

31
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION EN Pichia pastoris DEL ECTODOMINIO DEL BETAGLICANO EL RECEPTOR TIPO III DEL TGF- beta

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
GABRIELA COSIO GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO LOPEZ CASILLAS



TESIS CON FALLA DE ORIGEN



1997

**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Expresión en Pichia pastoris del ectodominio del
betaglicano, el receptor tipo III del TGF-beta.

realizado por Gabriela Cosío García.

con número de cuenta 9250133-1 . pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Fernando López Casillas.

Propietario

M. en I.B.B. Emma Cecilia Saavedra Lira.

Propietario

M. en C. Víctor Manuel Valdés López

Suplente

Dra. Irma Romero Alvarez.

Suplente

M. en I.B.B. Saúl Cano Colín.

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINACION GENERAL
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Fernando López Casillas en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y con el financiamiento del proyecto 400346-5-2364PN auspiciado por CONACYT.

Agradecimientos.

Al Dr. Fernando López Casillas por haberme permitido realizar el presente trabajo en su laboratorio, así como por su valiosa asesoría y enseñanzas durante el tiempo en el que se llevó a cabo.

A Roberto Cosío e Hilda García con todo mi cariño y admiración. A mis hermanos Pavo y Diana.

Al Dr. Raúl Pulido Ayala por su inapreciable ayuda y amistad que me ha ofrecido durante tanto tiempo.

A Verónica Ponce, Valentín Mendoza, Magdalena Vilchis y José Esparza por su compañerismo y buen humor que hicieron del laboratorio un lugar muy agradable, y de manera especial a Vero y a Vale por sus provechosos consejos técnicos durante la realización del proyecto.

A la M. en I.B.B. Emma Saavedra Lira, a la Dra. Irma Romero Alvarez, al M. en C. Víctor Valdés López y al M. en I.B.B. Saúl Cano Colln por el tiempo dedicado para la revisión del presente trabajo, así como por las importantes observaciones realizadas.

A Erika, Sonia, Roxana, Mely, Luz, Gerardo y Héctor por todo aquello que compartimos durante nuestro "paso" por la Facultad de Ciencias.

A Ana María, Gloria, Diana, Belem, Mike, Samuel, Ivonne, Paco, Mario, Toño y Romi por su gran apoyo y amistad.

A Héctor por su incansable soporte y todo su amor.

INDICE.

Resumen.	
I. Introducción.....	3
1.1.Características Generales del TGF- β (Transforming Growth Factor type β) y sus Receptores.....	4
1.2.Características Generales del Betaglicano o Receptor tipo III del TGF- β	11
1.3.Características Generales del Sistema de Expresión en <i>Pichia pastoris</i>	14
II. Objetivos.....	19
III. Estrategia General.....	20
IV. Resultados.....	24
IV.1. Clonación del cDNA del betaglicano soluble en los vectores para <i>Pichia pastoris</i>	24
IV.1.1.Construcción de los cDNAs.....	24
IV.1.2.Subclonación en pPIC.....	31
IV.2 Transformación de la levadura <i>Pichia pastoris</i> por el método de esferoplastos con las diferentes construcciones del ectodominio del betaglicano en los vectores pPIC.....	33
IV.3. Análisis por PCR del proceso de integración de las construcciones del ectodominio del betaglicano en los plásmidos pPIC en el genoma de la levadura <i>Pichia pastoris</i>	34
IV.4. Análisis de la inducción por metanol de la traducción del gen quimérico (ectodominio del betaglicano) en las transformantes de <i>Pichia pastoris</i>	38
IV.4.1.Concentración de RNA total obtenida después de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido la expresión del ectodominio del betaglicano en algunas clonas de <i>Pichia pastoris</i>	39
IV.4.2 Análisis por "Northern Blot" de los niveles de expresión del mRNA del betaglicano soluble mediante el aislamiento de RNA Total de las células transformadas con la construcción SBG4/pPIC9 y su hibridación con un fragmento de la secuencia del cDNA del sBG.....	39
IV.5 Análisis de la Expresión del betaglicano por transferencias tipo Western.....	43

IV.5.1 El betaglicano soluble secretado se detecta solamente en el medio condicionado de las subclonas pPIC9 pero de manera degradada.....	43
IV.5.2 La degradación no se pudo evitar con la acidificación del pH ni con la presencia de casaminoácidos en el medio de cultivo condicionado.....	45
IV.5.3 El betaglicano soluble se localiza intracelularmente en las subclonas en pPIC3.....	48
IV.5.4 Las cepas GS115 y KM71 de <i>P. pastoris</i> tienen proteasas que degradan al betaglicano soluble producido en baculovirus.....	52
V. Discusión de Resultados.....	55
VI. Conclusiones.....	59
VII. Material y Métodos.....	60
A. Soluciones y Medios de Cultivo.....	60
A.1 Medios empleados en el cultivo de <i>E. coli</i>	60
A.2 Medios utilizados en el cultivo de <i>Pichia pastoris</i>	60
A.3 Agentes empleados en la transformación de <i>P. pastoris</i>	62
B. Métodos.....	63
B.1 Clonación del cDNA del betaglicano soluble en los vectores para <i>P. pastoris</i>	63
B.1.1 Digestión de DNA con enzimas de restricción o endonucleasas.....	63
B.1.2 Reacción de PCR realizada para la construcción de los cDNAs del betaglicano soluble.....	64
B.1.3 Transformación de células competentes (<i>E. coli</i>).....	64
B.1.4 Extracción de DNA de plásmido por la técnica de Miniprep.....	64
B.1.5 Purificación de DNA por medio del equipo comercial GENECLEAN II Bio 101, Inc.....	65
B.1.6 Protocolo de Secuenciación de DNA (Método de Sanger).....	66
B.2 Transformación de la levadura <i>P. pastoris</i> por el método de esferoplastos.....	66
B.3 Análisis por PCR de las transformantes de <i>P. pastoris</i>	69
B.3.1 Aislamiento de DNA genómico de las transformantes de <i>P. pastoris</i>	69
B.3.2 Reacción de PCR.....	70
B.4 Inducción de la expresión del betaglicano soluble en <i>P. pastoris</i>	72
B.5 Aislamiento de RNA total de las transformantes de <i>P. pastoris</i>	73
B.6 Análisis por "Northern Blot".....	74
B.6.1 Electroforesis de RNA en geles de agarosa con formaldehído.....	74

B.6.2 Transferencia de RNA a la membrana de nitrocelulosa por capilaridad.....	75
B.6.3 Marcaje radioactivo de la sonda del cDNA del betaglicano soluble empleada para su hibridación con el RNA total aislado de las transformantes de <i>P. pastoris</i>	76
B.6.4 Ensayo de Hibridación.....	76
B.7 Análisis por "Western Blot".....	77
B.7.1 Gel de Poliacrilamida-SDS.....	78
B.7.2 Transferencia.....	80
B.7.3 Incubación con anticuerpos.....	80
VIII. Referencias.....	82

Lista de Figuras.

Figura

1. Estructura del TGF- β 2.
2. Algunos efectos del TGF- β sobre la matriz extracelular.
3. Estructura General de los receptores tipo I (T β R-I) y tipo II (T β R-II) del TGF- β .
4. Complejos de señalización que forma el TGF- β con sus receptores.
5. Estructura General del Betaglicano deducida a partir de la secuencia de su cDNA.
6. Estructura General de los plásmidos pPIC para la expresión heteróloga en *Pichia pastoris*.
7. Plásmido pPIC3 utilizado para la expresión del ectodominio del betaglicano secretado en *P. pastoris*.
8. Plásmido pPIC9 utilizado para la expresión del ectodominio del betaglicano secretado en *P. pastoris*.
9. Estrategia General para la construcción de los insertos del ectodominio del betaglicano y su expresión soluble en *Pichia pastoris*.
10. Construcciones del ectodominio del betaglicano subclonadas en pPIC3.
11. Construcciones del ectodominio del betaglicano subclonadas en pPIC9.
12. Estructura General del Betaglicano y de sus cDNAs mutantes LS y LSgag'.
13. Reacciones de PCR realizadas para reducir el extremo 5' de la secuencia del sBG y para la creación del sitio XbaI en los insertos del sBG subclonados en pPIC9 utilizando como molde a la mutante LS.
14. Fragmentos EcoRI-StuI obtenidos de la PCR realizada para reducir el extremo 5' de la secuencia del sBG y para la creación del sitio XbaI en los insertos del sBG subclonados en pPIC9.
15. Estrategia General para la construcción y subclonación de los insertos del sBG en los vectores pPIC de *P. pastoris*.
16. Productos esperados de la PCR con los oligos RBG2 y 5'AOX1 en el análisis del DNA genómico de las transformantes de *P. pastoris*.
17. Análisis por electroforesis de los productos amplificados de la PCR con los oligos RBG2 y 5'AOX1 del DNA genómico de algunas de las transformantes de la cepa GS115 de *P. pastoris*.

18. Análisis por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído de las muestras de RNA obtenido de las clonas 4B y 4D de la cepa GS115 de *P. pastoris* luego de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido la expresión del gen quimérico del sBG.
19. Transferencia tipo Northern de las muestras de RNA analizadas por electroforesis de las clonas 4B y 4D de *P. pastoris* luego de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido la expresión del gen quimérico del sBG.
20. Análisis por "Western Blot" de la expresión soluble del BG en el medio de cultivo condicionado de algunas clonas GS115 y KM71 luego de 42 y 63 horas de haberse inducido su expresión.
21. Análisis por "Western Blot" de la expresión soluble del BG en el medio condicionado de las clonas IVB, 4B y 5 de *P. pastoris*, luego de 21, 29, 45 y 63 horas de haberse inducido la expresión de la proteína.
- 22a. Análisis por "Western Blot" de la expresión del sBG en el extracto celular y sobrenadantes de alicuotas tomadas del medio de cultivo condicionado de las clonas 3D y 4B, luego de 24 y 45 horas de haberse inducido la expresión de la proteína.
- 22b. "Western Blot" de la expresión del sBG en las pastillas celulares (P) y sobrenadantes (SN) de las alicuotas del medio de cultivo condicionado de las clonas IVB y 5, luego de 24 y 45 horas de haberse inducido la expresión de la proteína.
23. Análisis por "Western Blot" de la degradación del sBG producido en baculovirus en presencia del extracto celular y sobrenadantes de alicuotas tomadas del medio de cultivo condicionado de las clonas 4B y 5, luego de 45 horas de haberse iniciado la inducción de la expresión del sBG.

Lista de Tablas.

Tabla

- I. Características de las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris*.
- II. Insertos de sBG subclonados en los vectores pPIC.
- III. Centros Formadores de Colonias (C.F.C.) producidos por microgramo de DNA de la transformación por esferoplastos de las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris* para cada construcción.
- IV. Transformantes de las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris* analizadas por PCR para corroborar la presencia del inserto de sBG en su genoma.
- V. Clonas de las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris* seleccionadas para el análisis de los niveles de mRNA recombinante.
- VI. Cantidad de RNA total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtenido del cultivo de algunas transformantes de las cepas GS115 y KM71 luego de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido la expresión del gen quimérico del sBG.
- VII. Cantidad de DNA utilizada para la transformación por esferoplastos de las levaduras GS115 y KM71 de *P. pastoris*.

Abreviaturas.

TGF- β	Factor de Crecimiento Transformante tipo Beta (Transforming Growth Factor type β)
T β R-I	Receptor tipo I del TGF- β
T β R-II	Receptor tipo II del TGF- β
BG	Betaglicano o Receptor tipo III del TGF- β
sBG	Betaglicano soluble
GAG	Cadenas de Glicosaminoglicanos
MEC	Matriz Extracelular
HSA	Albúmina Sérica Humana (Human Seric Albumin)
PAI-1	Activador-Inhibidor del Plasminógeno. (Plasminogen Activator-Inhibitor)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	etilendiaminotetra-acetato
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilén glicol
PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonil
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilendiamina
TBS	Solución Amortiguadora Tris-Salina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

RESUMEN

Cosío García, Gabriela. Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. Expresión en *Pichia pastoris* del ectodominio del Betaglicano, el Receptor Tipo III del TGF- β . Asesor de tesis: Fernando López Casillas. Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Febrero 1997.

El betaglicano, también llamado el receptor tipo III del TGF- β , es un proteoglicano capaz de regular el acceso del TGF- β al complejo de señalamiento formado por los receptores tipo I y II (López-Casillas, et.al., 1994). La forma membranal del betaglicano potencia los efectos del TGF- β mediante la presentación del ligando al receptor tipo II, lo que promueve la formación de un complejo de señalamiento. Por el contrario, la forma soluble del betaglicano, que se origina a partir de la forma membranal mediante la liberación proteolítica del ectodominio del receptor, secuestra al TGF- β , bloqueando con ello sus acciones. Debido a este efecto, el betaglicano soluble secretado se considera un antagonista natural del TGF- β , de alta especificidad y con uso farmacológico potencial.

Con el objeto de obtener cantidades elevadas y a bajo costo de betaglicano soluble, se transformaron levaduras de la especie *Pichia pastoris* con plásmidos recombinantes que dirigen la expresión del ectodominio del betaglicano de rata. La expresión heteróloga en *P. pastoris* permite obtener proteínas recombinantes procesadas como en otras células eucariontes con rendimientos y costos comparables al de los sistemas de expresión en células procariontes. Se emplearon dos tipos de construcciones de betaglicano soluble, una silvestre y otra con las mutaciones SS535-546AA, que impiden la adición de glicosaminoglicanos al betaglicano expresado en células de mamífero. Ambas construcciones tienen, justo antes de la región transmembranal, un codón de terminación, lo cual permite la expresión de una proteína secretada tanto en células de insecto como de mamífero (López-Casillas, et. al., op. cit.). Ambas construcciones se subclonaron separadamente en los vectores de expresión pPIC3 y pPIC9, para *P. pastoris*. Para la expresión de proteínas de secreción, el primer vector requiere del uso eficiente del péptido señal endógeno de la proteína por expresar, mientras que con pPIC9, el cDNA de la proteína por expresar se debe empalmar con las secuencias del péptido señal del factor alfa de *Saccharomyces*, las cuales están presentes en pPIC9 y son utilizadas eficientemente por *P. pastoris*.

Las levaduras transformadas con estas 4 construcciones fueron capaces de producir cantidades elevadas del mRNA recombinante únicamente cuando se inducía la expresión del gen AOX1, cuyo promotor dirige la transcripción de estas construcciones. Sólo las proteínas expresadas a partir de pPIC9 pudieron secretarse al medio de cultivo, las expresadas a partir de pPIC3 quedaron localizadas intracelularmente, lo cual indica que el péptido señal de betaglicano no es funcional en *P. pastoris*. Desafortunadamente, el

betaglicano soluble secretado por las transformantes derivadas de pPIC9 se encontró degradado. Ensayos de los medios condicionados, así como de extractos celulares de *P. pastoris*, demostraron que poseen proteasas capaces de degradar betaglicano soluble purificado producido en células de insecto, sugiriendo que esas mismas actividades proteolíticas son responsables de la degradación del betaglicano soluble producido en la levadura. Ni la acidificación del medio de cultivo, ni la adición de casaminoácidos, manipulaciones que han demostrado conferir protección proteolítica a otras proteínas expresadas en *P. pastoris*, impidieron la degradación del betaglicano soluble.

En conclusión, la factibilidad de usar el sistema de expresión heteróloga de *P. pastoris* para la producción del betaglicano soluble está severamente limitada por la alta susceptibilidad que esta proteína recombinante demostró tener a las proteasas de esta levadura.

I . Introducción.

La vida de todo organismo multicelular depende en gran medida de una compleja red de señales de comunicación intercelular, así como de las células con su medio extracelular. En esta red de comunicación intervienen los factores solubles y la matriz extracelular (MEC) los cuales llevan al control del crecimiento, diferenciación, proliferación y metabolismo celular. Este tipo de señales pueden ser de naturaleza química o eléctrica, como en las células nerviosas. El señalamiento celular de tipo químico consiste en la secreción de sustancias específicas como las hormonas, que al ser reconocidas en otras células por las moléculas receptoras para tal sustancia, son capaces de generar una determinada respuesta. Entre las sustancias señalizadoras se encuentran aminoácidos, péptidos y proteínas que a través de los procesos autocrino, paracrino y endocrino llevan un determinado mensaje a la célula blanco (Lodish, et al, 1995). La respuesta celular depende de la unión de la molécula señalizadora o ligando, con una proteína receptora específica que puede encontrarse en la superficie, núcleo o citoplasma de la célula (Lodish, et al, 1995). En general, se propone que esta unión provoca un cambio conformacional en el receptor, lo cual genera una cascada de señales en el interior celular que causa una modificación en la función y comportamiento de la célula (Lodish, et al, 1995). En la mayoría de los sistemas receptor-ligando, el ligando parece sólo funcionar para unirse al receptor, ya que no es metabolizado por la célula, no presenta propiedades enzimáticas, ni tampoco funciona como intermediario en las actividades celulares (Lodish, et al, 1995). Entre las proteínas que funcionan como ligando y que llevan mensajes de una célula a otra se encuentran los factores de crecimiento, el TGF- β o Factor de Crecimiento Transformante tipo β pertenece a este grupo de mensajeros inter-celulares.

El TGF- β es una proteína relacionada con la señalización y comunicación celular que conduce a procesos que pueden favorecer la formación de matriz extracelular, la inhibición de la proliferación, la regulación de la diferenciación e inmunosupresión (Massagué, 1990). El TGF- β forma parte de una enorme familia de factores con muy diversas funciones que inciden en el crecimiento, diferenciación y morfogénesis; esta superfamilia incluye a las familias de factores tales como las inhibinas, las activinas, la de la sustancia inhibitoria Mülleriana, la del producto génico decapentapléptico en *Drosophila*, la de las proteínas morfogenicas de hueso (BMPs) y la del TGF- β (Massagué, 1990). Cabe mencionar que los dominios activos de estos polipéptidos comparten entre el 25% y el 35% de identidad aminoacídica con el TGF- β (Cheifetz, et al; 1987). Debido a la versatilidad que presenta esta proteína, el TGF- β ha sido reconocido como el prototipo de factor de crecimiento multifuncional (Roberts y Sporn, 1993). La interacción celular con el TGF- β está mediada por un grupo de proteínas que incluye a dos receptores transmembranales y al proteoglicano conocido como betaglicano, el cual existe en una forma soluble o anclado a la membrana. Dada la importancia que tiene la función de este factor en lo que a la regulación del crecimiento y organización

celular se refiere y a las implicaciones fisiológicas que trae consigo, resulta de gran interés un mayor estudio sobre su regulación y modo de acción a través de los receptores. Es por ésto que el presente proyecto tuvo como objetivo principal la expresión de una forma recombinante soluble del betaglicano, también llamado receptor tipo III del TGF- β , ya que mediante su producción en cantidades considerables se hace posible realizar diversos experimentos que permitan evaluar su función antagonica de los efectos del TGF- β (López-Casillas, et al., 1994).

1.1 Características Generales del TGF- β (Transforming Growth Factor type β) y sus Receptores.

El TGF- β pertenece a una superfamilia de citocinas cuya estructura consiste en un dímero de dos cadenas idénticas de 112 aminoácidos con un peso aproximado de 25 kDa (Daopin, 1992) y unidas por puentes disulfuro (Massagué, 1990). La familia del TGF- β está constituida, en vertebrados, por diversas isoformas que son: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 y el TGF- β 5, las cuales comparten entre el 60% y el 80% de identidad en su secuencia de aminoácidos (Wang, et al, 1991). Estas isoformas presentan actividades similares pero no idénticas. Todos los miembros de esta familia presentan gran similitud en su secuencia con el prototipo TGF- β 1, particularmente en el dominio activo en donde la característica más conservada es el espacio existente entre siete cisteínas (Massagué et al, 1994). La estructura cristalina del TGF- β 2 (Fig. 1) revela un motivo estructural único, el nudo de cisteínas, que es un anillo central de 8 aminoácidos cerrado por dos puentes disulfuro entre cisteínas y cruzado por un tercero. Cuatro segmentos de láminas de β -plegadas antiparalelas se extienden desde el anillo y una α -hélice lo hace de manera opuesta a las láminas β (Fig. 1) (Schlunegger, 1992; Daopin, 1992). La cisteína remanente forma un puente disulfuro con la cisteína correspondiente en el otro monómero (Fig. 1) (Massagué, et al, 1994). Los dos monómeros están orientados de forma plana y antiparalela uno del otro (Schlunegger, 1992; Daopin, 1992).

La familia del TGF- β presenta gran complejidad, ya que es posible encontrar heterodímeros de diferentes productos génicos del TGF- β que se co-expresan en la misma célula (Cheifetz, et al, 1987). Un ejemplo de esto lo constituye el heterodimero TGF- β 1.2 formado por el TGF- β 1 y el TGF- β 2, el cual se encontró en plaquetas porcinas (Cheifetz, et al, 1987). La multiplicidad de estas formas sugiere funciones específicas para cada una de ellas, estas diferencias se manifiestan en el patrón de expresión de varios TGF- β s *in vivo* y en su distinta capacidad de interactuar con diferentes receptores en la superficie celular (Cheifetz, et al, 1987).

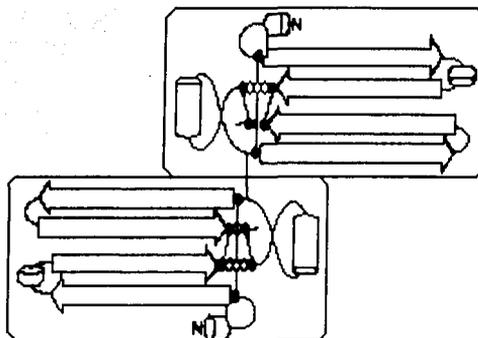


Fig. 1. Estructura del TGF- β 2.

Estructura tridimensional del TGF- β 2 la cual incluye a 6 cisteínas (óvalos negros) y cuatro aminoácidos adicionales (óvalos blancos) que forman en conjunto un nudo de cisteínas, cuatro segmentos antiparalelos de láminas de β -plegadas, una α -hélice larga y dos α -hélices cortas. Como puede verse en la figura, dos monómeros se dimerizan y la séptima cisteína forma el puente disulfuro entre ellos (Massagué, et al, 1994).

Las acciones del TGF- β pueden clasificarse en tres categorías principales: efectos sobre el ciclo celular, sobre la matriz extracelular y aquellos que presenta sobre otros factores de crecimiento y sus receptores (Lin y Lodish, 1993). Algunos autores han propuesto que las acciones inmediatas de los distintos TGF- β s son durante la progresión de las células a través del ciclo celular y que los efectos mediados por la matriz extracelular y por otros factores de crecimiento y sus receptores son secundarios (Lin y Lodish, 1993). En muchos tipos celulares el efecto más directo que tiene el TGF- β , es la interrupción del ciclo celular en la fase G1 tardía, previniendo así la inducción de la síntesis de DNA y la progresión a la fase S (Lin y Lodish, 1993).

El TGF- β es capaz de inhibir o estimular la proliferación celular dependiendo de ciertas condiciones celulares específicas tales como la presencia de otros factores de crecimiento, así como de la disponibilidad de sus receptores en un momento determinado (Roberts, et al, 1985). Mientras el TGF- β 1 se caracterizó por su capacidad inductora de la proliferación de células de riñón de rata, sus efectos en la mayoría de los tipos celulares es antimitogénica (Roberts, et al, 1981). Este factor es un potente inhibidor del crecimiento de muchos tipos celulares, incluyendo a células normales y transformadas de tejidos epitelial, endotelial, fibroblastos, neuronal, linfóide y hematopoyético (Roberts, et al, 1985; Cheifetz, et al, 1987). También el

TGF- β presenta un importante papel en la regulación de la formación de la MEC y durante el proceso de la adhesión célula-célula y célula-MEC (Massagué, 1990). La acción del TGF- β en células normales mesenquimatosas, epiteliales y linfoides, así como en muchas líneas tumorales, está relacionada con la regulación de la adhesión celular durante la inducción de la síntesis y depósito de componentes de la matriz extracelular (colagenas y fibronectinas); en la reducción de la síntesis de enzimas tales como las colagenasas y la transinas / estromelinas que catalizan la degradación de diversos componentes de la matriz; en el aumento de los niveles de inhibidores de enzimas degradativas como el inhibidor-activador del plasminógeno (PAI-1) y los inhibidores de metalo-proteasas tisulares (TIMPs); y en general de la modificación del repertorio de algunos receptores de adhesión de la superficie celular como las integrinas (Massagué, 1990; Lin y Lodish, 1993) (Fig. 2). Los efectos del TGF- β pueden estar mediados, de manera secundaria, por la producción de componentes de la matriz extracelular y estos efectos a su vez pueden oponerse algunas veces a las acciones inhibitorias del TGF- β (Lin y Lodish, 1993).

El TGF- β también presenta una función inmunosupresora debido en parte a su efecto inhibitorio en el crecimiento de células linfoides (Massagué, et al, 1994). Aparte de sus efectos antiproliferativos, el TGF- β puede promover el crecimiento de algunos tipos celulares durante el desarrollo y reparación tisular (Massagué, et al, 1994), un ejemplo de esto puede verse en las plaquetas, las cuales son capaces de vertir sus contenidos ricos en TGF- β en los tejidos heridos para estimular así su recuperación (Roberts, et al, 1993). Sin embargo, una actividad excesiva del TGF- β es causante del llamado "lado oscuro" de los efectos del TGF- β , el cual consiste en la acumulación de matriz extracelular que puede provocar desórdenes de tipo fibrótico en el riñón, hígado y pulmón (Border, et al, 1992) y causar enfermedades tales como la artritis, padecimientos ulcerativos, arterioesclerosis y glomerulonefritis (Lin y Lodish, 1993).

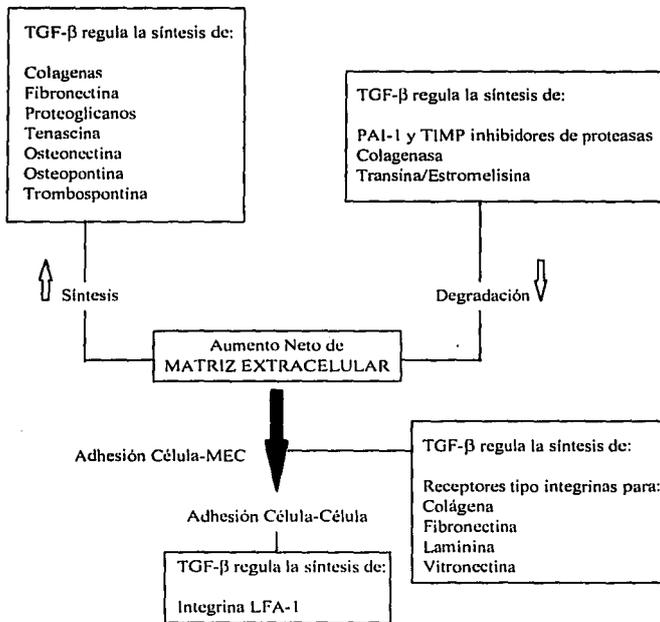


Fig. 2. Algunos efectos del TGF- β sobre la matriz extracelular. (Massagué, 1990.)

Recientemente, se han hecho grandes progresos en el desciframiento de las vías de señalamiento del TGF- β con la identificación de las proteínas Mad (*Mothers against decantaplegic*) las cuales parecen ser intermediadores fosforilables que transmiten la señal de los receptores al núcleo celular (Liu, et al, 1996). No obstante, aún se desconocen muchos de los eventos moleculares que se llevan a cabo en la ruta de señalamiento que emplea el TGF- β para ejercer su acción durante la síntesis de otros factores de crecimiento o de proteínas de la matriz extracelular y durante la progresión del ciclo celular (Lin y Lodish, 1993). Todavía no se tiene evidencia de que la acción del TGF- β se encuentre directamente ligada a las rutas conocidas de señalización intracelular que traen consigo el transporte de fosfatidilinositol, la modulación de los niveles de cAMP intracelular o la fosforilación de residuos de tirosina (Lin y Lodish, 1993). La clonación de los tres receptores del TGF- β ha proporcionado las bases a partir de las cuales podrá ser posible establecer el mecanismo completo de transducción de la señal del TGF- β (Lin y Lodish, 1993; Liu, et al, 1996).

La expresión y actividad del TGF- β están controladas por la regulación de su transcripción, por la producción del TGF- β como un producto latente y por el secuestro del TGF- β activo por moléculas de la matriz extracelular o por proteínas circundantes (Massagué, 1990). La actividad del TGF- β está mediada por la unión a receptores específicos, ya sea en membrana o libres en el medio. El modelo del receptor que se ha propuesto para el TGF- β consiste en un complejo formado por dos proteínas transmembranales distintas con un dominio de cinasa, en el que una de ellas es dependiente de la otra para la unión del ligando y ambas participan activamente en la señalización (Attisano, et al, 1993). Como muchas otras citocinas, la familia del TGF- β sigue rutas de fosforilación de proteínas para señalizar intracelularmente; sin embargo, a diferencia de las otras citocinas cuyos receptores se autofosforilan en tirosinas, los receptores I y II del TGF- β se autofosforilan en treoninas y serinas y señalizan como complejos heteroméricos (Massagué, et al, 1994). Los receptores I y II del TGF- β son glicoproteínas transmembranales de 53 y de 70-100 kDa respectivamente (Massagué, 1990). Ambos receptores poseen regiones intracelulares con actividad de cinasa sobre residuos de Ser y Thr; una región hidrofóbica transmembranal y un dominio extracelular rico en contenido de cisteínas (Fig.3) (Attisano, et al, 1993).

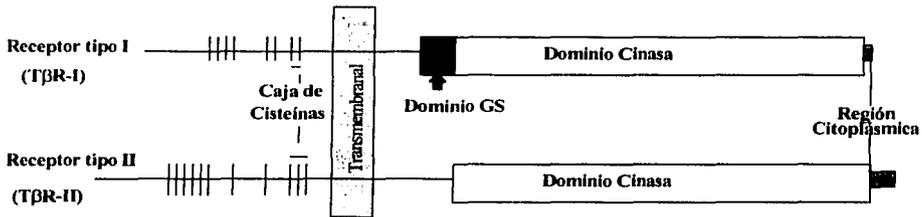


Fig. 3. Estructura General de los receptores tipo I (T β R-I) y tipo II (T β R-II) del TGF- β . La estructura de cada receptor muestra una region extracelular rica en cisteínas, una región hidrofóbica transmembranal y los dominios citoplásmicos con actividad de cinasa (Massagué et al, 1994). El receptor tipo I presenta, en contraste con el receptor tipo II, un dominio GS, el cual consiste en una región de 29 aminoácidos, cuya función aún se desconoce, localizada en el extremo N-terminal del dominio cinasa. La región GS, debe su nombre a la presencia de una secuencia GSGSG característica, en la parte media del receptor tipo I.

El betaglicano es el receptor tipo III y une al TGF- β en su región extramembranal; sus características y funciones principales se describen en detalle más adelante. La afinidad que cada uno de los receptores tiene por el TGF- β varía dependiendo la isoforma que presente el factor. La existencia de distintas formas de TGF- β que interactúan de manera diferente con una familia de receptores para TGF- β , brinda una gran flexibilidad

a la regulación del crecimiento y diferenciación de tejidos por el sistema del TGF- β (Cheifetz, et al, 1987). Otra forma de regulación del sistema del TGF- β podría estar dada si la expresión de las diferentes isoformas estuviera bajo el control de distintos tipos de estímulos (Cheifetz, et al, 1987). Toda esta flexibilidad en la regulación es necesaria, dada la gran gama de tejidos y tipos celulares cuya diferenciación y proliferación están controladas por la familia de los factores relacionados con el TGF- β (Cheifetz, et al, 1987).

En la superficie celular, el receptor I requiere del receptor II para unir TGF- β y a su vez el receptor II necesita del I para la señalización (Wrana, et al, 1992). Uno de los mecanismos hipotéticos de señalización consiste en la unión del TGF- β al receptor tipo II para luego formar un complejo ternario con el tipo I, cuyo dominio citoplásmico envía la señal al núcleo a través de su región ser/thr cinasa (López-Casillas, et al 1993) (Fig. 4). En el otro de los mecanismos propuestos de señalización y control de la acción del TGF- β participa el betaglicano anclado en membrana. El dominio extracelular del betaglicano que participa en la interacción con el TGF- β es muy grande y no presenta parecido alguno con aquellos de los receptores I y II que son cortos y poseen arreglos de cisteína característicos (Attisano, et al., 1993; Ebner, et al., 1993; Franzén, et al., 1993). El betaglicano en membrana une al TGF- β circundante en el medio y luego se lo presenta al receptor II para formar un complejo (López-Casillas, et al., 1993). El receptor II une mejor al TGF- β ligado al betaglicano membranal que al TGF- β libre en el medio (López-Casillas, et al., 1994). Este complejo carece de función señalizadora cuando no hay receptor tipo I disponible, por lo que en este caso podría inferirse que la función principal de este complejo es el de capturar al TGF- β hasta que el receptor I pueda ser utilizado (López-Casillas et al., 1994). En el caso de haber receptor I utilizable, este desplaza al betaglicano del complejo, se une, y da lugar al complejo receptor de señalamiento (López-Casillas, et al., 1994) (Fig. 4). A veces, el betaglicano puede encontrarse soluble en el medio. El betaglicano soluble es capaz de regular los efectos del TGF- β al capturarlo en el medio extracelular y no permitir su contacto con los receptores tipo II y I transmembranales, ya que se ha observado que el anclaje del betaglicano a la membrana es necesario para la presentación del TGF- β al receptor II el cual podrá formar un complejo con el receptor I si este se encuentra disponible (López-Casillas et al., 1994).

De acuerdo a lo anterior, el betaglicano es un modulador de la acción del TGF- β ya que anclado en membrana es capaz de presentarlo a los receptores y en forma soluble bloquea su acción, inhibiendo su unión a los receptores en membrana. Esta doble función moduladora que presenta el betaglicano resulta de gran interés ya que abre la posibilidad de que este receptor en su forma soluble pueda ser utilizado como un fármaco que actúe de forma antagónica a la acción del TGF- β . Dado que el TGF- β está involucrado en los procesos de inhibición y proliferación celular, así como en la regulación de la formación de la matriz extracelular y que en exceso debido a un malfuncionamiento de su sistema regulatorio o de sus receptores

puede dar lugar a desórdenes fibróticos tales como la glomerulonefritis, el betaglicano en su forma soluble podría capturarlo en el medio extracelular e impedir su interacción con los receptores tipo I y tipo II, lo cual bloquearía la fibrosis generada por el TGF- β .

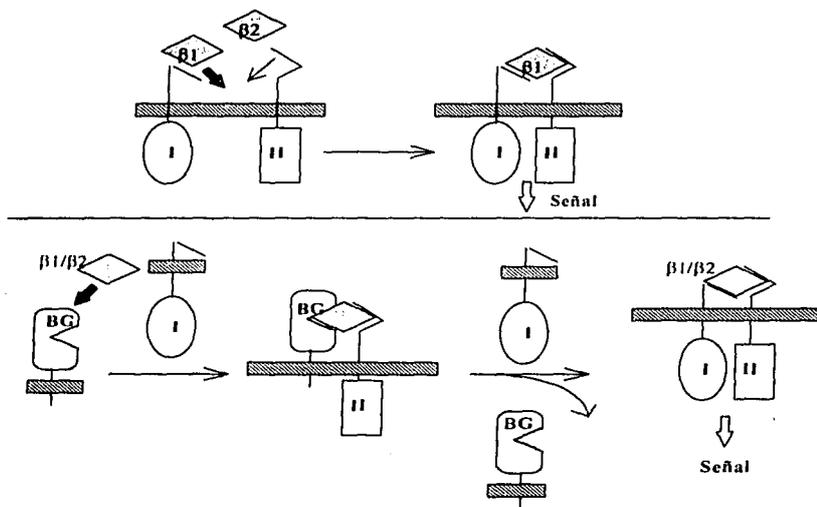


Fig. 4. Complejos de Señalización que forma el TGF- β con sus receptores. En la parte superior de la figura se muestra la unión del TGF- β al receptor tipo II para luego formar un complejo ternario con el tipo I, cuyo dominio citoplásmico envía la señal a núcleo a través de su región ser/thr cinasa. En la parte inferior de la figura se muestra la interacción del betaglicano con el TGF- β y su presentación al receptor tipo II para formar un complejo. Si el receptor I está disponible, éste desplazará al betaglicano para formar el complejo receptor de señalización. La región señalada con franjas inclinadas  corresponde a la membrana plasmática.

1.2 Características Generales del Betaglicano o Receptor Tipo III del TGF- β .

El betaglicano es un proteoglicano transmembranal constituido por 853 aminoácidos de acuerdo con la secuencia de su cDNA (López-Casillas et al, 1991). El peso de la cadena polipeptídica principal a la cual se une el TGF- β , es de aproximadamente 120 kDa (sin cadenas de glicosaminoglicanos (GAG)) (Cheifetz y Massagué, 1989; Andres, et al; 1991). Esta proteína puede hallarse anclada a la membrana o en forma soluble en el medio extracelular; estas dos formas difieren en sus propiedades hidrofóbicas y en su capacidad de asociarse con liposomas. Estas diferencias se deben a la presencia de una ancla hidrofóbica en el betaglicano membranaral, por lo que es éste último al que se le ha encontrado la propiedad de asociarse con liposomas (Andres, et al, 1989). Entre las funciones principales que se le atribuyen al betaglicano están el de regular la acción del TGF- β así como la de mediar la adhesión celular (célula-célula, célula-matriz extracelular) (Andres, et al, 1989).

El betaglicano se encuentra en general en todas las líneas celulares de aquellos organismos que presentan el sistema del TGF- β , es decir, en todos los metazoarios. En los vertebrados y en particular en mamíferos, el betaglicano esta ausente en cierto tipo de células epiteliales, endoteliales, hematopoyéticas y mioblásticas que sin embargo, sí responden a la acción del TGF- β (Massagué, et al.,1986; Ohta, et al., 1987; Segarini, et al., 1989; Cheifetz, et al., 1990). El betaglicano es el receptor de superficie membranaral más abundante en muchas líneas celulares, habiendo 200,000 moléculas por célula aproximadamente (Massagué, 1985; Massagué y Like, 1985). También se ha observado su mayor abundancia en tejido embrionario que en el de adulto por lo que se le supone cierta función en los procesos de desarrollo de un nuevo organismo (Andres, et al, 1991).

El betaglicano es una proteína heterogénea que presenta alrededor de 200 kDa de cadenas de los glicosaminoglicanos heparan y condroitín sulfato unidas covalentemente (Lin y Lodish, 1993), y 10 kDa de glicanos unidos a la cadena polipeptídica, la cual pesa entre 100-120 kDa (Segarini y Seyedin, 1988; Cheifetz, et al, 1988). El TGF- β se une a la cadena polipeptídica del betaglicano (Cheifetz, et al, 1988; Segarini y Seyedin, 1988) y se ha observado que las cadenas de glicosaminoglicanos no son indispensables para la expresión del proteoglicano en la superficie celular, así como tampoco para la interacción con el TGF- β (Cheifetz y Massagué, 1989). Es posible que las cadenas de glicosaminoglicanos unidas a la cadena polipeptídica principal del betaglicano presenten alguna función aún no definida; por analogía con otros proteoglicanos de membrana, se cree que las cadenas de glicosaminoglicanos puedan participar en la unión de componentes de la matriz extracelular o de otros factores solubles (Cheifetz y Massagué, 1989), así como

actuar como reservorios importantes y estabilizadores de algunos factores de crecimiento como del factor de crecimiento endotelial (ECGF) (Schneiber, et al, 1985, Vlodavsky, et al, 1987) y de los hematopoyéticos (Gordon, et al, 1987).

El receptor tipo III está constituido por una secuencia señal hidrofóbica en el extremo amino terminal seguida por la región extracelular, una región transmembranal y una cadena citoplásmica relativamente corta (43 aminoácidos), la cual no presenta ningún elemento aparente de señalización (Wang, et al, 1991; López-Casillas, et al, 1991) (Fig. 5). Se cree que el péptido señal es de aproximadamente 24 aminoácidos y se calcula que la cadena polipeptídica del betaglicano sin incluir a esta secuencia pesa unos 91.643 kDa (López-Casillas, et al.,1991). Las cadenas de los glicosaminoglicanos heparan y condroitín sulfato están generalmente unidas al grupo hidroxilo libre de serina en la secuencia serina-glicina, particularmente cuando esta secuencia se encuentra rodeada por residuos ácidos (Bourdon, et al., 1987) (Fig. 5). En el dominio extracelular del betaglicano existen 6 de estas secuencias (López-Casillas, et al, 1991) de las cuales la Ser⁵³⁵-Gly y la Ser⁵⁴⁶-Gly están rodeadas por residuos ácidos y se ha demostrado que estos son los sitios de glicosaminación por heparan y condroitín sulfato (López-Casillas, et al, 1994). El dominio extracelular presenta siete sitios potenciales de glicosilación de asparaginas, de los cuales algunos pueden presentar N-glicosilación (López-Casillas et al, 1994) (Fig. 5). Existen 16 cisteínas en el dominio extracelular (López-Casillas, et al, 1991) (Fig. 5), y cerca de la región transmembranal se presenta una región rica en prolinas (Pro-Ile-Pro-Pro-Pro-Pro) (Fig. 5), la cual se cree que puede funcionar como una bisagra en la base del dominio extracelular (López-Casillas, et al, 1991). Hay dos sitios potenciales de corte cerca del dominio transmembranal que pueden dar lugar a formas solubles del betaglicano (Andres, et al, 1989) (Fig. 5). Uno de ellos se encuentra en la secuencia Lys⁷⁴⁵-Lys, el cual es sensible a tripsina y puede constituir un sustrato para alguna endoproteasa (Barr, P.J., 1991). El otro sitio se encuentra en la secuencia Lys⁷⁵²-Ala-Val-Val (López-Casillas, et al, 1991) (Fig. 5). Cabe mencionar que aún se desconoce si el proceso proteolítico llevado a cabo en esta región cerca del dominio extramembranal es la única forma en que puede derivarse la variante soluble del betaglicano, ya que esta podría darse lugar también, a través del "splicing" o empalme alternativo del mRNA, o por la expresión de algunos otros genes que también codifiquen para esta proteína (Andres, et al, 1989). El dominio citoplásmico está solamente constituido por 43 aminoácidos y presenta como característica distintiva un alto contenido de serinas (42%) y treoninas (López-Casillas, et al, 1994) (Fig. 5). Algunos de estos sitios pueden ser objeto de fosforilaciones regulatorias, en particular la treonina⁸¹⁷ de la región yuxtamembranal del betaglicano la cual se encuentra en una secuencia que la hace candidata de fosforilación por una proteína cinasa C (Pearson y Kemp, 1991).

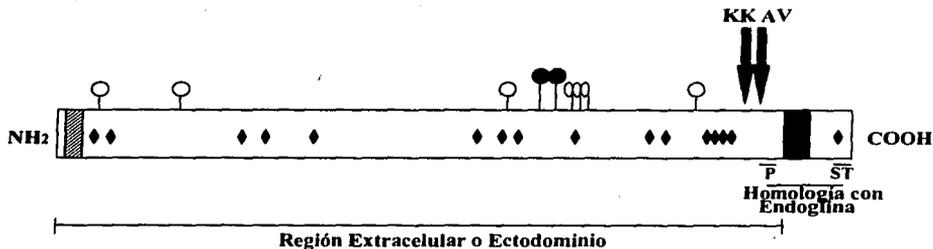


Fig. 5. Estructura General del Betaglicano deducida a partir de la secuencia de su cDNA. La figura muestra la región transmembranal ■, los siete sitios potenciales de N-glicosilación ○, la región correspondiente al péptido señal ▨, aquellos sitios de unión de cadenas GAG ●, las 17 Cisteínas ◆, el sitio potencial de corte Lys-Lys (KK), el sitio de corte potencialmente regulado Leu-Ala-Val-Val (AV), la región rica en residuos de Prolina (P), la región C-terminal rica en Ser/Thr (S/T) y la región de homología con endogлина. (López-Casillas, et al, 1991).

El betaglicano posee ciertas regiones de similitud con otras proteínas. En el extremo amino terminal y en sus regiones transmembranal y citoplásmica presenta un 63% de identidad y un 71% de similitud aminoacídica con la endogлина (Fig. 5) (López-Casillas, et al, 1991; Wang, et al, 1991), la cual es una glicoproteína homodimérica de 95 kDa unida por puentes disulfuro de células endoteliales (Gougos y Letarte, 1990) que también une TGF-β1 y TGF-β3 pero no TGF-β2 (Cheifetz, et al, 1992). La endogлина se encuentra expresada en altas concentraciones en pre-eritroblastos, macrófagos, células leucémicas de líneas linfoides y mieloides, en sinciciotrofoblastos y en células vasculares endoteliales (Cheifetz, et al, 1992). Se ha observado que la endogлина es capaz de funcionar como un componente del sistema receptor del TGF-β en células endoteliales, las cuales carecen de betaglicano (Cheifetz, et al, 1992). La segunda mitad del dominio extracelular del betaglicano también presenta cierto parecido con otras proteínas de muy diversa función (Bork y Sander, 1992) tales como la uromodulina, los receptores espermáticos Zp2 y Zp3, y con la proteína pancreática zimogeno granular de membrana GP-2. La similitud entre estas proteínas está en una región de 260 residuos entre los que se encuentran ocho cisteínas estrictamente conservadas (Bork y Sander, 1992). La conservación de la hidrofobicidad, polaridad y tendencia de plegamiento en varias posiciones es consistente con la conservada estructura tridimensional que presentan estas proteínas (Bork y Sander, 1992).

Como ya se explicó, el betaglicano es una proteína cuya principal función es la de modular la acción del TGF-β. Debido a la capacidad que presenta el TGF-β de inducir e inhibir la proliferación y diferenciación celular, este factor presenta una gran variedad de funciones fisiológicas con ciertas implicaciones médicas

importantes, ya que en exceso puede estar involucrado en eventos relacionados con la reparación de tejidos, procesos inflamatorios asociados con fibrosis, supresión del sistema inmune, así como en carcinogenesis (Roberts y Sporn, 1993). Se ha observado en modelos animales de tales padecimientos, que la administración de anticuerpos específicos contra TGF- β disminuye sus efectos fibróticos (Roberts y Sporn, 1993). El estudio del betaglicano resulta de gran interés ya que a través de un mejor conocimiento de la composición del gen, su regulación, la estructura de la proteína y su mecanismo de acción será posible en un futuro hallar alguna forma de controlar algunos padecimientos referidos a estos procesos, por ejemplo, mediante el empleo del betaglicano en su forma soluble como fármaco para combatir desórdenes de tipo fibrótico, el cual al ser administrado en el paciente, secuestraría al TGF- β en el medio extracelular y así evitaría la formación del complejo receptor de señalización entre los receptores tipo I, II y el TGF- β .

El presente proyecto pretende lograr la expresión del betaglicano soluble en cantidades considerables en el sistema de la levadura *Pichia pastoris*, el cual resulta muy atractivo ya que no sólo posee todas las ventajas de un sistema de expresión eucarionte en cuanto a procesamiento de proteínas sino que su costo y fácil manipulación del organismo, lo hacen un sistema muy atractivo. Cabe mencionar que anteriormente ya se había logrado la expresión del betaglicano soluble en células de insecto infectadas por baculovirus (López-Casillas, et al, 1994), sin embargo, debido a la complejidad y alto costo del mantenimiento de este sistema, se decidió establecer su expresión en un sistema de levadura.

1.3 Características Generales del Sistema de Expresión en *Pichia pastoris*.

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica, es decir, capaz de metabolizar metanol como única fuente de carbono. Esta levadura es de los organismos eucariontes que más se han utilizado como sistema de expresión heteróloga debido a que presenta todas las ventajas de un procarionte en cuanto a bajo costo de cultivo, fácil manipulación y niveles muy altos de expresión, los cuales pueden llegar a ser de 10 a 100 veces mayores que los que se obtienen mediante el empleo de *Saccharomyces cerevisiae*. Además de poseer muchas de las ventajas de un sistema de expresión eucarionte en cuanto al procesamiento, plegamiento y modificaciones postraduccionales de proteínas, *Pichia* también presenta la ventaja de que no hiperglicosila y que la mayoría se trata de N-glicosilación. La longitud promedio de las cadenas de oligosacáridos que adiciona postraduccionalmente es de 8-14 residuos de manosa por cadena, mientras que *S. cerevisiae* adiciona cadenas de 50-100 residuos de manosa (Tshopp, et al, 1987). Otra de las ventajas que presenta *Pichia* es que produce muy bajos niveles de proteínas propias por lo que si se quiere expresar una proteína secretada, ésta

comprendería la mayor proporción de la proteína total en el medio de cultivo, facilitándose así su purificación (Barr, et al 1992). El metabolismo del metanol lo llevó a cabo mediante la oxidación del metanol a formaldehído, reacción catalizada por la enzima alcohol oxidasa. *Pichia pastoris* presenta dos genes con un 97% de homología que codifican para la alcohol oxidasa, el AOX1 y el AOX2 (Koutz, et al, 1989).

La expresión de la alcohol oxidasa es inducida por la presencia de metanol como única fuente de carbono en el medio de cultivo de la levadura, hecho que ha sido aprovechado para el diseño de una versión en plásmido de su promotor que permite la expresión heteróloga de proteínas (Ellis, et al, 1985; Koutz, et al 1989) (Fig. 6). Cabe mencionar que en presencia de glucosa o glicerol no es posible detectar la presencia de esta enzima (Koutz, et al, 1989), la cual constituye hasta el 30% de la proteína total de la levadura en un medio de cultivo con metanol. A pesar de ser muy parecidos en su secuencia, los niveles de expresión de ambos genes en un medio con metanol es muy distinta, teniendo así que la expresión de AOX1 es mayor que la expresión del gen AOX2 (Koutz, et al, 1989). Aquellas cepas que sólo tienen funcional el gen AOX2, presentan un crecimiento más lento en medio con metanol que aquellas que expresan de manera normal el AOX1.

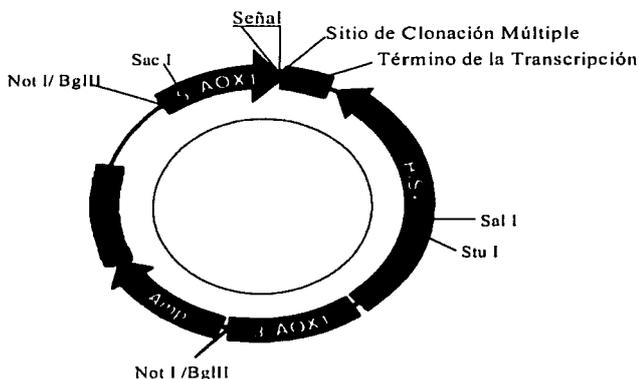


Fig. 6. Estructura General de los plásmidos pPIC para la expresión heteróloga en *Pichia pastoris*. (*Pichia* Expression Kit. Version C. Catalog no. K1710-01. Invitrogen.)

Durante el presente proyecto se empleó el equipo comercial de expresión en *Pichia pastoris* de la compañía Invitrogen, en el cual se incluían dos tipos de cepas con diferentes genotipos, los plásmidos diseñados con el promotor del gen AOX1 y los reactivos para la transformación de las levaduras. En la Fig. 6 se describe esquemáticamente la estructura general del plásmido diseñado con el promotor de la alcohol oxidasa de *P. pastoris*. Este plásmido presenta un fragmento (5'AOX1) de aproximadamente 1000 pb que contiene al promotor del gen AOX1 a la cual le sigue el sitio de clonación múltiple en donde se inserta el gen de interés; las secuencias que indican el término de la transcripción; el gen de la enzima histidínoI deshidrogenasa (HIS4); una secuencia de la región del extremo 3' del gen AOX1 después del término de la transcripción y el gen que confiere resistencia a ampicilina en bacterias. En este plásmido no existe ningún origen de replicación para levadura ya que el sistema está diseñado para que las transformantes sólo puedan aislarse si sucede la recombinación entre el plásmido y el genoma de *Pichia*.

En la transformación de la levadura *Pichia pastoris* se utilizaron dos plásmidos derivados de la estructura general descrita en la Fig. 6, estos plásmidos son pPIC3 y pPIC9 (*Pichia* Expression Kit. Version C. Catalog no. K1710-01. Invitrogen.). La principal diferencia entre estos dos es que el plásmido pPIC9 presenta la secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae*, la cual es de gran utilidad para la expresión de proteínas secretadas.

El plásmido pPIC3 (Fig. 7) (*Pichia* Expression Kit. Version C. Catalog no. K1710-01. Invitrogen.) tiene un tamaño de 7.8 kb y sus sitios únicos de clonación son BamHI, SnaBI, EcoRI, AvrII y NotI. Este plásmido generalmente se utiliza para la expresión intracelular de proteínas (Clare, et al, 1991a; Scorer, et al, 1993) a menos que el cDNA subclonado posea secuencias que provean a la proteína traducida un péptido señal, aunque esto no siempre garantiza que esa secuencia señal sea funcional en *Pichia pastoris* para guiar a la proteína de interés por la vía secretoria.

El plásmido pPIC9 (Fig 8) (*Pichia* Expression Kit. Version C. Catalog no. K1710-01. Invitrogen.) tiene un tamaño de 8.0 kb y sus únicos sitios de clonación son: XhoI, SnaBI, EcoRI, AvrII y NotI. Este plásmido se utiliza para la expresión de proteínas solubles debido a que presenta entre las bases 949-1218, la secuencia del péptido señal del factor α de *S. cerevisiae*. El gen de interés, que en este caso se trata de la secuencia que codifica para el ectodominio del betaglicano, debe ser clonado de manera que coincida con el marco de lectura del codón de inicio de la secuencia señal para así producir un péptido de fusión entre el péptido señal del factor α y el betaglicano soluble. La secuencia Glu-Lys-Arg *(sitio de corte) Glu-Ala-Glu-Ala, localizada después del péptido señal α , provoca su corte y eliminación del producto final por las enzimas codificadas por los genes KEX2 y STE13.

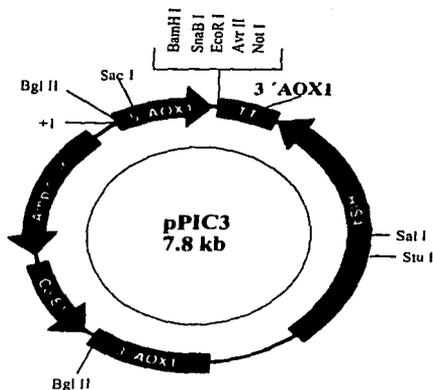


Fig 7. Plásmido pPIC3 utilizado para la expresión del ectodominio del betaglicano secretado en *P. pastoris*. (Pichia Expression Kit, Version C, Catalog no. K1710-01, Invitrogen.).

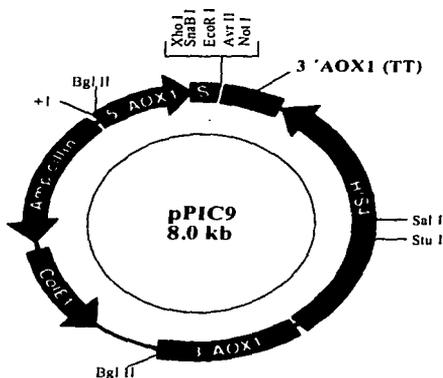


Fig. 8. Plásmido pPIC9 utilizado para la expresión del ectodominio del betaglicano secretado en *Pichia pastoris*. (Pichia Expression Kit, Version C, Catalog no. K1710-01, Invitrogen.).

Los insertos del ectodominio del betaglicano fueron subclonados tanto en pPIC3 como en pPIC9 y debido a que pPIC9 presentaba la secuencia de la señal para secreción del prepro factor a de *S. cerevisiae*, se esperaba que la expresión secretada del ectodominio del betaglicano fuera más factible en este plásmido que en pPIC3. Sin embargo, también resultaba interesante probar si la levadura al ser transformada con pPIC3, era o no capaz de reconocer la secuencia señal del propio betaglicano soluble y así guiar a la proteína por la vía secretoria.

Las cepas de *Pichia pastoris* empleadas para su transformación fueron: GS115 y KM71 (*Pichia* Expression Kit, Version C, Catalog no. K1710-01, Invitrogen.). Las dos cepas están mutadas en el gen histidinol deshidrogenasa (HIS4) por lo cual son incapaces de sintetizar histidina, característica empleada como marcador selectivo luego de la transformación de las cepas con los plásmidos pPIC3 y pPIC9, los cuales presentan el gen HIS4. Las características principales de estas cepas se resumen en la Tabla I.

Cepa	Genotipo	Fenotipo
GS115	his 4	Mut ^r
KM71	arg4his4aox1..ARG4	Mut ^r , Arg ^r

Tabla I. Características de las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris*. (*Pichia* Expression Kit, Version C, Catalog no. K1710-01, Invitrogen.).

La cepa KM71 es Mut^s (*Methanol utilisation slow*), ya que debido a que ha perdido el gen AOX1, los niveles de síntesis de la alcohol oxidasa son muy bajos y la cepa presenta un crecimiento muy lento en un medio de cultivo con metanol. Esta cepa fue mutada en el gen de la argininosuccinato liasa (ARG4), lo que le impediría crecer en ausencia de arginina. Sin embargo el fenotipo fue recuperado al insertarle el gen ARG4 silvestre en el lugar del gen AOX1.

La inserción del gen de interés en *P. pastoris* se lleva a cabo mediante la recombinación homóloga entre el DNA transformante que se introduce de manera lineal y las regiones de homología dentro del genoma (Cregg, et al, 1985; Cregg, et al, 1989). Estas integraciones resultan bastante estables en ausencia de presión selectiva. Los plásmidos pPIC (Fig. 6) presentan el gen HIS4 y fueron diseñados para poder ser linearizados con una enzima de restricción de modo que la transformación de las levaduras con el DNA lineal de la secuencia del gen de interés, diera como resultado transformantes His⁺, es decir, que pueden crecer en ausencia de histidina, por recombinación en el locus his4 o en el locus AOX1 del genoma de la levadura. Los eventos de inserción sencillos en el genoma de *Pichia* tienden a ocurrir con mucha mayor frecuencia que los intercambios múltiples o dobles.

II. Objetivos.

II.1 Objetivo General:

El presente proyecto tiene como objetivo principal la expresión del ectodominio del betaglicano en cantidades considerables en el sistema de la levadura *Pichia pastoris*. Niveles altos de esta expresión son requeridos para la realización de experimentos *in vitro* e *in vivo* con esta molécula.

II.2 Objetivos Particulares:

Debido a que la expresión del ectodominio del betaglicano secretado se llevó a cabo mediante el empleo de un plásmido que presentó la secuencia señal del factor a de *S. cerevisiae* y otro que carecía de la misma, uno de los objetivos particulares del proyecto consistió en probar de qué modo la levadura *P. pastoris* era capaz de expresar la forma extracelular del betaglicano, ya sea mediante la utilización del péptido señal del factor a o a través del empleo de la del propio receptor.

Otro de los objetivos particulares fue el de observar si *P. pastoris* es capaz de procesar e introducir cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) a la proteína medular del ectodominio del betaglicano ("core protein") durante su síntesis.

III. Estrategia General.

El objetivo inicial del proyecto fue el de lograr la expresión de dos formas del betaglicano soluble, una silvestre y otra carente de cadenas de glicosaminoglicanos, clonadas cada una en los dos plásmidos pPIC (pPIC3 y pPIC9). La intención de clonarse en dos plásmidos diferentes fue la de verificar con qué secuencia señal era capaz de expresar preferentemente la levadura *P. pastoris*.

La secuencia del betaglicano soluble se obtuvo a partir de las mutantes LS y LSgag' (López-Casillas, et al, 1994) construidas a partir de clonas provenientes del cDNA del betaglicano de rata (López-Casillas, et al, 1991). Estas mutantes presentan como características principales una secuencia o epítope del oncogen c-myc entre las bases 438 y 476 y una reducción en la secuencia no traducida del extremo 3' (López-Casillas, et al, 1993). Las secuencias corresponden solamente a la región extramembranal o ectodominio del betaglicano y presentan una secuencia de 6 histidinas en el extremo C-terminal, justo antes del codón de término, la cual les fue insertada con el propósito de facilitar la purificación de la proteína a través de una columna de cromatografía por afinidad (López-Casillas, et al, 1994). La mutante LSgag' presenta sustituidas la Ser⁵³⁵ y la Ser⁵⁴⁶ por Ala lo cual evita la glicosaminoglicación de la proteína al ser expresada en células de mamífero. La funcionalidad y propiedades de estas mutantes han sido previamente reportadas (López-Casillas, et al, 1994).

Las construcciones LS y LSgag' fueron posteriormente modificadas para su subclonación en los vectores de *P. pastoris* (Fig. 9). Entre las modificaciones de estas construcciones están la reducción de aproximadamente 343 pb a 5 pb del extremo 5' no traducido de la secuencia del cDNA del ectodominio del betaglicano (Fig. 9). Para llevar a cabo la clonación en el plásmido pPIC9, fue indispensable crear un sitio XbaI (Fig. 9). El corte enzimático en este sitio da lugar a un extremo pegajoso, el cual fue "rellenado" con la polimerasa "Klenow" para originar un extremo como compatible con SnaBI, y así poder ser insertado en pPIC9. La inserción de la secuencia del ectodominio del betaglicano entre los sitios SnaBI y AvrII en pPIC9 hizo posible que la secuencia señal del factor α incluida en el vector pudiera quedar en el marco de lectura correcto, justo antes de la secuencia del receptor (Fig. 10). La exactitud de todas las manipulaciones en los cDNAs fueron verificadas por secuenciación nucleotídica (Material y Métodos).

Los insertos fueron subclonados en pPIC3 entre los sitios EcoRI y AvrII (Fig. 11) ; mientras que la subclonación en pPIC9 se llevó a cabo en los sitios SnaBI y AvrII (Fig. 10).

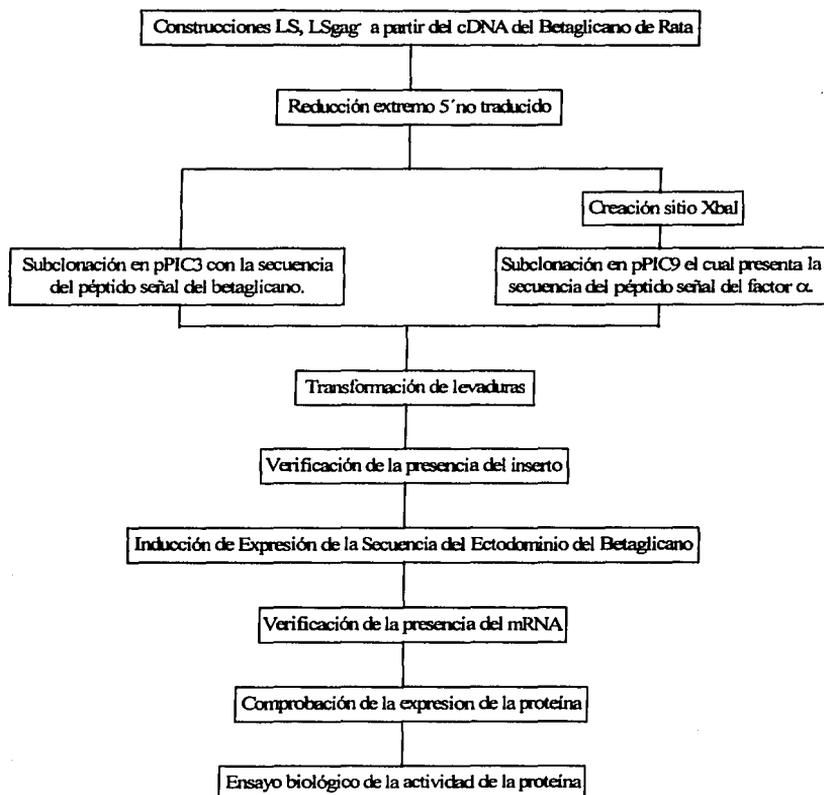


Fig. 9. Estrategia General para la construcción de los insertos del ectodominio del betaglicano y para su expresión soluble en *Pichia pastoris*.

Construcciones del Ectodominio del Betaglicano Subclonadas en el Vector pPIC9.

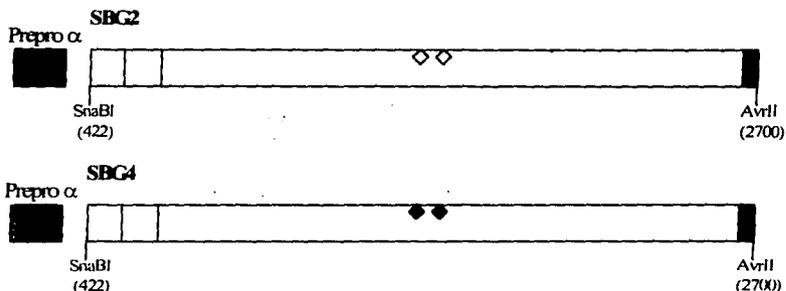


Fig. 10 Construcciones del ectodominio del betaglicano subclonadas en pPIC9. En la presente figura se muestran las construcciones SBG2 y SBG4 subclonadas en pPIC9 en donde se indica la localización del péptido señal del factor α de *S. cerevisiae* ■ justo antes de la secuencia del ectodominio del betaglicano, el epitope c-myc □ y las 6 histidinas en el extremo C terminal ■. En SBG2 se muestra la posición de las Ser³³⁵ y la Ser⁵⁴⁶ ◇, mientras que en SBG4 se muestra esta misma posición en la que se sustituyeron las Ser por Ala ◆.

Construcciones del Ectodominio del Betaglicano Subclonadas en el Vector pPIC3.

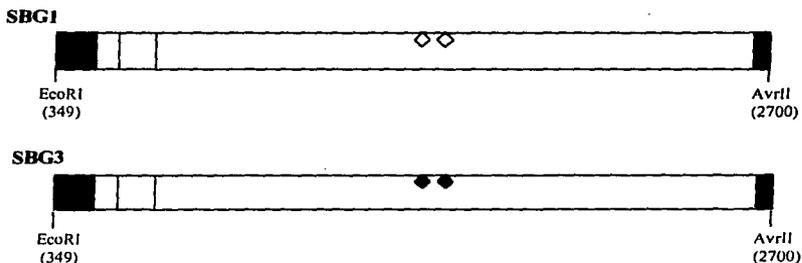


Fig. 11. Construcciones del ectodominio del betaglicano subclonadas en pPIC3. En esta figura se muestran las construcciones SBG1 y SBG3 subclonadas en pPIC3 en donde se indica la localización del péptido señal del ectodominio del betaglicano ■, el epitope c-myc □ y las 6 histidinas en el extremo C terminal ■. En SBG1 se muestra la posición de las Ser³³⁵ y la Ser⁵⁴⁶ ◇, mientras que en SBG3 se muestra esta misma posición en la que se sustituyeron las Ser por Ala ◆.

Después de la subclonación en los vectores pPIC, se transformaron las levaduras por el método de esferoplastos, el cual se basa en la degradación parcial de la pared celular de las levaduras mediante la hidrólisis de los enlaces β -1,3 de los polímeros de glucosa por una β -glucanasa, también denominada zimoliasa. Se ha determinado empíricamente que la digestión óptima de la pared celular para la transformación es cuando se han lisado un 30% de células.

La integración de los insertos se comprobó por PCR en el DNA genómico de las levaduras, mediante la amplificación de un fragmento flanqueado por los oligonucleótidos RBG2 (empleado para la reducción del extremo 5' del ectodominio de betaglicano que es complementario a las bases 540-560 del betaglicano) y 5'AOX1 del promotor del gen de la alcohol oxidasa.

La expresión del ectodominio del betaglicano se indujo mediante la adición de 0.5% de metanol en el medio de cultivo, posteriormente se verificaron los niveles de mRNA producido por análisis de "Northern Blot" y se analizó la expresión del betaglicano soluble secretado por análisis de "Western Blot".

Con la intención de facilitar la lectura del presente trabajo, la metodología seguida durante el mismo se describe en detalle en el Capítulo VIII. Material y Métodos.

IV. Resultados.

IV.1. Clonación del cDNA del betaglicano soluble en los vectores para *Pichia pastoris*.

IV.1.1. Construcción de los cDNAs.

La secuencia del ectodominio del betaglicano se obtuvo a partir de las mutantes LS y LSgag⁻ (López-Casillas, et al, 1994), que a su vez derivaron del cDNA del betaglicano de rata de la clona lbg7 (López-Casillas, et al, 1991). Estas mutantes tienen marcos de lectura que codifican únicamente al ectodominio del betaglicano; es decir, las regiones transmembranal y citoplásmica han sido separadas del marco de lectura por la introducción de un codón de terminación. Estos cDNAs tienen aproximadamente 2700 pb, con la región 3' no traducida recortada y el epítotope c-myc (EQKLISEEDL) insertado entre las bases 438 y 476, seis codones después de la secuencia señal (López-Casillas, et al, 1993); esta secuencia fue incluida con la intención de facilitar la detección de los insertos mediante la utilización del anticuerpo monoclonal 9E10 (Evan, et al, 1985).

La mutante LS se creó mediante la inserción justo antes de la región transmembranal de la proteína en el sitio NcoI (pb 2677), de un par de oligonucleótidos hibridados que codificaban para un codón de terminación. Estos oligos tenían también seis codones para histidina en el extremo C-terminal antes del codón de término que se insertaron con el propósito de facilitar la purificación de la proteína en una columna de cromatografía por afinidad (López-Casillas, et al, 1994).

La mutante LSgag⁻ (Fig. 12) derivó de la mutante gag⁻, la cual fue creada por mutagénesis dirigida usando la técnica de PCR (Wrana, et al, 1992). La mutante gag⁻ presenta sustituidas la Ser⁵³⁵ y la Ser⁵⁴⁶ por Ala, por lo cual, en células de mamífero se evita la glicosaminoglicación de la proteína. A esta mutante también fue necesario insertarle un par de oligonucleótidos hibridados que codificaran para un codón de término en el sitio NcoI, para que así pudiera obtenerse solamente la forma soluble del betaglicano.

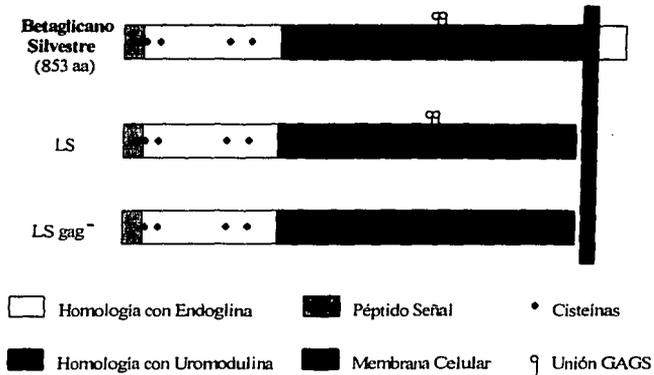


Fig. 12. Estructura General del Betaglicano y de sus cDNAs mutantes LS y LSgag⁻. En la presente figura se muestra la estructura general del betaglicano silvestre, así como la de las proteínas codificadas por los cDNAs mutantes obtenidos a partir de la clona lbg7 (López-Casillas et al, 1993) denominadas LS y LSgag⁻. Nótese que las mutantes LS y LSgag⁻ no presentan las regiones transmembranal y citoplásmica y que la mutante LSgag⁻ carece de cadenas de glicosaminoglicanos.

La secuencia del betaglicano empleada para su expresión en *P. pastoris* pudo obtenerse tomando como molde a las mutantes LS y LSgag⁻ (López-Casillas, et al, 1994; Wrana, et al, 1992) clonadas en el vector pGEM-4Z (Promega), las cuales fueron renombradas con los términos SolMycBGH6/gem4Z y SolMycBGH6dm10/gem4Z, respectivamente.

Para llevar a cabo la clonación en los vectores de *P. pastoris* fue necesario reducir de aproximadamente 343 pb a 5 pb, el extremo 5' no traducido, considerado no necesario para la expresión de la proteína en la levadura. Por otra parte, para la clonación en el plásmido pPIC9, fue indispensable crear un sitio XbaI. Este sitio fue creado para que al insertar la secuencia del betaglicano soluble en el plásmido, la secuencia señal del factor a incluida en el vector pudiera quedar en el marco de lectura correcto, justo antes de la secuencia del receptor. Los insertos del betaglicano soluble correspondientes al extremo 5' no traducido con y sin sitio XbaI se obtuvieron mediante el empleo de la técnica de la PCR (Material y Métodos). El molde empleado, fue la secuencia de la mutante LS, y se usaron como indicadores los oligonucleótidos RBG1, RBG2, RBG3 y RBG4.

Las secuencias de los oligonucleótidos fueron :

RBG1

EcoRI
5' caa**GAATTC**gagagatggcagtgacatccca 3'

RBG2

5' ctgctggcacagccagacagaa 3'

RBG3 (base cambiada para dar lugar al sitio XbaI)

5' ccgcccgtc**T**agagcccagca 3'

RBG4 (base cambiada para dar lugar al sitio XbaI)

5' gctgggctc**A**gaccggcgt 3'

El oligonucleótido RBG1 permite la amplificación del gen 5 pb antes del codeón de inicio de la transcripción, reduciendo de esta manera el extremo 5' no traducido del gen. Además contiene un sitio de restricción para la enzima EcoRI, que facilita la subclonación del producto final de la PCR.

En la Fig. 13 se describen esquemáticamente las reacciones de PCR llevadas a cabo para reducir la secuencia del extremo 5' del ectodominio de betaglicano, así como para la creación de un sitio XbaI en uno de los insertos. El fragmento obtenido de la amplificación originada por RBG1 y RBG2, usando LS como molde, se cortó con StuI (pb 517) para dar un producto de 174 pb (Fig. 14). La amplificación con los oligos RBG4 y RBG1, usando también LS como molde, dieron un producto de 88 pb con una mutación que cambio una citosina por una timina. Esta mutación fue introducida por el oligo RBG4, el cual había sido diseñado con esta sustitución.

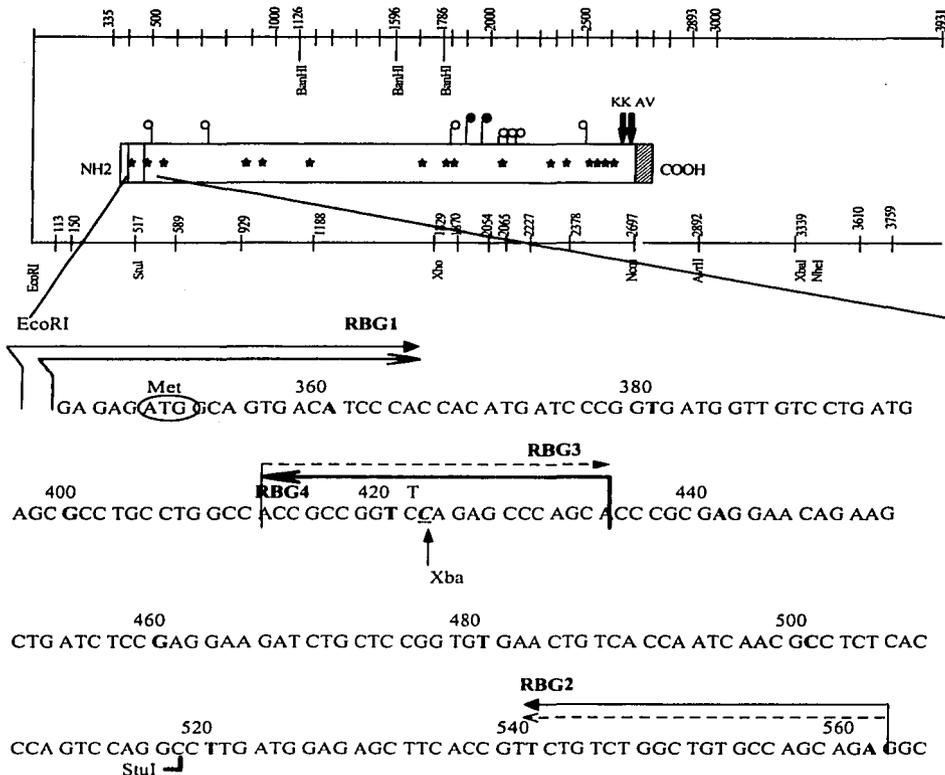


Fig 13. Reacciones de PCR realizadas para reducir el extremo 5' de la secuencia del sBG y para la creación del sitio XbaI en los insertos del sBG subclonados en pPIC9 utilizando como molde a la mutante LS. En la parte superior de la figura se muestra el esquema general de los motivos estructurales principales de la cadena polipeptídica de la mutante LS del Betaglicano (López-Casillas et al, 1993) la cual corresponde a la región extramembranal de la proteína, así como algunos sitios de restricción. La figura muestra la localización de los siete sitios potenciales de N-glicosilación ○, los sitios de unión de cadenas GAG ●, las 17 Cisteínas ★, el sitio potencial de corte Lys-Lys (KK), el sitio de corte potencialmente regulado Leu-Ala-Val-Val (AV), así como la localización de los seis codones de histidina en el extremo C-terminal antes del codón de término de la transcripción ▨. En la parte inferior de la figura se describen esquemáticamente las reacciones de PCR llevadas a cabo para reducir la región del extremo 5' de la secuencia del ectodominio del betaglicano; así como para crear un sitio XbaI en los insertos que fueron subclonados en pPIC9 (Ver texto). Encerrada en un círculo se indica la metionina (Met) que indica el inicio de la traducción.

La sustitución de una citosina por una timina en este codón provocó el cambio de una leucina (CCA) por una prolina (CTA), cambió que generó un sitio Xba I en la base 422. El fragmento de 147 pb producido por la amplificación causada por los oligos RBG3 y RBG2, también empleando LS como molde, fue utilizado también para introducir el sitio Xba I en la base 422. El empalme producido entre las secuencias de los oligos RBG3 y RBG4 de los fragmentos de 147 pb y de 88 pb, permitió usarlos como moldes en una segunda PCR en la que los oligos RBG1 y RBG2 funcionaron como iniciadores. Esta segunda PCR dió lugar a un fragmento de 216 pb, el cual tiene un nuevo sitio Xba I en la base 422 de la secuencia de LS. El fragmento obtenido también se cortó con StuI en la base 517 para dar un producto de 174 pb (Fig.14).

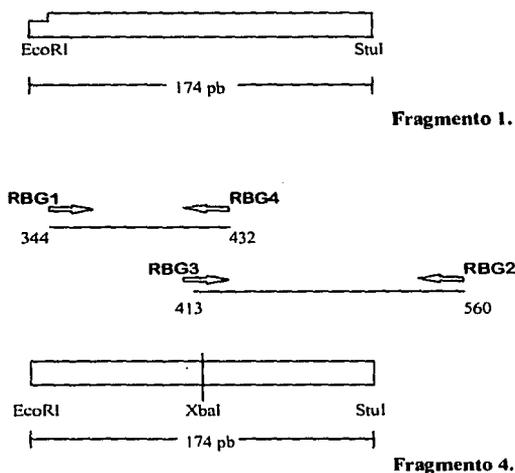


Fig. 14. Fragmentos EcoRI-StuI obtenidos de la PCR realizada para reducir el extremo 5' de la secuencia del sBG y para la creación del sitio Xba I en los insertos del sBG subclonados en pPIC9. En esta figura se muestran dos fragmentos de 174 pb, siendo la única diferencia entre ellos el sitio Xba I en la base 422 del Fragmento 4. Los fragmentos 1 y 4 fueron subclonados en SolMycBGH6/gem4Z.

Cada fragmento fue subclonado en sus sitios EcoRI-StuI en la secuencia denominada SolMycBGH6/gem4Z (mutante LS insertada en el plásmido pGEM-4Z) (Fig. 15). Con los productos de las ligaciones se transformaron bacterias (Material y Métodos) que se sembraron en cajas de Petri con medio LB/ampicilina.

Se tomaron 6 colonias de cada ligación y se crecieron en medio "Terrífico" (Material y Métodos) con ampicilina por una noche. Al siguiente día se hizo extracción de DNA de plásmido por la técnica de miniprep (Material y Métodos). El DNA obtenido se digirió con EcoRI/BamHI para corroborar la presencia del inserto, obteniendo así los productos esperados (780 pb, 470 pb, 190 pb y 3600 pb). Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación (Material y Métodos) del fragmento de 780 pb del fragmento EcoRI_{base 349} - BamHI_{base 1126} de las 12 clonas seleccionadas (6 de cada ligación) para verificar la exactitud de las manipulaciones realizadas, en especial aquellas que involucraron PCR, pues existe la posibilidad de que en éstas se hubieran creado mutaciones puntuales.

El fragmento EcoR I (base 349) y Xho (base 1829) (Fig. 15) del DNA de las minipreps realizadas a dos de las clonas seleccionadas (clona proveniente de la ligación Fragmento EcoRI/StuI Silvestre---Secuencia LS y clona proveniente de la ligación Fragmento EcoRI/StuI con sitio XbaI---Secuencia LS) fue subclonado en la secuencia de la mutante LSgag- insertada en el plásmido pGEM-4Z, denominada SolMycBGdm10H6/gem 4Z. Estas inserciones se hicieron con el propósito de tener las mismas construcciones anteriormente descritas en un cDNA mutado en las Serinas 535 y 546.

Los nuevos nombres asignados a las cuatro construcciones fueron:

NOMBRE	CARACTERISTICA
pSBG1	SolMycBGH6 (5' no traducida reducida) /pgem 4Z (Tipo Silvestre).
pSBG2	SolMycBGH6 (5' no traducida reducida + mutación Xba I) /pgem 4Z
pSBG3	SolMycBGdm10H6 (5' no traducida reducida) /gem 4Z (Ser ⁵³⁵ y Ser ⁵⁴⁶ mutadas)
pSBG4	SolMycBGdm10H6 (5' no traducida reducida + mutación Xba I) /pgem 4Z (Ser ⁵³⁵ y Ser ⁵⁴⁶ mutadas)

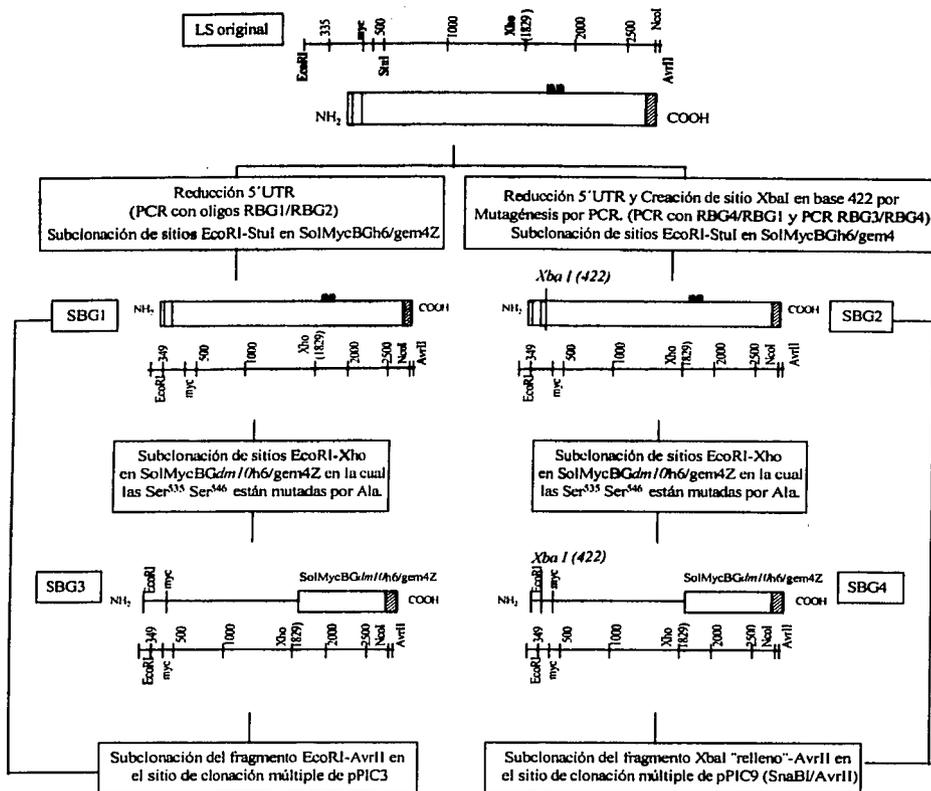


Fig. 15. Estrategia General para la construcción y subclonación de los insertos del sBG en los vectores pPIC de *P. pastoris*. La secuencia de la mutante LS (López-Casillas et al, 1993) fue empleada como molde para la construcción de los diferentes insertos. Todos los insertos presentan seis codones para histidina antes del codón de término  y antes del sitio AvrII en la región C-terminal. Los insertos SBG1 y SBG2 presentan el péptido señal del betaglicano . Los insertos SBG2 y SBG4 presentan una mutación que dio lugar a un sitio XbaI, el cual fue utilizado para la subclonación en pPIC9. Los insertos SBG1 y SBG3 fueron subclonados en el vector pPIC3. SBG3 y SBG4 presentan mutadas las Ser³³⁵ Ser³⁴⁶ por el aminoácido Ala, por lo que de esta manera se evita la glicosaminoglicación en estos sitios. Nótese la presencia de la secuencia del epítipo c-myc entre las bases 438-476, esta secuencia se insertó con la intención de facilitar la detección de la proteína expresada.

El DNA obtenido de las minipreps de las clonas seleccionadas de las cuatro construcciones, se cortó con Eco/BamHI y con XbaI/Xho, con el fin de verificar que todos los insertos estuvieran correctos.

A continuación se mencionan las características principales de las construcciones correspondientes a las secuencias de las variantes del betaglicano soluble que se planearon expresar en el sistema de *Pichia pastoris*. Los cuatro insertos denominados SBG1, SBG2, SBG3 y SBG4 (Fig.15) presentan:

- aproximadamente 2280 pb para SBG1 y SBG3; y 2355 pb para SBG2 y SBG4.
- corresponden a la secuencia del betaglicano en su forma soluble
- presentan la región del extremo 5' no traducida reducida a 5 bases aproximadamente.
- presentan el epítipo c-myc entre las bases 438-476.
- tienen una cola de 6 histidinas en el extremo C-terminal.

Los insertos SBG1 y SBG3 se introdujeron en el vector pPIC3, siendo el SBG3 el que presentó las Ser⁵³⁵ y la Ser⁵⁴⁶ mutadas por Ala (Fig. 15).

Los insertos SBG2 y SBG4 presentaron una mutación en la base 422 en la cual se cambió una citosina por una timina, modificando el aminoácido leucina (codón CCA) por una prolina (codón CTA), originando así un sitio XbaI (Fig. 15). El SBG4 presentó mutadas las Ser⁵³⁵ y la Ser⁵⁴⁶ por Ala (Fig. 15). Estas dos secuencias fueron introducidas en el plásmido pPIC9.

IV.1.2 Subclonación en pPIC.

Se transformaron bacterias (Material y Métodos) con los plásmidos (pPIC3 y pPIC9) provistos en el equipo comercial de expresión y se sembraron en cajas de medio LB/ampicilina (Material y Métodos). De estas cajas, se inoculó una colonia en medio LB para su cultivo durante una noche. Se extrajo el DNA de los plásmidos por la técnica de miniprep (Material y Métodos) y se congeló a -20° C. De las colonias de bacterias transformadas se guardaron alícuotas en glicerol a -70° C.

El DNA extraído por miniprep de las construcciones SBG1 y SBG3 clonadas en SolMycBGH6/gem4Z, así como del plásmido pPIC3, se cortó con las enzimas de restricción AvrII y EcoRI. Los fragmentos resultantes, se aislaron y purificaron con el equipo comercial GeneClean Bio 101, Inc. (Material y Métodos) y se ligaron en los sitios mencionados al vector pPIC3.

Para la inserción de SBG2 y SBG4 (ambos con un sitio XbaI) en el vector pPIC9, se cortaron las construcciones SBG2 y SBG4 en SolMycBGdm10H6/gem 4Z con la enzima XbaI, dando así lugar a un extremo pegajoso en este sitio. El extremo pegajoso fue "rellenado" con la enzima "Klenow", dando así origen a un sitio SnaBI (extremo romo).

El plásmido pPIC9 y las construcciones SBG2 y SBG4 en SolMycBGdm10H6/gem 4Z se cortaron con SnaBI y AvrII. Los fragmentos resultantes de la digestión se aislaron, se purificaron y se ligaron en los sitios SnaBI y AvrII del vector pPIC9.

Con el DNA de las ligaciones se transformaron bacterias y se sembraron en cajas de medio LB/ampicilina. Se extrajo el DNA de algunas clonas y se cortó con BamHI para verificar su identidad (se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 9kb del vector, 470 pb, 190 pb, 796 pb para las clonas en pPIC3 y 984 pb para las clonas en pPIC9). Al analizar las muestras por electroforesis en un gel de agarosa se observó que sólo en algunas clonas se obtenían los fragmentos esperados. Fue necesario hacer varias transformaciones con las ligaciones que involucraban al plásmido pPIC9 para estar seguros de su identidad, ya que en general, se obtenían menos colonias al transformar con estas ligaciones que con las que involucraban a pPIC3. Además las digestiones realizadas con BamHI para corroborar su identidad no eran del todo satisfactorias de acuerdo con los patrones observados en los geles de agarosa. Estos problemas se debieron principalmente a que los insertos subclonados en este plásmido involucraban una ligación del extremo romo, las cuales tienen menor eficiencia que las de extremos pegajosos. Las subclonas de pPIC9 fueron secuenciadas para verificar que los marcos de lectura del péptido α y el betaglicano estuviesen continuos.

Después de la verificación por secuenciación del DNA de plásmido extraído de bacterias se eligieron para la transformación de *P. pastoris* aquellos que presentaron la secuencia correcta (Tabla II).

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS
pPI-1	pPIC3 + SBG1 (BG silvestre)
pPIII-4	pPIC3 + SBG3 (BG sin cadenas GAG)
pPII-7	pPIC9 + SBG2 (BG con sitio XbaI)
pPIV-14	pPIC9 + SBG4 (BG con sitio XbaI y sin GAG)

Tabla II. Insertos de sBG subclonados en los vectores pPIC. El DNA extraído por miniprep de clonas de *E. coli* fue secuenciado para verificar su identidad. En esta Tabla se indican los plásmidos que presentaron la secuencia correcta y que se eligieron para transformar a la levadura *Pichia pastoris*.

IV.2. Transformación de la levadura *Pichia pastoris* por el método de esferoplastos con las diferentes construcciones del ectodominio del betaglicano soluble en los vectores pPIC.

Una vez que se tuvieron las diferentes construcciones del betaglicano soluble clonadas en los vectores pPIC, se linealizó el DNA con la enzima NsiI para poder transformar a la levadura *Pichia pastoris* por el método de esferoplastos (Material y Métodos).

El método de esferoplastos empleado para la transformación de *Pichia pastoris* resultó una estrategia eficaz en lo que a producción de transformantes se refiere, aunque pudieron notarse marcadas diferencias en el tiempo de digestión de la pared celular con la β -glucanasa en cada cepa utilizada (GS115 y KM71); así como en el número de Centros Formadores de Colonias (C.F.C.) o Transformantes originados por microgramo de DNA. El porcentaje recomendado de esferoplastos necesarios para una transformación eficiente es del 70% según el protocolo ya establecido (*Pichia* Expression Kit. Version C. Catalog no. K1710-01. Invitrogen.). El tiempo de digestión con glucanasa para la formación del 70% de esferoplastos en la cepa GS115 de *P. pastoris* fue de 10 minutos, mientras que para la formación de este mismo porcentaje en la cepa KM71 fueron 17 minutos. También fue distinto el número de C.F.C. o Transformantes originados para cada cepa (Tabla III).

Construcción	C.F.C. / μ g DNA (Centros Formadores de Colonias o Transformantes)	
	GS115	KM71
PIC3 + SBG1 (pPI-1)	166	5
PIC9 + SBG2 (pPII-7)	42	3
PIC3 + SBG3 (pPIII-4)	72	3
PIC9 + SBG4 (pPIV-14)	36	9
PIC3	64	5
PIC9	0	3

Tabla III. Centros Formadores de Colonias (C.F.C.) producidos por microgramo de DNA de la transformación por esferoplastos de las cepas GS115 y KM71 de cada construcción.

Como puede observarse en la Tabla III, se obtuvo un mayor número de C.F.C. por microgramo de DNA de las transformantes de la cepa GS115 que de la cepa KM71, así como también el tiempo necesario para la formación del 70% de esferoplastos fue menor en la cepa GS115 que en la KM71. Estos resultados muestran claramente diferencias entre las dos cepas, las cuales podrían ser de tipo estructural, en particular de su pared celular.

IV.3. Análisis por PCR del Evento de Integración de las construcciones del ectodominio del betaglicano en los plásmidos pPIC en el genoma de la levadura *Pichia pastoris*.

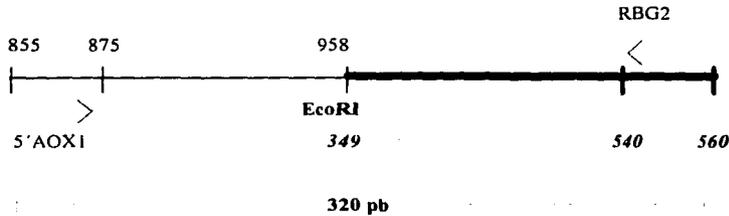
Después de haber transformado a *P. pastoris* con las construcciones del ectodominio del betaglicano en los plásmidos pPIC, se analizó por PCR (Material y Métodos) el DNA genómico (Material y Métodos) de algunas clonas obtenidas para comprobar si la secuencia del ectodominio del betaglicano había sido incluida en el genoma de la levadura.

En la reacción de PCR (Material y Métodos) se empleó el oligonucleótido RBG2, el cual había sido utilizado en la construcción de los insertos del betaglicano soluble, y una secuencia diseñada para amplificar un fragmento del extremo 5' del gen AOX1 de los vectores pPIC. En la Figura 16 se muestra el tamaño y características de los productos amplificados en las reacciones de PCR con los oligonucleótidos RBG2 y 5'AOX1 a partir del DNA genómico de las clonas transformadas con la construcción del betaglicano soluble en los plásmidos pPIC3 y pPIC9. Como se muestra, los productos de PCR esperados con estos cebadores son de 320 y 502 pb, usando moldes o templados derivados de pPIC3/SBG y pPIC9/SBG, respectivamente. Se analizaron por PCR, el DNA genómico de 22 clonas obtenidas de la cepa GS115; el de 11 clonas de la cepa KM71; el de la clona 5 de la cepa GS115 transformada con el vector pPIC3 sin inserto; el de una clona transformada con el gen de la albúmina sérica humana (HSA) provista en el equipo de expresión de *P. pastoris* y el DNA de los vectores pPIC3 y pPIC9.

El DNA de las clonas 5, HSA y el de los vectores pPIC3 y pPIC9 se utilizaron como controles negativos ya que estos no presentan ninguna secuencia que pudiera amplificarse en la reacción de PCR. También como control negativo se empleó la reacción de PCR llevada a cabo sin DNA (BCO).

El DNA extraído por miniprep de los plásmidos pPIII-4 y pPIV-14 se utilizó como control positivo. El DNA de estos plásmidos había sido utilizado para la transformación de *P. pastoris*, por lo que los productos amplificados resultantes de la reacción de PCR con este DNA, serían los esperados también en aquellas reacciones que involucraran el DNA genómico de las clonas de *P. pastoris* (Fig. 16). El plásmido pPIII-4 presenta la construcción SBG3 (ectodominio del BG sin cadenas GAG) en pPIC3, mientras que el plásmido pPIV-14 tiene la construcción SBG4 (mutación Xba y sin cadenas GAG) en pPIC9 (Tabla II).

A. Producto amplificado de la clona transformada con la construcción en pPIC3.



B. Producto amplificado de la clona transformada con la construcción en pPIC9.

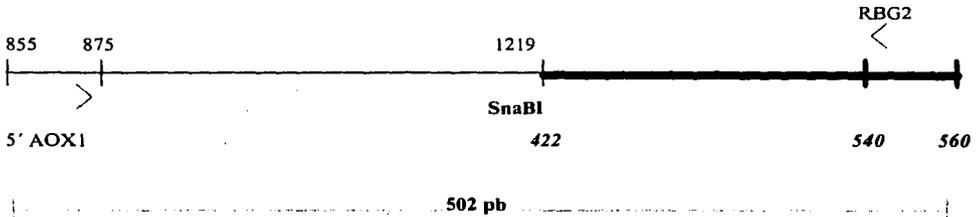


Fig. 16. Productos esperados de la PCR con los oligos RBG2 y 5' AOX1 en el análisis del DNA genómico de las transformantes de *P. pastoris*. Nota: La secuencia correspondiente al inserto del ectodominio del betaglicano se indica en la línea con mayor grosor, y con línea sencilla se indica la secuencia del vector pPIC. El número de par de base correspondiente a la secuencia del betaglicano se indica en formato *inclinado y en negro oscuro*, mientras que el número de pares de bases del plásmido se indica en formato normal.

En la Fig. 17 se muestran los fragmentos resultantes de la reacción de PCR para algunas de las clonas analizadas de la cepa GS115. En esta figura se observan también los carriles de las muestras resultantes de las reacciones de PCR que no dieron amplificación alguna con el DNA genómico de las clona 5, el de la clona HSA, el DNA de los vectores (pPIC3 y pPIC9), así como aquella en la que no se utilizó DNA (BCO). El DNA genómico de estas clonas carecen del inserto del ectodominio del betaglicano, por lo que no se observa nada en sus respectivos carriles (Fig. 17). En los demás carriles se observan dos tipos de fragmentos; uno de 0.502 kb (Fig. 17) resultante de la PCR de aquellas clonas provenientes de la construcción del ectodominio del betaglicano en pPIC9 (Fig. 16), la cual contenía al péptido señal α de *S. cerevisiae*; y

otro de 0.320 kb (Fig. 17) resultante de la PCR de aquellas clonas provenientes de la construcción del ectodominio del betaglicano en pPIC3 (Fig. 16).

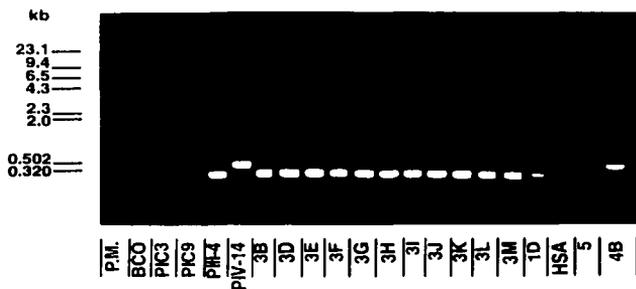


Fig. 17. Análisis por electroforesis de los productos amplificados de la PCR con los oligos RBG2 y 5'AOX1 del DNA genómico de algunas de las transformantes de la cepa GS115 de *P. pastoris*. En la presente figura se observan los productos amplificados de la reacción de PCR con los oligos RBG2 y 5'AOX1 del DNA genómico de algunas de las clonas obtenidas de la cepa GS115. El marcador de peso molecular utilizado (P.M.) fue el fago λ digerido con HindIII. No se observan productos amplificados en aquellos carriles de las muestras BCO (PCR sin DNA); HSA (PCR con DNA genómico de clona transformada con plásmido con el gen para Albúmina Sérica Humana); pPIC3 y pPIC9 (PCR con DNA de vectores) y 5 (PCR con el DNA de la clona de la cepa GS115 transformada sólo con el vector pPIC3). El DNA extraído por miniprep de los plásmidos pPIII-4 y pPIV-14, se utilizó como control positivo debido a que su identidad ya había sido confirmada por secuenciación. Nótese que los fragmentos obtenidos, presentan un peso de 0.502 kb en aquellas clonas transformadas con el inserto del betaglicano soluble en pPIC9 y de 0.320 kb en aquellas clonas transformadas con el inserto del betaglicano soluble en pPIC3.

El análisis por PCR reveló que aproximadamente el 80% de las clonas obtenidas para las cepas GS115 y KM71 presentaron el inserto de interés incluido en su genoma (Tabla IV).

GS115				
Transformación	Clonas Analizadas		Clonas con Inserto	
pPIC3 + SBG1	1A 1B 1C 1D		1A 1B	
pPIC9 + SBG2	2		2	
pPIC3 + SBG3	3B 3D 3E 3F 3G	3H 3i 3J 3K 3L 3M	3B 3D 3E 3F 3G	3H 3i 3J 3K 3L 3M
pPIC9 + SBG4	4B 4D 4E 4F 4G	4H 4i 4J 4K 4L	4B 4D 4E 4F 4G	4i 4J 4K 4L
pPIC 3	5		5	
KM71				
Transformación	Clonas Analizadas		Clonas con inserto	
pPIC3 + SBG1	1A 1B 1C	1D 1E 1F	1A 1B 1D	1E 1F
pPIC9 + SBG2	1IA 1IB 1IC	1ID 1IE 1IF	1IA 1IB 1IC	1ID 1IE 1IF
pPIC3 + SBG3	1IIA 1IIB 1IIC	1IID 1IIE	1IIB 1IIC 1IID	1IIE
pPIC9 + SBG4	1IVA 1IVB 1IVC	1IVD 1IVE 1IVF	1IVA 1IVB	1IVD 1IVE 1IVF

Tabla IV. Transformantes de las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris* analizadas por PCR para corroborar la presencia del inserto de sBG en su genoma. En la tabla se muestran aquellas clonas que presentaron el inserto de sBG para cada transformación de la cepa que se indica.

Posteriormente se examinaron los niveles de mRNA de algunas clonas seleccionadas al azar, previa inducción de la expresión de la proteína con metanol.

IV.4. Análisis de la inducción por metanol de la traducción del gen quimérico (ectodominio de betaglicano) en las transformantes de *Pichia pastoris*.

Una vez que se corroboró la presencia del inserto del ectodominio del betaglicano en el genoma de algunas clonas de *P. pastoris*, se verificó a través del análisis del RNA mensajero por "Northern Blot", su expresión inducida por metanol (Material y Métodos).

Primeramente se escogieron dos colonias de cada cepa transformadas con la construcción SBG4/pPIC9 que incluía a la secuencia del betaglicano soluble con las Ser 535 y 546 mutadas por alanina (sin sitios de unión para las cadenas de glicosaminoglicanos) de modo que, dependiendo de los resultados que se obtuvieran con estas clonas, se procedería a seguir el mismo protocolo para las demás construcciones (Tabla IV).

Después de iniciada la inducción de la expresión de la proteína (Material y Métodos) en los cultivos de las clonas seleccionadas, se tomaron muestras a las 16, 40 y 63 horas y se aisló RNA. Esto se hizo para establecer el tiempo óptimo de expresión del mRNA del ectodominio del betaglicano. Se hicieron cultivos en paralelo de las mismas clonas pero sin la adición de metanol, es decir, sin haber llevado a cabo la inducción de la expresión de la proteína, de modo que al hacer el análisis por "Northern Blot" pudiera tenerse un control negativo en el que no se esperara expresión del RNA mensajero. En la Tabla V se mencionan las clonas seleccionadas para el análisis de los niveles de mRNA.

Cepa	Construcción SBG4/PIC9
GS115	4B
	4D
KM71	IVA
	IVB

Tabla V. Clonas de las cepas GS115 y KM71 de *P. pastoris* seleccionadas para el análisis de los niveles de mRNA recombinante.

IV.4.1. Concentración de RNA total obtenida después de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido con metanol la expresión del ectodominio del betaglicano en algunas clonas de *P. pastoris*.

La concentración de RNA total que se obtuvo de los cultivos celulares luego de la inducción de la expresión del ectodominio del betaglicano fue menor que la de los cultivos en los que no se adicionó metanol como inductor de la expresión. Esto puede ser indicativo de que los cultivos en los que no se induce la expresión de la proteína, crecen mucho mejor que aquellos cultivos en los que si se induce la expresión del betaglicano soluble. En la Tabla VI se citan las concentraciones de RNA para cada cultivo calculadas a partir de la densidad óptica registrada a 260 nm.

Clona	Concentración de RNA Total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). 16 hrs.de inducción		Concentración de RNA Total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). 40 hrs.de inducción		Concentración de RNA Total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). 63 hrs.de inducción.	
	Inducida	No Induc.	Inducida	No Induc.	Inducida	No Induc.
GS115						
4B	6.4	13.2	6.8	11.6	5.0	10.0
4D	4.6	12.4	5.2	7.6		7.8
KM71						
IVA	7.8	11.6	7.1	7.9	3.4	7.6
IVB	7.8	11.4	7.6	11.8	3.9	7.8

Tabla VI. Cantidad de RNA Total ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) obtenido del cultivo de algunas transformantes de las cepas GS115 y KM71 luego de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido la expresión del gen quimérico del sBG (Inducida). También en la Tabla se muestran las concentraciones de RNA obtenido de aquellos cultivos en los que no se indujo la expresión del betaglicano soluble (No Induc.)

IV.4.2. Análisis por "Northern Blot" de los niveles de expresión del mRNA del betaglicano soluble mediante el aislamiento de RNA Total de las Células Transformadas con la Construcción SBG4/pPIC9 y su hibridación con un fragmento de la secuencia del cDNA del sBG.

El análisis de los niveles de expresión del ectodominio del betaglicano en las clonas de *P. pastoris* se realizó mediante una transferencia tipo Northern (Material y Métodos) para lo cual primero se llevó a cabo la electroforesis en un gel de agarosa-formaldehído de las muestras de RNA Total extraído de las clonas seleccionadas (Sambrook, et al, 1989) (Material y Métodos). Posteriormente, se transfirieron las muestras de

RNA en el gel agarosa-formaldehído a una membrana de nitrocelulosa para su hibridación con una sonda de cDNA de betaglicano de rata correspondiente al fragmento BamHI entre las bases 1125 y 1596. (Material y Métodos).

En la Fig. 18 sólo se presenta el análisis por electroforesis del RNA Total obtenido de los cultivos de las clonas 4B y 4D (SBG4 en pPIC9) de la cepa GS115. En esta figura (Fig 18) se observan aquellas muestras de RNA Total extraído de alícuotas de los cultivos de las clonas mencionadas tomadas después de 16, 40 y 63 horas de haberse iniciado la inducción de la expresión de la proteína con metanol. También en esta figura se incluyen aquellas muestras de RNA extraído de alícuotas de los cultivos de las clonas 4B y 4D en los que no se indujo la expresión, tomadas en los mismos tiempos en los que se tomaron las muestras de los cultivos en los que sí se había inducido expresión.

Se emplearon como controles positivos dos muestras de RNA total, las cuales corresponden en la Fig. 18 a la LM19 y LBG22, provenientes de mioblastos de rata transfectados con el cDNA de betaglicano (López-Casillas, et al, 1993). En la Figura 18 podemos destacar la integridad del mRNA 18s observada en los carriles de las muestras tomadas después de 40 y 63 horas de haberse iniciado la inducción de la expresión, tanto de los cultivos en los que se había adicionado metanol como inductor y de aquellos en los que no se realizó la inducción. Por otra parte el mRNA de las muestras tomadas a las 16 horas, se observa degradado. Cabe hacer notar la diferencia de intensidad observada entre los RNA 28s y 18s de las clonas de *Pichia pastoris*, siendo así el de 18s el que se observa mayormente teñido en el gel de agarosa-formaldehído. Desconocemos si esta diferencia es indicativa de un nivel de expresión o abundancia relativa.

Una vez que se vió que el mRNA era expresado en las clonas de *P. pastoris* analizadas, se procedió a realizar la transferencia del RNA del gel agarosa-formaldehído a una membrana de nitrocelulosa que después se hibridó con una sonda o secuencia del betaglicano soluble marcada radioactivamente y se lavó en condiciones de alta astringencia (Material y Métodos). La transferencia tipo Northern se hibridó con una secuencia de DNA correspondiente al sitio BamHI-BamHI entre las bases 1126 y 1596 del cDNA del betaglicano de rata. Estas secuencias están presentes en el cDNA del BG soluble subclonado en los plásmidos usados para transformar *P. pastoris*.

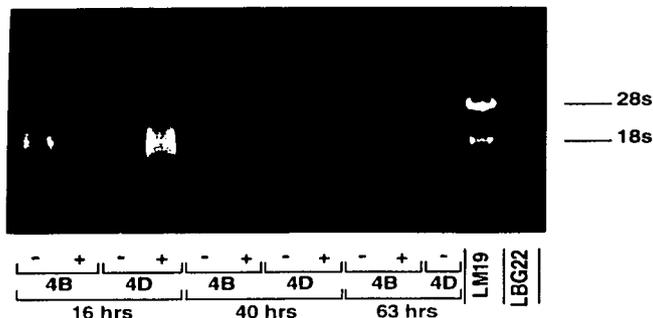


Fig. 18. Análisis por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído de las muestras de RNA obtenido de las clonas 4B y 4D de la cepa GS115 de *P. pastoris* luego de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido la expresión del gen quimérico del sBG. Con (+) se indican aquellas muestras de las clonas en las que se indujo la expresión y con (-) se indican aquellas en las que no se realizó la inducción con metanol. Las clonas LM19 y LBG22 se emplearon como controles positivos debido a que ambas provienen de mioblastos de rata transfectadas con el cDNA de betaglicano (López-Casillas et al, 1993). Nótese cierta degradación de RNA en los carriles de las muestras tomadas luego de 16 horas de haberse iniciado la inducción de la expresión de la proteína.

En la Fig. 19 se muestra la transferencia tipo Northern del gel agarosa-formaldehído de la Fig. 18. En la Fig. 19 se observan dos señales muy intensas en los carriles de las muestras de RNA obtenido de las alícuotas tomadas del cultivo de la clona 4B (cepa GS115) después de 40 y 63 horas de iniciada la inducción con metanol. El carril de la muestra de la clona 4B tomada luego de 40 horas de haberse iniciado la inducción es el que presenta la señal más intensa. No se observa señal en los carriles de la clona 4D.

La intensidad de la señal observada indica que el mRNA de la clona 4B (cepa GS115) se encuentra intacto y en mayor proporción en comparación con el del control LBG22 que apenas puede advertirse en la foto. No se observa ninguna señal en aquellas muestras de RNA obtenido de los cultivos después de 16 horas de haberse iniciado la inducción de la expresión de la proteína.

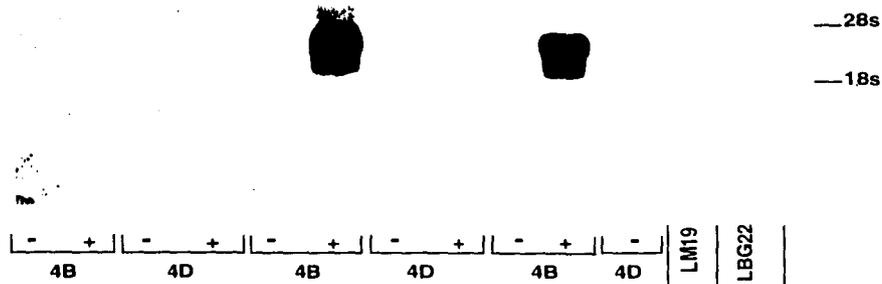


Fig. 19. Transferencia tipo Northern de las muestras de RNA analizadas por electroforesis de las clonas **4B** y **4D** de *P. pastoris* luego de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido la expresión del gen quimérico del **sBG**. La presente transferencia corresponde al gel de agarosa-formaldehído de la Fig. 18, es decir, las muestras y el orden de las mismas en esta figura son iguales a las de la Fig. 18. Esta Transferencia fue probada con una sonda de cDNA que incluye el fragmento entre las bases 1126 y 1596 del cDNA del betaglicano de rata de las muestras de RNA de las clonas 4B y 4D (cepa GS115) obtenido después de 16, 40 y 63 horas de haberse inducido la expresión con metanol del gen quimérico del ectodominio de betaglicano (+) así como de aquellas en las que no hubo inducción de la expresión (-). Nótese que el RNA mensajero de la clona **4B** extraído del cultivo luego de 40 y 63 horas de inducida la expresión de la proteína se encuentra intacto y sobreexpresado en comparación con el del control **LBG22**, el cual apenas y se distingue en la foto.

Se calcula que el mRNA de las clonas **LBG22** y **LM19** (no se observa señal en el carril de la muestra **LM19** y apenas puede distinguirse señal en el carril de **LBG22**) (Fig. 19) presenta aproximadamente 4 kb (no se muestra marcador de peso molecular), ya que corresponde a todo el mensajero del betaglicano silvestre, desde la base 150 a la 3931. Como puede observarse, el peso molecular del mRNA producido por *Pichia* es un poco menor que el del control **LBG22** de rata, observado en la Fig. 19. En las clonas de *Pichia*, el mRNA del 5'AOX1 va desde la base 773-1216 y el mRNA del 3'AOX1 va de la base 1228-1418, dando un total de 633; y el de la secuencia del ectodominio del betaglicano producido por las clonas **4B** y **4D** (**SBG4/pPIC9**) es de 2355 pb, resultando así en un mRNA de aproximadamente 3 kb.

Los resultados obtenidos para las clonas de la cepa **KM71** (**IVA** y **IVB**) (resultados no mostrados) fueron similares a los que se obtuvieron con las clonas de la cepa **GS115**.

Las clonas que produjeron niveles detectables de mRNA en transferencias tipo Northern , fueron la IVA, IVB y 4B. De estas, se escogieron la 4B (GS115) y IVB (KM71) para la realización de los experimentos del análisis de la expresión del betaglicano por Western Blot; y se determinó el tiempo de 40 horas a partir de la inducción como tiempo óptimo de detección de señal de síntesis de mRNA.

Cabe mencionar que los mismos experimentos de análisis de RNA mensajero fueron realizados con las células transformadas con la construcción SBG3/pPIC3 de las cepas GS115 y KM71. Los resultados obtenidos (no mostrados) fueron muy similares a los de las clonas transformadas con SBG4/pPIC9, es decir, los niveles de mRNA detectables se obtuvieron a las 40 y 60 horas de iniciada la inducción con metanol y también se observó un incremento en la síntesis de su mRNA en comparación con el control LBG22.

Una vez que se eligieron aquellas clonas que expresaron niveles considerables de mRNA de betaglicano, se efectuaron experimentos de inducción de expresión acompañados con transferencias tipo Western , de modo que pudiera detectarse la presencia y niveles del betaglicano expresado.

IV.5. Análisis de la Expresión del Betaglicano por Transferencias tipo Western .

La presencia y niveles del betaglicano expresado por las clonas 4B (GS115) y IVB (KM71), en las que ya se había comprobado la presencia y sobreexpresión del mRNA del sBG, se analizaron por transferencias tipo Western (Material y Métodos). Se tomaron alícuotas del medio de cultivo de las clonas en las que se había inducido con metanol la expresión del betaglicano, así como también de aquellas en las que no se indujo esta expresión. Las muestras del cultivo se analizaron con el anticuerpo policlonal No. 822 obtenido en conejo inmunizado con el ectodominio del betaglicano producido en bacterias (López-Casillas, et al, 1993).

IV.5.1. El Betaglicano Soluble secretado se detecta solamente en el medio condicionado de las subclonas en pPIC9 pero de manera degradada.

Para analizar la presencia y niveles del betaglicano soluble expresado, se examinaron en una transferencia tipo Western (Fig. 20) las muestras tomadas de los cultivos en medio condicionado con metanol, así como también las muestras tomadas de los cultivos en un medio sin metanol, de las clonas 4B y

IVB (GS115) a las 63 horas de haberse iniciado la inducción de la expresión; y las de las clonas 3B, 3D, IIIC y IIIB (KM71) a las 42 horas de iniciada la inducción. Se usó como control positivo 100 y 10 ng de betaglicano soluble (sBG) producido en baculovirus (López-Casillas, et al, 1994) el cual presenta un tamaño de aproximadamente 100 kDa.

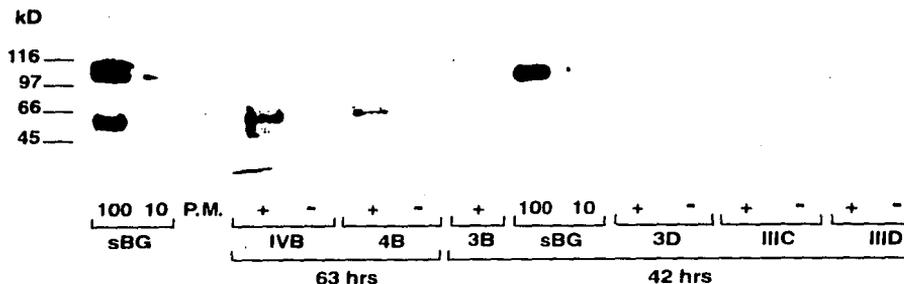


Fig. 20. Análisis por “Western Blot” de la expresión soluble BG en el medio de cultivo condicionado de algunas clonas GS115 y KM71 luego de 42 y 63 horas de haberse inducido su expresión. Se analizaron muestras del medio de cultivo de las clonas 4B (GS115) y IVB (KM71), luego de 63 horas de haberse inducido la expresión del gen; y de las clonas 3B (GS115), 3D (GS115), IIIC (KM71) y IIIB (KM71) luego de 42 horas de haberse iniciado la inducción con metanol (+). Con (-) se indican aquellas muestras provenientes de clonas en las que no se indujo expresión. Como controles positivos se emplearon 100 y 10 ng de betaglicano soluble (sBG) producido en baculovirus (López-Casillas et al, 1994). Nótese la expresión del betaglicano soluble de manera degradada en las clonas 4B y IVB transformadas con la construcción SBG4/pPIC9, luego de 63 horas de haberse inducido la expresión del ectodominio del betaglicano.

En la Fig. 20 se observa una señal en los carriles de las muestras tomadas del medio condicionado de las clonas IVB y 4B, transformadas con la construcción SBG4/pPIC9, luego de 63 horas de haberse iniciado la inducción de la expresión de la proteína. Estas señales denotan un patrón de degradación del betaglicano soluble expresado por estas clonas, observándose así un barrido de bandas menores a los 66 kDa. Nótese que en el carril correspondiente a los 100 ng del betaglicano soluble (sBG) producido en baculovirus se observa una banda alrededor de los 100 kDa correspondiente al sBG y otra banda de menor tamaño entre los 66 y 45 kDa, la cual corresponde a un producto de degradación del sBG producido en baculovirus, debida probablemente a las condiciones de almacenamiento y descongelación de la proteína durante los presentes

experimentos. La señal del control positivo es apenas distinguible cuando se utilizaron 10 ng de sBG. No se observa señal alguna en los carriles correspondientes a las muestras tomadas de los cultivos después de 42 horas después de iniciada la inducción de la expresión de la proteína en las clonas 3B, 3D, IIIC y IIID, transformadas con la construcción SBG3/pPIC3.

Los resultados de este experimento mostraron que las únicas clonas en las que se observan niveles detectables de expresión del betaglicano son la IVB y la 4B a las 63 horas después de haber adicionado el inductor de la expresión del betaglicano soluble. Nada se observa en los carriles correspondientes a las clonas 3B, 3C, IIIC y IIIB, transformadas con la construcción SBG3/pPIC3, las cuales resultaron incapaces de utilizar eficientemente el péptido señal del betaglicano soluble. La señal obtenida de la expresión para las clonas IVB y 4B muestra un patrón de degradación del betaglicano, obteniendo varias bandas menores a los 66 kDa.

Debido a que en este experimento se obtuvo el betaglicano degradado, se trató de disminuir este fenómeno mediante diversas estrategias entre las cuales estaba el empleo de un medio de inducción de expresión carente de amortiguador de fosfatos pH 6.0 (Material y Métodos), de modo que la acidificación del medio resultante del crecimiento de la levadura, pudiera inhibir la actividad de proteasas activas a pH neutro o cercano a la neutralidad.

IV.5.2 La degradación no se pudo evitar con la acidificación del pH ni con la presencia de casaminoácidos en el medio de cultivo condicionado.

Se hizo un intento acidificando el medio de cultivo condicionado para la expresión del betaglicano soluble mediante la eliminación del amortiguador de fosfatos pH 6 del medio de cultivo BMGY (Material y Métodos) de las levaduras transformadas. Lo anterior se hizo considerando que la acidificación del medio de cultivo provocado por el crecimiento de las levaduras pudiera inhibir la actividad de las proteasas de *Pichia*.

En este experimento se indujo la expresión en la clona IVB, 4B y en la 5 (transformada sólo con el plásmido pPIC3) (carriles P3 en la Figura 21). Se analizaron las alícuotas del medio condicionado tomadas a 0, 3, 6, 21, 29 y 45 horas después de iniciada la inducción de la expresión tanto de los cultivos que presentaron amortiguador de fosfatos pH 6.0, como de aquellos que carecían de esta solución amortiguadora. En la Figura 21 se indican los resultados del análisis de las muestras tomadas luego de 21, 29 y 45 horas de haber sido inducida la expresión de la proteína.

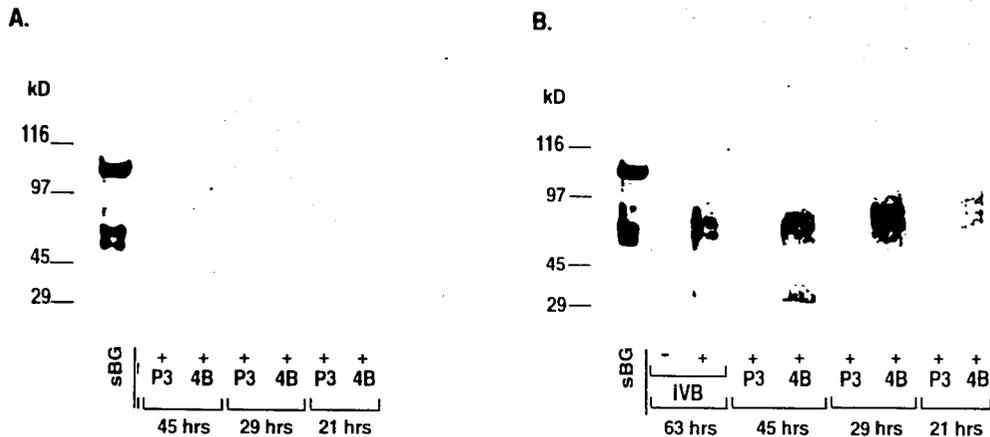


Fig. 21. Análisis por "Western Blot" de la expresión soluble del BG en el medio condicionado de las clonas IVB, 4B y 5 (carriles P3) de *P. pastoris* luego de 21, 29, 45 y 63 horas de haberse inducido la expresión de la proteína. Con (+) se indican aquellas muestras de las clonas en las que se indujo la expresión del sBG y con (-) se indican aquellas provenientes de clonas en las que no se indujo expresión. Como control positivo se emplearon 100 ng de betaglicano soluble producido en baculovirus (sBG) (López-Casillas et al, 1994).

A. Muestras tomadas del cultivo de las clonas 4B y 5 (carril P3) en las que se indujo la expresión de la proteína (+) con metanol en un medio sin amortiguador de fosfatos, por lo que el pH del medio inductor se encontraba considerablemente ácido.

B. Muestras tomadas del cultivo de las clonas IVB, 4B y 5 (carril P3) en las que se indujo la expresión de la proteína (+) con metanol en un medio con amortiguador de fosfatos pH 6.0.

Nótese que no hay expresión detectable del betaglicano soluble en aquellas clonas cuya expresión fue inducida en un medio sin amortiguador de fosfatos, así como la expresión soluble del betaglicano pero degradada en aquellas clonas inducidas en un medio con amortiguador de fosfatos pH 6.0.

De acuerdo con lo que se observa en el panel A. de la Fig. 21, no se detecta expresión del ectodominio del betaglicano en las muestras cuya inducción de la expresión de esta proteína se realizó en un medio sin amortiguador de fosfatos. En los cultivos cuya inducción de la expresión se hizo en un medio con amortiguador de fosfatos pH 6.0 (panel B. Fig. 21), se observa señal en la muestra de la clona IVB tomada después de 63 horas de haberse inducido la expresión y de la clona 4B a partir de las 21 hrs después de la inducción con metanol. Estas señales presentan un barrido de degradación de la proteína expresada, entre los 100 y 29 kDa, similar al que se observa en la Fig 20. En esta transferencia tipo Western también se observan varios productos de degradación en el carril correspondiente a los 100 ng del betaglicano soluble (sBG) producido en baculovirus. En este carril se observa una banda principal alrededor de los 100 kDa correspondiente al sBG y otras bandas de menor tamaño entre los 100 y 29 kDa, las cuales corresponden a productos de degradación del sBG producido en baculovirus, originados probablemente por las condiciones de descongelación de la proteína durante estos experimentos.

Dado que el fenómeno de degradación no disminuía por la acidificación del medio de inducción, se intentó disminuir este fenómeno a través del empleo de "distractores" de proteasas tales como los casaminoácidos, suponiendo que éstos saturarían a las proteasas de *Pichia*, disminuyendo así la utilización del betaglicano soluble expresado como sustrato. En los primeros experimentos de este tipo se utilizó una concentración de 0.1% de casaminoácidos en el medio de inducción de las clonas 4B y 5. Las alícuotas del medio de cultivo de las clonas mencionadas se tomaron a las 0, 3, 6, 9, 21, 29 y 45 horas después de la inducción de la expresión (resultados no mostrados). En estos experimentos la expresión del betaglicano soluble comenzó a ser evidente a partir de las 21 horas después de la inducción. La proteína expresada continuó siendo degradada, a pesar de la presencia de casaminoácidos 0.1% (resultados no mostrados). Los resultados del "Western Blot" (no mostrados) indicaron un barrido por debajo de los 100 kDa en aquellas muestras correspondientes a las alícuotas de la clona 4B tomadas a las 21 y 29 horas después de la inducción de la expresión de la proteína. Debido a que los resultados indicaron degradación del betaglicano expresado con 0.1% de casaminoácidos, se utilizó entonces una concentración mayor igual a 1.25% de este elemento en el medio de cultivo, sin que con esto se evitara o disminuyera la degradación de la proteína expresada. Los resultados obtenidos con la utilización de 1.25% de casaminoácidos se observan en los carriles de los sobrenadantes (SN) de los paneles A., B. de la Figura 22a. y panel C. de la Figura 22b.

IV.5.3. El Betaglicano Soluble se localiza intracelularmente en las subclonas en pPIC3.

Para explicar la ausencia del betaglicano soluble en las subclonas en pPIC3, se estudió la posibilidad de que el producto de traducción quedara intracelularmente y que no fuese secretado, para lo cual se analizaron las pastillas celulares (Material y Métodos) y sobrenadantes provenientes de las alícuotas tomadas del medio condicionado en el que se crecieron las clonas 3D, 4B, IVB y 5 después de 24 y 45 horas de haberse inducido la expresión de la proteína. El análisis de la clona 5 transformada con pPIC3 sin inserto se empleó como control negativo para evaluar la especificidad del anticuerpo 822.

Los resultados mostrados en las Figuras 22a. y 22b. indican la presencia del betaglicano soluble producido por las clonas 3D, 4B y IVB, a partir de las 45 horas después que se inició la inducción con metanol. No se observa ninguna señal que indique la presencia del betaglicano en los carriles de las muestras tomadas del cultivo después de 24 horas de haberse adicionado el inductor de la expresión.

En el panel A. de la Fig 22a, se observa una señal en el carril de la muestra de la pastilla celular obtenida del cultivo de la clona 3D, la cual corresponde a una banda bien definida que se localiza a los 100 kDa, acompañada por algunas otras bandas de pesos moleculares entre los 100 y 50 kDa. Esta señal indica la presencia del betaglicano soluble casi intacto dentro de la pastilla celular de la clona transformada con la construcción SBG3/pPIC3, la cual presenta la secuencia del péptido señal del propio betaglicano. No se detecta señal en la muestra del sobrenadante de esta misma clona, ni tampoco en aquellas muestras tomadas de los cultivos en los que no se indujo la expresión de la proteína. Este resultado indica que las clonas de *Pichia* transformadas con las construcciones del betaglicano soluble en pPIC3, pueden sintetizar el betaglicano soluble pero no son capaces de utilizar eficientemente el péptido señal del betaglicano, por lo que no lo expresan de manera extracelular.

En los paneles B. (clona 4B) de la Fig. 22a. y C. (clona IVB) de la Fig. 22b., se observa una fuerte señal en los carriles de la pastilla celular y una señal muy tenue en el del sobrenadante de las muestras tomadas de los cultivos de las clonas transformadas con la construcción SBG4/pPIC9 solamente después de 45 horas de haberse inducido la expresión de la proteína. La señal observada en los carriles de las pastillas y sobrenadantes denotan un patrón de degradación. La señal que se distingue en el carril de la muestra de los sobrenadantes del cultivo de las clonas 4B (panel B. de la Fig. 22a.) y IVB (panel C. de la Fig. 22b.) es muy tenue en comparación con la que se observa en los carriles de las muestras de las pastillas celulares, y comprende pesos moleculares que van desde 80 a 60 kDa. El barrido de degradación observado en las

muestras de las pastillas celulares de estas mismas clonas, se extiende a todo lo largo del gel de poliacrilamida. Este barrido podría indicar la presencia de betaglicano degradado dentro de la célula de las clonas transformadas con la construcción SBG4/pPIC9. No se observa señal en los carriles de las muestras de los cultivos en los que no se indujo expresión del betaglicano, así como en aquellas muestras tomadas del cultivo a las 24 horas después de haberse inducido la expresión.

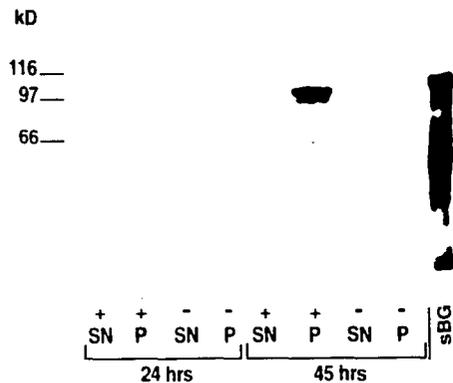
En el panel D. de la Fig. 22b. correspondiente a las muestras del cultivo de la clona 5, transformada con pPIC3 sin inserto, no se observa ninguna señal en los carriles de las pastillas y sobrenadantes analizados del cultivo. Estos resultados demuestran la especificidad del anticuerpo empleado para el betaglicano soluble.

En los paneles de las Fig. 22a. y 22b. se observa un patrón de degradación en el carril del control positivo en el cual se emplearon 100 ng del betaglicano soluble producido en baculovirus. Esta patrón de degradación, posiblemente se haya debido a las condiciones de almacenamiento y descongelación a la que estuvo sujeta la alícuota empleada en los presentes experimentos.

Los resultados obtenidos mostraron que el betaglicano soluble era expresado secretado tanto por las clonas transformadas con la construcción SBG4/pPIC9, como por aquellas transformadas con la construcción SBG3/pPIC3. El ectodominio del betaglicano se expresó secretado pero de manera degradada solamente en las clonas 4B y 1VB, transformadas con SBG4/pPIC9, las cuales presentaron la secuencia señal del factor α de *S. cerevisiae*. Las clonas transformadas con SBG3/pPIC3 sintetizaron al betaglicano soluble, pero no fueron capaces de utilizar el péptido señal del propio betaglicano, por lo que el ectodominio del betaglicano quedó atrapado dentro de la levadura.

La degradación del betaglicano soluble producida por las proteasas de *Pichia* llevó a la realización del siguiente experimento en el cual se trató de averiguar si el betaglicano era degradado por proteasas libres en el medio de cultivo secretadas por la célula o por proteasas transmembranales de la misma levadura, así como el tiempo necesario para la degradación completa de la proteína en cuestión.

A.



B.

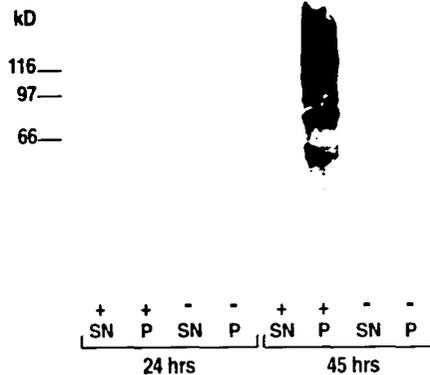


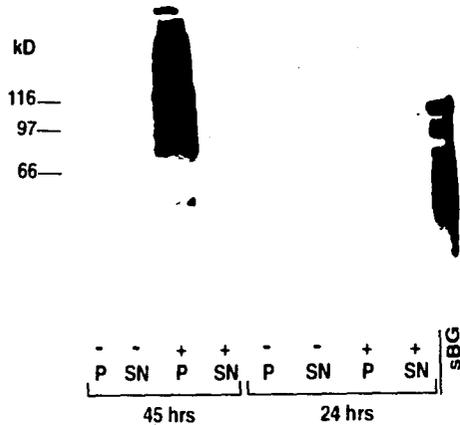
Fig. 22a. Análisis por “Western Blot” de la expresión del sBG en el extracto celular y sobrenadantes de las alicuotas tomadas del medio de cultivo condicionado de las clonas 3D y 4B luego de 24 y 45 horas de haberse inducido la expresión de la proteína. Las muestras de las pastillas celulares corresponden a los carriles (P) y las de los sobrenadantes a los carriles (SN). Con (+) se indican las muestras provenientes de clonas en las que se indujo la expresión del sBG y con (-) se indican aquellas en las que no hubo inducción. Como control positivo se emplearon 100 ng de betaglicano soluble (sBG) producido en baculovirus.

A. Clona 3D (SBG3/pPIC3)

B. Clona 4B (SBG4/pPIC9)

Nótese la presencia de una banda de aproximadamente 100 kD en la pastilla celular de la clona 3D, la cual podría tratarse del betaglicano soluble casi intacto.

C.



D.



Fig. 22b. "Western Blot" de la expresión del sBG en las pastillas celulares (P) y sobrenadantes (SN) de las alícuotas del medio de cultivo condicionado de las clonas IVB y 5 luego de 24 y 45 horas de haberse inducido la expresión de la proteína. Con (+) se indican las muestras provenientes de clonas en las que se indujo la expresión del sBG y con (-) se indican aquellas en las que no hubo inducción. En el carril sBG se emplearon como control positivo 100 ng de betaglicano soluble producido en baculovirus.

C. Clona IVB (SBG4/pPIC9)

D. Clona 5 (vector pPIC3) (carriles P3)

IV.5.4. Las células GS115 y KM71 tienen proteasas que degradan al betaglicano soluble producido en baculovirus.

Debido a que la degradación del betaglicano soluble producido por las clonas de *Pichia* transformadas con la construcción SBG4/pPIC9, no disminuye con la acidificación del medio, ni con la adición de casaminoácidos, se trató de averiguar si la degradación era originada por proteasas secretadas por *Pichia pastoris* o por proteasas celulares de la levadura.

El presente experimento consistió en la incubación a 30°C de 100 ng de betaglicano soluble expresado en baculovirus con los sobrenadantes y pastillas celulares de las alícuotas tomadas del cultivo de las clonas 4B y 5 después de 45 horas de haberse inducido la expresión de la proteína. Se tomaron alícuotas de las incubaciones a diferentes tiempos (0, 60 y 120 minutos) para su análisis en una transferencia tipo Western (Fig. 23). Como control negativo se realizaron incubaciones del betaglicano soluble producido en baculovirus con el medio condicionado para la inducción de la expresión de la proteína (BMGY/Metanol 0.5%).

En todos los carriles correspondientes a la muestra control (100 ng de betaglicano soluble producido en baculovirus incubado con el medio condicionado para la expresión) de la Fig. 23 se observa una sola banda intacta alrededor de los 100 kDa.

En el panel A. de la Fig. 23 se observa un barrido de degradación en el carril de la muestra del betaglicano incubado a tiempo 0 con el sobrenadante de la alícuota tomada del cultivo de la clona 4B, 45 horas después de haberse inducido la expresión de la proteína. Este barrido corresponde al betaglicano soluble degradado producido en forma soluble por la clona 4B. Este mismo barrido se observa en los carriles de esta misma muestra en los paneles B. y C. en los cuales el betaglicano se incubó por tiempos mayores.

No se advierte ningún otro patrón de degradación en los demás carriles de los paneles A., B., y C. de la Fig. 23, aunque sí es bastante notoria la disminución de la intensidad de la señal del betaglicano a mayores tiempos de incubación tanto con los sobrenadantes como con las pastillas celulares de las clonas 4B y 5 (carriles PIC3). Esta disminución en la intensidad de la señal podría traducirse en una medida del decremento en la cantidad relativa del betaglicano soluble intacto producido en baculovirus a mayores tiempos de incubación tanto con los sobrenadantes como con las pastillas celulares de las clonas 4B y 5; medida cualitativamente por la comparación entre el ancho de la banda control del betaglicano incubado con el medio de inducción (BMGY/Metanol 0.5%) y el ancho de las otras bandas. El ancho de la banda control

del betaglicano incubado con el medio de inducción permaneció casi constante en todos los tiempos de incubación, mientras que el ancho de las bandas presentadas en los carriles de las muestras de las incubaciones con los sobrenadantes y pastillas de las clonas 4b y 5, iba disminuyendo considerablemente a mayores tiempos de incubación, lo cual puede conducir a la hipótesis de que el betaglicano es degradado tanto por proteasas secretadas por la célula al medio del cultivo, como por proteasas presentes en los extractos celulares.

De acuerdo con lo que se observa en los paneles B. y C. de la Fig. 23, la degradación del betaglicano soluble de baculovirus es más rápida cuando se incuba con las pastillas celulares que con los sobrenadantes ya que no se distingue ninguna señal en los carriles de las incubaciones a 120 minutos con las pastillas celulares de las muestras tomadas de los cultivos de las clonas 4B y 5, mientras que en los carriles de las incubaciones con los sobrenadantes, todavía se advierte una ligera señal.

La degradación del betaglicano soluble producido en baculovirus por las proteasas de *P. pastoris*, es directamente proporcional al tiempo de incubación con los sobrenadantes como con las pastillas celulares del cultivo de las clonas de la levadura *P. pastoris*, por lo que es de suponer que a tiempos mayores de incubación, el betaglicano se obtendría completamente degradado en las condiciones en las que se realizó este experimento.

Por otra parte, la degradación observada durante la incubación con los sobrenadantes y pastillas celulares de la clona 5 transformada sólo con el plásmido pPIC3, indica que el fenómeno de la degradación del betaglicano no es debida a una acción secundaria originada por la inserción del gen quimérico del ectodominio del betaglicano, sino que es debida a las proteasas de la levadura.

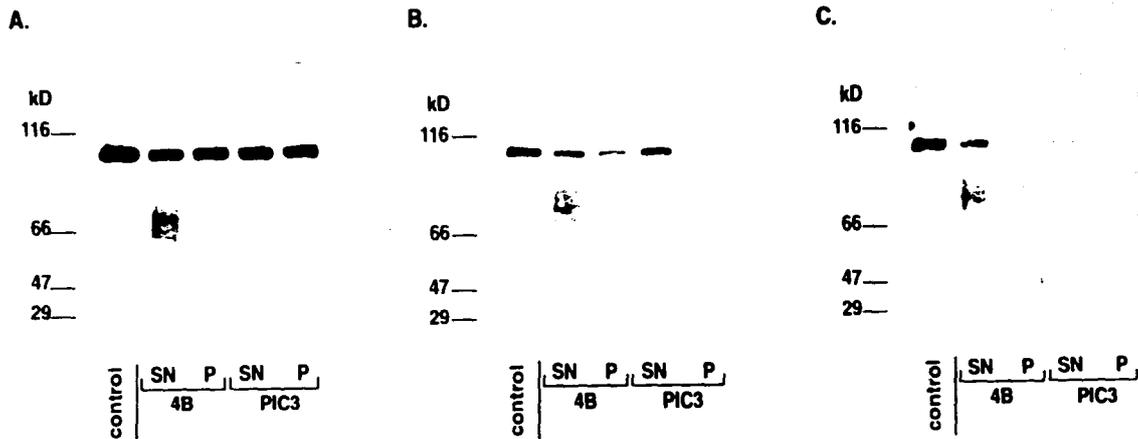


Fig. 23. Análisis por "Western Blot" de la degradación del sBG producido en baculovirus en presencia del extracto celular y sobrenadantes de las alícuotas tomadas del medio de cultivo condicionado de las clonas 4B y 5 luego de 45 horas de haberse iniciado la inducción de la expresión del sBG. En el presente experimento se utilizaron 100 ng de betaglicano soluble que se incubaron con los sobrenadantes (SN) y pastillas celulares (P) de las alícuotas del cultivo de las clonas 4B (SBG4/pPIC9) y 5 (carriles PIC3). El betaglicano soluble se incubó a 30°C con las distintas muestras a diferentes tiempos. Como control negativo se incubó betaglicano soluble con el medio de inducción de la expresión BMGY/Metanol 0.5%.

- A. Tiempo 0.
- B. 60 minutos de incubación.
- C. 120 minutos de incubación.

V. Discusión de Resultados.

Dada la importancia del receptor tipo III o betaglicano como modulador de los efectos del TGF- β , la producción de esta molécula en un sistema de expresión resulta indispensable para la realización de experimentos *in vivo* e *in vitro* que aporten más datos sobre sus funciones, estructura y regulación que pueden llevar, entre otras metas, a lograr el diseño de un fármaco parecido al betaglicano soluble que contrarrestara los efectos del TGF- β en aquellos padecimientos fibróticos. Es por esto que era necesaria la expresión de esta proteína en un sistema que produjera niveles considerables de la molécula a bajo costo. La expresión heteróloga de esta proteína en *Pichia pastoris* resultaba una alternativa muy conveniente debido al bajo costo de su cultivo y fácil manipulación del microorganismo. Aunque la expresión secretada del ectodominio del betaglicano ya se había logrado con anterioridad en células de insecto infectadas por baculovirus (López-Casillas, et al, 1994) , el elevado costo del cultivo de las células y la relativa complejidad de su mantenimiento, lo hacen un sistema menos rentable. A pesar de los diferentes intentos que se hicieron para la expresión del ectodominio del betaglicano en las dos cepas de *Pichia pastoris*, la proteína de interés se obtuvo siempre degradada, por lo cual se descarta el empleo del sistema de expresión en *P. pastoris* para la obtención del betaglicano soluble.

En las dos cepas de *Pichia pastoris* transformadas por el método de esferoplastos, pudieron observarse notables diferencias en lo que se refiere al tiempo de digestión con zimoliasa para la formación del 70% de esferoplastos, así como en el número de Centros Formadores de Colonias por microgramo de DNA obtenidos para cada cepa. Estas diferencias pueden deberse a variaciones estructurales particulares de la pared o membrana celular de cada cepa, aunque también deben tomarse en cuenta aquellos errores experimentales y de medición que pudieron ocasionar diferencias en las condiciones de cada experimento. De acuerdo a la Tabla III, puede verse que la cepa GSI15 (Mut⁺) dio lugar a la mayor cantidad de Centros Formadores de Colonias por microgramo de DNA, además de que se necesitó menos tiempo de digestión con zimoliasa para formar el porcentaje de esferoplastos requerido. Durante estos experimentos no fue posible comparar los resultados de la transformación obtenidos para cada construcción ya que el número de experimentos realizados no fueron suficientes. Debido a que se obtuvieron resultados muy distintos para cada transformación en cada cepa, considero necesaria, en el caso que se requiriera establecer un protocolo estándar de transformación, la repetición de este experimento bajo distintas condiciones y con cada una de las cepas.

Por otra parte, puede observarse a partir de los resultados del análisis por PCR del DNA genómico, que del 80-100% de las clonas analizadas para las cepas GS115 y KM71, presentaron el inserto de interés por lo que puede concluirse que el método de transformación por esferoplastos es un método eficiente.

Los resultados del análisis de la expresión del mRNA del betaglicano soluble por "Northern Blot" , mostraron la presencia del mRNA intacto y sobreexpresado en las clonas transformadas con las construcciones del ectodominio del betaglicano cuyas Ser⁵³⁵ y Ser⁵⁴⁶ estaban mutadas por Ala. Sin embargo, la expresión soluble de la proteína se detectó solo en el medio de cultivo de las subclonas en pPIC9 pero de manera degradada y de manera intacta e intracelular en las subclonas en pPIC3. A partir de estos experimentos fue posible evidenciar que la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión, no es capaz de utilizar la secuencia señal del betaglicano soluble para poder guiar a la proteína por la vía secretoria, por lo que ésta queda atrapada dentro de la célula.

La expresión del betaglicano soluble sin sitios de unión de cadenas de glicosaminoglicanos en las cepas GS115 y KM71 (clonas 4B y IVB) pudo detectarse por transferencia tipo Western a partir de las 21 horas después de la inducción de la expresión de la proteína con metanol, observándose niveles crecientes a mayores tiempos después de la adición del metanol. Sin embargo, en todos los casos se observó degradación completa del betaglicano expresado. La presencia de casaminoácidos como sustratos competidores de proteasas al 0.1% y 1.25% en el medio condicionado, así como la acidificación del medio por el crecimiento de las levaduras en un medio de cultivo sin amortiguador de fosfatos pH 6.0, no disminuyeron el fenómeno de degradación de la proteína expresada en GS115 y KM71.

Por otra parte, durante el presente proyecto tampoco fue posible cumplir con el objetivo de verificar si la levadura *P. pastoris* era capaz de procesar e introducir cadenas de glicosaminoglicanos en el ectodominio del betaglicano cuyas Ser⁵³⁵ y Ser⁵⁴⁶ no se encontraban mutadas, ya que una vez que se vio que las proteínas mutadas en estos aminoácidos eran expresadas de manera degradada, se considero que lo mismo se obtendría en la expresión de las otras proteínas. Por otro lado, se podría pensar que si las transformantes de la levadura *P. pastoris* fueran capaces de sintetizar y añadir cadenas de glicominoglicanos al betaglicano soluble y secretarlo intacto al medio extracelular, posiblemente la degradación de la proteína provocada por proteasas de la levadura secretadas al medio de cultivo, si este fuera el caso, hubiera sido menor suponiendo que las cadenas de heparan y condroitín sulfato pudieran proteger a la cadena polipéptídica medular de las proteasas de *Pichia*.

Se desconoce el momento de la degradación del betaglicano soluble expresado por *Pichia*, aunque se tienen varios indicios de que este fenómeno debe llevarse a cabo ya sea durante su secreción al medio extracelular o por proteasas transmembranales o extracelulares de la propia levadura. Existe la evidencia de que la proteína al encontrarse dentro de la célula está casi intacta, como puede observarse en el extracto celular de la clona 3D transformada con la construcción SBG3/pPIC3 en la transferencia tipo Western (Fig. 22). La degradación puede suceder durante su secreción al medio extracelular, ya que puede existir la posibilidad de que la proteína quede "atorada" sin poder salir completa a través de la membrana celular. Por otro lado, los experimentos de incubación del betaglicano soluble expresado en baculovirus con las pastillas celulares y con el medio en donde se cultivaron y se indujo expresión de la proteína en las levaduras, muestran patrones de degradación del betaglicano en ambos tipos de incubación por lo que puede inferirse que la degradación tiene lugar cuando la proteína se encuentra en contacto con los extractos celulares y cuando se encuentra en contacto con el medio en donde se cultivó la levadura.

Entre las alternativas que podrían sugerirse para evitar la degradación observada del betaglicano expresado en *Pichia* está la utilización de inhibidores de proteasas en el medio de cultivo desde el inicio de la inducción de la expresión. Sin embargo, esta propuesta no fue llevada a cabo en el presente proyecto debido a que lo que se requería era la expresión del betaglicano en grandes cantidades, en un sistema relativamente sencillo y a un bajo costo y el empleo de inhibidores de proteasas no cumple con este último requisito. Algunos de los inhibidores que pudieron haberse considerado están la α -macroglobulina, la cual es de los inhibidores más universales que existen; la leupeptina, la cual inhibe proteasas de serina y de grupos tiol; así como el empleo de una mezcla de diversos inhibidores, lo cual traería mejores resultados ya que se desconocen las características de las proteasas de la levadura que participan en la degradación del betaglicano. La concentración y condiciones en las que se adicionaría el inhibidor tendrían que establecerse mediante la realización de varios experimentos, así como a partir de condiciones establecidas en experimentos previos por otros autores.

Otra alternativa para obtener al betaglicano soluble intacto era el establecimiento de un protocolo de extracción y purificación del receptor tipo III del interior celular de las subclonas en pPIC3, las cuales resultaron incapaces de secretar la proteína. Otra opción que pudo seguirse consiste en la creación de mutantes por mutagénesis química de alguna de las cepas de *P. pastoris*, en las que se encontrarán inactivadas sus proteasas.

Cabe mencionar que algunas de las causas del fenómeno de degradación observado en la expresión del betaglicano se deben a la estructura y características particulares del betaglicano. La estructura de esta

proteína seguramente presenta sitios proteolíticos específicos de las proteasas de *Pichia pastoris*, esta deducción surge del hecho de que ya en muchas ocasiones varios autores han podido expresar diversas proteínas en esta levadura, tanto de forma secretada (Digan, et al, 1989; Clare, et al, 1991b; Zhu, et al, 1995; Paifer, et al, 1994) como intracelular (Clare, et al, 1991a; Scorer, et al, 1993) por lo que a través del presente proyecto fue posible evidenciar que la levadura *Pichia pastoris* no es un buen sistema de expresión del betaglicano soluble o receptor III del TGF- β , debido principalmente a las características particulares de esta proteína.

VI. Conclusiones.

Las conclusiones a las que se llegó en el presente trabajo son:

- El Betaglicano Soluble con las Ser⁵³⁵ y Ser⁵⁴⁶ mutadas se expresa secretado en el medio condicionado de las subclonas pPIC9 solamente.
- El Betaglicano Soluble con las Ser⁵³⁵ y Ser⁵⁴⁶ mutadas se expresa secretado pero de manera degradada.
- La degradación no se pudo evitar con la acidificación del medio condicionado de la levadura *Pichia pastoris* ni con la adición de casaminoácidos 1.25% como sustrato competidor de proteasas.
- La levadura *Pichia pastoris* no es capaz de utilizar la secuencia señal del betaglicano soluble con las Ser⁵³⁵ y Ser⁵⁴⁶ mutadas para guiar a la proteína por la vía secretoria, hecho evidenciado por la expresión del betaglicano soluble intacto solamente de manera intracelular en las subclonas pPIC3 cultivadas en el medio condicionado.
- Las células GS115 y KM71 tienen proteasas que degradan al betaglicano soluble producido en baculovirus.
- El betaglicano soluble intacto no se expresa en el sistema de expresión en *Pichia pastoris*.

VIII. Material y Métodos.

A. Soluciones y Medios de Cultivo.

A.1. Medios Empleados en el Cultivo de *E. coli*.

- Medio Líquido LB (Luria-Bertani) con y sin ampicilina. (1 litro)

En 950 ml de agua desionizada, mezclar:

- 10 g Bacto-triptona
- 5 g Extracto de bacto-levadura
- 10 g NaCl

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 5N y aforar con agua desionizada a 1 litro. Esterilizar en autoclave por 20 minutos. Para preparar medio sólido, agregar 15 g de bacto-agar por litro de medio. Si se requiere preparar medio LB con ampicilina, esta debe agregarse en una concentración igual a 0.15 mg/ml.

- Medio Líquido "Terrífico" ("Terrific Broth") (1 litro)

En 900 ml de agua desionizada, mezclar:

- 12 g Bacto-triptona
- 24 g Extracto de bacto-levadura
- 9.4 g Fosfato Dibásico de Potasio
- 2.2 g Fosfato Monobásico de Potasio
- 4 ml Glicerol

Aforar a 1 litro y esterilizar en autoclave por 20 minutos.

A.2 . Medios Utilizados en el Cultivo de *Pichia pastoris*.

- Medio Líquido o Sólido de YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium). (1 litro)

- 1 % Extracto de levadura
- 2 % Peptona
- 2% Dextrosa

Para preparar medio sólido, agregar 20 g/l de bacto-agar. Esterilizar en autoclave por 20 minutos.

- Medio Líquido BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium) (1 litro)

- 1 % Extracto de levadura
- 2 % Peptona
- 100 mM Solución Amortiguadora de Fosfato de Potasio, pH 6.0
- 1.34 % Base Nitrogenada de Levadura sin Aminoácidos
- 75 mM Sulfato de Amonio
- 4×10^{-5} Biotina
- 1 % Glicerol

Esterilizar en autoclave por 20 minutos.

- Medio Líquido o Sólido MD (Minimal Dextrose Medium) (1 litro)

- 1.34 % Base Nitrogenada de Levadura sin Aminoácidos
- 75 mM Sulfato de Amonio
- 4×10^{-5} % Biotina
- 1% Dextrosa

Para preparar medio sólido agregar 15 g de bacto-agar. Esterilizar en autoclave por 20 minutos.

- Medio Sólido RDB y RD (Regeneration Dextrose medium) (1 litro)

- 1 M Sorbitol
- 75 mM Sulfato de Amonio
- 1 % Dextrosa
- 1.34 % Base Nitrogenada de levadura sin Aminoácidos
- 4×10^{-5} % Biotina
- 0.005 % Aminoácidos

Esterilizar en autoclave por 20 minutos. Dejar enfriar y mantener en un baño de agua a 45°C. Adicionar una mezcla precalentada a 45°C de Dextrosa, de cada aminoácido y de Biotina.

-Para preparar platos RDB, agregar 20 g de agar junto con el sorbitol.

-Para preparar RD, agregar 10 g de agarosa junto con el sorbitol y mantener la solución después de esterilizada en autoclave en un baño de agua a 60°C antes de la adición de la dextrosa, los aminoácidos y la biotina.

A.3. Agentes Empleados en la Transformación de *Pichia pastoris*.

Los siguientes medios y reactivos fueron provistos por el equipo comercial de Expresión en *Pichia pastoris* de la compañía Invitrogen.

- Medio SOS

1M Sorbitol

0.3 X YPD

10 mM CaCl_2

- Medio SE

1 M Sorbitol

25 mM EDTA, pH 8.0

- Medio SCE

1 M Sorbitol

10 mM Solución Amortiguadora de Citrato de Sodio, pH 5.8

1 mM EDTA

- Medio CaS

1 M Sorbitol

10 mM Tris-HCl, pH 7.5

10 mM CaCl_2

- 40 % PEG

40% (p/v) PEG 3350 en agua

- CaT

20 mM Tris-HCl, pH 7.5

20 mM CaCl_2

- Enzima Zimoliasa

3 mg/ml (100,000 unidades/g de actividad lítica)

- 1M DTT (Ditioneitol)

B. Métodos.

B.1 Clonación del cDNA del betaglicano soluble en los vectores para *Pichia pastoris*.

B.1.1 Digestión de DNA con enzimas de restricción o endonucleasas.

Todas las digestiones enzimáticas se realizaron con enzimas de restricción a una concentración de 10 unidades/ μ l. Las soluciones amortiguadoras de las enzimas se emplearon en una concentración 1X. Tanto las enzimas como sus respectivos amortiguadores fueron provistos por la compañía Boehringer Manheim. En todas las digestiones se utilizó 1 μ l de enzima para digerir aproximadamente 10 μ g de DNA a una temperatura de 37°C durante 2 horas como mínimo.

B.1.2 Reacción de PCR realizada para la construcción de los cDNAs del betaglicano soluble.

Para subclonar los insertos del betaglicano soluble en los vectores de *P. pastoris*, fue necesario reducir el extremo 5' de su cDNA, así como crear un sitio XbaI en algunos de los insertos para su subclonación en el plásmido pPIC9. Se usaron como iniciadores los oligonucleótidos RBG1, RBG2, RBG3 y RBG4 y como molde, la mutante LS. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Thermal Controller PTC-100 MJ Research Inc. A continuación se citan los reactivos y programa empleados en estas reacciones. Por cada reacción de PCR se emplearon:

Reactivos	Concentración final en la mezcla de reacción
Secuencia mutante LS	1 μ g
Oligonucleótidos RBG	250 ng de cada oligonucleótido
dATP	1.25 mM
dCTP	1.25 mM
dGTP	1.25 mM
dTTP	1.25 mM
MgCl ₂	1.5 mM
10 X Buffer	Tris HCl 10 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 1.5 mM
Taq Pol (2u/ μ l)	2u
H ₂ O	

Programa de Reacción:

	Tiempo (seg)	Temperatura (°C)	
1	60	94	Desnaturalización
2	30	94	Desnaturalización
3	30	63	Hibridación
4	45	72	Polimerización
5	29 veces al paso 2		
6	0	20	
7	Fin		

B.1.3. Transformación de Células Competentes (*E. coli.*)

Luego de haber reducido el extremo 5' del cDNA del betaglicano soluble, haber originado un sitio XbaI en algunos insertos y subclonado en SolMycBGH6 y en SolMycBGdm10H; así como después de haber subclonado los insertos del betaglicano soluble en los vectores pPIC, se transformaron bacterias mediante el siguiente protocolo.

Las células competentes *E. coli* de la cepa DH1 α F se descongelaron en hielo y se tomaron 50 μ l de estas células, las cuales se mezclaron en un tubo eppendorf junto con 4 μ l de la preparación de DNA. La mezcla se dejó en hielo por 30 minutos. Después de transcurrido este tiempo, se sometió a las bacterias a un choque térmico por 2 minutos a 42°C y se regresaron al hielo. Se agregó 1 ml de medio LB a cada tubo eppendorf, se mezcló bien y se dejó crecer el cultivo a 37°C. Luego de una hora de incubación a 37°C se colectaron las células por centrifugación a 16000 x g por 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 100 ml de medio LB.

B.1.4. Extracción de DNA de plásmido por la técnica de "Miniprep".

El DNA de plásmido que se extrajo durante el proceso de clonación del cDNA del betaglicano soluble en los vectores para *Pichia pastoris* se llevó a cabo a través del siguiente procedimiento. Se inoculó una colonia de bacterias en 3 ml de medio "Terrífico" o LB con ampicilina por una noche. Se colectaron las células por centrifugación a 2940 x g por 2 minutos. Se extrajo el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100 μ l de la solución alcalina de lisis I (ver más adelante). Se colocaron en hielo y se les agregó 200 μ l de la solución alcalina de lisis II. Se mezcló suavemente y se incubó la mezcla en hielo por 15 minutos. Se agregó 175 μ l de Acetato de Potasio 5 M pH 6.0, se mezcló delicadamente y se dejó incubando 15 minutos en hielo. Se centrifugó la mezcla a 16000 x g a 4°C por 15 minutos. Se extrajo la fase acuosa y se

colocó en un nuevo tubo eppendorf estéril. Se agregaron 150 μ l de fenol saturado con Tris pH 8.0 y 150 μ l de cloroformo. Se agitó y se centrifugó la mezcla a 16000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió al fase acuosa a un nuevo tubo y se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó la mezcla por 15 minutos a -20°C y se centrifugó a 16000 x g por 15 minutos a 4°C . Las pastillas de DNA se lavaron con etanol al 80%, se volvió a centrifugar a 16000 x g a 4°C por 15 minutos y la pastilla se resuspendió en 50 μ l H_2O *Milli-Q* (*Millipore*) estéril + 1 μ l de RNAsa A 10 mg/ml.

- Solución Alcalina de Lisis I.

22.5 ml 20%(1.11 M) Glucosa

12.5 ml 1 M Tris pH 8.0

20 ml 0.25 M EDTA

445 ml H_2O

- Solución Alcalina de Lisis II. (Preparar en el momento de extracción de DNA)

9.3 ml H_2O

0.2 ml 10 N NaOH

0.5 ml 20 % SDS

- Acetato de Potasio 5 M pH 6.

60 ml Acetato de Potasio 5M

11.5 ml Acido Acético Glacial

28.5 ml H_2O

B.1.5. Purificación de DNA por medio del Equipo Comercial GENECLEAN II Bio 101, Inc.

La purificación de DNA incluido en agarosa que se obtuvo durante todo el proceso de clonación del cDNA del betaglicano en los vectores pPIC, se llevó a cabo a través del empleo del equipo comercial GENECLEAN II BIO 101 Inc, cuya metodología de purificación se basa en la unión del DNA de cadena doble o sencilla a una matriz de sílice, sin unir moléculas contaminantes, tales como fenol, cloroformo, bromuro de etidio, agarosa, RNA o proteínas. La agarosa se disuelve en una solución de NaI 6M y el DNA se une a las moléculas de la matriz de sílice. Posteriormente se hacen varios lavados con una solución de NaCl, Tris, EDTA y Etanol, lo cual precipita el DNA.

B.1.6. Protocolo de Secuenciación de DNA. (Método de Sanger)

El método de secuenciación que se siguió para verificar la identidad de las construcciones del betaglicano soluble fue el descrito por Sanger, et al 1977 mediante el empleo del equipo comercial SEQUENASE Version 2.0 United States Biochemical.

B.2. Transformación de la Levadura *Pichia pastoris* por el Método de Esferoplastos.

La transformación se llevó a cabo siguiendo la metodología y material provistos en el equipo comercial de expresión de la levadura *Pichia pastoris* de la compañía Invitrogen.

Se transformaron dos cepas distintas, la GS115 y la KM71, cuyas características principales son:

Cepa	Genotipo	Fenotipo
GS115	his 4	Mut ^s
KM71	arg4his4aox1..ARG4	Mut ^s , Arg ^r

Estas cepas presentan una mutación en el gen histidíol deshidrogenasa (HIS4) por lo que son incapaces de sintetizar histidina. Las cepas con el fenotipo Mut^s (*Methanol utilisation slow*) no presentan el gen AOX1, por lo que su crecimiento es muy lento en un medio con metanol como única fuente de carbono. La cepa KM71 originalmente carecía del gen para arginina (ARG4), pero este gen en su forma silvestre fue insertado en el lugar del gen AOX1, haciendola Arg^r.

La introducción del plásmido en la levadura *Pichia pastoris*, se hizo mediante el método de esferoplastos. Debido a que la pared celular de las levaduras impide la introducción de material genético dentro de la célula, fue necesario romper esa pared para facilitar su introducción. Lo anterior se hizo mediante la acción de una enzima denominada zimoliasa, la cual es una β -glucanasa que hidroliza los polímeros de glucosa con uniones β -1,3 en la pared celular. La adición de esta enzima digiere parcialmente la pared celular y una sobredigestión podría causar la lisis de la célula. La digestión de la pared fue monitoreada mediante la sensibilidad de las células al SDS. Al agregar SDS a alícuotas de células, la solución se aclaraba y podía medirse su densidad óptica o absorbancia a 800 nm. Empíricamente ya se había determinado con anterioridad por otros autores que es necesario un 30% de células lisadas (70% de esferoplastos formados) para que el grado de la digestión de la pared sea óptima para transformación. Una vez alcanzado este

porcentaje de formación de esferoplastos, las células son incubadas con el DNA y con una solución isotónica para remover la enzima.

El DNA que se empleó para la transformación fue linearizado para facilitar recombinación con el genoma de *Pichia* mediante el corte en el sitio NsiI en la base 678 en la región 5' del promotor del gen AOX1 de los plásmidos. El DNA que se empleó para transformación fue el de las construcciones en los vectores pPIC codificantes para el betaglicano soluble silvestre, para el betaglicano sin cadenas de glicosaminoglicanos, y el de los plásmidos pPIC3 y pPIC9 sin inserto. Las transformaciones con los plásmidos pPIC sin inserto se hicieron para poder obtener clonas que pudieran emplearse como controles negativos durante los experimentos de análisis de la expresión del betaglicano soluble.

Cabe mencionar que la cantidad de DNA empleado para cada transformación y para cada cepa no fue la misma. La cantidad de DNA utilizada en cada caso se cita en la Tabla VII.

Construcción	Cantidad de DNA (μg) empleada por transformación	
	GS115	KM71
pPIC3 + SBG1 (pPI-I)	0.06	7.65
pPIC9 + SBG2 (pPII-7)	0.06	7.65
pPIC3 + SBG3 (pPIII-4)	0.5	7.65
pPIC9 + SBG4 (pPIV-14)	0.5	7.65
pPIC3	0.7	7.65
pPIC9	0.05	7.65

Tabla VII. Cantidad de DNA utilizada para la transformación por esferoplastos de las levaduras GS115 y KM71 de *Pichia pastoris*.

De cada una de las cepas se tomó una muestra de células y se crecieron en 10 ml de medio YPD toda la noche a 30 °C. A partir de este cultivo se tomó una alícuota y se sembró en cajas Petri con medio YPD sólido. Otra alícuota fue tomada para su almacenamiento en glicerol a -70°C.

Las células sembradas en las cajas se dejaron crecer durante dos días a 30°C. Después, se inoculó una colonia de cada cepa en 10 ml de YPD en un matraz Erlenmeyer de 50 ml y se crecieron a 30°C con agitación (250-300 rpm) durante dos días aproximadamente. Luego de transcurrido este tiempo se inocularon 5, 10 , 15 y 20 ml de células del cultivo con 200 ml de medio YPD, y se incubaron toda la noche con agitación (250-300 rpm) a 30°C. Al siguiente día se midió la turbidez de los cultivos a 600 nm y se eligió para preparar los esferoplastos aquél que presentó una absorbancia o densidad óptica (O.D.) entre 0.2 y 0.3.

El cultivo elegido se centrifugó a 2400 x g durante 10 min a 10°C para obtener las células en un tubo Falcon estéril de 50 ml. La pastilla obtenida se resuspendió en 20 ml de agua estéril.

Se centrifugó nuevamente a 2400 x g por 5 min a 10°C y la pastilla obtenida se resuspendió en 20 ml de una solución de SED recién preparada y volvió a centrifugarse a 2400 x g por 5 min a 10°C.

Las células obtenidas se resuspendieron ahora en 20 ml de 1M de Sorbitol y se volvió a centrifugar como en el párrafo anterior. La pastilla se resuspendió en 20 ml de SCE y se dividió la suspensión en dos tubos Falcon de 50 ml con 10 ml de células en cada uno. Uno de los tubos se usó para determinar el tiempo óptimo de digestión de la pared celular con zimoliasa. Una vez determinado este tiempo, el otro tubo de células se empleó para la preparación de los esferoplastos.

Se adicionaron 800 μ l de una solución fresca al 5% de SDS a cada uno de 17 tubos eppendorf estériles. En uno de los tubos se agregaron 200 μ l de células provenientes de uno de los tubos Falcon con 10 ml de células. La mezcla de células y SDS de este tubo correspondió al tiempo cero de reacción con zimoliasa. Al volumen restante de células en el tubo Falcon se le agregaron 7.5 μ l de zimoliasa (3 mg/ml), se mezcló delicadamente por inversión y se incubó a 30°C en un baño de agua. Para monitorear la formación de esferoplastos y así determinar el tiempo de digestión óptimo, se agregaron 200 μ l de células del tubo que estaba incubando a 30°C a cada uno de los 17 tubos eppendorf con SDS a distintos tiempos (2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 minutos). Se midió la densidad óptica de cada uno de los tubos a 800 nm. Para calibrar el espectrofotómetro a 800 nm, se utilizó una mezcla de 200 μ l de SCE con 800 μ l de SDS al 5%.

El porcentaje de formación de esferoplastos se determinó a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Esferoplastos} = 100 - (O.D._{800} / O.D._{800} \text{ al tiempo}=0) (100)$$

El tiempo óptimo de incubación con zimoliasa que se determinó fue aquél que resultó en un 70% de formación de esferoplastos. Una vez que se determinó este tiempo, se añadieron 7.5 μ l de zimoliasa al tubo con células restante y se incubó a 30°C por el tiempo de digestión determinado.

Se centrifugó la mezcla a 750 x g por 10 minutos a 10°C y se resuspendió la pastilla en 10 ml de Sorbitol 1M. Se volvió a centrifugar a 750 x g por 10 min a 10°C. Se lavaron los esferoplastos con 10 ml de CaS y se centrifugó como en el paso anterior. La pastilla obtenida se resuspendió en 850 μ l de CaS y los esferoplastos se utilizaron inmediatamente para su transformación.

En cada transformación se colocaron 100 μ l de la preparación de esferoplastos en un tubo eppendorf junto con el DNA y se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 10 min. Se agregó 1 ml a cada tubo de una solución recién preparada de 40% PEG con CaT en una proporción 1:1. Se mezcló delicadamente y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 750 x g por 10 min a 10°C y la pastilla se resuspendió en 150 μ l de medio. Se incubó por 20 min y se agregaron 850 μ l de 1M de Sorbitol.

Los esferoplastos transformados se sembraron en cajas Petri con RDB, para lo cual se combinaron 100 μ l, 200 μ l y 400 μ l de la mezcla de los esferoplastos transformados para el caso de la cepa GS115; y 300 μ l para la cepa KM71, junto con 10 ml de agarosa-RD derretida y se vació en las cajas RDB. Luego que la agarosa hubo solidificado, se invirtieron las cajas y se incubaron a 30°C. Las transformantes aparecieron luego de 4-6 días. Para verificar la viabilidad de las células, se combinaron 100 μ l de los esferoplastos con 900 μ l de 1M de Sorbitol sin DNA y sin PEG/CaT. De esta mezcla se combinaron 100 μ l con 10 ml de agarosa-RD e histidina (0.004%) y se sembró en una caja de RDB.

B.3. Análisis por PCR de las transformantes de *P. pastoris*.

El presente protocolo se utilizó para determinar la presencia de la secuencia del cDNA del ectodominio del betaglicano en el genoma de *Pichia pastoris* en las dos cepas transformadas.

Se aisló y analizó el DNA genómico de las levaduras transformadas con el inserto de betaglicano. Se aisló y utilizó también en la reacción de PCR el DNA genómico de las clonas transformadas con pPIC3 sin inserto, el de las clonas transformadas con el DNA de la Albúmina Sérica Humana y el DNA de los vectores pPIC como controles negativos, ya que estos no presentan ninguna secuencia que pudiera amplificarse en la reacción de PCR

- El análisis por PCR permitió verificar la presencia del inserto en el genoma de la levadura, pero no así el sitio de su inserción en el mismo.

B.3.1. Aislamiento de DNA Genómico de las transformantes de *P. pastoris*.

Se crecieron cultivos en 10 ml de medio YPD (Medios utilizados en el cultivo de *Pichia pastoris*) en matraces Erlenmeyer de 50 ml a 30°C toda la noche de cada una de las clonas de *P. pastoris*. Se colectaron

las células por centrifugación durante 2 minutos a 2000 x g en una centrífuga Spinchron Beckman rotor GH-3.8. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 0.5 ml de agua destilada estéril. Las células se transfirieron a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se colectaron nuevamente por centrifugación durante 5 segundos a 16000 x g en una microcentrífuga. Se decantó el sobrenadante y el tubo con células se agitó brevemente para resuspender la pastilla en el líquido residual.

Se agregaron 0.2 ml de la siguiente mezcla: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1mM Na₂EDTA. También se adicionaron 0.3 g de esferas de vidrio de 0.5 mm de diámetro lavadas con HCl. La mezcla se agitó con un vortex por 3-4 minutos y se adicionaron 0.2 ml de solución amortiguadora TE pH 8 (10mM Tris-Cl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0). Se centrifugó por 5 minutos a 16000 x g por 5 minutos y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión. Se centrifugó por 2 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla de DNA se resuspendió en 0.4 ml de agua *Milli-Q* (*Millipore*) estéril con 3 µl de una solución de RNasa 10 mg/ml. Se incubó a 37°C durante 5 minutos y se agregaron 10 µl de una solución 4M de acetato de amonio más 1 ml de etanol al 100%. Se mezcló por inversión y se centrifugó nuevamente por 2 minutos a 16000 x g, se decantó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar al aire para después resuspenderse en 50 µl de agua *Milli-Q* (*Millipore*) estéril. Con el presente protocolo se obtuvo una preparación de 2-4 mg de DNA genómico, lista para su análisis por PCR.

B.3.2. Reacción de PCR.

La amplificación del fragmento que incluía parte de la secuencia del vector y del gen de interés se llevó a cabo mediante el empleo de dos oligonucleótidos de aproximadamente 22 bases. Los oligos empleados fueron el RBG2, el cual ya había sido utilizado durante la construcción de los insertos del betaglicano, y una secuencia diseñada para amplificar un fragmento del extremo 5' del gen AOX1 del vector. A continuación se indican las secuencias de estos dos oligonucleótidos.

RBG2

5' ctgctggcacagccagacagaa 3'

5'AOX1

5' gcttgcaattggaacctcg 3'

El indicador RBG2, como ya se mencionó, es complementario a la secuencia de la mutante LS (López-Casillas et al, 1993) correspondiente al ectodominio del betaglicano, situada entre las bases 560-422; mientras que el oligonucleótido 5'AOX1 corresponde a la secuencia del promotor del gen AOX1 situada entre las bases 855-875 de los plásmidos pPIC.

Los fragmentos esperados de acuerdo con las características de cada construcción presentan 320 pb para las clonas transformadas con la construcción en pPIC3, y 502 pb para las clonas transformadas con la construcción en pPIC9.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Thermal Controller PTC-100 MJ Research Inc. A continuación se cita el protocolo y programa de reacción de PCR que se empleó para comprobar la presencia del inserto de interés en las transformantes de *P. pastoris*.

En cada reacción de PCR se emplearon:

Reactivos	Concentración final en la mezcla de reacción
Oligo 5' AOX1 (50 ng/μl)	50 ng
Oligo RBG2 (50 ng/μl)	50 ng
DNA (genómico)	1 μg
10X Buffer	Tris HCl 10 mM KCl 50 mM MgCl ₂ 1.5 mM
dATP	1.25 mM
dCTP	1.25 mM
dGTP	1.25 mM
dTTP	1.25 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Taq Pol (2u/μl)	0.5 u
H ₂ O	

Programa de Reacción:

	Tiempo	Temperatura (°C)
1	3 min	94
2	20 segs	94
3	20 segs	59
4	30 segs	72
5	32 segs	regresar al paso2
6	3 min	72
7	0	4
8		Fin

-Una vez que se verificó la presencia del inserto en el genoma de cada una de las clonas transformadas, se indujo la expresión de la proteína de interés para detectar los niveles de mRNA mediante el análisis por transferencia tipo Northern.

B.4 Inducción de la Expresión del betaglicano soluble en *P. pastoris*.

Dado que los plásmidos en los que se llevó a cabo la subclonación de los insertos del ectodominio del betaglicano presentan la secuencia de la región del extremo 5' del promotor del gen AOX1 (alcohol oxidasa) a la cual le sigue la secuencia de la proteína de fusión factor α -ectodominio betaglicano para el caso de las subclonaciones en pPIC9 y la del ectodominio del betaglicano con su propia secuencia señal para el caso de las subclonaciones en el plásmido pPIC3, la inducción de la expresión del gen de interés en las transformantes de *P. pastoris* se llevó a cabo mediante la adición de 0.5% de metanol en el medio de cultivo BMGY (Medios utilizados en el cultivo de *Pichia pastoris*), lo cual provocó la inducción de la expresión de la alcohol oxidasa y la del betaglicano soluble.

Los experimentos de inducción de expresión de la proteína se llevaron a cabo en cultivos iniciales con una $D.O_{600nm}$ de 1.0, a los cuales se les agregó 0.5% de metanol cada 24 horas. Para analizar los niveles de expresión y determinar así el tiempo óptimo de la misma, se tomaron alícuotas del cultivo cada 0, 8, 24, 48, 72 y 96 horas. Todas las muestras se congelaron a $-70^{\circ}C$ antes de ser analizadas por transferencias tipo Northern y Western.

Se inoculó una sola colonia en 5 ml de medio BMGY en matraces Erlenmeyer de 50 ml. Se dejaron crecer a una temperatura de $30^{\circ}C$ con agitación (aprox. 250 rpm) hasta que el cultivo alcanzó una $O.D_{600nm}$ de 2. Las células se cosecharon por centrifugación a $750 \times g$ durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en BMGY, en el volumen que aproximadamente diluyera la suspensión hasta una $O.D.$ igual a 1.0. Algunos experimentos de inducción se llevaron a cabo con cultivos en 10 ml de BMGY en matraces de 50 ml y otros se realizaron con cultivos en 25 ml de BMGY en matraces de 250 ml. Para inducir la expresión de la proteína de interés se agregó metanol absoluto en una concentración igual a 0.5%. cada 24 horas. Se tomaron muestras de las células a diferentes tiempos (0, 8, 24, 48, 72 y 96 horas) para analizar el nivel de expresión y determinar el tiempo óptimo de la misma. En cada tiempo se tomó un mililitro del cultivo y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Las muestras se centrifugaron por 2-3 minutos a temperatura ambiente para cosechar las células y el sobrenadante se transfirió a otro tubo eppendorf limpio. Tanto las pastillas celulares como los sobrenadantes se guardaron a $-70^{\circ}C$ antes de ser analizadas por transferencias tipo Northern y Western.

B.5. Aislamiento de RNA total de las transformantes de *P. pastoris*.

El aislamiento de RNA se hizo para determinar la presencia y condición del mRNA del inserto del betaglicano soluble transcrito en algunas de las clonas obtenidas para las cepas GS115 y KM71 luego de la inducción de la expresión de la proteína con metanol.

Se crecieron dos cultivos de cada clona, induciendo en uno de ellos la expresión del ectodominio del betaglicano con metanol. Se tomaron alícuotas de los cultivos a las 12, 36 y 60 horas de haberse inducido la expresión del betaglicano soluble y se colectaron las células por centrifugación. Se lisaron las células mediante agitación con SDS y fenol saturado pH 8.0. Se aplicó un choque térmico, se centrifugó, se extrajo la fase acuosa y se precipitó el RNA con etanol y acetato de amonio 3M pH 5.3. El RNA obtenido se resuspendió en agua tratada con DEPC.

Todas las soluciones fueron preparadas, a excepción del medio BMGY con agua *Milli-Q* (*Millipore*) tratada con DEPC en una concentración de 0.1%.

De cada clona se crecieron dos cultivos en 10 ml de medio BMGY en matraces Erlenmeyer de 50 ml por una noche, al siguiente día se colectaron las células por centrifugación a 750 x g y se resuspendieron en 10 ml medio BMGY. Este volumen de medio con células se dividió en dos partes iguales y se añadieron a 55 ml de BMGY en matraces de 500 ml. En uno de los cultivos se indujo la expresión de la proteína y el otro se utilizó como control negativo. Se tomaron alícuotas de 12 ml a las 12, 36 y 60 horas de haberse inducido la expresión del betaglicano soluble y se colectaron las células por centrifugación a 1500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en una solución amortiguadora AE (50 mM Acetato de Sodio, pH 5.3; 1mM EDTA) preparada con agua tratada con DEPC y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Se lisaron las células mediante la adición de 40 ml de SDS 10% y su agitación por 20 segundos. Se agregó un volumen igual de fenol saturado (450-500 ml) con solución amortiguadora TE pH 8 y se agitó la mezcla por 20 segundos. Se incubó a 65°C por 4 minutos y luego se aplicó un baño de etanol/hielo seco por un minuto. La mezcla se centrifugó a 4°C a 16000 x g durante 2 minutos. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 40 ml de acetato de sodio 3M pH 5.3, así como 2.5 volúmenes de etanol al 100% (20°C). Se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C y se removió el etanol. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 80% y se dejó secar al aire. El RNA total se resuspendió en 20 ml de agua tratada con DEPC y se guardó a -20°C.

B.6. Análisis por "Northern Blot".

Para detectar la presencia del mRNA del betaglicano soluble, se analizaron las muestras de RNA obtenido de las cepas en las que se indujo expresión. Para lo cual se realizó un análisis tipo Northern mediante la electroforesis en un gel de agarosa con formaldehído (Sambrook, et al, 1989). Las muestras de RNA se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Sambrook, et al, 1989), la cual se sometió a hibridación con una sonda de cDNA de betaglicano de rata (fragmento BamHI entre bases 1125 y 1596) marcada radioactivamente.

B.6.1. Electroforesis de RNA en geles de agarosa con formaldehído

a) Se preparó una Solución Amortiguadora de Corrida en agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) con los siguientes reactivos.

0.1 M MOPS (pH 7.0)
40 mM Acetato de Sodio
5 mM EDTA (pH 8.0)

b) Se preparó una mezcla de agarosa derretida en agua tratada con DEPC, se dejó enfriar a 60°C y se le agregaron los volúmenes de Solución Amortiguadora de Corrida y de Formaldehído requeridos para alcanzar una concentración de 1X y 2.2 M, respectivamente.

c) Las muestras de RNA se mezclaron para su análisis en el gel de agarosa con los siguientes reactivos:

RNA (hasta 30 µg)	7 µl
5X Solución Amortiguadora de Carga	3 µl
Formaldehído	5 µl
Formamida	15 µl
Bromuro de Etidio	3 µl

Se incubaron las muestras a 65°C por 15 minutos.

d) Las muestras se enfriaron en hielo y se les agregaron 2 ml de Solución Amortiguadora de Carga con Formaldehído en agua DEPC:

50 % Glicerol

1 mM EDTA (pH 8.0)

0.25% Azul de Bromofenol

0.25% Cianol de Xileno

e) Antes de cargar las muestras en el gel de agarosa, se aplicó un voltaje de 5 V/cm al gel sin muestras por 5 minutos. Después de transcurrido este tiempo se cargaron las muestras y se dejaron correr en la solución amortiguadora con formaldehído a 3-4 V/cm en una campana de extracción.

B.6.2. Transferencia de RNA a la membrana de nitrocelulosa por capilaridad.

El gel de agarosa se lavó varias veces con agua tratada con DEPC para remover el formaldehído. Se colocó el gel en posición invertida sobre un pedazo de filtro Whatman 3MM, el cual a su vez se colocó sobre un soporte sólido de dimensiones mayores que el gel, dentro de un recipiente. El recipiente se llenó con una solución 20X SSC (NaCl 3M; Citrato de Sodio 0.3M; pH 7.0) hasta que la solución alcanzó la parte superior del soporte sólido. Se cortó un pedazo de filtro de nitrocelulosa de igual tamaño al del gel de agarosa, se sumergió en agua desionizada y luego se dejó en una solución de 20X SSC por 5 minutos. Se rodeó el gel de agarosa con Parafilm y se colocó sobre éste la membrana de nitrocelulosa. Sobre la membrana se pusieron dos pedazos de filtro Whatman 3MM previamente mojados en la solución 20X SSC. Se cortaron varios pedazos de toallas de papel del tamaño de los pedazos del filtro Whatman y se colocaron sobre estos. Sobre las toallas se colocó un objeto que ejerció aproximadamente 500 g de fuerza sobre el gel. Se dejó proceder la transferencia de 10-24 horas, cambiando las toallas de papel mojadas por otras secas. Se quitaron las toallas de papel, así como los filtros Whatman 3MM y se colocaron el gel y la membrana de nitrocelulosa sobre un filtro seco Whatman 3MM, poniendo la membrana en contacto con el filtro y el gel encima de esta. Se marcaron las posiciones del gel en la membrana con un lápiz, se quitó el gel y la membrana se remojó en 6X SSC por 5 minutos. Se dejó secar la membrana en toallas de papel por 30 minutos.

B.6.3. Marcaje Radioactivo de la sonda del cDNA de betaglicano soluble usada para su hibridación con el RNA Total aislado de las transformantes de *P. pastoris*.

La secuencia de DNA del betaglicano soluble que se utilizó como sonda para la hibridación, se marcó radioactivamente mediante el siguiente protocolo (Feinberg y Vogelstein, 1983).

En la reacción de marcaje radioactivo con α CTP 32 P de la sonda de DNA se emplearon:

Reactivos	μ l
dATP 0.5 mM	1
dTTP 0.5mM	1
dGTP 0.5mM	1
α CTP 32 P 10 μ Ci/ μ l	5
Mezcla de Hexanucleótidos	2
DNA o sonda (20ng/ μ l)	5
Enzima "Klenow" (2u/ μ l)	1
H ₂ O	5

El DNA o sonda se desnaturalizó a 100°C durante 3 minutos, se centrifugó a 16000 x g y se adicionó a la mezcla de los reactivos mencionados. Se dejó la mezcla durante 30 minutos en un baño a 37°C y se paró la reacción con 40 ml de EDTA 25mM. Se hizo una dilución 1:10 para medir la incorporación de los nucleótidos radioactivos a través de un ensayo de cromatografía en papel con ácido tricloroacético y la cuantificación de radioactividad en un contador Geiger. Las sondas de DNA marcadas radioactivamente presentaron una actividad específica de 4.8 X 10⁸ cpm/ μ g y de 7.2 X 10⁸ cpm/ μ g.

B.6.4. Ensayo de Hibridación.

La membrana de nitrocelulosa se prehibridó por 4 horas a 42°C en un horno Labnet modelo Hybaid Maxi 14 con la siguiente mezcla de hibridación.

- 50% formamida
- 5X Solución de Denhardt's
- 5X SSC
- 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.5

0.1% SDS

500 mg/ml de RNA de *Torula* previamente desnaturalizado por 5-10 min a 100°C.

Se añadió la sonda o secuencia del DNA desnaturalizada a 100°C por 10 minutos y la incubación se continuó por 18-20 horas a 42°C.

Al cabo de 18-20 horas de hibridación, la membrana de nitrocelulosa se lavó en condiciones de alta astringencia con una solución amortiguadora preparada con 1X SSC y 0.1% de SDS en agua destilada. Se hicieron 5 lavados a temperatura ambiente de 5-10 minutos cada uno y 5 lavados a 65°C. Una vez lavada la membrana, se quitó el exceso de solución amortiguadora, se envolvió en un pliego de plástico transparente y se colocó sobre una película KODAK X-OMAT AR Xar-5, 8 X 10 " durante 63 horas aproximadamente.

B.7. Análisis por "Western Blot".

Para poder detectar la presencia del ectodominio del betaglicano producido en *Pichia pastoris* en el medio de cultivo, se colectaron para su análisis por "Western Blot", alícuotas de 1.5 ml que se tomaron a distintos tiempos durante la inducción de la expresión de la proteína de los cultivos de las clonas seleccionadas. Las alícuotas tomadas de los cultivos se centrifugaron a 16000 x g por 2-3 minutos a temperatura ambiente para recoger las células, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo limpio. Tanto el extracto celular como el sobrenadante se guardaron a -20°C para su análisis por transferencia tipo Western.

Las pastillas celulares guardadas a -20°C, se descongelaron y resuspendieron en 100 ml de Solución Amortiguadora de Lisis (50 mM Fosfato Monobásico de Sodio, pH 7.4; 1 mM PMSF ó fluoruro de fenilmetilsulfonil; 1 mM EDTA; 5 % Glicerol) por cada mililitro de muestra. Se adicionó un volumen igual de esferas de vidrio de 0.5 mm de diámetro lavadas con 1N HCl, se agitó la muestra por 30 segundos y se incubó en hielo por otros 30 segundos. Este procedimiento se repitió 8 veces. Se centrifugó a 16 000 x g por 10 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf. Se tomaron 50 ml del lisado celular y se mezclaron con 50 ml de solución amortiguadora de carga para gel de poliacrilamida-SDS (Ver Gel de Poliacrilamida-SDS). Cada muestra se desnaturalizó por 5 minutos a 100°C antes de ser cargada en el gel de poliacrilamida-SDS.

Se descongelaron las alícuotas de los sobrenadantes y se tomaron 50 ml que se mezclaron con 50 ml de solución amortiguadora de carga para gel de poliacrilamida-SDS. Cada muestra se desnaturalizó por 5 minutos a 100°C antes de ser cargada en el gel de poliacrilamida-SDS.

B.7.1. Gel de poliacrilamida-SDS

Las muestras de los extractos celulares y sobrenadantes de los cultivos en los que se indujo la expresión del betaglicano soluble, se analizaron por electroforesis en un gel 7% de poliacrilamida-SDS y se corrieron en una cámara para electroforesis Bio-Rad Modelo Mini-Protean II a 30 mamps por gel.

Cada gel de poliacrilamida-SDS se preparó de acuerdo al siguiente protocolo (Harlow y Lane, 1988; Sambrook, et al, 1989):

- Gel Separador:

H ₂ O	5	ml
30 % Mezcla de Acrilamida (29.2% acrilamida; 0.8% N,N'- metilen-bisacrilamida)	2.3	ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.6	ml
10 % SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)	0.1	ml
10% Persulfato de Amonio	0.1	ml
TEMED (N,N,N',N', -terametiletilendiamina)	0.007	ml

- Gel Concentrador:

H ₂ O	3.4	ml
30 % Mezcla de Acrilamida	0.83	ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.63	ml
10 % SDS (Dodecil Sulfato de Sodio)	0.05	ml
10% Persulfato de Amonio	0.05	ml
TEMED (N,N,N',N', -terametiletilendiamina)	0.005	ml

- Solución Amortiguadora de Electroforesis (Sambrook, et al, 1989):

25 mM Tris
250 mM Glicina (pH 8.3)
0.1% SDS

- Solución Amortiguadora de Carga (Sambrook, et al, 1989):

50 mM Tris-Cl (pH 6.8)
100 mM DTT (ditiotreitól)
2% SDS
0.1% Azul de Bromofenol
10% Glicerol

Cada muestra analizada se preparó mezclando:

1 M DTT	15 μ l
2X Solución amortiguadora de Carga	35 μ l
Muestra	100 μ l

Se calentaron las muestras a 100°C por 5 minutos y se cargaron 50 μ l de cada muestra en cada carril del gel de poliacrilamida-SDS 7%.

Se cargaron en cada carril del marcador de peso molecular 15 μ l (1 μ g) mezclados con 35 μ l de DTT+2X SDS-Amortiguador de Carga.

La fijación y tinción de los geles de poliacrilamida-SDS (Sambrook, et al, 1989) se realizó en una solución de metanol/ácido acético con Azul de Coomasie R250 por 4 horas a temperatura ambiente.

- Solución Teñidora de Azul de Coomasie (2 litros):

5 g Azul de Coomasie R250
900 ml de agua desionizada
900 ml de metanol
200 ml de ácido acético glacial

Una vez transcurrido el tiempo de tinción, se destiñeron los geles en la solución de metanol/ácido acético sin el colorante a temperatura ambiente de 4-8 horas.

B.7.2. Transferencia.

Una vez que se llevó a cabo la electroforesis de las distintas muestras, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Los geles de poliacrilamida-SDS se pusieron en una Solución Amortiguadora de Transferencia por 15-30 minutos antes de ser colocados sobre la membrana de nitrocelulosa.

- Solución Amortiguadora de Transferencia (4 litros) (Sambrook, et al, 1989)

12.12 g Trizma

57.6 g Glicina

0.8 l Metanol

Los geles se colocaron sobre un pedazo de filtro Whatman 3MM (previamente mojado en la solución amortiguadora de transferencia), el cual había sido colocado sobre la esponja del cassette provisto en la cámara Bio-Rad Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell. Sobre los geles se colocaron la membrana de nitrocelulosa y sobre ésta otro pedazo de filtro Whatman 3MM (mojado en la Solución Amortiguadora de Transferencia) y la segunda esponja del cassette. Se cerró el casette y se introdujo en la cámara de transferencia. Se llenó la cámara Bio-Rad Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell con el Amortiguador de Transferencia y se conectó a una fuente de poder Bio-Rad Modelo 1000/500. La transferencia se llevó a cabo a 60 miliamperios por gel durante 15-18 horas a temperatura ambiente.

B.7.3. Incubación con Anticuerpos.

Una vez que se realizó la transferencia de las proteínas de los sobrenadantes y pastillas celulares de los geles de poliacrilamida-SDS a una membrana de nitrocelulosa, se tiñeron estos últimos con una solución de azul de Coomassie/ácido acético, y la membrana se sumergió en 300 ml de una Solución Bloqueadora (TBS 1X/Tween 0.1% / leche descremada en polvo 5%) durante 30 minutos. Se realizaron varios lavados (3-4) de 5-10 minutos con 100 ml TBS 1X/Tween 0.1%.

- Solución Bloqueadora

20X TBS (Solución Amortiguadora Tris-Salina)

500 mM Tris-Cl (pH 7.5)

3 M NaCl

Se agregó el primer anticuerpo, el policlonal No. 822 obtenido en conejo inmunizado con el ectodominio de betaglicano producido en bacterias (López-Casillas et al, 1993) en un título de 1/2000 y se incubó durante 45 minutos. Luego de este tiempo, se volvió a lavar con TBS 1X/Tween 0.1% y se incubó por 30 minutos con el segundo anticuerpo contra IgG de conejo-Peroxidasa de Sigma Immuno Chemicals Product No. A-4416 Lot. 054H8914 en un título de 1/5000. Se lavó la membrana con TBS 1X/Tween 0.1%, se retiró el exceso de detergente y se efectuó un ensayo de quimioluminiscencia mediante el empleo del equipo comercial ECL Western blotting detecting reagents de Amersham. La membrana de nitrocelulosa se expuso sobre una película KODAK X-OMAT AR Xar-5, 8 X 10 " a distintos tiempos (10-300 segundos).

VIII. Referencias.

- Andres, J.L., Rönstrand, L., Cheifetz, S., and J. Massagué. 1991. Purification of the TGF- β binding proteoglycan betaglycan. *J. Biol. Chem.* 266:
- Andres, J.L., Stanley, K., Cheifetz, S. and J. Massagué. 1989. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor- β . *J. Cell. Biol.* 109:3137-3145.
- Attisano, L., Cárcamo, F., Ventura, F., Weis, M.B., Massagué, J., and J. L. Wrana. 1993. Identification of human activin and TGF- β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell.* 75: 671-680.
- Barr, P.J. 1991. Mammalian subtilisins: the long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* 66:1-3.
- Bork, P., and C. Sander. 1992. A large domain common to sperm receptors (Zp2 and Zp3) and TGF- β type III receptor. *FEBS (Fed. Eur. Bioch. Soc.) Lett.* 300:237-240.
- Bourdon, M.A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N.B., and E. Rouslahti. 1987. Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:3194-3198.
- Cheifetz, S., and J. Massagué, J. 1989 The TGB- β receptor proteoglycan. Cell surface expression and ligand binding in the absence of glycosaminoglycan chains. *J. Biol. Chem.* 264:12.25-28.
- Cheifetz, S., Andres, J.L., and J. Massagué. 1988. The TGF- β receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J. Biol. Chem.* 263:16984-16991.
- Cheifetz, S., Bellón, T., Calés, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massagué, J., and M. Letarte. 1992. Endoglin is a component of the TGF- β receptor system in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267:19027-19030.
- Cheifetz, S., Hernandez, H., Laiho, M., ten Dijke, P., et al 1990. Determinants of cellular responsiveness to three transforming growth factor β -isoforms. Role of serum factors and distinct TGF- β receptor subsets. *J. Biol. Chem.*
- Cheifetz, S., Weatherbee, J. A., Tsang, M. L. S., Anderson, J. K., Mole, J. E., Lucas, R., and J. Massagué. 1987 . The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48: 409-415.
- Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K. and Romanos, M.A. (1991a) High Level Expression of Tetanus Toxin Fragment c in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* 9:455-460.
- Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K. and Henwood, C.A. (1991b) Production of Epidermal Growth Factor in Yeast: High Level Secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene.* 105:205-212.

- Cregg, J.M., Barringer, K.J., and A.V. Hessler. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* 5:3376-3385.
- Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thrill, G., and C.A. Stillman. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from yeast, *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9:1316-1323.
- Daopin, S., Piez, K.A., Ogawa, Y., and D.R. Davies. 1992. *Science*. 257:369-373.
- Digan, M.E., Larr, S.V., Brierley, R.A., Siegel, R.S., Williams, M.E., Ellis, S.B., Kellaris, P.A., Provow, S.A., Craig, W.S., Velicelebi, G., Harpold, M.M. and Thill, G.P. 1989. Continuous Production of a novel Lysozyme via Secretion from the yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. 7: 160-164.
- Ebner, R., Chen, R.-H., Shum, L., Lawler, S., Zioncheck, T.F., Lee, A., López, A., and R. Derynck. 1993. Cloning of a type I TGF- β receptor and its effect on TGF- β binding to the type II receptor. *Science* (Wash. D.C.) 260: 1344-1348.
- Ellis, S.B., Burst, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M., and T.R. Gingeras. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast, *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5(5):1111-1121.
- Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G., and Bishop, M. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3610-3616.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. 1984. *Anal Biochem.* 132, 6.
- Franzén, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C.-H., and K. Miyazono. 1993. Cloning of a TGF- β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell* 75: 681-692.
- Gordon, M.Y., Riley, G.P., Watt, S.M., and M.F. Greaves. 1987. Compartmentalization of a hematopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. *Nature*. 326:403-405.
- Gougos, A., and M. Letarte. 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 265:8361-8364.
- Harlow, E. and Lane, D. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. USA. pp 709.
- Koutz, P.J., Davis, G.R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J.M., and G. Thrill. 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*. 5:167-177.
- Lin, H.Y., and H.F. Lodish. 1993. Receptors for the TGF- β superfamily. *Trends Cell Biol.* 3:14-19.
- Lodish, H., Baltimore, D., Berck, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P. and Darnell, J. 1995. *Molecular Cell Biology.* Scientific American Books. W.H. Freeman and Company. USA. pp 1344.

- Liu, F., Hata, A., Baker, J., Doody, J., Cárcamo, J., Harland, R., and Massagué, J. 1996. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*. 381: 620-623.
- López-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J.L., Lane, W.S., and J. Massagué. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell*. 67:785-795.
- López-Casillas, F., Payne, H., Andres, J., and J. Massagué. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J. Cell. Biology*. 124 (4): 557-568.
- López-Casillas, F., Wrana, J.L., and J. Massagué. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF- β signaling receptor. *Cell*. 73:1435-1444.
- Massagué, J. 1985. Subunit structure of a high-affinity receptor for type β -TGF. *J. Biol. Chem*. 260:7059-7066.
- Massagué, J. 1990. The transforming growth factor- β family. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 6: 597-641.
- Massagué, J., Attisano, L., Wrana, J. 1994. The TGF- β Family and its composite receptors. *Trends in Cell Biology*. 4:172-178.
- Massagué, J., and B. Like. 1985. Cellular receptors for type β -TGF. *J. Biol. Chem*. 260:2636-2645.
- Massagué, J., Cheifetz, S., Endo, T. and B. Nadal-Ginard. 1986. Type β transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:8206-8210.
- Ohta, M., Greenberger, J.S., Anklesaria, P., Bassols, A., and J. Massagué. 1987. Two forms of transforming growth factor- β distinguished by multipotential hematopoietic progenitor cells. *Nature*. 329:539-541.
- Paifer, E., Margolles, E., Cremata, J., Montesino, R., Herrera, L and J.M. Delgado. 1994. Efficient Expression and Secretion of Recombinant Alpha Amylase in *Pichia pastoris* using two different Signal Sequences. *Yeast*. 10: 1415-1419.
- Pearson, R.B., and B.E. Kemp. 1991. Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity domains: Tabulations. *Meth.Enzymol*. 200:62-81.
- Roberts, A.B., Anzaw, M.A., Wakefield, L.M., Roche, N.S., Stern, D.F., Sporn, M.B.. 1985. Type- β transforming growth factor: A bifunctional regulator of cellular growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:119-123.
- Roberts, A., and M. Sporn. 1993. Mini Review. Physiological actions and clinical applications of Transforming Growth Factor- β (TGF- β). *Growth Factors*. 8:1-9.
- Roberts, A.B., Anzano, M.A., Lamb, L.C., Smith, J.M., and M.B. Sporn. 1981. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: Isolation from non-neoplastic tissues. *Proc.Natl. Acad.Sci. USA*. 78:53339-5343.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Schlunegger, M.P., and M. Grütler. 1992. *Nature*. 358:421-424.
- Schneiber, A.B., Kenney, J., Kowalski, W.J., Friesel, R., Mehlman, T., and T. Maciag. 1985. Interaction of endothelial cell growth factor with heparin: Characterization by receptor and antibody recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:6138-6142.
- Scorer, A., Buckholz, R., Clare, J.J. and M. Romanos. 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136:111-119.
- Segarini, P.R. and S.M. Seyedin. 1988. The high molecular weight receptor to transforming growth factor- β contains glycosaminoglycan chains. *J. Biol. Chem.* 263:8366-8370.
- Segarini, P.R., Rosen, D.M., and S.M. Seyedin. 1989. Binding of TGF- β to cell surface proteins varies with cell type. *Mol. Endocrinol.* 3:261-272.
- Tschopp, J.F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., and L. Grinna. 1987. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *BioTechnology*. 5:1305-1308.
- Vlodavsky, I., Folkman, J., Sullivan, R., Fridman, R., Ishai-Michaeli, R., Sasse, J., and M. Klagsburn. 1987. Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: Synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:2292-2296.
- Wang, X.-F., Lin, H.Y., Ng-Eaton, E., Downward, J., Lodish, H.F., and R.A. Weinberg. 1991. Expression cloning and characterization of the TGF- β type III receptor. *Cell*. 67:797-805.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X.-F., and J. Massagué. 1992. TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. 71:1003-1014.
- Zhu, A., Monahan, C., Zhang, Z., Hurst, R., Leng, L. and J. Goldstein. 1995. High-level expression and purification of coffee bean α -galactosidase produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Archives of Bioch. and Bioph.* 324 (1): 65--70.