 °C con agitación (300 rpm). La pastilla celular proveniente de 1 mL de cultivo fue cosechada mediante centrifugación (5,000 Xg, 5 min). El ADN plasmídico fue purificado utilizando el estuche comercial *QIAprep™ Spin Miniprep Kit*, siguiendo el protocolo estándar recomendado por el fabricante. Para verificar la presencia de los plásmidos de expresión de HUIFNA, los insertos correspondientes fueron amplificados mediante *PCR*. Las reacciones fueron llevadas a cabo en soluciones de 25 µL conteniendo *IX Taq Mix* (Qiagen), 10 pmol de cada oligonucleótido, y 2 µL de ADN plasmídico aislado. Los plásmidos puros fueron utilizados como control. Las condiciones de termociclado y el análisis de los productos fueron idénticas a las descritas anteriormente (Sección 3.3.2.).

3.4. Análisis de expresión de la proteína recombinante HUIFNA

3.4.1. Condiciones de cultivo e inducción de la expresión

Cultivos de levaduras INVSc1 portadoras de los plásmidos pYES2/CT/HUIFNA-FL o pYES2/CT/HUIFNA-PM fueron preparados en 5 mL de medio SC/Glu-Ura. Los cultivos fueron incubados a 30 °C durante 24 h (con agitación, 300 rpm). Enseguida, el paquete celular fue separado mediante centrifugación (5,000 rpm, 10 min) y resuspendido en 5 mL de medio SC/Raf-Ura. Los cultivos fueron incubados otras 24 h en las condiciones medioambientales antes mencionadas. Después, el paquete celular fue separado mediante centrifugación (5,000 rpm, 10 min) y resuspendido en 5 mL de medio SC/Gal-Ura. La expresión de proteínas fue promovida durante 48 h en las condiciones de incubación antes mencionadas. Finalmente, el cultivo celular fue separado mediante centrifugación (5,000 rpm, 10 min). Tanto el paquete celular como el sobrenadante fueron utilizados para analizar el nivel de expresión de proteína recombinante intra- y extracelular, respectivamente.

3.4.2. Obtención de fracciones de proteínas intra- y extracelulares

Las fracciones de proteínas intracelulares fueron obtenidas a partir del paquete celular, utilizando el estuche comercial *CellLytic™ Y Plus Kit* y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Por otro lado, las fracciones de proteínas extracelulares fueron obtenidas a partir del sobrenadante, siguiendo un protocolo estándar de precipitación con metanol y cloroformo [Wessel y Flügge, 1984].

3.4.3. Análisis de las fracciones de proteínas intra- y extracelulares

Alícuotas de cada fracción proteica fueron separadas en condiciones reductoras y desnaturizantes mediante electroforesis en gel de tricina, transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema electro-transferencia húmeda, y analizadas mediante inmuno-detección con anticuerpos dirigidos contra etiquetas moleculares.

3.4.4. Separación y electro-transferencia de proteínas

Alícuotas (15 μ L) de cada fracción de proteínas fueron mezcladas con 5 μ L de solución 4X de *Laemmli Sample Buffer (Biorad)* y desnaturizadas a 95 °C durante 10 min. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis en gel de tricina al 16.5% en las condiciones de corrida proporcionadas por un amortiguador Tris-Tricina. El gel fue preparado siguiendo un protocolo estándar [Schägger, 2006]. La separación de proteínas se realizó en dos etapas: la primera a 80 V (concentración) y la segunda a 120 V (resolución). La corrida se realizó utilizando dos soluciones amortiguadoras diferentes: *buffer* del cátodo (0.1 M de Tris, 0.1 M de Tricina, 0.1 % de SDS) y *buffer* del ánodo (0.2 M de Tris-HCl, pH 8.9). Posteriormente, las proteínas separadas en el gel fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema *Criterion™ Blotter (Biorad)*, siguiendo el protocolo estándar proporcionado por el fabricante.

3.4.5. Inmuno-detección con anticuerpos anti-etiquetas moleculares

La membrana de nitrocelulosa fue tratada durante la noche con solución de bloqueo (5% de leche *Svelty™ Nestle®*; 50 mM de NaCl; 0.05% de *Tween®* 20, y 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0). Al día siguiente, fue lavada 3 veces (10 min cada lavado) con solución de TBST (50 mM de NaCl; 0.05% de *Tween®* 20; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0). Para el

reconocimiento primario, fue tratada con una dilución 1:5,000 del anticuerpo monoclonal anti-V5 (diluido en TBST). Después de una 1 h de incubación a temperatura ambiente (con agitación constante), fue lavada 3 veces (10 min cada lavado) con solución de TBST. Para el reconocimiento secundario, fue tratada con una dilución 1:5,000 del anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (diluido en TBST). Después de 1 h de incubación a temperatura ambiente (con agitación constante), fue lavada 3 veces (10 min cada lavado) con solución de TBST. El inmuno-reconocimiento fue revelado mediante tratamiento con una solución de sustratos para fosfatasa alcalina (*Biorad*).

3.5. Expresión y producción de la proteína recombinante β -galactosidasa

3.5.1. Condiciones de cultivo e inducción de la expresión proteica

Cultivos de levaduras INVSc1 portadoras de los plásmidos pYES2/CT/LacZ fueron preparados en volúmenes de 25 mL. La proliferación celular en los medios SC/Glu-Ura y SC/Raf-Ura fue promovida en las condiciones de cultivo previamente utilizadas (Sección 3.4.1.). En cambio, la expresión de proteínas en medio SC/Gal-Ura fue inducida durante 72 horas (considerando las condiciones anteriormente señaladas). Para las cinéticas de producción (Sección 3.6.), se tomaron alícuotas (2 mL) del cultivo a tiempos: 0, 8, 23, 32, 47, 54, y 72 h con la finalidad de determinar las curvas (tendencias) de crecimiento celular, consumo de sustrato, y producción de proteína recombinante. Las alícuotas fueron separadas mediante centrifugación (5,000 rpm, 10 min) y tanto el paquete celular como el sobrenadante fueron utilizados para el análisis cinético.

3.5.2. Análisis de expresión de β -galactosidasa mediante inmuno-detección

Los extractos proteicos fueron obtenidos usando un estuche comercial (Sección 3.4.2.). La separación y electro-transferencia de proteínas fueron realizadas como se describió anteriormente (Sección 3.4.4.). La expresión fue determinada mediante inmuno-reconocimiento con anticuerpos dirigidos contra etiquetas moleculares como se detalló previamente (Sección 3.4.5.).

3.6. Cinética de crecimiento celular, consumo de sustrato y producción β -galactosidasa

3.6.1. Cinética de crecimiento celular

El crecimiento celular (biomasa) fue analizado mediante el registro de densidad óptica a 650 nm (DO_{650}). En una micro-placa de titulación, se prepararon diluciones 1:5 de las muestras de cultivo colectadas (0.08 mL del diluyente y 0.02 mL de cada cultivo). La DO_{650} fue registrada en un lector de micro-placas, usando 0.1 mL de diluyente como blanco. La biomasa fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$X = \frac{A - A_0}{0.02}$$

Donde, X representa la biomasa (en UDO_{650}/mL), A y A_0 los registros de DO_{650} de la muestra de cultivo y el blanco, respectivamente, y 0.02 el volumen de muestra analizado (en mL).

3.6.2. Cinética de consumo de galactosa

La concentración de galactosa (sustrato) fue determinada mediante un ensayo de azúcares reductores usando el método de ácido dinitrosalicílico (DNSA). Primeramente, se obtuvo la ecuación de una línea recta ($r^2 > 0.99$) a partir de una curva estándar realizada con soluciones de concentración conocida de galactosa (0 a 2.5 mM). Para la cinética de consumo de sustrato, el sobrenadante de cada muestra fue diluido hasta obtener un valor de A_{540} en el rango de linealidad (0 a 1.2) y posteriormente se calculó la concentración de galactosa utilizando la siguiente ecuación:

$$[Gal] = \frac{A_{540} - 0.4323}{0.5711}$$

donde la pendiente (m) está representada por el valor de 0.5711 y el intercepto (a) por 0.4323.

3.6.3. Cinética de producción de β -galactosidasa

Los valores de actividad β -galactosidasa fueron obtenidos mediante un ensayo de actividad enzimática específica usando una variante del método de Miller (Amberg *et al.* 2005). Los extractos proteicos intracelulares fueron obtenidos usando un estuche comercial (Sección 3.4.2.). La concentración de proteínas fue determinada espectrofotométricamente empleando un micro-ensayo como variante del método de *Bradford* (Zor y Selinger, 1996). La concentración de proteínas celulares totales fue calculada interpolando el resultado de la

relación A_{595}/A_{450} correspondiente al intervalo lineal ($r^2 > 0.99$) de una curva estándar de concentraciones conocidas de BSA (0 a 0.05 mg/mL). Para el ensayo de actividad β -galactosidasa, inicialmente se prepararon diluciones de los extractos intracelulares conteniendo 2-4 $\mu\text{g/mL}$ de proteína en un volumen final de 0.5 mL de solución amortiguadora Z (40 mM de Na_2HPO_4 ; 60 mM de NaH_2PO_4 ; 10 mM de KCl; 1 mM de MgSO_4 ; 50 mM de 2-mercaptoetanol; pH 7.0). Después de 2 min de incubación a 30 °C, 0.1 mL de solución de sustrato *o*-Nitrofenil-galactopiranosido (ONPG) a 4 mg/mL fueron añadidos y la reacción hidrolítica fue permitida durante 15 min (a 30 °C). Inmediatamente, la reacción fue detenida mediante la adición de 0.2 mL de una solución 0.5 M de Na_2CO_3 . El producto (*o*-nitrofenolato), de la acción enzimática sobre el sustrato, fue cuantificado mediante registros de A_{420} . La actividad específica enzimática (*AEE*) de la β -galactosidasa fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$AEE = \frac{A_{420}}{t \cdot C \cdot v}$$

donde t (en min) representa el tiempo de reacción, C (en mg/mL) la concentración de proteínas intracelulares correspondiente, y v (en mL) el volumen de muestra utilizado para la dilución inicial. La *AEE* de β -galactosidasa fue representada como KU por mg de proteína (KU/mg). Cada KU es el equivalente a 1.0 $\text{UA}_{420}/\text{min}$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1.1. Obtención de los plásmidos de expresión de la proteína HUIFNA

Las secuencias codificantes para el péptido completo (FL) y el correspondiente péptido maduro (PM) de la proteína HUIFNA fueron específicamente obtenidas mediante amplificación molecular (*PCR*), utilizando oligonucleótidos sintéticos como iniciadores y ADN genómico de humano como molde. En consideración a la longitud de la secuencia codificante para el péptido completo (FL = 564 pb) y para el péptido maduro (PM = 495 pb), fue posible predecir la longitud esperada para los respectivos productos de *PCR*. Como se muestra en la Figura 4-1, ambos fragmentos muestran una longitud similar del tamaño esperado, calculado teóricamente para FL de 588 pb y para PM de 519 pb, lo que sugiere una amplificación exitosa.

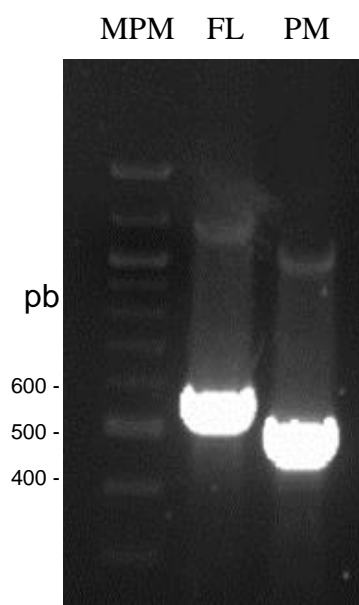


Figura 4-1. Análisis de los productos de *PCR* del gen codificante para la proteína HUIFNA (FL y PM).

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. MPM, marcador de peso molecular (100-bp, *New England Biolabs*).

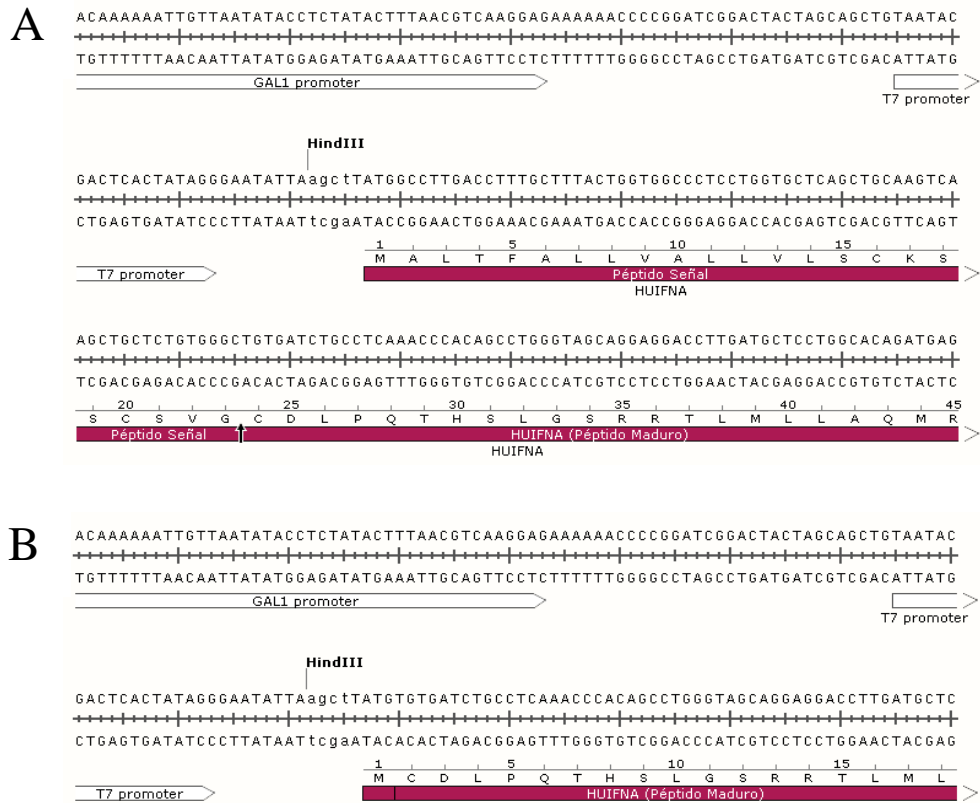


Figura 4-2. Representación esquemática de la secuencia nucleotídica obtenida después de la inserción de las variantes de HUIFNA (FL y PM) en el plásmido pYES2/CT.

Sitios de inserción (HindIII) de las secuencias codificantes para el extremo amino-terminal del péptido completo (A) y del péptido maduro (B). Parte de la secuencia del promotor GAL1 y el promotor T7 también se indican.

Los productos de *PCR* fueron posteriormente ligados en el plásmido de expresión en levadura pYES2/CT mediante una estrategia de clonación direccional, donde los insertos y el vector fueron digeridos con las enzimas de restricción HindIII y XbaI, lo que permite la inserción de las secuencias HUIFNA (FL y PM) bajo el control del promotor GAL1 y en fase con las etiquetas moleculares (V5 y 6xHis). La Figura 4-2 muestra una representación esquemática de la secuencia obtenida (en el N-terminal) después de la inserción de FL y PM.

En esta etapa del proyecto, cabe destacar que la propuesta consideró la noción de construir dos vectores de expresión en *S. cerevisiae* para fines distintos: uno de localización citosólica (pYES2/CT-HUIFNA-PM), para producir altos niveles de péptido maduro; y otro con potencial de localización extracelular (pYES2/CT-HUIFNA-FL), para comprobar si el péptido señal del precursor HUIFNA es reconocido por el sistema de exportación de

proteínas en levadura y tener la posibilidad de utilizarlo como etiqueta de secreción de proteínas humanas con potencial biofarmacéutico. Esta última noción ha sido demostrada en dos proteínas residentes del retículo endoplásmico en células humanas, ERp57 (una proteína disulfuro isomerasa) [Ciplys *et al.*, 2013] y calreticulina (una lectina) [Ciplys *et al.*, 2015].

Después de transfectar bacterias (*E. coli* ER2738) con las ligaciones, las transformantes estables fueron seleccionadas por su habilidad de resistir el efecto antibiótico de la ampicilina (Amp^R). Posteriormente, el ADN plasmídico de siete unidades formadoras de colonia independientes fue purificado y analizado mediante la liberación del inserto (usando las endonucleasas HindIII y XbaI). Afortunadamente, todos los plásmidos aislados contenían el inserto del tamaño esperado (resultado no mostrado). Ante esto, el ADN plasmídico proveniente de cada una de las clonaciones fue enviado a un servicio de secuenciación automática. Después de verificar la autenticidad de la secuencia nucleotídica, los plásmidos fueron aislados en alta pureza para transfectar levaduras.

4.1.2. Obtención de cepas de levadura productoras de HUIFNA

Los ensayos de producción de HUIFNA se realizaron en la cepa INVSc1 de *S. cerevisiae*. Inicialmente, células de levadura competentes fueron transfectadas con 1 µg de cada plásmido. Posterior a un periodo de recuperación en sorbitol a 1 M, las células transformantes estables fueron seleccionadas en medio completo sintético suplementado con glucosa y carente de uracilo (SC/Glu-Ura). Previo al análisis de producción, la presencia de los plásmidos fue corroborada mediante amplificación específica de los insertos. Para cada transformación, una unidad formadora de colonia fue cultivada en medio SC/Glu-Ura y el ADN plasmídico fue extraído a partir de 1 mL de cultivo. Para contrastar el resultado, las amplificaciones (*PCR*) fueron realizadas utilizando una muestra de ADN plasmídico de alta pureza como control. Como se puede observar en la Figura 4-3, los productos amplificados corresponden a los esperados para los plásmidos de expresión que portan a HUIFNA.

El análisis de expresión de HUIFNA en levaduras fue realizado inicialmente en medios de cultivo que favorecen la proliferación celular (SC/Glu-Ura y SC/Raf-Ura, 24 h

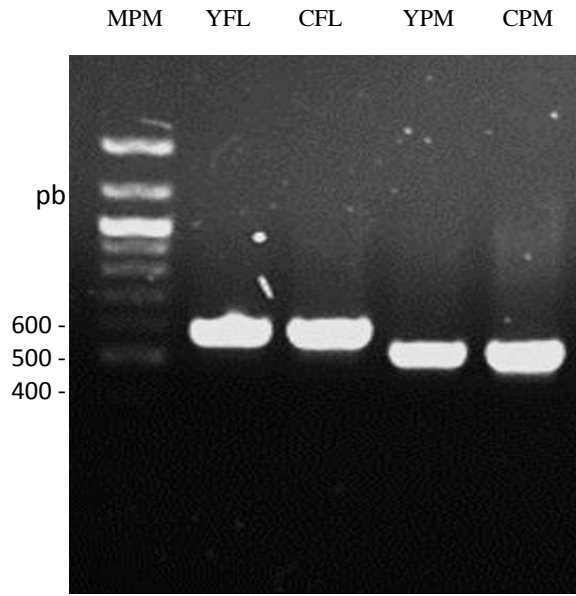


Figura 4-3. Análisis de los productos de *PCR* obtenidos a partir de extractos plasmídicos de las células de levadura portadoras de los plásmidos de expresión de HUIFNA (YFL y YPM) y sus respectivos controles (CFL y CPM).

Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. MPM, marcador de peso molecular (100-bp, *New England Biolabs*).

cada uno), seguido de un periodo de 48 h en medio de cultivo de inducción de la expresión proteica (SC/Gal-Ura). Después de una separación mediante centrifugación, el paquete celular (fracción intracelular) y el sobrenadante (fracción extracelular) fueron analizados para determinar cualitativamente el nivel de expresión de HUIFNA. Desafortunadamente, los ensayos de inmuno-reconocimiento utilizando anticuerpos dirigidos contra etiquetas (V5 y 6xHis) no fueron concluyentes, ya que no fue posible detectar una proteína del tamaño esperado (22-23 kDa). Con base en estos resultados (preliminares), es posible suponer que el proceso de producción de HUIFNA (a partir de los plásmidos obtenidos en el presente trabajo) demanda un protocolo estandarizado, y de ser posible optimizado, que garantice elevados niveles de expresión de la proteína recombinante. Con este fin, se realizó un procedimiento estándar de expresión y producción de la enzima β -galactosidasa, utilizando el plásmido comercial pYES2/CT/LacZ en el mismo sistema de expresión y siguiendo la cinética de producción.

4.1.3. Obtención de una cepa de levadura productora de β -galactosidasa

Los ensayos de producción de la de β -galactosidasa se realizaron en la cepa INVSc1 de *S. cerevisiae*. Inicialmente, células de levadura competentes fueron transfectadas con 1 μ g del plásmido pYES2/CT/LacZ. Posterior a un periodo de recuperación en sorbitol 1 M, las células transformantes estables fueron seleccionadas en medio completo sintético suplementado con glucosa y carente de uracilo (SC/Glu-Ura). El análisis de expresión de β -galactosidasa en levaduras fue realizado inicialmente en medios de cultivo que favorecen la proliferación celular (SC/Glu-Ura y SC/Raf-Ura, 24 h cada uno), seguido de un periodo de 48 h en medio de cultivo de inducción de la expresión proteica (SC/Gal-Ura). Después de una separación mediante centrifugación, el paquete celular (fracción intracelular) y el sobrenadante (fracción extracelular) fueron analizados para determinar cualitativamente el nivel de expresión de β -galactosidasa. Los ensayos de inmuno-reconocimiento utilizando anticuerpos dirigidos contra el epítipo V5 revelaron una proteína del tamaño esperado, 120 kDa, en la fracción intracelular (Figura 4-4). Adicionalmente, los ensayos bioquímicos mostraron una actividad enzimática aceptable (13.3 KU/mg). Ambos resultados sugieren una producción de β -galactosidasa funcionalmente activa.

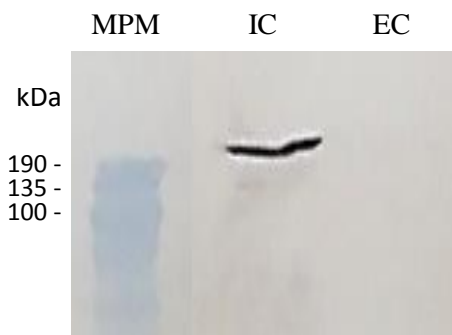


Figura 4-4. Análisis de expresión de la β -galactosidasa recombinante en extractos proteicos de levaduras portadoras del plásmido pYES2/CT/LacZ.

Inmuno-detección de β -galactosidasa con anti-V5. Los extractos intra- (IC) y extra-celulares (EC) fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. MPM, marcador de peso molecular (11-190 kDa, *New England Biolabs*).

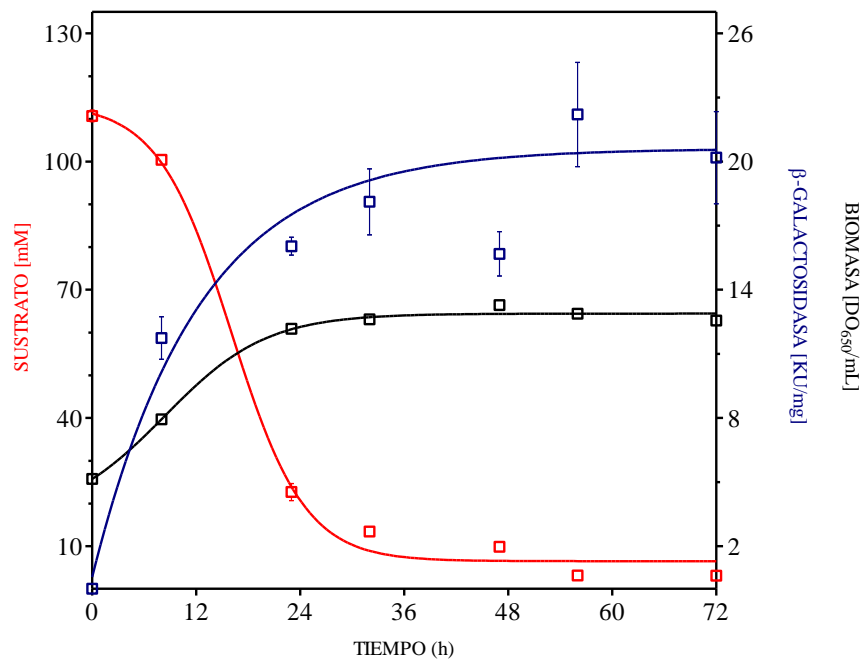


Figura 4-5. Cinéticas de crecimiento celular (biomasa, línea negra), consumo de sustrato (galactosa, línea roja), producción de b-galactosidasa (producto, línea azul).

Los valores de la media y su desviación estándar están representados en cuadros abiertos con barras de dispersión.

4.1.4. Análisis de producción de β-galactosidasa

La producción de β-galactosidasa fue analizada siguiendo un procedimiento estándar de expresión y producción de la enzima β-galactosidasa durante un periodo de 72 h de inducción. Las cinéticas de crecimiento celular, consumo de sustrato, y producción de proteína recombinante fueron valoradas mediante muestreo del cultivo celular a diferentes tiempos: 0, 8, 23, 32, 47, 54 y 72 h (Tabla 4-1, Figura 4-5). El crecimiento celular (biomasa) fue determinado mediante registros de DO₆₅₀/mL, el consumo de galactosa (sustrato) mediante un protocolo estándar de cuantificación de azúcares reductores (método de DNSA), y la producción de β-galactosidasa (producto) mediante un ensayo estándar de evaluación de la actividad enzimática. Además, el contenido de proteínas celulares totales (útil como alternativa para valorar el crecimiento celular y requerido para el cálculo de actividad enzimática específica) fue cuantificado mediante una variante del micro-ensayo de *Bradford*.

Tabla 4-1. Resultados de las cinéticas de crecimiento celular, consumo de sustrato (galactosa) y producción de β -galactosidasa. La cuantificación de proteínas celulares totales también se muestra (n = 3, media \pm D.E.).

Tiempo (h)	Crecimiento Celular (DO ₆₅₀ /mL)	Azúcares Reductores (mM)	Proteínas Totales (mg/mL)	β -Galactosidasa (KU/mg)
0	5.1 \pm 0.5	110.6 \pm 3.3	0.18 \pm 0.03	0.0
8	7.9 \pm 0.5	100.4 \pm 2.7	0.27 \pm 0.05	11.7 \pm 2.4
23	12.2 \pm 0.4	22.6 \pm 4.9	0.40 \pm 0.05	16.0 \pm 1.0
32	12.6 \pm 0.5	13.4 \pm 2.3	0.32 \pm 0.07	18.1 \pm 3.8
47	13.3 \pm 0.5	9.9 \pm 0.9	0.29 \pm 0.09	15.7 \pm 2.6
54	12.9 \pm 0.3	3.1 \pm 0.4	0.31 \pm 0.06	22.2 \pm 6.0
72	12.6 \pm 0.5	3.1 \pm 0.2	0.26 \pm 0.08	20.2 \pm 5.3

La Tabla 4-1 resume los resultados obtenidos de cada una de las determinaciones. Adicionalmente, esos resultados se representan gráficamente en la Figura 4-5. Como era esperado, el crecimiento celular mostró una tendencia ascendente típica de una curva exponencial, mostrando una tasa específica de crecimiento de $0.075 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$. Interesantemente, el consumo de galactosa exhibió una tendencia inversamente proporcional el crecimiento, revelando una tasa específica de consumo de $0.050 \pm 0.006 \text{ h}^{-1}$. Por otro lado, la producción de β -galactosidasa también desarrolló una tendencia ascendente exponencial, presentando una tasa específica de producción de $0.081 \pm 0.019 \text{ h}^{-1}$. Considerando que los valores máximos en las tres cinéticas se alcanzan después de 32 h de cultivo (Figura 4-6), se realizó un análisis de rendimiento relativo (tomando el respectivo valor máximo como 100%) para determinar el tiempo en el que se alcanzan rendimientos superiores al 90%. Como se observa en la Figura 4-6, a las 28 h de cultivo se obtienen rendimientos considerados como aceptables. En conjunto, los resultados sugieren que el protocolo de expresión y producción de β -galactosidasa recombinante propuesto en el presente trabajo puede ser adecuado (como procedimiento inicial) para el análisis de proteínas de interés biotecnológico y biofarmacéutico: medio SC/Glu (24 h), medio SC/Raf (24 h), y medio SC/Gal (28 h); preferentemente en cultivos de 25 mL.

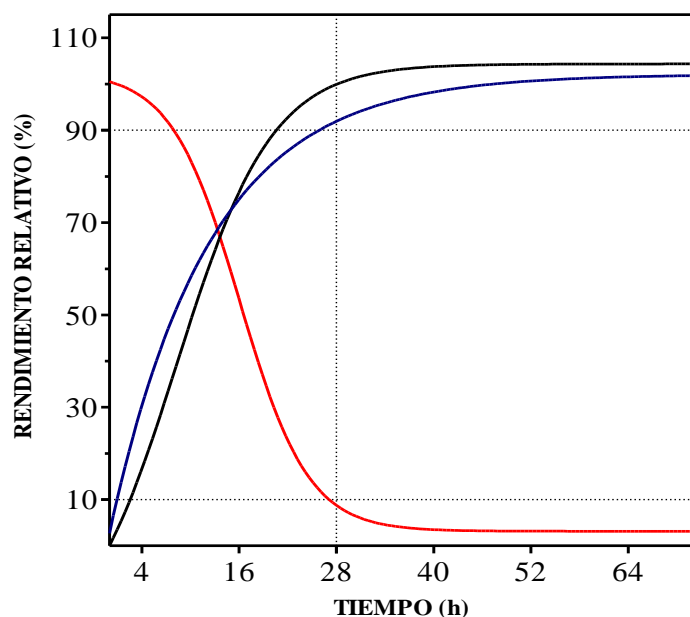


Figura 4-6. Representación esquemática de los rendimientos relativos de las cinéticas de crecimiento celular (negro), consumo de sustrato (rojo), y producción de proteína recombinante (azul).

4.1.5. Rendimientos de producción

Finalmente, los rendimientos de producción fueron calculados tomando en cuenta los datos obtenidos a las 32 horas: (i) 77.2 UDO₆₅₀ por cada mmol de galactosa consumida, (ii) 96.5 U/mg de β-galactosidasa por cada UDO₆₅₀ desarrollada, y (iii) 7.5 KU/mg de β-galactosidasa por cada mmol de galactosa consumida.

5. CONCLUSIONES

Mediante técnicas estándar de clonación molecular, se obtuvieron 2 vectores de expresión en levadura que portan la secuencia codificante para la proteína interferón α de humano bajo el control del promotor GAL1 (inducible con galactosa) y en fase con dos etiquetas moleculares: V5 (para inmuno-detección) y 6xHis (para inmuno-detección y purificación mediante cromatografía de afinidad).

El análisis de expresión de la proteína recombinante interferón α de humano, en cultivos de levaduras que portan los plásmidos previamente obtenidos, mostró una producción deficiente de las variantes completa (FL) y madura (PM) en las fracciones analizadas (intra- y extra-celulares). Por otro lado, el análisis de expresión de la proteína recombinante β -galactosidasa de bacteria exhibió una eficiente producción de enzima activa en lisados intra-celulares de levaduras portadoras del plásmido pYES2/CT/LacZ.

Mediante un análisis de las cinéticas de crecimiento celular, consumo de sustrato, y producción de β -galactosidasa, se estableció un procedimiento estándar (como primera alternativa) para la producción de proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico y biotecnológico.

En relación a la expresión y producción de interferón α de humano, se proponen tres variables que pudieran facilitar el análisis del producto: (i) uso de controles o testigos de producción, usando el mismo sistema de expresión, (ii) uso de un inmuno-ensayo enzimático, tipo ELISA, para determinar el nivel de expresión, y (iii) utilizar otras células de levadura que favorezcan la expresión de proteínas recombinantes, p. ej. la cepa Regal, la cual porta un plásmido (pRegal) que favorece la sobre-expresión constitutiva de tres proteínas (Gal3p, Gal4p, y Gal80p) que activan al promotor GAL1.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Amberg DC, Burke DJ, Strathem JN. *Methods in Yeast Genetics: a CSHL Course Manual*. 2005 Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2005.
- Asmana Ningrum R. Human interferon alpha-2b: a therapeutic protein for cancer treatment. *Scientifica (Cairo)*. 2014; 2014: 970315.
- Ayyar VS. History of growth hormone therapy. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011; 15 Suppl 3: S162-5.
- Basile G, Peticca M. Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol*. 2009; 43 (3): 273-8.
- Bergman LW. Growth and maintenance of yeast. *Methods Mol Biol*. 2001; 177: 9-14.
- BIOPHARMA®: Biopharmaceutical Products in the U.S. and European Markets. (www.biopharma.com/approvals.html, consultada el 06 de Febrero de 2016).
- Boender LG, Almering MJ, Dijk M, van Maris AJ, *et al*. Extreme calorie restriction and energy source starvation in *Saccharomyces cerevisiae* represent distinct physiological states. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813 (12): 2133-44.
- Cepononyte S, Bruzyte S, Melvydas V, Serviene E. Production of heterologous proteins using *S. cerevisiae* expression system. *Biologija* 2008; 54 (3): 178-82.
- Chigira Y, Oka T, Okajima T, Jigami Y. Engineering of a mammalian O-glycosylation pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: production of O-fucosylated epidermal growth factor domains. *Glycobiology*. 2008; 18 (4): 303-14.
- Ciplys E, Zitkus E, Gold LI, Daubriac J, Pavlides SC, Højrup P, Houen G, Wang WA, Michalak M, Slibinskas R. High-level secretion of native recombinant human calreticulin in yeast. *Microb Cell Fact*. 2015; 14 (1): 165.
- Ciplys E, Zitkus E, Slibinskas R. Native signal peptide of human ERp57 disulfide isomerase mediates secretion of active native recombinant ERp57 protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif*. 2013; 89 (2): 131-5.
- Dukkipati A, Park HH, Waghay D, Fischer S, Garcia KC. BacMam system for high-level expression of recombinant soluble and membrane glycoproteins for structural studies. *Protein Expr Purif*. 2008; 62 (2): 160-70.
- Eckart MR, Bussineau CM. Quality and authenticity of heterologous proteins synthesized in yeast. *Curr Opin Biotechnol*. 1996; 7 (5): 525-30.
- EL-Baky NA, Linjawi MH, Redwan EM. Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnol*. 2015; 15: 14.
- Forster J, Famili I, Fu P, Palsson BØ, Nielsen J. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res*. 2003; 13 (2): 244-53.
- Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Curr Protoc Protein Sci*. 2010; Chapter 5: Unit 5.24. 1-29.
- Gamboa RA, Trujillo-Roldán MA Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano. *Residente*. 2009; 4 (3): 87-91.
- Gull I, Samra ZQ, Aslam MS, Athar MA. Heterologous expression, immunochemical and computational analysis of recombinant human interferon alpha 2b. *Springerplus*. 2013; 2 (1): 264.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund M. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 74 (5): 937-53.
- Hesse F, Wagner R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends Biotechnol*. 2000; 18 (4): 173-80.
- Kappeli O. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts. *Adv Microb Physiol*. 1986; 28: 181-209.
- Keen H, Glynne A, Pickup JC, Viberti GC, Bilous RW, Jarrett RJ, Marsden R. Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycaemic potency in healthy men. *Lancet*. 1980; 2 (8191): 398-401.
- Keppeke GD, Calise SJ, Chan EK, Andrade LE. Anti-rods/rings autoantibody generation in hepatitis C patients during interferon- α /ribavirin therapy. *World J Gastroenterol*. 2016; 22 (6): 1966-74.

- Lee PS, Lee KH. *Escherichia coli*--a model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. *Biotechnol Bioeng*. 2003; 84 (7): 801-14.
- Li H, Li X, Liu Q, Shi Z, Shi D. Expression of biologically active human recombinant interferon alpha 2b in human breast cancer cell line Bcap-37. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013; 171 (6): 1535-44.
- Liu Z, E.J Tyo K, Martinez J.L, Petranovic D, Nielsen J. Different expression systems for production of recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng*. 2012; 109 (5): 1259-68.
- Madzak C, Treton B, Blanchin-Roland S. Strong hybrid promoters and interactive expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression on heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2000; 2 (2): 207-16.
- Mortimer RK, Johnston JR. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*. 1986; 113 (1): 35-43.
- Nasser MW, Pooja V, Abdin MZ, Jain SK. Evaluation of yeast as an expression system. *Indian J Biotechnology*. 2003; 2 (4): 477-93.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol*. 2004; 267: 15-52.
- Pivarnik LF, Senecal AG, Rand AG. Hydrolytic and transgalactosyl activities of commercial beta-galactosidase (lactase) in food processing. *Adv Food Nutr Res*. 1995; 38: 1-102.
- Rader RA. Expression systems for process and product improvement: a perspective on opportunities for innovator and follow-on product developers. *BioProcess International* 2008; 6: S4-S9.
- Robinson AS, Hines V, Wittrup KD. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technology*. 1994; 12 (4): 381-4.
- Salgueiro SP, Sá-Correia I, Novais JM. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. *Appl Environ Microbiol*. 1988; 54 (4): 903-9.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Schägger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc*. 2006;1 (1): 16-22.
- Schmidt F. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 65 (4): 363-72.
- Sibley E. Genetic variation and lactose intolerance: detection methods and clinical implications. *Am J Pharmacogenomics*. 2004; 4 (4): 239-45.
- Splechtna B, Nguyen TH, Haltrich D. Comparison between discontinuous and continuous lactose conversion processes for the production of prebiotic galacto-oligosaccharides using beta-galactosidase from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem*. 2007; 55 (16): 6772-7.
- Verduyn C. Physiology of yeasts in relation to biomass yields. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1991; 60 (3-4): 325-53.
- Vieira ED, Andrietta Mda G, Andrietta SR. Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy. *Braz J Microbiol*. 2013; 44 (2): 551-8.
- Walsh, G., Headon, D. R. *Protein Biotechnology*. John Wiley and Sons. 1995. 1: 13-15.
- Wang N, Zhang Y, Wang Q, Liu J, *et al*. Gene cloning and characterization of a novel α -amylase from alkaliphilic *Alkalimonas amylolytica*. *Biotechnol J*. 2006; 1: 1258-65.
- Wessel D, Flüggé UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*. 1984; 138 (1): 141-3.
- Wheatley RW, Lo S, Jancewicz LJ, Dugdale ML, Huber RE. Structural explanation for allolactose (lac operon inducer) synthesis by lacZ β -galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the lac repressor. *J Biol Chem*. 2013; 288 (18): 12993-3005.
- Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*. 1996; 236 (2): 302-8.

7. ANEXOS

Homo sapiens interferon, alpha 2 (IFNA2), mRNA (NCBI Ref. Seq. NM_000605)

LOCUS NM_000605 1143 bp mRNA linear PRI 14-MAY-2014
DEFINITION Homo sapiens interferon, alpha 2 (IFNA2), mRNA.
ACCESSION NM_000605
VERSION NM_000605.3 GI:209413719
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Yamaguchi M, Kitagawa Y, Zhou M, Itoh M and Gotoh B.
TITLE An anti-interferon activity shared by paramyxovirus C proteins:
inhibition of Toll-like receptor 7/9-dependent alpha interferon
induction
JOURNAL FEBS Lett. 588 (1), 28-34 (2014)
PUBMED [24269682](#)
REMARK GeneRIF: Data indicate the ability of C protein to block Toll-like
receptor (TLR) 7- and TLR9-dependent IFN-alpha induction.

REFERENCE 2 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Cachat A, Chevalier SA, Alais S, Ko NL, Ratner L, Journo C,
Dutartre H and Mahieux R.
TITLE Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2
de novo infection through PKR activation
JOURNAL J. Virol. 87 (24), 13386-13396 (2013)
PUBMED [24089560](#)
REMARK GeneRIF: IFNA2 inhibits viral protein expression through PKR
activation, leading to a decrease of viral protein synthesis.

REFERENCE 3 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Erb HH, Langlechner RV, Moser PL, Handle F, Casneuf T, Verstraeten
K, Schlick B, Schafer G, Hall B, Sasser K, Culig Z and Santer FR.
TITLE IL6 sensitizes prostate cancer to the antiproliferative effect of
IFNalpha2 through IRF9
JOURNAL Endocr. Relat. Cancer 20 (5), 677-689 (2013)
PUBMED [23913484](#)
REMARK GeneRIF: IL6 is an inducer of IRF9 expression in prostate cancer
and a sensitizer for the antiproliferative effects of IFNalpha2.
Publication Status: Online-Only

REFERENCE 4 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Becker-Merok A, Ostli-Eilersten G, Lester S and Nossent J.
TITLE Circulating interferon-alpha2 levels are increased in the majority
of patients with systemic lupus erythematosus and are associated
with disease activity and multiple cytokine activation
JOURNAL Lupus 22 (2), 155-163 (2013)
PUBMED [23213068](#)
REMARK GeneRIF: The association with clinical disease and activation of
multiple inflammatory cytokines supports a role for IFN-alpha2 in
disease perpetuation in a large subset of systemic lupus
erythematosus patients.

REFERENCE 5 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Hardy GA, Sieg S, Rodriguez B, Anthony D, Asaad R, Jiang W, Mudd J,
Schacker T, Funderburg NT, Pilch-Cooper HA, Debernardo R, Rabin RL,
Lederman MM and Harding CV.
TITLE Interferon-alpha is the primary plasma type-I IFN in HIV-1
infection and correlates with immune activation and disease markers

JOURNAL PLoS ONE 8 (2), E56527 (2013)
PUBMED [23437155](#)
REMARK GenerIF: These studies identify IFNalpha derived from lymph nodes, rather than blood leukocytes, as a possible source of the IFN-I signature that contributes to immune activation in HIV-1 infection

REFERENCE 6 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Olopade OI, Bohlander SK, Pomykala H, Maltepe E, Van Melle E, Le Beau MM and Diaz MO.
TITLE Mapping of the shortest region of overlap of deletions of the short arm of chromosome 9 associated with human neoplasia
JOURNAL Genomics 14 (2), 437-443 (1992)
PUBMED [1385305](#)
REFERENCE 7 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Flores I, Mariano TM and Pestka S.
TITLE Human interferon omega (omega) binds to the alpha/beta receptor
JOURNAL J. Biol. Chem. 266 (30), 19875-19877 (1991)
PUBMED [1834641](#)
REFERENCE 8 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Adolf GR, Kalsner I, Ahorn H, Maurer-Fogy I and Cantell K.
TITLE Natural human interferon-alpha 2 is O-glycosylated
JOURNAL Biochem. J. 276 (PT 2), 511-518 (1991)
PUBMED [2049076](#)
REFERENCE 9 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Oliver,G., Balbas,P., Valle,F., Soberon,X. and Bolivar,F.
TITLE [Cloning of human leukocyte interferon cDNA and a strategy for its production in E. coli]
JOURNAL Rev. Latinoam. Microbiol. 27 (2), 141-150 (1985)
PUBMED [3906813](#)
REFERENCE 10 (bases 1 to 1143)
AUTHORS Streuli,M., Nagata,S. and Weissmann,C.
TITLE At least three human type alpha interferons: structure of alpha 2
JOURNAL Science 209 (4463), 1343-1347 (1980)
PUBMED [6158094](#)
COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [AL353732.14](#) and [BC104163.1](#). This sequence is a reference standard in the [RefSeqGene](#) project. On Oct 11, 2008 this sequence version replaced [gi:11067750](#).

Summary: This gene is a member of the alpha interferon gene cluster on chromosome 9. The encoded protein is a cytokine produced in response to viral infection. Use of the recombinant form of this protein has been shown to be effective in reducing the symptoms and duration of the common cold. [provided by RefSeq, Jun 2011].

Sequence Note: This RefSeq record was created from transcript and genomic sequence data because no single transcript was available for the full length of the gene. The extent of this transcript is supported by transcript alignments and experimental data.

Publication Note: This RefSeq record includes a subset of the publications that are available for this gene. Please see the Gene record to access additional publications.

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

PRIMARY	REFSEQ_SPAN	PRIMARY_IDENTIFIER	PRIMARY_SPAN	COMP
	1-23	AL353732.14	42112-42134	c
	24-828	BC104163.1	1-805	
	829-1143	AL353732.14	40992-41306	c

FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1143
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:9606"
/chromosome="9"

```

/ map="9p22"
gene 1..1143
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ note="interferon, alpha 2"
/ db_xref="GeneID:3440"
/ db_xref="HGNC:HGNC:5423"
/ db_xref="HPRD:00950"
/ db_xref="MIM:147562"
exon 1..1143
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ inference="alignment:Splign:1.39.8"
misc_feature 15..17
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ note="upstream in-frame stop codon"
STS 19..1085
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ db_xref="UniSTS:481663"
STS 24..828
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ db_xref="UniSTS:489668"
STS 25..685
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ db_xref="UniSTS:482177"
CDS 69..635
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ note="alpha-2a interferon; interferon alpha 2b;
interferon alpha A; leIF A; IFN-alpha-2; interferon alpha
2a"
/ codon_start=1
/ product="interferon alpha-2 precursor"
/ protein_id="NP_000596.2"
/ db_xref="GI:11067751"
/ db_xref="CCDS:CCDS6506.1"
/ db_xref="GeneID:3440"
/ db_xref="HGNC:HGNC:5423"
/ db_xref="HPRD:00950"
/ db_xref="MIM:147562"
/ translation="MALTFALLVALLVLSCKSSCSVGC DLPQTHSLGSRRTLMLLAQM
RRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDET
LLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSP
CAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLSRKE"
sig_peptide 69..137
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/ note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P01563.1)"
mat_peptide 138..632
/ gene="IFNA2"
/ gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/ product="Interferon alpha-2"
/ experiment="experimental evidence, no additional details
recorded"
/ note="propagated from UniProtKB/Swiss-Prot (P01563.1)"
STS 707..921
/ gene="IFNA2"

```

```

/gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/standard_name="SHGC-35327"
/db_xref="UniSTS:1258"
STS 722..941
/gene="IFNA2"
/gene_synonym="IFN-alphaA; IFNA; IFNA2B; INFA2"
/standard_name="STS-J00207"
/db_xref="UniSTS:72255"

```

ORIGIN

```

1 gagaacctgg agcctaaggt ttaggctcac ccatttcaac cagtctagca gcactctgcaa
61 catctacaat ggccttgacc tttgctttac tgggtggcct cctgggtgctc agctgcaagt
121 caagctgctc tgtgggctgt gatctgcctc aaaccacag cctgggtgagc aggaggacct
181 tgatgctcct ggcacagatg aggagaatct ctcttttctc ctgcttgaag gacagacatg
241 actttggatt tccccaggag gagtttgga accagttcca aaaggctgaa accatccctg
301 tcctccatga gatgatccag cagatcttca atctcttcag cacaaaaggac tcatctgctg
361 cttgggatga gaccctccta gacaaattct aactgaact ctaccagcag ctgaatgacc
421 tgggaagcctg tgtgatacag ggggtggggg tgacagagac tcccctgatg aaggaggact
481 ccattctggc tgtgaggaaa tacttccaaa gaatcactct ctatctgaaa gagaagaaat
541 acagcccttg tgcctgggag gttgtcagag cagaaatcat gagatctttt tctttgtcaa
601 caaacttgca agaaagtta agaagtaagg aatgaaaact ggttcaacat ggaaatgatt
661 ttcattgatt cgtatgccag ctcacctttt tatgatctgc catttcaaag actcatgttt
721 ctgctatgac catgacacga tttaaatctt ttcaaatggt tttaggagta ttaatcaaca
781 ttgtattcag ctcttaaggc actagtcctt tacagaggac catgctgact gatccattat
841 ctattttaat atttttaaaa tattatttat ttaactattt ataaaaaac ttatttttgt
901 tcatattatg tcatgtgcac ctttgcacag tggttaatgt aataaaatat gttctttgta
961 tttggtaaat ttatttttgt ttgttcattg aacttttgct atggaaactt ttgtacttgt
1021 ttattcttta aaatgaaatt ccaagcctaa ttgtgcaacc tgattacaga ataactggta
1081 cacttcattt atccatcaat attatattca agatataagt aaaaataaac tttctgtaaa
1141 cca

```

//