

**PRODUCCION DE LA ENZIMA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO
SULFATASA HUMANA EN *Pichia pastoris***

JEFFERSON MORENO MEDINA

TRBAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

MICROBIOLOGO INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

BOGOTÁ D.C.

2012

**PRODUCCION DE LA ENZIMA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO
SULFATASA HUMANA EN *Pichia pastoris***

JEFFERSON MORENO MEDINA

Ingrid Schuler. PhD.
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Janeth del Carmen Arias Palacios. M.Sc. M.Ed.
Directora Carreras de Microbiología
Facultad de Ciencias

**PRODUCCION DE LA ENZIMA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO
SULFATASA HUMANA EN *Pichia pastoris***

JEFFERSON MORENO MEDINA

**Carlos Javier Alméciga Díaz, Q.F.,
Ph.D.**

Director

Instituto de Errores Innatos del
Metabolismo

Pontificia Universidad Javeriana

Edwin Alexander Rodríguez, L.Q.

Co-Director

Instituto de Errores Innatos del
Metabolismo

Pontificia Universidad Javeriana

Henry Córdoba, I. Q. M.Sc.

Evaluador

Pontificia Universidad Javeriana

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

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

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Dios por permitirme cumplir este nuevo logro en mi vida, bendecirme y alimentarme cada día con las mejores energías.

A la Universidad Pontificia Universidad Javeriana por darme las pautas académicas, éticas y morales para mi formación integral.

Al Instituto de Erros Innatos del Metabolismo por darme la oportunidad de realizar este trabajo de grado y especialmente a mi Director Carlos Javier Alméciga y Co-Director Edwin Alexander Rodriguez sin cuya guía, paciencia y constante apoyo no habría sido posible llevar a cabo esta prolongada tarea.

A todas las personas que aportaron su granito de arena y me brindaron una mano amiga.

Al lector.

Desde lo más profundo de mi corazón agradezco a mis padres quienes me han apoyado en todo, a mis amigos y a los que me acompañaron en este largo proceso.

CONTENIDO

1. RESUMEN	11
2. INTRODUCCION	12
3. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. MARCO TEÓRICO- REFERENTES CONCEPTUALES	17
4.1 Los errores innatos del metabolismo	17
4.2 Mucopolisacaridosis (MPS)	17
4.3 Mucopolisacaridosis IV A – enfermedad de Morquio A	20
4.4 Perfil clínico MPS IV A	21
4.5 Tratamiento	22
4.6 Gen GALNS	24
4.7 Enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS)	25
4.8 Expresión de proteínas en <i>P. pastoris</i>	26
5. OBJETIVOS	29
5.1 Objetivo general	29
5.2 Objetivos específicos	29
6. METODOLOGIA	30
6.1 <i>Pichia pastoris</i>	30
6.2 Banco de células de <i>P. pastoris</i>	30
6.3 Vector de expresión pPIC9-GALNS	30
6.4 Transformación de <i>P. pastoris</i> con los plásmidos pPIC9 ó pPIC9-GALNS	31
6.4.1 Preparación de los plásmidos para electroporación	31
6.4.2 Preparación células competentes de <i>P. pastoris</i>	32
6.4.3 Transformación de células de <i>P. pastoris</i>	32
6.4.5 Extracción de DNA genómico de <i>P. pastoris</i> .	33
6.4.6 Amplificación del gen GALNS en ADN genómico de clones obtenidos	34
6.5 Evaluación de expresión de clones GALNS a diferentes escalas	34
6.5.1 Cultivo de clones a un volumen de 10 mL	34
6.5.2 Cultivo de clones a un volumen de 100 mL	35
6.5.3 Determinación de Biomasa	35
6.5.4 Determinación de proteínas totales	36
6.5.5 Determinación de actividad específica GALNS	37
6.6 Evaluación de proteína intracelular	37
6.7 Evaluación de concentraciones de sustrato inductor	38
6.8 Evaluación de expresión de GALNS a escala de biorreactor	38
6.9 Cuantificación de GALNS recombinante por medio de ELISA Indirecta	40
6.10 SDS-PAGE y Western-blot.	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Plásmido pPIC9-GALNS	41
7.2 Amplificación del gen GALNS	41
7.3 Cuantificación de ADN	42
7.4 Evaluación de expresión de GALNS en <i>P. pastoris</i> a escala de 10 mL	42
7.4.1 Crecimiento celular	42
7.4.2 Evaluación de proteína total extracelular	43
7.4.3 Actividad específica GALNS	44
7.5 Evaluación de expresión de GALNS en <i>P. pastoris</i> a escala de 100 mL	45
7.5.1 Crecimiento celular	45
7.5.2 Evaluación de proteína total extracelular	47

7.5.3 Actividad específica GALNS 100 mL	47
7.6 Evaluación de proteínas totales intracelulares	48
7.7 Evaluación de concentraciones de sustrato inductor	50
7.8 Evaluación a escala de biorreactor	51
7.9 SDS-PAGE Y Western blot	55
7.10 Confirmación de fenotipos mediante amplificación de genes AOX	57
8. ANALISIS DE RESULTADOS	59
9. CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	69
BIBLIOGRAFIA	70
ANEXOS	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pacientes de Túnez con MPS IVA severo	21
Figura 2. Modelo del sitio activo de GALNS	26
Figura 3. Estructura del monómero GALNS	26
Figura 4. Vector pPIC9	31
Figura 5. Plásmido	41
Figura 6. Gen GALNS	42
Figura 7. Crecimiento celular a 10 mL	43
Figura 8. Proteína total extracelular a escala de 10 mL	44
Figura 9. Actividad específica GALNS a 10 mL	45
Figura 10. Crecimiento celular a 100 mL	46
Figura 11. Proteína total extracelular a escala de 100 mL	47
Figura 12. Actividad específica GALNS a 100 mL	48
Figura 13. Evaluación intracelular de la proteína GLANS- Clon 2	49
Figura 14. Evaluación intracelular de la proteína GLANS- Clon 3	49
Figura 15. Expresión de GALNS a escala de 1,7 L (Primer cultivo)	52
Figura 16. Expresión de GALNS a escala de 1,7 L (Segundo cultivo)	53
Figura 17. Linealización de la biomasa generada	54
Figura 18. Actividades volumétricas del clon 3	55
Figura 19. Análisis SDS-PAGE	56
Figura 20. Análisis Western blot	57
Figura 21. Confirmación de fenotipos mediante amplificación de genes AOX	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las mucopolisacaridosis	18
Tabla 2. Concentración y pureza del ADN extraído	42
Tabla 3. Parámetros cinéticos en etapa de inducción a 100 mL	46
Tabla 4. Parámetros cinéticos en etapa de crecimiento a 1,7 L	51
Tabla 5. Parámetros cinéticos en etapa de inducción a 1,7 L	52

INDICE DE ANEXOS

A. MAXI-PREP	76
B. TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN	78
C. EXTRACCION DE PROTEÍNA INTRACELULAR PARA <i>P. pastoris</i>	79
D. ELISA INDIRECTA	80
Reactivos ELISA INDIRECTA	81
E. SDS-PAGE	82
Reactivos SDS-PAGE	83
F. TINCION DE PLATA	86
Reactivos tinción de plata	86
G. WESTERN BLOT	88
Reactivos Western blot	88

1. RESUMEN

La enfermedad de Morquio A o mucopolisacaridosis IV A (MPS IV A) es una enfermedad autosómica recesiva de depósito lisosomal, causada por un defecto en el gen ubicado en 16q24.3, afectando la expresión de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) y favoreciendo la progresiva acumulación de los glucosaminoglicanos (GAGs), queratán sulfato QS y condroitín-6-sulfato C6S; lo que genera múltiples daños que incluyen el sistema musculoesquelético, cardio-respiratorio, entre otros. Debido a que presenta diferentes patologías no cuenta con un tratamiento específico, por eso el avance de la terapia de reemplazo enzimático para esta enfermedad es de gran importancia. En este trabajo se evaluó la producción de la enzima GALNS recombinante en *Pichia pastoris* de la cepa GS115 a escala de 10, 100 y 1700 mL. Además, se evaluaron concentraciones de 0,5; 1,5 y 2,5% de sustrato inductor a escala de 100 mL. La máxima actividad enzimática en las diferentes escalas fue observada alrededor de las 95 h de fermentación, con una producción a 1,7 L de cultivo de $0,106 \text{ U mg}^{-1}$ GALNS, un rendimiento de $0,09 \text{ U mg}^{-1}$ GALNS g^{-1} y una actividad específica de $0,23 \text{ U mg}^{-1}$ proteína total. Mediante SDS-PAGE se observaron 2 bandas alrededor de 50 y 31 kDa. El Western Blot identificó la presencia del monómero de 50 kDa aproximadamente y otra de más de 100 kDa que sugiere la presencia del dímero, evaluado a las horas de la máxima expresión GALNS (86 y 96 h) en los cultivos de biorreactor. Estos resultados muestran el potencial de producción de la enzima recombinante GALNS en *P. pastoris* transformada con pPIC9-GALNS para su aplicación de la terapia de reemplazo enzimático para la MPS IV A.

2. INTRODUCCION

La Mucopolisacaridosis (MPS) Tipo IV A o síndrome de Morquio A es una enfermedad de depósito lisosomal autosómica recesiva, descrita por primera vez por el pediatra uruguayo Luis Morquio en 1929 (1). Está determinada por la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) la cual se encarga de catalizar la degradación de los glucosaminoglicanos (GAGs) queratán sulfato (QS) y condroitín-6 sulfato (C6S) (1,2). La acumulación de estos GAGs genera varias manifestaciones en los pacientes como, retraso en el crecimiento, bajo peso, cuerpo desproporcionado (tronco y cuello corto, cabeza grande), anormalidades articulares, opacidad corneal, sordera y compromiso cardíaco, entre otras. Dado que es una enfermedad multisistémica, se requiere de un enfoque multidisciplinar para su tratamiento y manejo adecuado. La severidad de estas manifestaciones varía según la mutación (1). El gen que codifica para esta enzima se encuentra ubicado en el cromosoma 16q24.3 (3).

El síndrome de Morquio A es un trastorno genético poco frecuente, su incidencia global es de 1 en 40.000 (1), siendo esta muy variable y encontrándose en todos los grupos étnicos. En Australia se presenta en 1 de cada 201.000 nacidos vivos; en Portugal y Países Bajos 1:450.000 nacidos vivos; en Irlanda del Norte 1:76.000 nacidos vivos. En el programa de Morquio A fueron registrados 326 pacientes hasta el año 2007, con 172 hombres y 154 mujeres provenientes de 42 países, con una edad media de 14.9 y 19.1 años para hombres y mujeres respectivamente; el 64% de los pacientes menores de 18 años, documentados como casos clínicos desde el primer año de vida hasta los 73 años (4).

El tratamiento paliativo para un paciente con MPS difiere con las complicaciones y severidad de los síntomas que presenta el paciente, el cual considera principalmente los

sistemas afectados para proporcionarle cierta estabilidad. Por esta razón se realizan exámenes paraclínicos periódicamente para evaluar el desarrollo de la enfermedad. El tratamiento pasa por la evaluación de especialistas en diferentes campos de la medicina, que en el caso de un paciente Morquio A se refiere a ejercicios regulares y ferulización para controlar la progresiva pérdida del movimiento (1). Además de las terapias de sostén, se han explorado otras posibilidades como el trasplante de medula ósea que busca la reconstitución del sistema hematopoyético con células madre de un donante inmunocompatible, mejorando en algunos casos la movilidad articular y observando un retraso del deterioro en el organismo a pesar de la falta de actividad enzimática (5). Sin embargo, estos resultados no se garantizan. En el caso de la MPS IVA, el beneficio es limitado para el sistema musculoesquelético así se trasplante en edades tempranas (6). Otra alternativa de tratamiento es la terapia génica en donde se busca reemplazar el gen defectuoso mediante el uso de vectores (virales y no virales). Aunque se han realizado importantes estudios de transferencia génica con el uso de virus adenoasociados como posible tratamiento para la MPS IVA (7), aún se requiere de trabajos adicionales.

La MPS tipo IV A actualmente no cuenta con un tratamiento específico que muestre beneficios significativos para los pacientes. Sin embargo, estudios como el de Dvorak *et al* (8), presentan la capacidad de internalización de una enzima GALNS recombinante en los lisosomas de un modelo animal, disminuyendo la acumulación de QS en las células. En otro hallazgo realizado por Tomatsu, *et al* (9), sobre expresaron la enzima GALNS en células CHO y evaluaron la farmacocinética y su distribución en los tejidos afectados al aplicar una dosis de la enzima vía intravenosa a ratones GALNS de tres meses de edad, detectando la enzima en varios tejidos como hueso, medula ósea, hígado, bazo, riñón y corazón. Estos estudios mostraron la posibilidad de producir una enzima recombinante que pueda ser empleada en el desarrollo de una Terapia de Reemplazo Enzimático. El

Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) ha trabajado durante los últimos años en la producción de enzimas lisosomales recombinantes, como la Iduronato-2-sulfato (IDS) en *Pichia pastoris* (10), y N-acetilgalactosamina-6-sulfato (GALNS) en *Escherichia coli* (11), relacionadas con las mucopolisacaridosis tipo II y tipo IV A respectivamente.

Teniendo en cuenta las ventajas que tiene *P. pastoris*, como la posibilidad de realizar modificaciones postraduccionales, en el presente trabajo se realizó por primera vez, la clonación, transformación, y producción a escalas de 10, 100 y 1700 mL de la enzima recombinante humana GALNS con el fin de evaluar y caracterizar su producción en este sistema eucarionte.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) es la encargada de degradar los GAGs queratán sulfato (QS) y condroitín-6-sulfato (C6S). Cuando esta enzima se encuentra ausente o deficiente en el organismo, estos GAGs se acumulan en los lisosomas, generando la enfermedad de Morquio A ó mucopolisacaridosis IV A (MPS IV A). El síndrome de Morquio A presenta principalmente manifestaciones clínicas como displasia esquelética y afectación en cornea y cartílago debido a la acumulación especialmente del QS (2). Los pacientes con una forma severa de la enfermedad no sobreviven mas allá de la segunda o tercera década de vida, debido al gran compromiso pulmonar y cervical; mientras que los pacientes con una forma leve de MPS IV A pueden sobrevivir hasta la séptima década de la vida (2).

Actualmente los tratamientos para una enfermedad genética, como el síndrome de Morquio A, no son específicos y son tratados desde la amplitud de la medicina. Una opción terapéutica es el trasplante de medula ósea, siempre y cuando el paciente presente deterioro mínimo cognitivo y no presente una disfunción significativa de órganos vitales. Aunque los pacientes con MPS IV A no presentan retraso mental, este tipo de terapia no tiene beneficio para el sistema musculoesquelético. Otras opciones son el trasplante de células madre hematopoyéticas, terapia génica, terapia con fármacos con moléculas pequeñas y reducción de sustrato (12, 13), pero en la actualidad no hay estudios que muestren resultados contundentes para ser empleadas como tratamiento de la enfermedad. La terapia de reemplazo enzimático (TRE), ha tenido un impacto importante en pacientes con enfermedades de depósito lisosomal. La TRE consiste en proporcionar al paciente una enzima exógena, catalíticamente activa, a través de infusiones intravenosas regulares para lograr una disminución importante del sustrato acumulado.

A pesar que los ensayos preclínicos con la enzima recombinante producida en células de mamífero han mostrado resultados prometedores para el tratamiento de la enfermedad, los costos elevados de producción, el riesgo de contaminación con patógenos que afecten la salud humana y los altos costos del tratamiento para los pacientes, son razones importantes para evaluar sistemas de producción diferentes para estas proteínas. En el IEIM durante los últimos años se ha trabajado en la producción de enzimas recombinantes en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. Para el caso específico de GALNS, a pesar de fue posible producir una enzima activa en *E. coli*, la enzima no fue internalizada por células en cultivo, posiblemente debido a la ausencia de glicosilaciones. Con el objetivo de obtener una enzima recombinante GALNS glicosilada, el presente proyecto busca evaluar por primera vez la producción de este enzima en la levadura *P. pastoris*, lo que constituirá un avance importante en la búsqueda de una TRE para esta enfermedad.

4. MARCO TEÓRICO- REFERENTES CONCEPTUALES

4.1. LOS ERRORES INNATOS DEL METABOLISMO

Los errores innatos del metabolismo son enfermedades raras que se definen como trastornos bioquímicos en la estructura o función de proteínas, lo que contribuye a la alteración en el metabolismo de lípidos, carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas, conduciendo a los fenotipos propios de cada patología (14,15).

Dentro de los errores innatos del metabolismo se encuentran las enfermedades de depósito lisosomal, causadas por la mutación en un gen que codifica para una enzima intralisosomal. Estas enzimas son encargadas de hidrolizar proteínas, hidratos de carbono complejos, ácidos nucleídos, lípidos, sulfatos y fosfatos. Los productos finales de la hidrólisis son eliminados del cuerpo o son reutilizados por la célula. La acumulación progresiva de estos productos conduce a una alteración y destrucción celular generalizada causando disfunción en órganos y tejidos (16).

4.2. MUCOPOLISACARIDOSIS (MPS)

Las Mucopolisacaridososis (MPS), son un grupo de errores innatos del metabolismo, caracterizados bioquímicamente por la acumulación de los glucosaminoglicanos (GAGs), en tejidos y su consecuente aumento en la secreción urinaria. Una deficiencia enzimática lisosomal, proveniente de la mutación de un gen y genera incapacidad de los lisosomas para degradar macromoléculas sulfatadas para liberarlas al citosol como producto de su degradación, acumulándose progresivamente. Las MPS se clasifican de acuerdo con el sustrato acumulado y la enzima deficiente. Este grupo de desordenes presentan gran heterogeneidad clínica; existiendo formas leves y severas de la enfermedad, que se corresponden con la actividad enzimática ausente, lo cual explica la dificultad en su diagnóstico (17).

Los glucosaminoglicanos son cadenas de polisacáridos que están unidos por enlaces covalentes a una proteína central, denominándolos proteoglicanos, como los N-sulfonilglucosamina, N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Estos GAGs están ligados al amino libre por el grupo sulfato, al hidroxilo de la hexosamina o en menor proporción están unidos a otro azúcar, y varían de tamaño según las repeticiones de disacáridos que posean. Presentan carga anionica gracias al ácido urónico y especialmente a sus grupos sulfato (18). Hasta la fecha se han identificado once deficiencias enzimáticas que conducen a una acumulación de varias especies de GAGs, incluyendo dermatánsulfato (DS), heparánsulfato (HS), condroitin-4- ó -6- sulfato (C4S o C6S), queratánsulfato (QS) y ácido hialurónico (19).

En la tabla 1, se presenta un resumen de los ensayos de diagnóstico disponible, características clínicas, enzima defectuosa y los GAGs correspondientes para cada una de las MPS.

Tabla 1. Clasificación de las Mucopolisacaridosis.

Tipo MPS*	Otros nombres	Ensayo cualitativo para el tipo de GAG secretado	Actividad enzimática: afectada	Características clínicas relativas de la MPS*	Salvedades en las pruebas de laboratorio
MPS I	Hurler, Hurler-Schele, Scheie	DS, HS	α -L-Iduronidasa	Niños con discapacidad cognitiva, rara vez tienen evidentes problemas de comportamiento. Progresiva opacidad corneal.	Los GAG en orina suelen ser elevados. Es importante identificar las interferencias de la prueba.
MPS II	Hunter	DS, HS	Iduronato -2-sulfatasa	Ligado a X, la historia clínica puede ser importante y más en pacientes hombres. No presenta opacidad corneal. Cambios comunes de comportamiento/cognitivo en pacientes severamente afectados.	Los GAG en orina suelen ser elevados. Es importante identificar las interferencias de la prueba.

Tabla 1. Clasificación de las Mucopolisacaridosis.

MPS III	San Filipo, tipo A-D	HS	A: heparan N-sulfatasa B: α -N-acetilglucosaminidasa C: N-acetil-CoA: α -glucosaminidasa aciltransferasa D: N-acetilglucosamina-6-sulfatasa	Cambios de comportamiento/ cognitivo. Manifestación e implicación en huesos, articulaciones. Opacidad corneal no es común o usualmente leve.	
MPS IV	Morquio, Tipo A y B	A: QS, CS B: QS	A: N-acetilgalactosamina 6-sulfatasa también conocido como GALNS B: β -galactosidasa	Generalmente la cognición es preservada incluso en pacientes gravemente afectados. Característica displasia esquelética. Opacidad corneal desarrollada en algunos pacientes	El nivel de GAG es frecuentemente normal, la actividad de GALNS puede ser lábil cuando se ensaya por DBS; adicionalmente los controles pueden ser necesarios para asegurar la precisión para diagnosticar MPS IVA
MPS VI	Maroteaux-Lamy	DS	Arilsulfatasa B (ASB) o N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa	Generalmente la cognición es preservada incluso en pacientes gravemente afectados. La opacidad leve o severa generalmente se desarrolla, no puede ser un signo primario.	La medición cualitativa y cuantitativa en orina de DS, múltiples sulfatasas y múltiples enzimas; los GAG en orina pueden estar en rangos normales en pacientes poco afectados.
MPS VII	Sly	DS, HS, CS	β -glucuronidasa	Hidropesía fetal es común al nacer. Opacidad corneal común	
MPS IX	Deficiencia de hialuronidasa	Desconocido: cuatro pacientes descritos en literatura.	Hialuronidasa	No hay características oculares. Masas periarticulares observadas en algunos pacientes. Síntomas prominentes comunes.	Elevación de a. hialuronico en plasma.

*Nota: las características clínicas por si solas no se deben utilizar para descartar o excluir en un particular tipo de MPS. DS: dermatán sulfato; HS: heparán sulfato, CS: condroitin-4-6- sulfato; QS: Queratán sulfato.
Adaptado de Thomas JA (19)

Las MPS son enfermedades degenerativas y multisistémicas, debido a la acumulación progresiva de los GAGs. Generan síntomas diferentes en órganos y sistemas, entre ellos: retraso mental, hiperactividad, hidrocefalia comunicante, compresión de médula espinal, pérdida de audición, opacidad corneal, rigidez articular, problemas respiratorios, problemas cardiovasculares, síndrome del túnel carpiano, disóstosis múltiple, hernia umbilical o inguinal, rasgos faciales toscos, entre otros; por ende, son enfermedades que requieren un enfoque multidisciplinar para su tratamiento y manejo adecuado (20).

4.3. MUCOPILISACARIDOSIS IV A (ENFERMEDAD DE MORQUIO A)

La MPS Tipo IV A, o enfermedad de Morquio A, es una enfermedad de depósito lisosomal de herencia autosómica recesiva, resultante de la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), la cual se encarga de la degradación de los GAGs QS y C6S (1, 2). Los pacientes con esta enfermedad presentan un amplio espectro de fenotipos clínicos. En la forma clásica, el paciente presenta displasia ósea severa, pérdida de la audición, compromiso cardíaco, enanismo, opacidad corneal. En el fenotipo clínico más atenuado, los pacientes presentan un retraso en las manifestaciones clínicas de la forma clásica (21).

El síndrome de Morquio A es un trastorno genético poco frecuente. Su incidencia global es de 1 en 200.000 (23), siendo esta proporción muy variable, y se encuentra en todos los grupos étnicos. Para la población colombiana se identificaron las mutaciones p.G301C, p.S162F y p.F69V en pacientes del viejo Caldas, de las cuales la última no ha sido reportada en otras poblaciones (23,24). Posteriormente, las mutaciones p.A75G y p.R386C fueron identificadas en pacientes del departamento de Boyacá (Saboya y Chiquinquirá), de las cuales la primera no se ha identificado aún en otros pacientes latinoamericanos (25).

4.4. PERFIL CLINICO MPS IV A

Los diferentes fenotipos presentados en la MPS IV A se enfocan principalmente en el compromiso esquelético, como se muestra en la *Figura 1*. Los pacientes afectados al nacer presentan un fenotipo normal, sin embargo, al finalizar el primer año de vida se desarrolla giba toracolumbar, claramente visible al sentarse. Dentro de los dos y tres años de vida, más del 70% de los pacientes afectados presentan retraso en el crecimiento, tronco corto, alteraciones dentarias (dientes muy espaciados; formación de caries frecuentemente y esmalte dental delgado), pectus carinatum, cifosis, escoliosis, displasia de cadera, rigidez articular, opacidad corneal, rasgos faciales toscos, y genu valgum. El desarrollo psicomotor es normal y se puede ver alterado por la existencia de sordera neuro sensorial o de conducción. También se presenta desaliento y signos como las extremidades inferiores piramidales. De los cinco a seis años de vida, importantes deformidades torácicas producen dificultades en la función pulmonar y cardiaca, los cuales reducen la esperanza de vida. Los pacientes con MPS IVA generalmente son distinguidos de los otros fenotipos de MPS ya que no se manifiesta con retraso mental y no se observan otras deformidades óseas. (1, 26, 20)



Figura 1. Pacientes de Túnez con MPS IV A severo. Tomado de Laradi S. (27)

4.5. TRATAMIENTO

La MPS IV A no cuenta con un tratamiento específico. Los pacientes necesitan de ejercicios regulares y ferulización en la noche para limitar la progresiva pérdida del movimiento. Se realizan repetidas evaluaciones físicas y de resonancia magnética para evaluar la inestabilidad atlantoaxial (28). Las pertinentes revisiones y cuidados dan lugar para prevenir el desarrollo de la cifosis lumbar y corregir la deformidad genu valgum (29).

Entre los procedimientos quirúrgicos encontramos la tonsilectomía, adenoidectomía, la cirugía de columna cervical y el tratamiento para corregir el genu valgum y la displasia de cadera (30).

El trasplante de médula ósea ha probado tener importantes beneficios en pacientes con MPS I, II, III y VI, aunque con resultados variables (31). Adicional a la dificultad de conseguir un donante compatible y al elevado riesgo de complicaciones, el trasplante de medula ósea en pacientes MPS IVA tiene un efecto limitado sobre las anomalías cardíacas, visuales y esqueléticas (13).

A pesar que se han realizado ensayos preclínicos de terapia génica, obteniendo resultados prometedores, esta terapia aún se encuentra en etapas preliminares y estudios adicionales se deben realizar antes de que se pueda evaluar en pacientes (7,32).

Finalmente, se encuentra la TRE, la cual ha mostrado resultados importantes en el tratamiento de varias enfermedades de depósito lisosomal como Gaucher (34), Fabry (34), Pompe (35), MPS I (36), MPS II (37) y MPS VI (38, 39).

El principio de la TRE es proporcionarle regularmente al paciente la enzima deficiente la cual debe presentar las mismas características a la enzima humana. Esta enzima debe cumplir con varios requisitos como ser activa, estable, no ser inmunogénica, se debe

producir en cantidades suficientes, tener un alto grado de purificación, presentación adecuada y direccionamiento de la enzima sobre la célula blanco (40).

Para el caso de la enfermedad de Morquio A, los ensayos preclínicos han mostrado la posibilidad de utilizar esta alternativa terapéutica para el tratamiento de los pacientes con esta enfermedad (8), y la evaluación clínica de la TRE se encuentra en fase III (41). En comparación con la terapia de trasplante de células madre hematopoyéticas, la TRE puede entregar más cantidad de enzima, presenta un riesgo significativamente menor de alterar la salud del paciente y es aplicable a un mayor número de individuos afectados (12).

Por eso el objetivo de producir la enzima GALNS en un sistema de expresión eucarionte como lo es *P. pastoris*, anteriormente realizado en *E. coli* (11, 42), en el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo se convierte en un objetivo para alcanzar en un futuro cercano la TRE para la enfermedad de Morquio A.

Recientemente, el IEIM mostró la posibilidad de producir en *E. coli* una enzima GALNS recombinante activa (42). A pesar que *E. coli* no realiza N-glicosilaciones, si tiene la capacidad de realizar la modificación de cisteína a formilglicina para la activación de la enzima (40). De esta forma, estos resultados sugirieron que: (i) las N-glicosilaciones parecen no ser necesarias para la producción de una proteína recombinante activa, y (ii) la enzima FGE procariota es capaz de reconocer y activar una sulfatasa humana mostrando el alto grado de conservación de este mecanismo celular (11). La purificación y caracterización *in-vitro* de esta proteína permitió demostrar que las N-glicosilaciones no son necesarias para la producción de una proteína activa o para su estabilidad, pero si para mediar la captura celular de la proteína (42). Aunque aún es necesario ampliar estos estudios, estos resultados muestran el potencial de esta enzima recombinante en el desarrollo de una nueva estrategia de TRE para MPS IV A.

4.6. GEN GALNS

El gen *GALNS* humano se encuentra localizado en el brazo largo (q) del cromosoma 16 en la posición 24.3 y presenta 14 exones y 13 intrones, el cual codifica para una proteína de 522 aminoácidos incluyendo un péptido señal de 25 aminoácidos (44). Se han descrito más de 100 mutaciones diferentes, siendo estas coherentes con las variadas manifestaciones clínicas que se observan en estos pacientes. Las mutaciones encontradas son de tipo no sinónimas, siendo frecuentes p.R386C (Inglaterra, Japón, Italia, México, Alemania, China); p.G301C (la mayoría encontradas en Colombia pero también en Portugal, Marruecos y la población británica, francesa y brasileña) y la p.I113F (Inglaterra e Irlanda), así como pequeñas deleciones e inserciones, duplicaciones y reordenamientos (21,44).

La enzima *GALNS* es un homodímero de 120 kDa con monómeros de 60 kDa que se procesan a polipéptidos con un peso molecular de 40 y 15 kDa. Este último polipéptido es una glicoproteína con dos sitios potenciales de glicosilación. Los oligosacáridos de *GALNS* contienen manosa-6-fosfato (M6P) que dirige a los residuos de la proteína al lisosoma y el resto de M6P se une a un receptor en el aparato de golgi dirigiéndose a los compartimentos pre-lisosomales. Las enzimas que escapan del sistema se secretan por la célula a través de la ruta secretora constitutiva y son recapturadas por los receptores celulares de superficie devolviéndolas al lisosoma por endocitosis. Este aspecto hace posible suministrar la TRE a pacientes con MPS IV A (9). Dentro del lisosoma, *GALNS* es un complejo funcional que comprende varias enzimas como la β -galactosidasa (EC 3.2.1.23), α -neuraminidasa (EC 3.2.1.18) y serincarboxipeptidasa catpesina A (EC 3.4.16.1) (21).

4.7. ENZIMA N-ACETILGALACTOSAMINA-6-SULFATO SULFATASA (GALNS)

La enzima lisosomal humana N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (EC 3.1.6.4) elimina los grupos sulfato a partir del N-terminal de la enzima de los GAGs QS y C6S. Los defectos en GALNS conducen a la acumulación de estos sustratos, desarrollando la enfermedad MPS IV A o Morquio A (22).

La enzima GALNS se ha purificado a partir de células de hígado humano como un oligómero de 39 y 19 kDa; de placenta humana, obteniendo un oligómero de 40 y 15 kDa; así como de fibroblastos (21, 22). Se ha producido la enzima recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO), la cual está siendo evaluada en ensayos clínicos (9)

En el trabajo realizado por Rivera-Colón, *et al* (22), reportaron la estructura tridimensional de la proteína y ubicaron el sitio activo de GALNS en una profunda grieta cónica rodeada de grupos positivos, siendo estos, aminoácidos como Asp39, Asp40, Arg83, Tyr108, Lys140, His142, His236, Asp288, Asn289, Lys310, y dihidroxialanina 79 que interactúan con el sustrato (*Figura 2*). Este sitio activo necesita de Ca^{+2} hexavalente el cual interactúa con el sustrato y por medio de reacciones electrostáticas lo dirige al sitio activo para que finalmente se una a la enzima (*Figura 3*) (22). Cabe anotar que los GAGs, QS y C6S son aniónicos, lo cual permite las interacciones electrostáticas con el sitio activo (18).

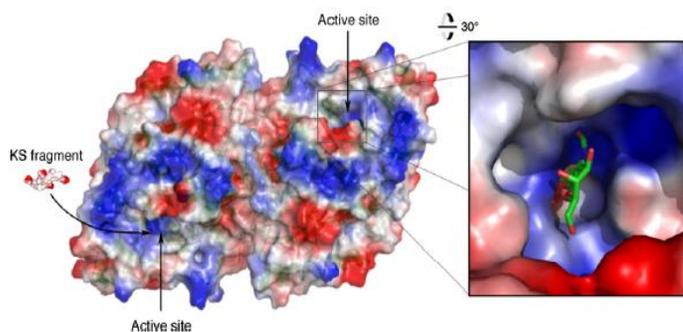


Figura 2. Modelo del sitio activo de GALNS. El potencial electrostático GALNS superficie (rojo) el color azul muestra las grandes superficies de carga positiva adecuado para interactuar con sustratos polianiónicos. Los sitios activos se indican con flechas. Un fragmento del GAG Queratán Sulfato (KS fragment) se muestra en la figura indicando el sitio activo al que es afín. Tomado de Rivera-Colón, *et al* (22).

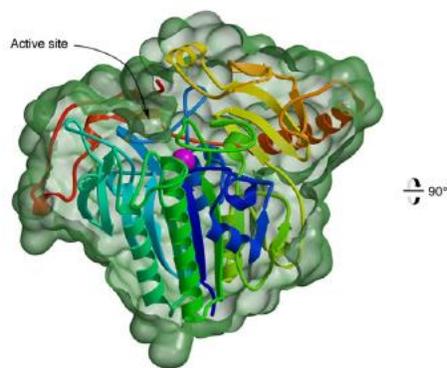


Figura 3. Estructura del monómero GALNS. Coloreado de azul y rojo desde el N-terminal hasta el C-terminal. Ca⁺² de color magenta. La superficie molecular en verde (calculado en POVScript1). Se indica el sitio activo. Tomado de Rivera-Colón, *et al* (22)

4.8. EXPRESION DE PROTEINAS HETEROLOGAS EN *P. pastoris*

La efectividad de un sistema recombinante depende de factores genéticos como el uso de codones de expresión, una transcripción eficiente mediante el uso de promotores fuertes, señales de traducción, péptido señal de secreción, entre otros. Así mismo, depende de factores fisiológicos como la producción de proteasas y la estrategia de fermentación (45).

La levadura metilotrófica *P. pastoris* ha sido ampliamente usada para la producción de diversas proteínas heterólogas recombinantes, ya que no es patógena, es fácil de manipular genéticamente ofreciendo altas densidades celulares bajo condiciones óptimas de crecimiento, altos niveles de productividad, viabilidad genética, capacidad de realizar complejas modificaciones postraduccionales como N-glicosilaciones, no siendo necesario la remodelación química de la enzima para su uso (45).

La levadura cuenta con dos promotores de la alcohol oxidasa, siendo esta la primera enzima de la vía de la asimilación del metanol. El gen *AOX1* es el responsable de más del 85% de producción de la enzima y el gen *AOX2* con menos del 15%. Existen tres fenotipos clasificados en la capacidad de metabolizar el metanol denominados como Mut^+ , Mut^s y Mut^- . El primero es una cepa transformada que utiliza el promotor *AOX1*, el cual le da la habilidad de degradar más rápidamente el metanol; la segunda, Mut^s , cepa transformada que tiene suprimido el gen *AOX1* trabajando con el gen *AOX2* permitiéndole un consumo lento del sustrato y en el caso de que ambos genes *AOX* se encuentren afectados se clasifica como Mut^- , por lo tanto, la cepa con este fenotipo no crece en este sustrato (45).

La asimilación del metanol sucede por los componentes citosólicos que transportan al peroxisoma y al lisosoma de la célula la degradación realizada previamente por la enzima alcohol oxidasa. Un ejemplo es la pexofagia del transporte selectivo a los peroxisomas,

cuando la fuente de carbono se cambia por metanol y la vía selectiva del citoplasma a la vacuola por la aminopeptidasa I que es activada en estado vegetativo, en ambas vías se requiere del gen *PpAtg11*. Estas vías metabólicas se observan en diferentes estadios celulares. (46)

En el caso del metabolismo dentro del peroxisoma, dada la activación del gen AOX, el metanol es convertido a formaldehído y peróxido de hidrógeno H_2O_2 , siendo este último tóxico y retenido para ser degradado por la catalasa, para producir moléculas de agua y oxígeno. Un porcentaje del formaldehído es transformado para la producción de biomasa y el otro para la producción de CO_2 y $NADH+H$ generando energía (47).

Existen diferentes fuentes de carbono utilizados para el crecimiento de *P. pastoris* como el metanol, glicerol, sorbitol, glucosa, manitol y trehalosa. Si se usa metanol como fuente de carbono y sustrato inductor, este inhibe el crecimiento celular en concentraciones por encima de 3.65 gdm^{-3} ; siendo un compuesto tóxico y volátil (48). Por lo tanto, es necesario controlar la concentración de metanol en valores inferiores a 0.5% de metanol para mutantes con fenotipo Mut^+ .

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la producción de la enzima humana recombinante N-acetilgalatosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) en *Pichia pastoris*.

5.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obtener los clones de *P. pastoris* GS115 transformados con los plásmidos pPIC9 o pPIC9-GALNS.
2. Evaluar la producción de la enzima GALNS con los clones obtenidos a escala de 10mL y 100mL de volumen efectivo de trabajo en medio definido por Invitrogen®.
3. Evaluar el efecto de la concentración de metanol sobre los valores de actividad enzimática a escala de 100 mL.
4. Estudiar la cinética del clon de mayor expresión de la enzima humana recombinante GALNS a escala de biorreactor.

6. METODOLOGIA

6.1. *Pichia pastoris*.

Para la expresión de la enzima humana N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) se utilizó la cepa GS115 de la levadura *Pichia pastoris* (50).

6.2. Banco de células de *P. pastoris*.

Para la conservación de las células obtenidas durante la realización del proyecto se realizaron bancos de trabajo tomando una colonia aislada de cada cepa para inocular en 10 mL de medio YPD (Extracto de levadura 1% (p/v), Peptona 2% (p/v), Dextrosa (D-Glucosa) 2% (p/v)). Se incubó durante un periodo de 20 h a 28°C, en agitación a 280 rpm. Posteriormente se adicionó este preinóculo a 490 mL de medio YPD incubándose a las mismas condiciones ambientales por 48 h. Finalmente, estas células se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos en una centrifuga refrigerada Eppendorf®, descartando el sobrenadante. Las células obtenidas fueron resuspendidas en medio YPD con Glicerol 20% (v/v), realizando alícuotas de 1 mL y se almacenó a - 80°C. Para cada uno de los bancos de trabajo realizados se evaluó su pureza por medio de la técnica de coloración de Gram, la viabilidad y estabilidad genética por medio de una siembra en medio solido (50).

6.3. Vector de expresión pPIC9-GALNS.

El vector de expresión pPIC9-GALNS, previamente construido en el IEIM, se utilizó el vector pPIC9 (*Figura 4*). Este vector posee las siguientes características: 1) fragmento del promotor *AOX1* que permite altos niveles de expresión tras inducción con metanol, 2) una secuencia de ADN codificando para la señal de secreción de la proteína (α -Factor), 3) el gen *HIS4* que le confiere la habilidad de sintetizar histidina por lo cual se utiliza como

6.4.2. Preparación células competentes de *P. pastoris*.

A partir del banco de trabajo de *P. pastoris* GS115 se tomó un vial el cual fue inoculado en 10 mL de medio YPD e incubado a 280 rpm a 28°C. Al cabo de 24 h de incubación se inoculó en 90 mL de medio YPD para obtener un volumen final de 100 mL, el cual se incubó a las mismas condiciones; se monitoreó la DO_{600} del medio de cultivo hasta alcanzar un valor entre de 1,3-1,5. Luego de lograr la DO_{600} deseada, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm a 4°C por 15 minutos, se rescató el pellet y se resuspendió en agua fría, volviendo a centrifugar. Posteriormente se homogenizó el pellet en 10 mL de sorbitol 1M y se centrifugó. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 1 mL de sorbitol 1M obteniendo así las células competentes. (50)

6.4.3. Transformación de células de *P. pastoris*.

La transformación de *P. pastoris* competentes se realizó por electroporación (Anexo B) Realizada con 20 μ L de células competentes, en un electroporador BioRad®; a 1200 Voltios, 200 Ω y 5-20 μ g de ADN (pPIC9 ó pPIC9-GALNS). El producto final fue sembrado en medio mínimo con dextrosa (MD: 1,34% YNB, 4×10^{-5} Biotina, 2% D-Glucosa) para seleccionar las células transformadas o clones y medio mínimo con histidina (MDH: 1,34% YNB, 4×10^{-5} Biotina, 2% D-Glucosa, 0,004% L-histidina) como control de viabilidad celular. Estas siembras fueron incubadas a 30°C hasta que se observaron colonias.

6.4.4. Determinación de fenotipos de células obtenidas.

Las células transformadas fueron aisladas en medio mínimo con metanol al 0,5% como fuente de carbono, la morfología y el tipo de crecimiento celular fue comparado con los controles ofrecidos por Invitrogen™ para clasificar los clones obtenidos como His⁺ Mut⁺ ó His⁺ Mut^s (50).

6.3.5. Extracción de DNA genómico de *P. pastoris*.

Para la extracción de DNA genómico de cada clon obtenido, el primer paso fue obtener biomasa en 200 mL de medio YPD que fue incubado a 28°C por 48 h a 280 rpm. Transcurrido el crecimiento, el medio fue centrifugado a 4000 rpm, 4°C por 15 minutos. Se tomó 300 mg de peso húmedo de las células para luego ser criopreservadas con nitrógeno líquido. La biomasa criopreservada se ubicó en un mortero frío para ser macerada hasta obtener un polvo al que se le adicionó 500µL de buffer de lisis (100nM Tris-HCl, 100 nM NaCl, 10 nM EDTA), recuperando el macerado en un vial. Posteriormente se le adicionó a éste un volumen de fenol-cloroformo-isoamilalcohol mezclado a temperatura ambiente por 10 minutos. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por 10-15 minutos; recuperando el sobrenadante. Posteriormente, se adicionó un volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de Acetato de Sodio 3M a pH 4,8-5,0 mezclando y dejando en reposo 5 minutos. Pasado el tiempo, se continuó con una centrifugación a las mismas condiciones nombradas anteriormente y se rescató el pellet; que fue lavado en etanol al 70% para volver a ser centrifugado; descartando el sobrenadante y dejando secar el pellet. Finalmente, el ADN fue resuspendido en buffer Tris-EDTA y se adicionaron 5 µL de RNAsa. Al ADN genómico extraído se cuantificó por espectrofotometría utilizando NanoDrop (ThermoScientific).

6.3.6. Amplificación del gen GALNS en ADN genómico de clones obtenidos.

La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: dNTPs 10mM (1µL), TOMF23 (5'-ACAGGGCCATTGATGGCCTCAACCTCCT-3') (1µL), TOMF34R (5'-GCTTCGTGTGGTCTTCCAGATTGTGAGTTG-3') GALNS reverse primer (1µL), Mg²⁺ (1µL), Buffer de reacción PCR 10X (5µL), Taqpolimerasa (0,5µL), DNA (1µL) y agua desionizada para un volumen final de 50µL. La reacción de PCR constó de 30 ciclos con

los siguientes parámetros: denaturación a 94°C/1min., hibridación a 60°C/ 30s y elongación a 72°C/ 30s. La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) para observar una banda con un peso aproximado de 250 pb.

6.5. Evaluación de expresión de clones GALNS a diferentes escalas.

6.5.1. Cultivo de clones a un volumen de 10mL.

Para cada una de los clones obtenidos se realizó un banco de trabajo como se describió previamente en 6.2. Se descongeló un vial de cada clon el cual fue inoculado en 10 mL de medio YPD (Extracto levadura 1%, Peptona 1% y Dextrosa 2%) para reactivar la cepa. Pasadas 18 h de incubación a 28°C y 280 rpm, se centrifugó el medio a 4°C, 3500 rpm por 15 minutos para inocular la biomasa obtenida en 10 mL de medio BMG (Glicerol 1%, Biotina 4×10^{-5} %, YNB 1,34%, Fosfato de potasio 100mM pH 6), incubando a 280 rpm y 28°C. Al cabo de 24 h el medio fue centrifugado con las mismas condiciones descritas, y posteriormente fue resuspendido el pellet en 10 mL de caldo BMM (Metanol 0,5%, Biotina 4×10^{-5} %, YNB 1,34%, Fosfato de potasio 100mM pH 6), incubado bajo las condiciones anteriormente mencionadas durante 96 h. Cada 24 h de la etapa de inducción se tomó una muestra de 200 μ L para los análisis respectivos mencionados y se adicionó metanol a una concentración final de 0.5% (v/v). Este experimento se realizó por triplicado para cada uno de los clones evaluados.

6.5.2. Cultivo de clones a un volumen de 100mL.

Los mismos clones fueron cultivados en un volumen de 100 mL junto con un control negativo correspondiente a una cepa transformada con el plásmido pPIC9. Para esto, se descongeló un vial de cada clon y se inoculó en 9 mL medio YPD con el objetivo de reactivar la cepa en las mismas condiciones descritas anteriormente y sirviendo de pre-

inoculo para un volumen final de 100 mL de medio BMG. Posteriormente se incubó a 28°C a 280 rpm por 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, fue centrifugado el medio a 4°C, 3500 rpm por 15 minutos, resuspendiendo el pellet obtenido en medio BMM con un volumen final de 100 mL comenzando la fase de inducción. Cada 24 h se tomaron muestras de 200 µL para los respectivos análisis, y se adicionó metanol a una concentración final de 0.5% (v/v) por un periodo de 120 h de cultivo. Esta metodología se hizo por triplicado.

6.5.3. Determinación de Biomasa.

Para determinar la concentración de biomasa en cada una de las muestras recogidas se tomó una alícuota y se realizó una dilución pertinente determinando la densidad óptica (DO) a 610 nm en un espectrofotómetro Shimadzu®. A partir de las absorbancias se calculó la concentración en gL⁻¹ (peso seco) mediante la curva de calibración (*Ecuación(1)*). Los resultados se transformaron logarítmicamente para su representación gráfica. A partir de estos datos se calcularon los parámetros de velocidad específica de crecimiento $\mu(x)(h^{-1})$ y el tiempo de duplicación $td(h)$

$$X = \frac{(0.619 * DO_{610nm})}{0.528} * Factor_{dilución} ; R^2: 0.99$$

Ecuación 1. Concentración de biomasa en peso seco. (Tomado de Córdoba H. 2003)(51)

6.5.4. Determinación de proteínas totales.

La determinación de proteínas totales de cada muestra se realizó por medio del método de Micro-Lowry. De cada extracto crudo se analizaron 10 µL de muestra los cuales fueron mezclados con 100 µL de SDS al 1% y 100 µL de solución de cobre en un tubo de

borosilicato de 13x100mm. Luego de homogenizar la mezcla, esta se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasada la incubación, se le adicionó 400 μL de reactivo de Follin (Sigma-Aldrich) con una dilución 1/17, se homogenizó e incubó a 55°C durante 5 minutos. La reacción se detuvo a 4°C durante 5 minutos. La absorbancia de las muestras se leyó a 610 nm en un espectrofotómetro Shimadzu®. La concentración de proteínas totales en cada una de las muestras se determinó con ayuda de la curva patrón de albúmina realizada simultáneamente.

6.5.5. Determinación de actividad específica GALNS.

La cuantificación de la actividad enzimática GALNS se basó en el método descrito por Van Diggelen *et al* (52), con modificaciones. Para la reacción se mezclaron 10 μL del extracto crudo con 20 μL de sustrato 4-metil-umberiferil- β -D-galactopiranosido-6-sulfato 22 mM en solución amortiguadora NaCl 0,1M, acetato de sodio 0,1M pH 4,3. Como blanco de reacción se emplearon 10 μL de agua desionizada. La mezcla se homogenizó e incubó durante 17 ó 18 horas a 37°C. Trascorrida la incubación se adicionaron 2 μL de una solución 10 mgmL^{-1} de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich), se homogenizó y se llevó nuevamente a incubar por 2 h a 37°C. Finalmente, se adicionaron 1300 μL de solución de parada (Glicina 24 gL^{-1} , Na_2CO_3 21,2 gL^{-1} , NaOH 7,5 gL^{-1} , pH 10). La fluorescencia de la muestra se determinó en un fluorómetro modelo Modulus™ (Turner Biosystem) a $\lambda_{\text{ex}}360 / \lambda_{\text{em}}415$. Las unidades de actividad enzimática (U), se definen como los nmol de 4MU liberados por cada hora de reacción enzimática. La actividad específica (UmL^{-1} proteína total) se calculó empleando la *Ecuación (2)*, y la actividad volumétrica (UmL^{-1}) mediante la *Ecuación (3)*.

$$\text{Actividad específica} = \text{nm 4MU} / \text{mgproteína total} / (\text{h})$$

Ecuación 2. Actividad enzimática específica.

$$\text{Actividad volumetrica} = \text{nmol 4MU/h} / 0.01\text{ml}$$

Ecuación 3. Actividad enzimática volumétrica.

6.6. Evaluación de proteína intracelular.

Para evaluar la secreción de la proteína recombinante, se escogieron dos clones, el clon que sobresalía en expresar la enzima GALNS y el clon deficiente en dicha expresión, según los resultados obtenidos al evaluar el extracto crudo.

Para esta determinación se realizó un cultivo a escala de 100 mL de los dos clones escogidos. Tomando una muestra de 1 mL cada 24 h. Finalizada el cultivo, se evaluó el crecimiento celular según el numeral 6.5.3. Posteriormente se realizó el protocolo del Anexo C. Se evaluó por el método de Micro-Lowry las proteínas totales y la actividad GALNS empleando el método descrito anteriormente.

6.7. Evaluación de concentraciones de sustrato inductor.

De los resultados obtenidos a escala de 100 mL, se seleccionó el mejor clon de expresión de la enzima humana recombinante GALNS en el cultivo de 100 mL, para ser evaluado a diferentes concentraciones de metanol. Dado que los cultivos iniciales se mantuvieron a una concentración de 0,5% (v/v) de metanol, se evaluaron adicionalmente las concentraciones de 1,5% y 2,5%(v/v). Estos cultivos fueron realizados según lo descrito anteriormente y la determinación de proteína y actividad GALNS se realizó empleando la metodología descrita. Cada cultivo fue realizado por duplicado.

6.8. Evaluación de expresión de GALNS a escala de biorreactor.

El clon de mayor producción de la enzima activa GALNS fue escalado en biorreactor Bioengineering® KFL2000 de 3,7 L, a un volumen efectivo de trabajo de 1,7 L. Para esto se descongeló un vial que fue inoculado en 50 mL de medio YPD, como preinóculo de la fermentación. Pasada la incubación a 28°C a 280 rpm por 48 horas, este preinóculo fue agregado a 150 mL de medio MGli (Glicerol 1%, YNB sin aminoácidos 1,34%). Transcurridas 24 horas de incubación, se agregaron 200 mL del inoculo a 1450 mL de medio salino (KH_2PO_4 25,74 gL^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 gL^{-1} ; K_2SO_4 8,58 gL^{-1} ; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,60 gL^{-1} ; Glicerol 4%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,02 gL^{-1}), para obtener un volumen final de trabajo de 1650 mL. Adicionalmente se agregó 1 mL de solución de trazas minerales ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,0 g; NaI 0,08 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3,0 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, H_3BO_3 0,02 g; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g; CoCl_2 0,5 g, ZnCl_2 7,0 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22,0 g; Biotina 0,2 g; 1,0 mL H_2SO_4 concentrado), 1 mL de antiespumante de silicona 1,5 mL de Biotina 2X. Las condiciones ambientales del cultivo fueron modificadas de acuerdo a las necesidades del proceso para mantener las variables óptimas de crecimiento y expresión génica. Se mantuvo un pH de 5,0 ajustándolo con hidróxido de amonio al 7% (v/v) y el Oxígeno Disuelto cercano al 10% en etapa de inducción. Se realizó un cultivo en lote hasta alcanzar una concentración de biomasa alrededor de 40 gL^{-1} y posteriormente se hizo un lote alimentado con glicerol al 50% monitoreándolo hasta obtener una concentración de 60 gL^{-1} . Transcurrido este tiempo, se dio inicio a la fase de inducción con metanol puro mediante una bomba peristáltica de flujo variable, manteniendo la concentración del sustrato inductor a 0,5% (v/v) por un periodo de 120 h. La concentración de metanol en el biorreactor se monitoreó empleando una sonda de metanol alcosens de Frings. La formación de espuma fue controlada mediante la adición de silicona antiespumante.

Durante el proceso se tomaron alícuotas cada 12 h de 5 mL aproximadamente. Las muestras recogidas durante inducción, fueron centrifugadas según condiciones descritas previamente y separado el sobrenadante el cual fue almacenado a 4°C hasta su uso. Esta metodología se realizó por duplicado.

Para observar la cinética del clon evaluado, a los dos cultivos realizados se les cuantificó la biomasa en gL^{-1} , se calculó la velocidad específica de crecimiento $\mu(x)(h^{-1})$, el tiempo de duplicación $td(h)$, rendimiento de proteína total vs biomasa ($Y_{P/x}$) y de GALNS vs biomasa ($Y_{GALNS/x}$) y productividad $P(x)$. Además se cuantificó la proteína total y se determinó la actividad específica GALNS como se describió previamente.

6.9. Cuantificación de GALNS recombinante por medio de ELISA Indirecta.

La proteína recombinante fue cuantificada empleando la técnica de ELISA indirecta previamente desarrollada en el IEIM (17). Esta técnica utiliza un anticuerpo tipo IgG epítoto específico previamente producidos y purificados en el IEIM a partir de huevos de gallinas inmunizadas con una porción de la secuencia de la proteína. Para la curva de calibración se empleó una proteína recombinante GALNS, producida en células CHO, obsequiada por la Dra. Adriana Montaña de la Universidad de Saint Louis (USA) (Anexo D).

6.10. SDS-PAGE y Western Blot

Se realizó el seguimiento de la producción de GALNS recombinante mediante el método de electroforesis en gel SDS-PAGE. Se colocaron 20 μ L de muestra con buffer Laemli en un gel al 10% que fue corrido a 120V y 60 mA en condiciones reductoras. Las proteínas fueron teñidas con una solución colorante de Azul de Coomassie Brillante R-250 (Anexo

E) y tinción de plata (Anexo F). Para realizar el Western Blot (Anexo G), se hizo inicialmente una electroforesis SDS-PAGE y posteriormente se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa sobre la cual se identificó la proteína recombinante mediante un anticuerpo monoclonal anti-GALNS donado por la Dra. Adriana Montaña de la Universidad de Saint Louis (USA)

7. RESULTADOS

7.1. Plásmido pPIC9-GALNS.

Para lograr la respectiva linealización del plásmido pPIC9-GALNS e integrar este en el genoma de *P. pastoris* por medio del mecanismo de recombinación homóloga se utilizó la enzima de restricción *Pme I* cortando justo en el promotor 5'AOX1 (Figura 5A). Luego de haber transformado y sembrado las células, fueron seleccionadas cinco transformantes evaluando posteriormente la inserción del gen GALNS. En la Figura 5B se muestra una electroforesis del ADN genómico extraído de los cinco clones, observando cinco bandas de 10000 pb aproximadamente.

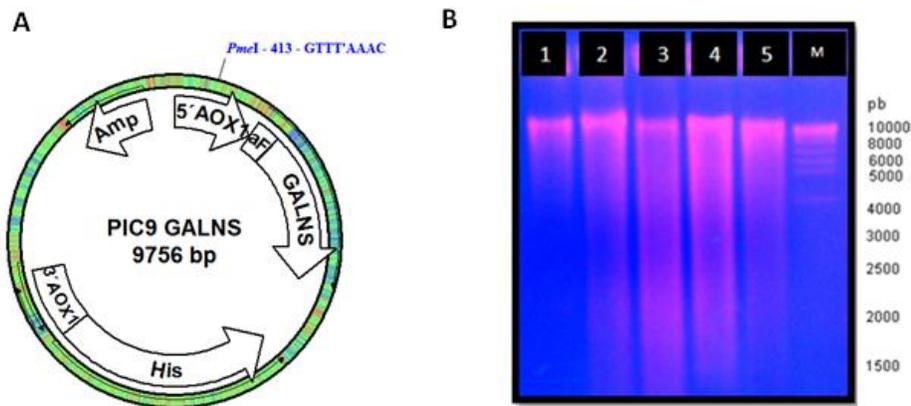


Figura 5. Plásmido. A Representación del plásmido indicando el corte de la enzima de restricción *Pme I* para su linealización. B. Electroforesis en gel de Agarosa del ADN genómico extraído. Clon: 1,2,3,4,5. MP: marcador de peso molecular.

7.2. Amplificación del gen GALNS.

Se realizó una amplificación de un fragmento del gen GALNS, logrando observar una banda de aproximadamente de 250 pb en todos los clones, siendo el indicativo que el gen fue correctamente insertado en el genoma de la levadura (*Figura 6*).

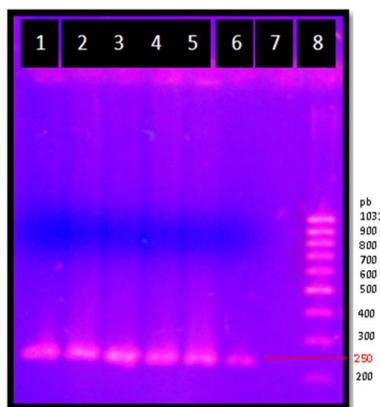


Figura 6. Gen GALNS. Electroforesis en gel de agarosa: Clon 1, 2, 3, 4 y 5. Fragmento amplificado del gen GALNS, 6: Control positivo, 7: Control negativo, 8: Marcador de peso molecular.

7.3. Cuantificación de ADN

En la *Tabla 2* se presentan los valores obtenidos al cuantificar el ADN genómico extraído, determinando la relación 260/280 nm y la relación 260/230 nm y la concentración obtenida para cada clon.

Tabla 2: Concentración y pureza del ADN extraído.

	CLON 1	CLON 2	CLON 3	CLON 4	CLON 5
260/280	1,99	2	1,97	1,86	1,97
260/230	2,11	2,11	1,89	1,44	1,77
[] ng/μl	1722,1	2742,1	3050,1	3971,4	1557

7.4. Evaluación de expresión de GALNS en *P. pastoris* a escala de 10 mL.

7.4.1. Crecimiento celular.

Los cinco clones obtenidos fueron evaluados a 10 mL de volumen efectivo de trabajo, durante 96 h de fermentación. Después de la reactivación la cepa en medio YPD la biomasa generada fue inoculada en medio BMG por 24 h para continuar con el crecimiento y poder inducir con metanol a 0,5% (v/v). Los datos representados en la *Figura 7* son tomados desde el crecimiento en medio BMG. La cinética de crecimiento de los cinco clones es similar, finalizando con una concentración promedio de 9.3 gL^{-1} de biomasa.

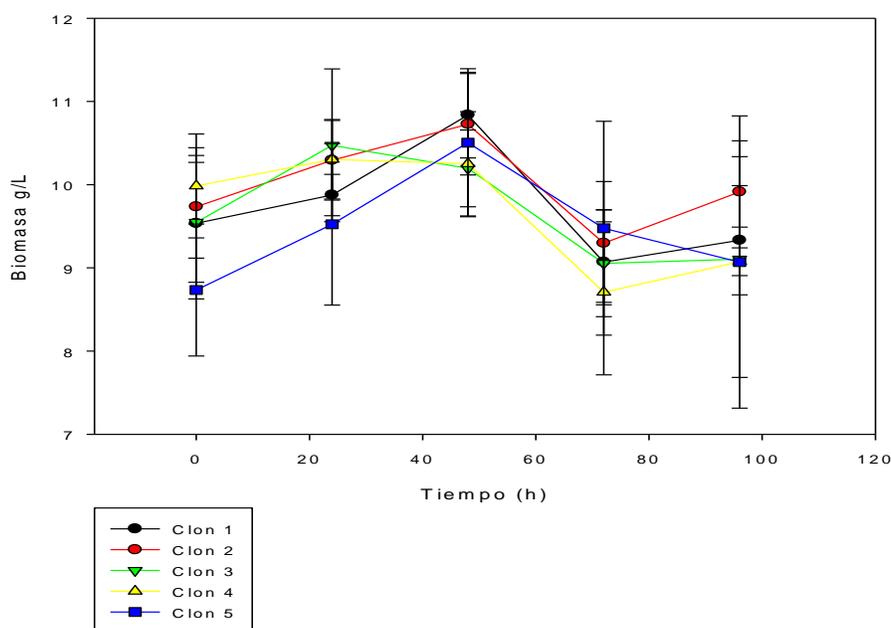


Figura 7. Crecimiento celular a 10 mL.

7.4.2. Evaluación de proteína total extracelular.

La evaluación de proteínas extracelulares se realizó al extracto crudo tomado cada 24 h. En la *Figura 8* se observa que la producción de proteínas aumenta con el paso del tiempo y que todos los clones mostraron un perfil similar. A las 96 h, la concentración máxima obtenida fue de $1,278 \text{ mgmL}^{-1}$ para el clon 2.

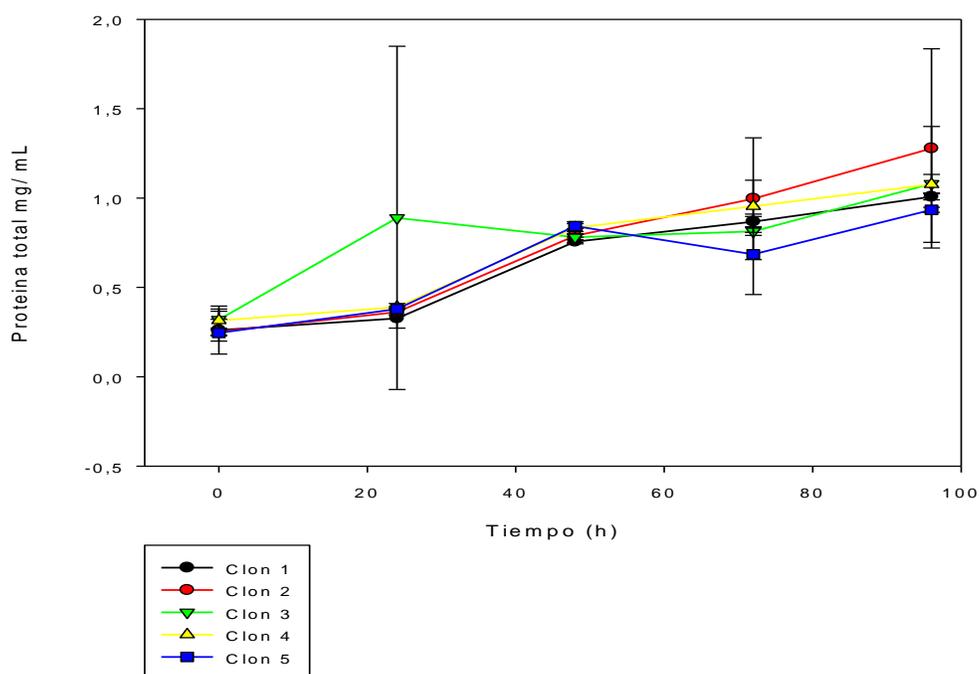


Figura 8. Cuantificación de proteínas totales extracelulares a escala 10 mL.

7.4.3. Actividad específica GALNS 10 mL

En la *Figura 9* se representan las actividades específicas evaluadas a los cinco clones, evidenciando que el clon 1 no presenta actividad, mientras que los clones 2,3, y 4 la actividad GALNS se detecta partir de las 24 h de inducción finalizando el cultivo con $0,0235$; $0,0475$ y $0,0337 \text{ Umg}^{-1}$ de proteína total, respectivamente. Respecto al clon 5; obtuvo su máximo de producción a las 72 h con $0,0707 \text{ Umg}^{-1}$ proteína total. Debido a que

se observó un valor creciente de actividad enzimática en algunos de los clones, se decidió realizar los cultivos a escala de 100 mL por un periodo 24 h más extenso que el realizado a escala de 10 mL.

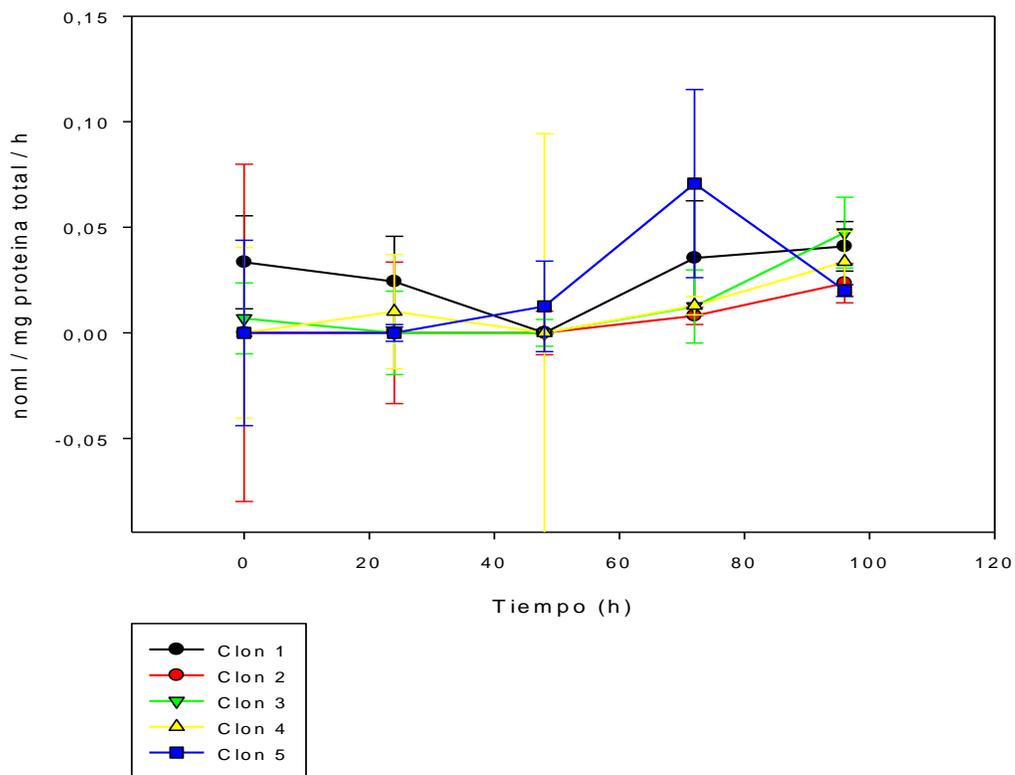


Figura 9. Actividad enzimática GALNS a escala de 10 mL.

7.5. Evaluación de expresión de GALNS en *P. pastoris* a escala de 100 mL.

7.5.1. Crecimiento celular

Se evaluaron los mismos cinco clones y una cepa correspondiente al control negativo, siendo esta transformada con el plásmido pPIC9. En la *Figura 10* se observa un patrón de crecimiento similar para todos los clones evaluados, destacándose el clon 3 que finalizó con $16,6 \text{ gL}^{-1}$ de biomasa en comparación con el control negativo siendo de $9,12 \text{ gL}^{-1}$. Mientras que los clones 2, 4 y 5 finalizaron con 12 gL^{-1} aproximadamente. En la *Tabla 3*,

se muestran los parámetros cinéticos calculados en la etapa de inducción. El clon 3 presenta una $\mu(x)$ de $0,004 \text{ (h}^{-1}\text{)}$, un $td(x)$ de $173,28 \text{ h}$, un rendimiento $Y_{P/x}$ de 0.0108mgg^{-1} y la productividad de la biomasa fue de $P(x) 0,0173 \text{ gh}^{-1}$ en comparación con los otros clones con menor productividad de biomasa.

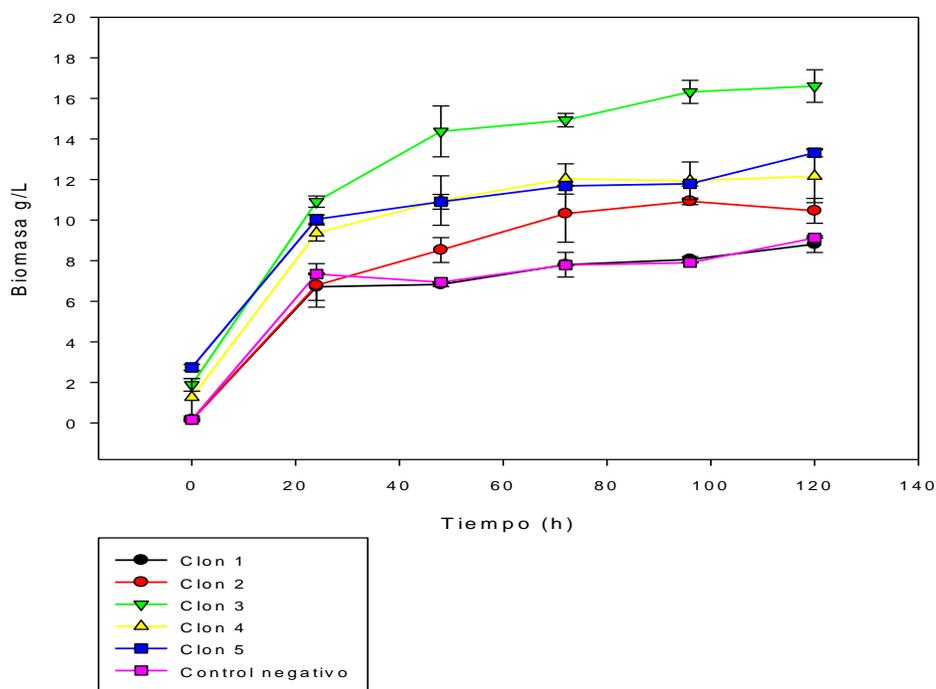


Figura 10. Crecimiento celular a 100 mL.

Tabla 3. Parámetros cinéticos en etapa de inducción a 100 mL.

Clon	$\mu(x) \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$td(x) \text{ (h)}$	$Y_{P/x} \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$	$P(x) \text{ gh}^{-1}$
1	0,003	231,04	0	0,0092
2	0,008	86,64	0	0,0125
3	0,004	173,28	0,0108	0,0173
4	0,005	138,62	0	0,0126
5	0,002	346,50	0,0025	0,0125
Control Neg.	0,003	231,04	0	0,0018

*Parámetros en etapa de inducción. $\mu(x)(h^{-1})$: Velocidad específica de crecimiento, $td(h)$: tiempo de duplicación, $Y_{P/x}$: rendimiento proteína total/ biomasa, $P(x)$: Productividad de biomasa (96 h).

7.5.2. Evaluación de proteína total extracelular.

Las proteínas totales extracelulares cuantificadas a los cinco clones y el control negativo se observan en la *Figura 11*. El mayor valor lo presentó el clon 3 a las 96 h con $1,2\text{mgmL}^{-1}$ de proteína total. Con un promedio final para el resto de clones de $0,18\text{mgmL}^{-1}$ de proteína.

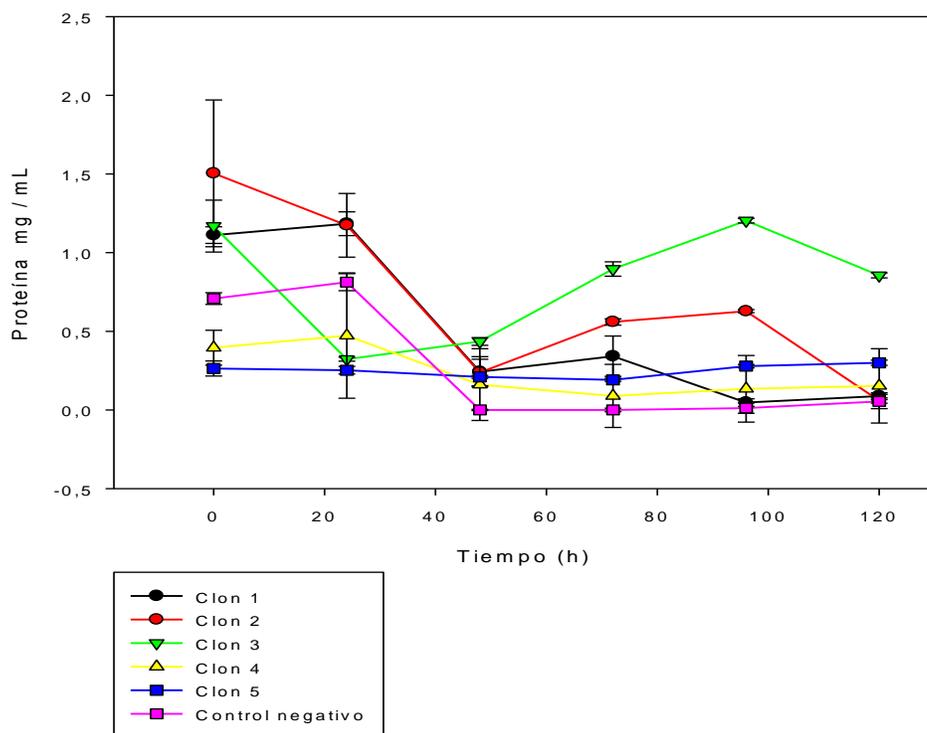


Figura 11. Proteína total extracelular a 100 mL

7.5.3. Actividad específica GALNS 100 mL

En la *Figura 12* se observa que los clones 1 y 2 no presentan actividad GALNS, mientras que los clones 4 y 5 a las 48 h de inducción muestran un valor alrededor de $0,02\text{Umg}^{-1}$ proteína total y finalmente el clon 3 se destaca alcanzando los $0,037\text{Umg}^{-1}$ de proteína total. Siendo este clon el candidato para escalar a 1,7 L y poder evaluar su expresión a

condiciones controladas de oxígeno disuelto, pH, temperatura y concentración de metanol. El control negativo efectivamente no presentó actividad GALNS.

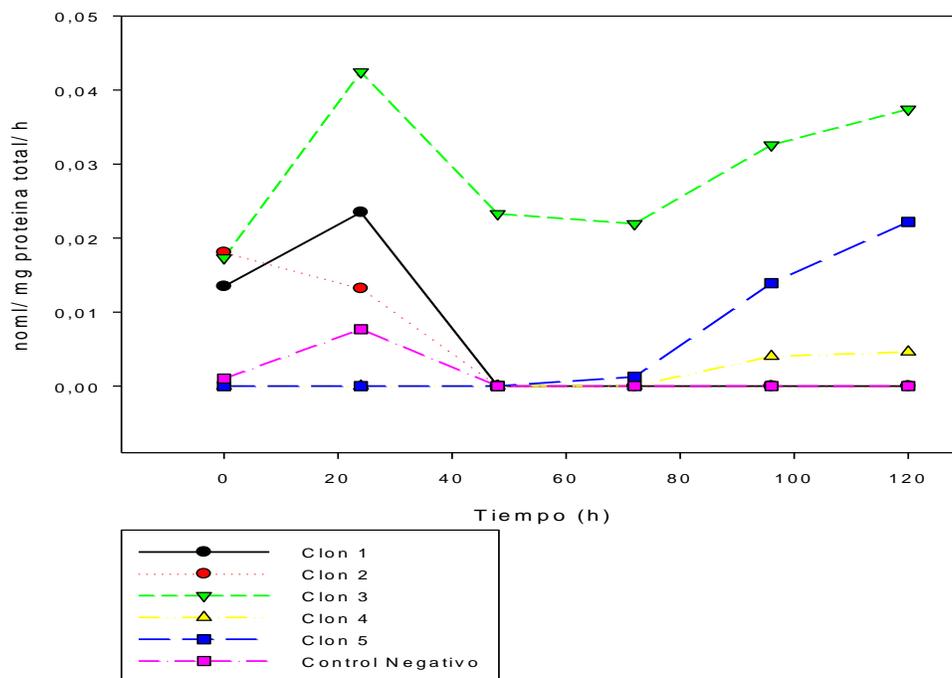


Figura 12. Actividad específica GALNS a 100 mL

7.6. Evaluación de proteínas totales intracelulares.

Para comprobar la secreción de la enzima recombinante humana GALNS, se lisaron células de los clones 2 y 3, siendo estos: un clon no productor de la enzima GALNS (según los resultados obtenidos) y un clon sobresaliente en su expresión. Las muestras evaluadas provenían de un cultivo de 100 mL de volumen efectivo de trabajo.

Al observar las *Figura 13* y *14* las cinéticas de crecimiento son semejantes entre sí para el crecimiento en glicerol, y en la etapa de inducción con metanol finalizaron los cultivos con $10,9 \text{ gL}^{-1}$ y $16,2 \text{ gL}^{-1}$ de biomasa para el clon 2 y clon 3 respectivamente siendo comparable con la *Figura 10*. Al cuantificar las proteínas totales de los lisados celulares se

obtuvo una concentración final de 0,504 y 0,328 mgmL⁻¹ la cual no pertenece a la proteína recombinante en expresión ya que no se detectó actividad enzimática durante las 120 h de cultivo.

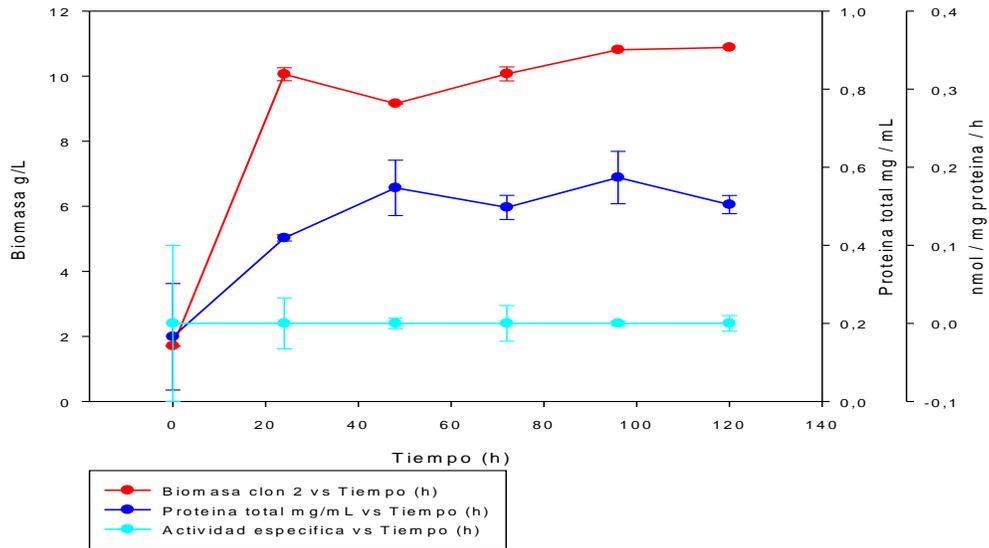


Figura 13. Evaluación intracelular de la proteína GALNS - Clon 2

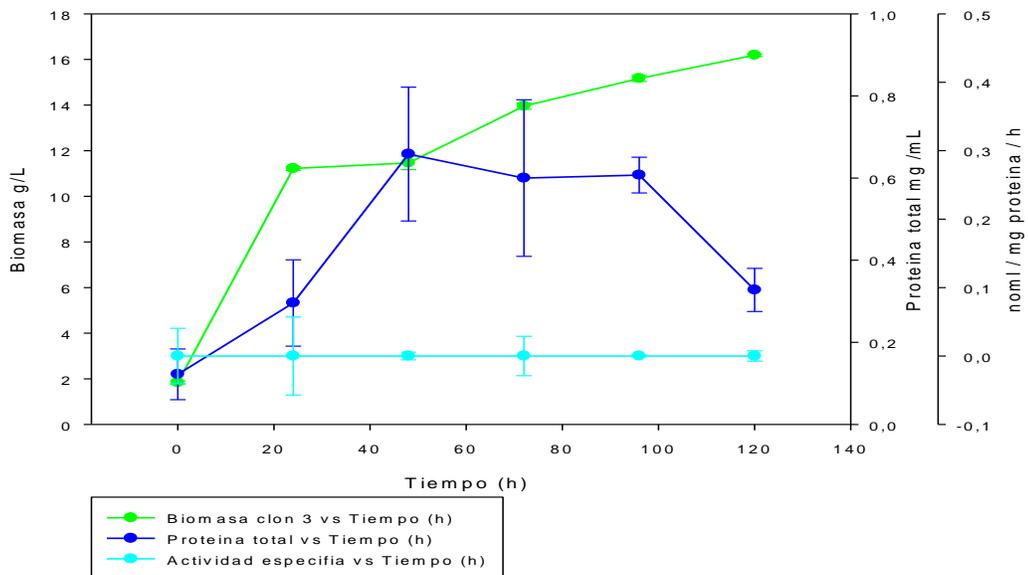


Figura 14. Evaluación intracelular de la proteína GALNS - Clon 3

7.7. Evaluación de concentraciones de sustrato inductor.

Adicionalmente, se evaluó el clon 3 en dos cultivos a escala de 100 mL a dos concentraciones de metanol correspondientes a 1,5% y 2,5% y se comparó con los datos obtenidos a concentración de 0,5% de metanol. En los resultados de estos experimentos se observa el crecimiento particular la cepa, duplicando el crecimiento obtenido a la concentración normal 0,5% recomendada por invitrogenTM. Sin embargo, no fue posible realizar la determinación de actividad enzimática debido a baja concentración de proteínas observadas durante todo el cultivo. Por este motivo se seleccionó la concentración de 0,5% de metanol para la realización de los cultivos a escala biorreactor.

7.8. Evaluación a escala de biorreactor

Con el fin de investigar más la producción de la enzima GALNS se realizaron dos cultivos del clon 3 a escala de 1,7 L utilizando una estrategia de lote alimentado. Se inicia con una etapa de cultivo tipo lote en un medio salino, con glicerol como única fuente de carbono, hasta alcanzar una densidad celular de 40 gL^{-1} . Posteriormente se realiza una etapa de lote alimentado con glicerol al 50% hasta obtener una concentración celular de 60 gL^{-1} aproximadamente, posteriormente se realiza la fase de inducción con una estrategia de lote alimentado con metanol como fuente de carbono. Durante toda la fermentación se mantuvo constante el pH 5,0, una temperatura de 28°C , y en etapa de inducción niveles cercanos a 10% OD y 0,5% (v/v) de metanol.

Para el primer cultivo se alcanzó una concentración de biomasa de 175 gL^{-1} y el segundo de 121 gL^{-1} , donde se calcularon parámetros cinéticos en etapa de crecimiento y etapa de

inducción (Tabla 4 y 5). En la Figura 15 se observa que para el primer cultivo, la máxima producción de la enzima GALNS ocurrió a las 95 h con 0,061 U mg^{-1} de proteína total y 0,076 U mg^{-1} GALNS, esta última calculada de acuerdo a los valores de GALNS observados mediante ELISA, sugiriendo que la mayoría de la proteína extracelular corresponde a la proteína GALNS recombinante. Una concentración final de 2,65 mgL^{-1} de proteína total, manteniendo el OD a valores cercanos del 10% desde las 17 h de fermentación. En comparación el segundo cultivo presentó la máxima producción de la enzima GALNS a las 86 h siendo de 0,165 U mg^{-1} de proteína total y 0,106 U mg^{-1} GALNS, con una concentración final de proteínas totales de 2,2 mgL^{-1} y el % OD se mantuvo a valores cercanos del 10% después de las 25 h de fermentación. Figura 16.

Tabla 4. Parámetros cinéticos en etapa de crecimiento a escala de 1,7L

	$\mu(x)$ (h $^{-1}$)	td(x) (h)	$Y_{Pt/x}$ (mg g $^{-1}$)	$Y_{GALNS/x}$ (U mg^{-1} GALNS g $^{-1}$)	P(x) gh $^{-1}$
Primer cultivo	0,253	2,740	-	-	5,35
Segundo cultivo	0,441	1,572	-	-	5,26

* $\mu(x)$: Velocidad específica de crecimiento, td: tiempo duplicación, $Y_{Pt/x}$: rendimiento proteína total/ biomasa, $Y_{GALNS/x}$: rendimiento proteína GALNS/ biomasa, P(x): Productividad de biomasa

Tabla 5. Parámetros cinéticos en etapa de inducción a escala de 1,7L

	$\mu(x)$ (h ⁻¹)	td(x) (h)	$Y_{Pt/x}$		P(x) gh ⁻¹	
			(mgg ⁻¹)	(Umg ⁻¹ GALNS g ⁻¹)		
Cultivo UNO	0,004	173,2868	0,06	0,0047	Hora 95	2,75
Cultivo DOS	0,008	86,6434	0,05	0,090	Hora 86	1,90

* $\mu(x)$: Velocidad específica de crecimiento, td: tiempo de duplicación, $Y_{Pt/x}$: rendimiento proteína total/ biomasa, $Y_{GALNS/x}$: rendimiento proteína GALNS/ biomasa, P(x): Productividad de biomasa

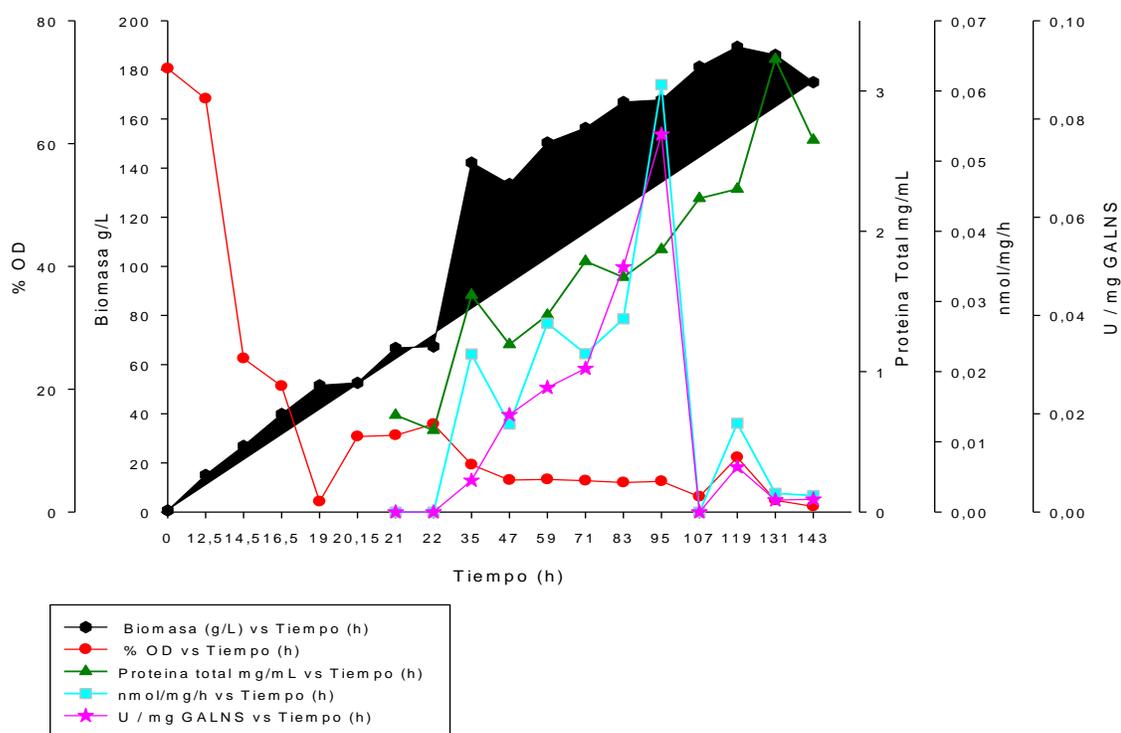


Figura 15. Expresión de GALNS a escala de 1,7 L (Primer cultivo)

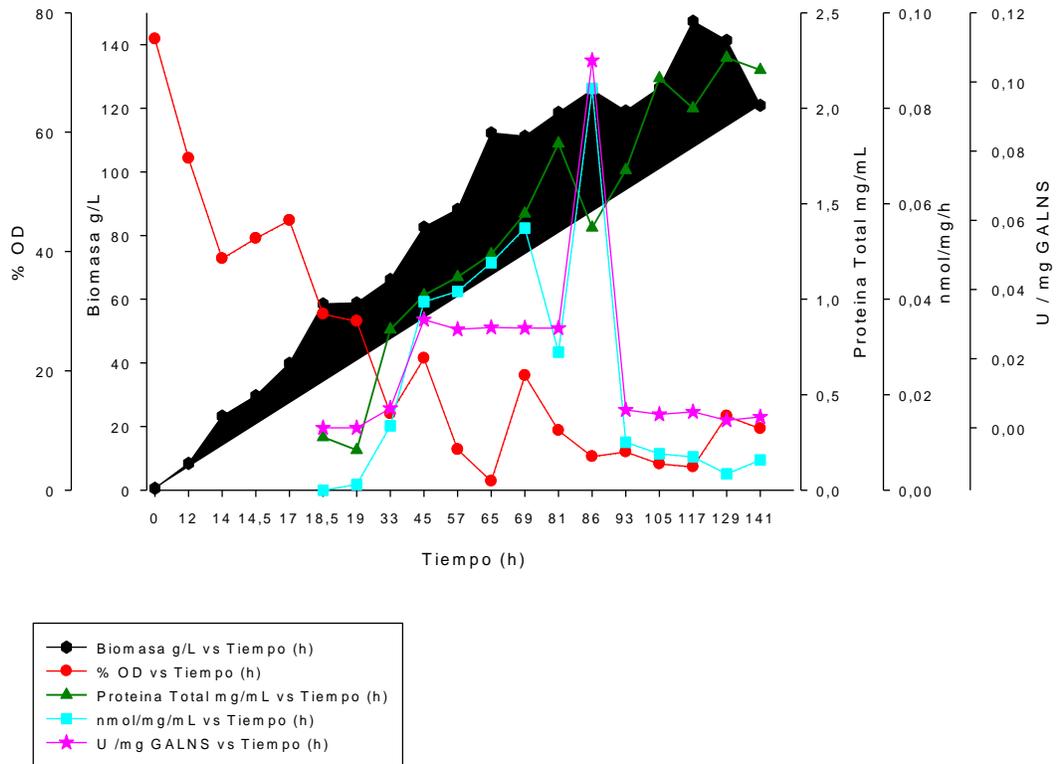


Figura 16. Expresión de GALNS a escala de 1,7 L (Segundo cultivo)

La *Figura 17* representa la corrección logarítmica de la concentración de biomasa obtenida en los dos cultivos a escala de biorreactor. Evidenciando una similitud en el crecimiento y comprobando que el cultivo uno generó más biomasa. Se observan las dos etapas respectivas al crecimiento celular con el glicerol y la etapa de inducción con metanol a partir de las 21 y 19 h.

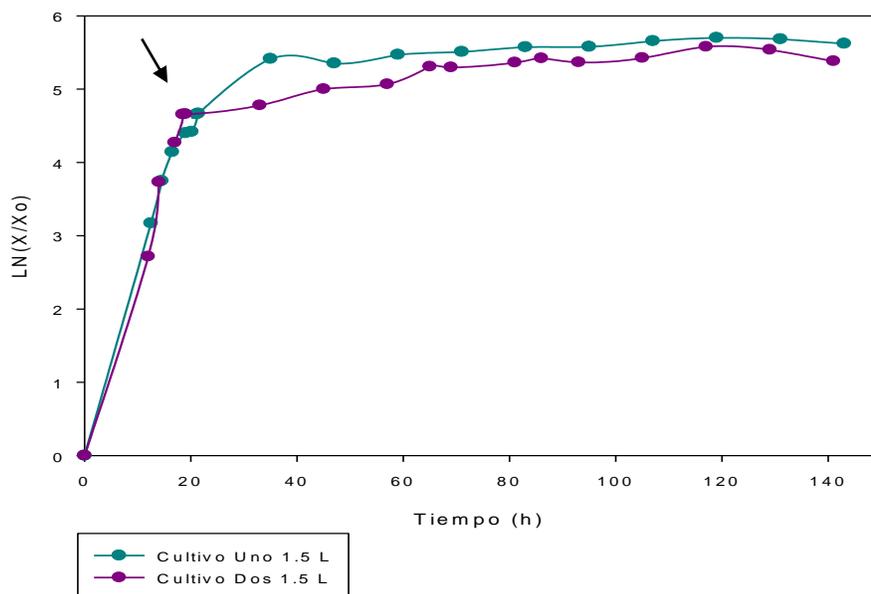


Figura 17. Linealización de la biomasa generada.

En la *Figura 18*, se presentan las actividades volumétricas en los diferentes cultivos realizados a escala de 10, 100 y 1700 mL evidenciando que la máxima producción de GALNS se encuentra alrededor de las 96 horas de cultivo.

La actividad volumétrica expresada en $\text{nmol h}^{-1}\text{mL}^{-1}$ (U mL^{-1}) obtenida para este clona las diferentes escalas fue de 0,051 (10 mL), 0,039 (100 mL) y 0,113 UmL^{-1} (1,5 L). Para el cultivo dos a 1,7 L la máxima actividad volumétrica fue de 0.226 UmL^{-1} a las 86 h.

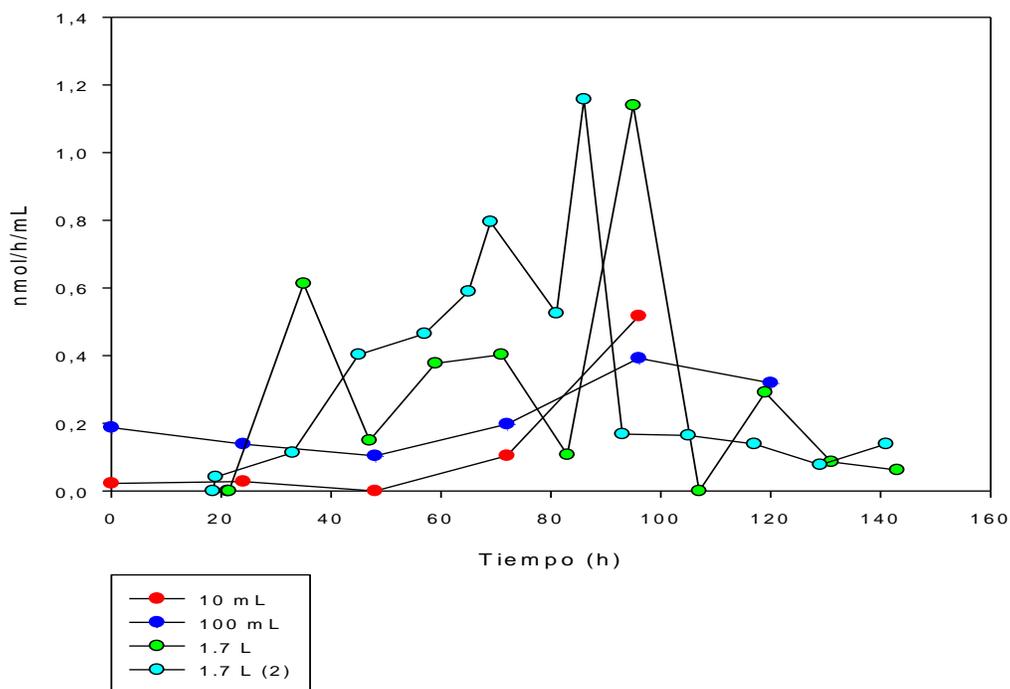


Figura 18. Actividades volumétricas de cultivos a 10, 100 y 1700 mL del clon 3.

7.9. SDS-PAGE Y Western blot

La expresión de GALNS fue seguida por SDS-PAGE en los dos cultivos a escala de biorreactor. Se observan varias bandas (*Figura 19*), con pesos moleculares aproximados de 50 y 31 KDa comprobándose la presencia de la proteína y el aumento en la concentración de esta a través del tiempo. Respecto al análisis del Western blot *Figura 20*, las muestras analizadas fueron a las 95 h del primer cultivo y 69 y 86 h del segundo cultivo, se observan dos bandas, una de 50 kDa y la otra de 100 kDa que sugiere la presencia del dímero.

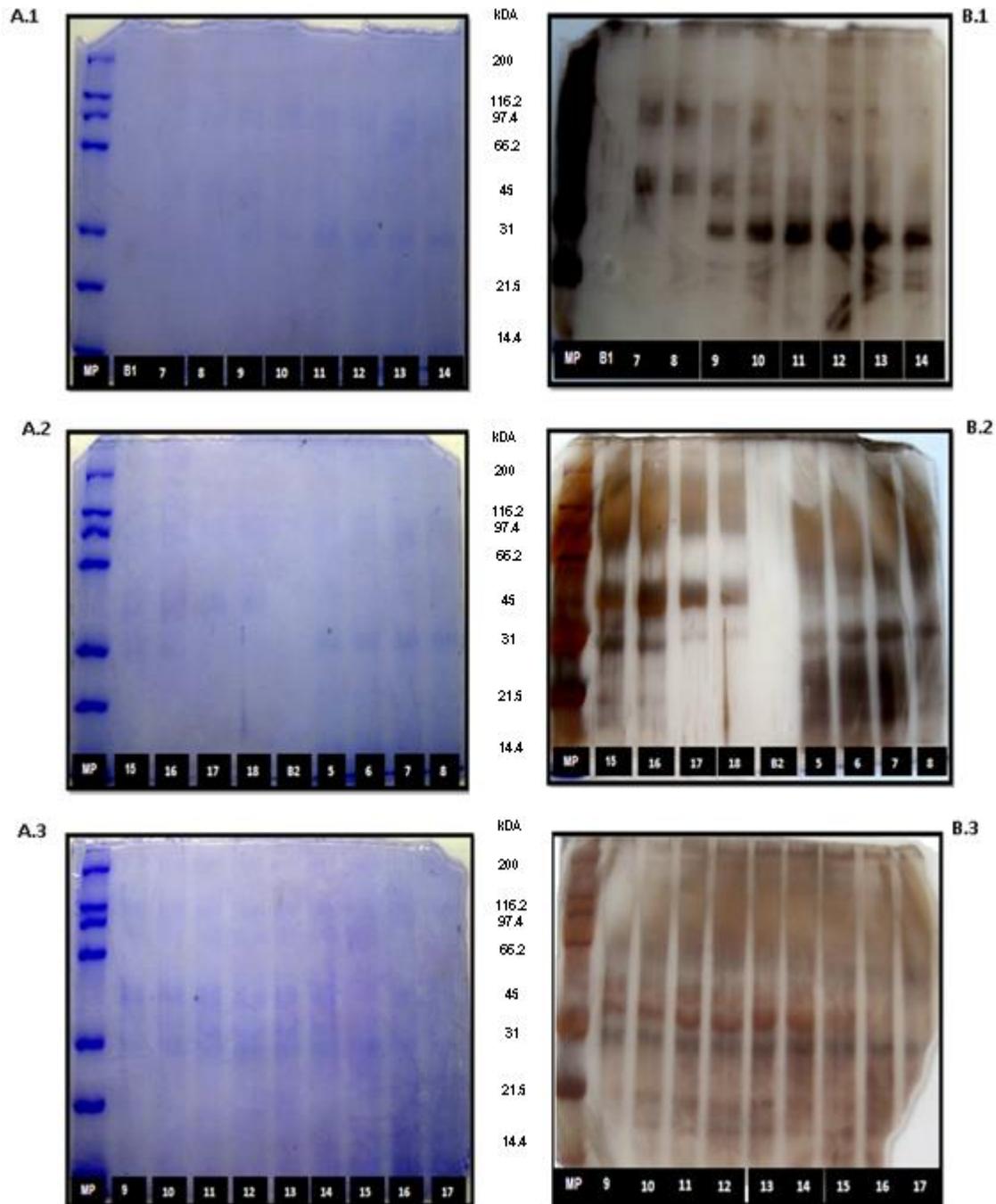


Figura 19. Análisis SDS-PAGE de la enzima recombinante GALNS expresada con metanol al 0.5%, de sobrenadantes del primer cultivo a 1,7 L. **(A.1)**: MP: Marcador de peso molecular; B1: Blanco; 7: muestra antes de inducción, 8: Muestra Inducción a las 21 h; 9: 35 h; 10: 47 h; 11: 59 h; 12: 71 h; 13: 83 h; 14: 95 h de cultivo. **(A.2)**: MP: Marcador de peso molecular; muestra 15: 107 h; 16: 119 h; 17: 131 h; 18: 143 h. Segundo cultivo. B2: Blanco; 5: Muestra antes de inducción; 6: Inducción a las 19 h; 7:33 h; 8: 45 h de cultivo. **(A.3)**: Sigüientes muestras segundo cultivo. MP: Marcador de peso molecular; 9: 57 h; 10: 65 h; 11: 69 h; 12: 81 h; 13: 86 h; 14: 93 h; 15: 105 h; 16: 117 h; 17: 129 h de cultivo. **(B.1)**, **(B.2)**, **(B.3)**: Tinción de plata correspondiente a los gels SDS-PAGE A.1, A.2 y A.3.

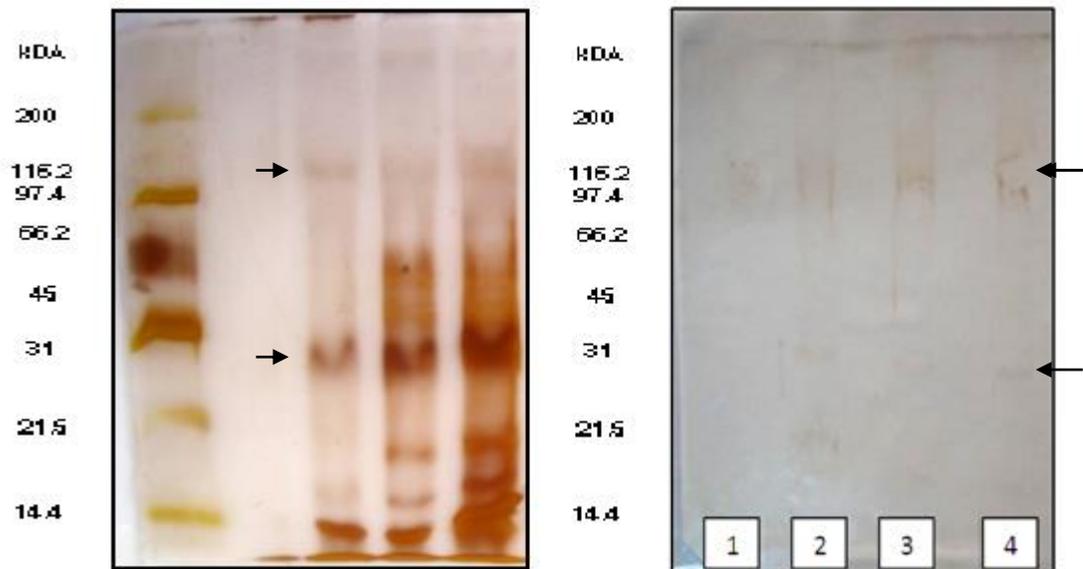


Figura 20. Análisis Western blot. Mostrando 1: Blanco, 2: 95 h del primer cultivo a 1.7L, 3: 69 h y 4: 86 h del segundo cultivo a 1.7L

7.10. Confirmación de fenotipos mediante amplificación de genes *AOX*

La Figura 21 se observa un banda a la altura de 2,0 kb en el plásmido pPIC9-GALNS, respecto a los cinco clones evaluados se presenta una banda que puede corresponder a los fragmentos correspondientes la secuencia del promotor *AOX1* mas el gen *GALNS* (2.0 kb), mas otra banda de 2.2 kb correspondiente al gen *AOX1* encontrado en el genoma de *P. pastoris*. Estos resultados sugieren que los cinco clones evaluados presentan un fenotipo *Mut⁺*, lo que difiere con los resultados obtenidos al comparar las velocidades de crecimiento.

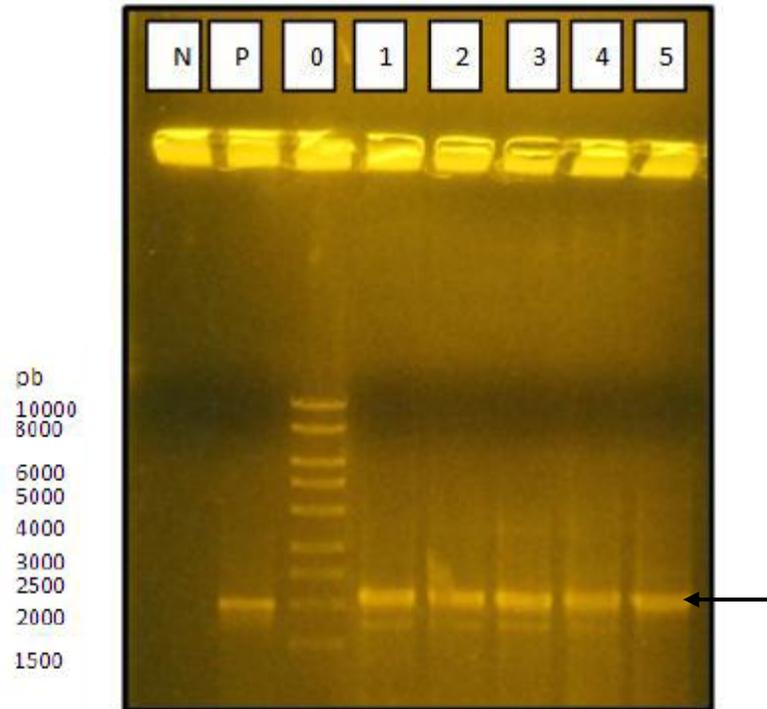


Figura 21. Análisis de fenotipo. Mostrando: N: control negativo, P: control positivo (pPIC9-GALNS), 0: Marcador de peso molecular, Clon 1, 2, 3, 4, 5.

8. ANALISIS DE RESULTADOS

La mucopolisacaridosis IV A o enfermedad de Morquio A, es una enfermedad que en la actualidad no se ha entendido su naturalidad completamente, causada por la deficiencia de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS) la cual por medio de manipulación genética se ha querido expresar en diferentes organismos para evaluarla y llegar al tratamiento, ya que los pacientes que padecen esta enfermedad tienen una edad media de 14,9 años para los hombres y 19,1 años para mujeres según la severidad del fenotipo (4). Con el fin de buscar una alternativa para la expresión de esta enzima recombinante se realizó este trabajo en el sistema de expresión *Pichia pastoris*.

La enzima recombinante GALNS fue producida por medio de un plásmido construido previamente en el IEIM denominado pPIC9-GALNS. En la *Figura 6* se observa la inserción del gen GALNS en el genoma de la levadura para los cinco clones obtenidos. Por su capacidad de secretar la proteína recombinante, sus altos rendimientos y la posibilidad de realizar modificaciones postraduccionales, *Pichia pastoris* se convierte en un organismo interesante para la producción de proteínas heterólogas. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que una de las desventajas es la degradación del producto recombinante (47). En 2006, Poutou observó una alta actividad proteolítica hacia el final de la producción de IDS recombinante en este sistema (48). Sin embargo, este fenómeno depende del cultivo realizado y del producto. Los resultados a 10 mL (*Figura 8*) y 1,7L (*Figura 16 y 17*) muestran que la actividad proteolítica pudo no afectar la producción de proteínas, estando está ligada al crecimiento celular observado por el incremento de la concentración de GALNS a través del tiempo, corroborando la afectación mínima a la proteína recombinante.

En la *Figura 7* perteneciente a los cultivos realizados a escala de 10 mL, se observa un crecimiento similar para los cinco clones, obteniéndose concentraciones de biomasa

alrededor de $9,3 \text{ gL}^{-1}$, mostrando que a las cepas se les facilito crecer con el primer sustrato ya que contienen la maquinaria enzimática suficiente para su fácil degradación y generar energía (48). Al adicionar el metanol para comenzar la fase de inducción, a las 24 h, se observa un incremento de biomasa para los clones 1, 2, y 5 que puede deberse a que en el medio de cultivo existía aún fuente de carbono de fácil asimilación aun no degradada; por lo que el metanol no tuvo un papel muy importante para generar biomasa, pero si para la producción de proteínas totales que aumentó desde este momento (*Figura 8*). Después de las 48 h se observa un rápido descenso en la velocidad del crecimiento celular recuperándose al finalizar el cultivo, creciendo a expensas del metanol. Para este instante se empezó la producción de GALNS, destacándose el clon 3 con $0,047$ y el clon 4 con $0,033 \text{ Umg}^{-1}$ proteína total.

Teniendo esos resultados a 10 mL se escalaron los mismo cinco clones a 100 mL junto a un control negativo. En la *Figura 10*, correspondiente al crecimiento celular a 100 mL, se evidencia que todos los clones, a excepción del clon 1, sobrepasan el crecimiento basal presentado por el control negativo. Destacándose el clon 3 con una $P(x)$ de $0,0173 \text{ gh}^{-1}$ y un $Y_{P/x}$ de $0.0.108 \text{ mg g}^{-1}$ en comparación con el control positivo que presentó un $P(x)$ igual a $0,0018 \text{ g h}^{-1}$ y $Y_{P/x}$ de 0 mg g^{-1} en etapa de inducción (*ver Tabla 3*). En comparación con los resultados de Díaz S. (54), las cepas Mut^+ y Mut^s presentan velocidades de crecimiento de $0,0143$ y $0,0074$ respectivamente. En términos de actividad específica GALNS (*Figura 12*), los clones 3, 4 y 5 presentaron producción de la proteína recombinante después de las 72 h de cultivo, evidenciando la mayor producción de GALNS en el clon 3, obteniendo un valor de $0,037 \text{ Umg}^{-1}$ proteína. Siendo este clon el elegido para escalar a 1,5 L en condiciones ambientales controladas. A esta escala el valor reportado por Rodríguez *et al* (11) para la enzima GALNS producida en *Escherichia coli* fue de $0,067$ y $0,078 \text{ Umg}^{-1}$ de proteína total a las 2 y 4 h de inducción,

respectivamente en la fracción intracelular soluble. Por otro lado, lo reportado por Mosquera, *et al.* (42) en *E. coli* alcanza una actividad GALNS de 0,05 y 0,01 U mg^{-1} de proteína intracelular mientras que la actividad extracelular estuvo en un rango de 2,95 \pm 0,488 a 6,18 \pm 1,16 U mg^{-1} , observándose la mayor actividad a las 4 horas de inducción.

Para confirmar que la proteína fue secretada y que no haya sido producida intracelularmente, se realizó lisis celular a los clones 2 y 3 en un cultivo de 100 mL. Ya que el clon 2 no presentó niveles de expresión y el clon 3 se destacó en ello. En las Figuras 13 y 14, se puede observar que la proteína intracelular cuantificada correspondiente a 0,504 y 0,0328 mgmL^{-1} para el clon 2 y 3 respectivamente a las 120 h no corresponde a la proteína recombinante GALNS por los resultados arrojados en la prueba de actividad específica siendo de 0 U mg^{-1} . Estos resultados sugieren que la proteína estaba siendo secretada.

Por otro lado, se evaluó el clon 3 a dos concentraciones adicionales de metanol 1,5% y 2,5%. Los resultados sugieren que la levadura utilizó todo el sustrato inductor para la generación de energía y biomasa, lo que se vio reflejado por la baja producción de proteínas totales, manteniéndose durante la mayor parte del tiempo (96 h), en valores de 0,078 y 0,086 mgmL^{-1} a 1,5% y 2,5% de metanol, respectivamente. Lo que indica que estas concentraciones de metanol no son tóxicas para la levadura pero la expresión de la enzima recombinante GALNS no se produjo. En comparación con lo reportado por Chen, *et al.* (55) donde evaluaron la producción de S-adenosilmetionina (SAM), que es un compuesto fisiológico importante para una óptima función hepática, en una cepa recombinante de *P. pastoris* que portaba el gen *Mat* obtenido de *Streptomyces spectabilis* y el gen *vgb*, gen de la hemoglobina obtenido de *Vitreoscilla*, ambos expresados por medio de los promotores AOX. En este estudio, se evidenció que a una concentración de 0.8% de metanol la producción del compuesto fue menor comparada con la obtenida a

2,4% de metanol, observándose que la expresión del gen *vgb* aumentó, generando más biomasa, activando la producción de la enzima *Mat* y por ende se obtuvo mayor concentración de SAM.

La limitación de oxígeno afecta metabólicamente a la levadura, causando privación de la energía, por eso las células se adaptan reorganizando su metabolismo para poder crecer en limitaciones de ATP y generar otros metabolitos en la respiración fermentativa presentando un impacto en la síntesis y/o secreción de proteínas (56). Además de afectar el crecimiento y la producción de proteínas, el oxígeno interviene en las reacciones de oxidoreducción afectando los plegamientos de proteínas dentro de la célula que en el caso del estrés oxidativo de *P. pastoris* en un cultivo con metanol con la adición de antioxidantes, como lo es el ácido ascórbico, se puede solucionar el problema, pero no solo se da por las condiciones del cultivo, el solo hecho de la beta-oxidación de los lípidos y la acumulación de proteína mal plegada en el retículo endoplasmático genera dicho estrés(57).

Se ha demostrado que en cultivos de lote alimentado las condiciones de hipoxia han aumentado la productividad de proteínas recombinantes en *P. pastoris* presentando un beneficio para la producción de estas, pero esto no sucede en todos los sistemas eucariontes. Tal es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* ya que se puede comportar de manera diferente respecto al procesamiento, la secreción y modificaciones postraduccionales (56).

Durante la inducción, el crecimiento en metanol es un proceso aerobio (55), y la limitación del oxígeno se vio influenciado por la capacidad de la levadura de crecer rápidamente (en la etapa de crecimiento) con el glicerol 50% generando una alta concentración de biomasa y provocando condiciones “anaerobias”, lo que conllevó a la producción y no al

crecimiento celular, según lo observado en los dos cultivos a 1,7 L. Esto indica que la ruta metabólica escogida por la levadura se da por la influencia del sustrato.

Para la etapa de crecimiento realizada en los cultivos a escala de biorreactor se observó una rápida tasa de crecimiento celular a expensas del glicerol, para el primer y segundo cultivo: velocidades específicas de crecimiento de 0,253 y 0.441 h⁻¹, y un tiempo de duplicación de 2,740 y 1,572 h, y una productividad de biomasa de 5.35 y 5.26 gh⁻¹, respectivamente (*Tabla 4*). El microorganismo creció más rápidamente en el segundo cultivo en esta fase, aclarando que las condiciones ambientales fueron las mismas para ambos. Al llegar a una biomasa aproximadamente de 60 gL⁻¹ se prosiguió a inducir cada cultivo con metanol al 0,5%, cambiando el ritmo metabólico de la levadura. En esta etapa para el cultivo uno, se calculó una $\mu(x)$ de 0,004 h⁻¹. En la *Figura 15* se evidencia que la máxima concentración de biomasa fue a las 119 h con 189 gL⁻¹ aproximadamente, por otro lado la producción de proteínas totales estuvo ligada al crecimiento celular ya que la concentración aumentó a través del tiempo; obteniendo a las 131 h la máxima producción 3,22 mgmL⁻¹. Al evaluar la actividad específica GALNS y obtener los resultados de ELISA indirecta se correlaciona que la máxima producción de enzima recombinante se dio a las 95 h de fermentación con valores de 0,061 Umg⁻¹ proteína total y 0,076 Umg⁻¹ GALNS. Cabe resaltar que las condiciones de oxígeno disuelto eran las deseadas manteniéndose en valores cercanos al 10% favoreciendo la expresión génica de GALNS. En la *Tabla 5*, se establecen algunos parámetros cinéticos en etapa de inducción, donde el rendimiento proteína total vs biomasa fue de 0,06 mgg⁻¹ y el rendimiento de la producción de GALNS respecto a 1 g de biomasa fue de 0,0047 mg⁻¹ GALNS g⁻¹ para las 95 h. La productividad de biomasa en esta etapa fue 2,75 gh⁻¹.

Para el segundo cultivo (*Figura 16*) en etapa de inducción se observó un comportamiento similar de la biomasa y las proteínas totales generadas, alcanzando a las 117 h una

concentración de 147 g L^{-1} de biomasa y $129 \text{ h } 2,3 \text{ mgmL}^{-1}$ de proteína total. En este cultivo se observa que la máxima producción de GALNS se dio a las 86 h de cultivo, obteniendo $0,165 \text{ Umg}^{-1}$ de proteína total y $0,106 \text{ Umg}^{-1}$ GALNS. Aclarando que los dos cultivos se mantuvieron a las mismas condiciones ambientales, en este segundo cultivo se generó más proteína recombinante. El rendimiento de GALNS respecto a 1 g de biomasa generada fue de $0,09 \text{ Umg}^{-1} \text{ GALNS g}^{-1}$ siendo a las 86 h. y la productividad de la biomasa fue de $1,9 \text{ gh}^{-1}$ corroborando que este cultivo generó 0,8 veces menos biomasa.

Un hallazgo realizado por Yamashita *et al* (46), en *P. pastoris* fue que en el momento de inducción o al realizar un cambio de sustrato por metanol, esta se somete a una fase de retardo mientras se adapta metabólicamente. Observaron que los aminoácidos no eran suficientes en el medio de cultivo ni en la reserva celular ya que debido a la fosforilación oxidativa y la activación de estos genes implica esta poca reserva de aminoácidos, encontrando que son necesarios para la síntesis óptima de los genes AOX y la rápida superación de la fase de latencia. Esto se observó en los dos cultivos realizados en biorreactor para el clon 3 (*ver Tablas 4 y 5*) donde en tapa de inducción disminuyó 63 veces la velocidad de crecimiento celular. Las cepas de *P. pastoris* se puede identificar por sus tasas de crecimiento específicas en metanol, dado que las cepas Mut^+ , Mut^s y Mut^- tienen una $\mu(x)$ general de $0,14 \text{ h}^{-1}$, $0,04 \text{ h}^{-1}$ y 0 h^{-1} respectivamente (48), lo cual no se cumple para el clon 3.

Habiendo encontrado que la máxima producción de la enzima GALNS del clon evaluado se da en un rango de 80 y 100 h de cultivo, se observó una drástica disminución de la proteína recombinante ($0,0025$ y $0,0031 \text{ Umg}^{-1}$ de GALNS), al finalizar el cultivo (140 h aprox.).

Se obtuvo un aumento de dos veces en la actividad de la enzima GALNS activa a escala de biorreactor en comparación con los cultivos realizados en Erlenmeyer debido a que se obtuvo una alta densidad celular y las condiciones de pH, %OD, temperatura y agitación estuvieron controladas, a diferencia de los cultivos en menor escala. Cabe resaltar que la actividad de GALNS total en biorreactor fue de 0.106 Umg^{-1} GALNS.

En el trabajo realizado por Mosquera, *et al.* (42) se realizó una caracterización de la enzima GALNS estableciendo que el pH óptimo para la proteína es de 5,5, por lo cual se mantuvo los cultivos en biorreactor cerca a este pH, y respecto a la temperatura, la enzima GALNS fue estable a 37°C por 12 h evaluadas sin una pérdida significativa de la actividad, tampoco el ensayo realizado a 4°C durante 192 h. A 45°C la actividad fue constante las primeras 6 h pero al transcurso de la incubación hasta las 120 h se vio una disminución relevante de la actividad enzimática. Finalmente evaluaron la estabilidad de la actividad GALNS en suero humano siendo estable por 6 h de incubación lo cual es importante estableciendo un tiempo de vida medio considerando una evaluación farmacocinética.

El análisis realizado mediante SDS- PAGE (*Figura 19 –A1, A2*) permite observar que la expresión de la proteína GALNS fue aumentando a través del tiempo debido a la mayor intensidad del bandeo a partir de las 35 h de cultivo y hasta su finalización, corroborándose con la permanente producción de proteínas totales cuantificadas y la actividad específica presentada. Para el segundo cultivo en la misma *Figura A2, A3* se observa también el bandeo a partir de las 57 h de cultivo siendo coherente con la producción de proteína y la cuantificación de enzima específica. En la *Figura 20* del Western blot se observa un bandeo de 50 kDa aproximadamente y otra de 100 kDa que sugiere la presencia del dímero GALNS.

Según estos resultados se puede inferir que la proteína fue expresada en los dos cultivos a escala de 1700 mL sugiriendo que posiblemente la conformación de esta en su mayoría se encuentre en forma inactiva, debido a los valores obtenidos en las actividades específicas y los altos valores calculados de $U\ mg^{-1}$ de GALNS.

Finalmente se confirmaron los fenotipos de los cinco clones (*Figura 21*), mediante una amplificación de los genes *AOX1* presentes tanto en el genoma de *P. pastoris*, como en el vector. A pesar que inicialmente los clones fueron clasificados como Mut^s al comparar su velocidad de crecimiento contra la reportada previamente para una cepa control con este fenotipo (54), el análisis molecular reveló un resultado diferente. En todos los clones se observó una banda con un tamaño mayor al observado en el control con pPIC9-GALNS, la cual puede ser el resultado de la sumatoria de la banda de 2,0 kb, que corresponde a la secuencia presente en el vector pPIC9-GALNS entre promotor *AOX1* y el final de del gen *GALNS* (492 + 1500 pb), y a la de 2,2 Kb correspondiente al gen de *AOX1* presente en el genoma de la levadura. Estos resultados sugieren que los clones corresponden a un fenotipo Mut⁺, lo cual puede explicar el alto consumo de metanol en los cultivos a escala de biorreactor. Sin embargo, es necesario realizar análisis adicionales con el objetivo de comprobar estos resultados.

En conclusión, este estudio es el primero donde se presentan resultados de expresión y producción de la enzima N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa en *P. pastoris* con valores de $0,106\ U\ mg^{-1}$ de GALNS y $0,165\ U\ mg^{-1}$ de proteína total. Trabajos posteriores, deben estar orientados a la optimización del medio de cultivo y condiciones ambientales, así como, a la purificación y caracterización de la enzima. Además, se deben realizar ensayos *in vitro* ya sea en células o modelos animales que presenten la deficiencia y permitan evaluar su actividad.

Con el presente estudio poco a poco se va aclarando el camino para emplear un tratamiento de reemplazo enzimático para esta enfermedad, y tener así diferentes enfoques terapéuticos dirigidos a aumentar la calidad de vida de pacientes Morquio A.

7. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron 5 clones transformados de *Pichia pastoris* de la cepa GS115 con el plásmido pPIC9-GALNS para la expresión de la enzima recombinante N-acetilgalactosamina-6-sulfato sulfatasa (GALNS), permitiendo evaluar la cinética del microorganismo y la producción de la enzima, obteniendo $0,106 \text{ U mg}^{-1}$ GALNS y un rendimiento de $0,09 \text{ U mg}^{-1}$ GALNS g^{-1} a escala de 1,7L.
- La producción de la enzima recombinante GALNS a una concentración de 1,5% y 2,5 % de sustrato inductor no se evidenció, permitiendo obtener un aumento de biomasa 2,2 veces más que en condiciones de 0,5%, lo cual demuestra que la concentración utilizada en estos ensayos es favorable para la expresión GALNS.
- Esta es la primera investigación donde se produce la enzima recombinante GALNS en *P. pastoris* teniendo buenos niveles de expresión comparado con otros sistemas. Teniendo la posibilidad de obtener una cantidad de enzima necesaria y poder crear estrategias para evaluar terapia de reemplazo enzimático para la MPS IV A.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la coexpresión con SUMF1, con el objetivo de incrementar los valores de actividad enzimática.
- Evaluar otros promotores para regular la expresión de GALNS, tales como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAP), formaldehído deshidrogenasa (PFLD1).
- Realizar un muestreo de intervalos de tiempo más corto para observar mejor la cinética del microorganismo en la etapa de inducción.
- Crear una estrategia de cultivo para la caracterización de los fenotipos Mut⁺ y Mut⁻
- Optimizar fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno y condiciones ambientales que permitan obtener una mayor producción de la enzima recombinante GALNS.
- Evaluar el efecto del antiespumante a base de silicona en la proteína recombinante GALNS
- Realizar la purificación de la enzima y caracterizar su captura celular empleando cultivos celulares.

BIBLIOGRAFIA

1. Lankester B, Whitehouse M, Gargan MF. Morquio syndrome. *Current Orthopedics* 2006; **20** (2): 128-131.
2. Tomatsu S, Montano AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y, Thacker MM, Mackenzie WG, Suzuki Y, Orii T. Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2011; **12** (6): 931-945
3. Clarke LA. Themucopolysaccharidoses: a success of molecular medicine. ExpertReviews in *Molecular Medicine* 2008; **10** (1)
4. Montaña AM, Tomatsu S, Gottesma G, Smith M, Orii T. International Morquio A registry: Clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2007; **30** (2): 165-174
5. Cahill RA, Olcay J, Klemperer M, Steele A, Mueller T, Badri NE, Chang Y, Good RA. Replacement of recipient stromal/mesenchymal cells after bone marrow transplantation using bone fragments and cultured osteoblast-like cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2004; 10 (10): 709-717.
6. Lange M, Teive H, Troiano A, Bitencourt M, Funke VA, Setúbal D, Neto J, Medeiros C, Werneck L, Pasquini R, Bonfim CMS. Bone marrow transplantation in patients with storage diseases: a developing country experience. *Arquivos de Neuro-psiquiatria* 2006; **64** (1): 1-4.
7. Alméciga-Díaz, C., Montano, A., Tomatsu, S., Barrera, L., 2010. Adeno-associated virus gene transfer on Morquio A: effect of promoters and sulfatase-modifying Factor 1. *FEBS J.* 277, 3608-3619.
8. Dvorak M, Wendt D, Hague C, Christianson T, Koppaka V, Crippen D, Kakkis E, Vellard M. Enzyme replacement in human model of mucopolysaccharidosis IVA *In vitro* and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. *Plos One*. 2010; 5 (8) e12194
9. Tomatsu S, Montaña A, Gutiérrez M, Grubb J, Oikawa H, Dung VC, Ohashi A, Nishioka T, Yamada M, Yamada M, Tosaka Y, Trandafirescu GG, Orii T. Characterization and pharmacokinetic study of recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Molecular Genetics and Metabolism* 2007; **91**(1): 69-78.

10. Landázuri P, Poutou RA, Acero J, Córdoba HA, Echeverri OY, Sáenz H, Delgado JM, Barrera LA. Cloning and shake flask expression of IDS-Like in *Pichiapastoris*. *Afr J Biotechnol* 2009; **8**: 2871-2877.
11. Rodríguez A, Espejo AJ, Hernández A, Velásquez OL, Lizaraso LM, Córdoba HA, Sánchez OF, Alméciga CJ, Barrera LA. Enzymereplacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichiacoli* BL21. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 2010; **37** (11): 1193-1201
12. Muenzer J. Themucopolysaccharidoses: A heterogeneousgroup of disorderswith variable pediatricpresentations. *J Pediatrics* 2004; **144**, 27-35
13. Ashworth JL, Biswas S, Wraith E, Lloyd IC. Mucopolysaccharidoses and theeye. *Survey of Ophthalmology* 2006; **51**(1): 1-17.
14. Mendez C, Zaldívar C, Gonzalez A. Errores innatos del metabolismo. Enfermedades lisosomales. *Revista cubana de pediatria* 2002; **74** (1): 68-76
15. Erna RB. Diagnóstico de errores innatos del metabolismo. *Revista chilena de pediatria* 2008; **79** (1): 92-95
16. Marsden D, Levy H. Newbornscreening of lysosomalstorage disorders. *Clinicalchemistry* 2010; **56** (7): 1071-1079
17. Bouzidi H, Khedhiri S, Laradi S, Ferchini S, Daudon M, Miled A. La mucopolysaccharidose IV A (syndrome de Morquio A): aspectsClinique, biologipe et thérapeutique. *Annales de BiologieClinique* 2007; **65** (1): 5-11
18. Auray C, Bhérer P, Gagnon R, Young S, Zhang H, An Y, Clarke J, Millington D. Efficienanalysis of urinaryglycosaminoglycansby LC-MS/MS in mucopolisaccharidoses type I, II and VI. *Molecular Genetics and Metabolism* 2011; 49-56
19. Thomas JA, Miller N, Norquist B, Underhill L, Keutzer J. Diagnosis of mucopolisaccharidoses. *Rheumatology* 2011; **50**: 41 -48
20. Gonzalez A, Garcia R. Protocolo de actuación en las mucopolisacaridosis. *Asociacion española de pediatría* 2010; **1**: 24-36
21. Emma J, Parkinson L, Muller VJ, Hopwood J, Brooks D. N-acetylgalactosamine-6-sultase proteindetection in MPS IV A patient and unaffected control samples. *ClinicaChimica Acta* 377. 2007; 88-91
22. Rivera Y, Schutsky E, Kita A, Garman SC. Thestructure of human GALNS Reveals the molecular basisformucopolysaccharidosis IV A. *Journal of Molecular Biology* 2012; **423**: 736-751

23. Kato Z, Fukuda S, Tomatsu S, Vega H, Yasunaga T, Yamahishi A, et al. A Novel Common Missense Mutation G301C in the N-Acetylgalactosamine-6-sulfate Sulfatase Gene in Mucopolysaccharidosis IVA. *Hum Genet* 1997;101:97-101
24. Tomatsu S, Montaña A, Nishioka T, Gutierrez M, Peña O, Trandafirescu G, et al. Mutation and Polymorphism Spectrum of the GALNS Gene in Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat.* 2005;26:500-12.
25. Tomatsu S, Dieter T, Schwartz IV, Sarmient P, Giugliani R, Barrera LA, et al. Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IVA: correlation among genotype, phenotype, and keratan sulfate. *J Hum Genet.* 2004;49(9):490-4.
26. Correa LN. Mucopolisacaridosis. *Precop SCP Universidad militar nueva granada* 2007; **3**
27. Laradi S, Tukel T, Khediri SK, Shabbeer J, Erazo M, Chkioua L, Chaabouni M, Ferchichi S, Miled A, Desnick RJ. Mucopolysaccharidosis type IV: N-Acetylgalactosamine-6-sulfate mutations in Tunisian patients. *Molecular Genetics and metabolism.* 2006; **87**: 213-218
28. Cohen W. Pautas de los ciudadanos de la salud de las personas con síndrome de Down. Down Syndrome Medical Interest Group. 1999.
29. Prat C, Lemaire O, Bret J, Zabraniecki L, Fournié. Morquio syndrome: Diagnosis in adult. *JointBoneSpine.* 2008; **75**: 495-498
30. Quiney F, Amirfeyz R, Smithson S, Gargan M, Monsell F. Themucopysaccharidoses. *Orthopedics and Trauma* 2012; **26** (1): 60-63
31. Ange MC, Teive HA, Troiano AR, Bitencourt M, Funke VA, Setubal DC, et al. Bone marrow transplantation in patients with storage diseases: a developing country experience. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006 Mar;64(1):1-4.
32. Alméciga-Díaz, C., Rueda-Paramo, M., Espejo, A., Echeverri, O., Montano, A., Tomatsu, S., Barrera, L., 2009. Effect of Elongation Factor 1 α promoter and SUMF1 over in-vitro expression of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Mol. Biol. Rep.* 36, 1863-1870.
33. Grabowski GA, Lesli N, Wenstrup R. Enzymetherapy for Gaucher disease: the first 5 years. *Blood Reviews.* 1998; **12**, 115-133

- 34.** Pisani A, Visciano B, Diez G, Sabbatini M, Porto C, Parenti G, Imbriaco M. Enzymereplacementtherapy in patients with Fabry disease: state of the art and review of literature. *Molecular Genetics AndMetabolims*, 2012
- 35.** Capelle CI, Winkel LP, Hagemans ML, Shapira SK, Arts W, Van doorn PA, Hop WC, Reuser AJ, Van der AT. Eight years experience with enzyme replacement therapy in two children and one adult with Pompe disease. *Neuromuscular Disorders*. 2008; **18** (6): 447-452.
- 36.** Minke H, Boelens J, Das A, Jones S, Van der Lee J, Mahlaoui N, Mengel E, Martin O. Enzyme replacement therapy and/or hematopoietic stemcell transplantation at diagnosis in patients with mucopolysaccharidosis type I: results of a European consensus procedure. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011; **6** (55): 2-9
- 37.** Burton B, Guffon N, Robets J, Van A, Jones S. Home treatmentwithintravenousenzymereplacementtherapywithidursulfaseformucopolysaccharid osistype II — data fromthe Hunter OutcomeSurvey. *Molecular Genetics AndMetabolims*, 2010, **101**, 123-129.
- 38.** Harmatz P, Giugliani R, Schwartz I, Guffon N, Leão E, SaMC,Wraith J, Beck M, Arash L, Scarpa M, Yu Z. Enzymereplacementtherapyformucopolysaccharidosis VI: A phase 3, randomized, doble-blind, placebo-controlled, multinationalstudy of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatsa (recombinant human arylsulfatase B or RHASB) and follow-on, open-labelextensionstudy. *J Pediatric*. 2006; **148** (9): 533-539
- 39.** Muñoz MV, Gandelman D, Bannach L, Raymundo M, Clinton J, Carneiro T, Alves T, Costa R, Kakkis E, Giugliani R. Intrathecaladministration of recombinant human N-acetylgalactosamine-4-sulfatse to a MPS VI patientwithpachymeningitiscervicalis. *Molecular Genetics and Metabolism* 2010; **99**, 346-350
- 40.** Saenz H, Barrera LA. La terapia de reemplazoenzimatico en el tratamiento de enfermedades geneticas. *Universitas Scientiarum*.2003 **8** (2): 31-42
- 41.** GALNS for MPS IVA (Morquio A syndrome).<http://www.bmrn.com/pipeline/morquio-syndrome.php>. Consultado el 3 de Noviembre de 2012.
- 42.** Mosquera A, Rodriguez A, Soto C, Leonardi F, Espejo A, Sánchez OF, Almeciga CJ, Barrera L. Characterization of a recombinan N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfates produced in E. coliforenzymereplacementtherapy of Morquio A disease. *ProcessBiochem* 2012; 1-6

43. Landgrebe J, Dierks T, Schamidt B, Figura Kv. The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene*. 2003;316:47-56.
44. Pajares S, Alcalde C, Couce ML, Del toro M, Gonzalez A, Guillén E, Pineda M, Pintos G, Gort L, Coll MJ. Molecular analysis of mucopolysaccharidosis IV A (MOrquio A) in Spain. *Molecular Genetics and Metabolism* 2012; **106** :196-201
45. Oriol C, Ramón R, Montesinos JL, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichiapastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories*. 2006 **5** (17) 1-20
46. Yamashita S, Yurimoto H, Murakami D, Yoshikawa M, Oku M, Sakai yasuyoshi. Lag-phase autophagy in the methylotrophic yeast *Pichiapastoris*. *Molecular Biology Society of Japan*. 2009; **14**, 861-870
47. A. Idiris, H. Tohda, H. Kumagai, K. Takegawa, Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86 (2010) 403–417
48. Poutou RA. *Expresión de Sulfatasas Humanas en Escherichiacoli y Pichiapastoris, Tesis Doctoral*. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., 2006, 162p
49. Ali M, Çalik P, Ozdamar T. The influence of carbon sources on recombinant human growth hormone production by *Pichiapastoris* dependent on phenotype: a comparison of *Muts* and *Mut+* strains. *Biotechnol Appl. Biochen.* 2009; **52**, 245-255
50. Invitrogen. *Pichia Expression kit A manual of method for expression of recombinant protein in Pichiapastoris*. Cat No. K1710-01 California. Invitrogen
51. Cordoba, H. Estudio de la producción a nivel de laboratorio de la enzima iduronato 2-sulfatasa humana recombinante (IDS-2hr) en *Pichia pastoris*. **Tesis de Maestría**. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, 2003.
52. Van Diggelen O, Zhao H, Kleijer W, Janse H, Poorthuis B, *et al*. A fluorometric enzyme assay for the diagnosis of Morquio type A. *Clinica Chemica Acta*. 1990; **187** (2): 131-140.

53. Patrick S, Fazenda M, McNeil B, Harvey L. Heterologous protein production using the *Pichiapastoris* expression system. *Wiley Inter Science*. 2005. **22**, 249-270
54. Diaz S. Clonacion y expression del gen optimizado de iduronato2_sulfato sulfatasa humana en *P. pastoris*. **Tesis pregrado**. Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, D.C., 2011, 67.
55. Chen H, Chu J, Zhang S, Zhuang Y, Oian J, Wang Y, Hu X. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin improves S-adenosylmethionine production in a recombinant *Pichiapastoris*. *MicrobiolBiotechnol*. 2007, **74** 1205-1212..
56. Bauman K, Carnicer M, Dragosits M, Graf A, Stadlmann J, Jouhten P, Maaheimo H, Gasser B, Albiol J, Mattanovich D, Ferrer P. A multi-level study of recombinant *Pichiapastoris* in different oxygen conditions. *BMC System Biology*. 2010, **4** (141): 1-23.
57. Gasser b, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodriguez E, Baumann K, Guiliiani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, Porro D, Ferrer P, Tutino ML, Mattanovich D, Villaverde A. Protein folding and comformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. *MicrobialCellFactories*. 2008, **7** (11): 1-18

ANEXOS

Los siguientes anexos describen los protocolos de las diferentes técnicas empleadas para la realización de este trabajo de grado.

A: MAXI-PREP

1. Centrifugar las células cultivadas Overnight en 100 mL de medio a 3500rpm durante 15-20 minutos a 4°C
2. Resuspender el pellet con 20 mL de solución STE (0,1M NaCl; 10 mM Tris HCl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0)
3. Centrifugar como en 1
4. Resuspender el pellet en 3,6mL de solución I (50mM glucosa, 25mM Tris HClpH 8,0; 10mM EDTA pH 8,0) Puede adicionarse 10mg/mL de lisozima en buffer tris HCl 10mM) 400 µL e incubar a 37°C por 30 minutos.
5. Adicionar 8 mL de solución II (fresca) (0,2N NaOH; 1% SDS) mezclar por inversión a temperatura ambiente durante 5-10 minutos
6. Adicionar 4 mL de solución III (acetato potásico 5M, Acido acético glacial 11,5 mL para 100 mL y agua destilada)
7. Mezclar por inversión e incubar en hielo por 10 minutos
8. Centrifugar como en 1
9. Filtrar sobrenadante a través de gasa estéril o papel filtro
10. Precipitar el ADN con 0,6 volúmenes de Isopropanol y mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
11. Centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante y lavar con etanol a 70% con un volumen de 20 mL. Centrifugar a 4°C. dejar secar el pellet.

- 12.** Resuspender el pellet en 600µL de buffer TE 1X (10mM Tris HCl pH 8,0; 1Mm EDTA pH 8,0)
- 13.** Agregar un volumen de 600µL de HCl 5M a 4°C
- 14.** Centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. Rescatar el sobrenadante y agregar un volumen de Isopropanol. Centrifugar a las mismas condiciones.
- 15.** Agregar un volumen de Etanol 70%. Y centrifugar como en **14**. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet por 10 minutos.
- 16.** Resuspender con 500 µL de buffer TE 1X.
- 17.** Purificar el ADN obtenido agregando 5 µL de RNAsa (5mgmL⁻¹), mezclar por inversión e incubar a 37°C por 30 minutos.
- 18.** Adicionar un volumen de Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol (25:1:1) (fenol equilibrado) y mezclar por inversión durante 1 minuto.
- 19.** Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente
- 20.** Separar la fase acuosa en otro tubo vial.
- 21.** Adicionar 1,5 volúmenes de Isopropanol e incubar a -20°C entre 15 y 20 minutos
- 22.** Centrifugar a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C
- 23.** Descartar el sobrenadante y lavar con etanol 70% centrifugándolo a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- 24.** Secar y resuspender el pellet en buffer TE 1X.

B: TRANSFORMACIÓN POR ELECTROPORACIÓN

1. Mezclar 20 μ L de células competentes de *P. pastoris* GS115 con 5 – 20 μ g de DNA linealizado.
2. Transferir esta mezcla a una cubeta de 0,2cm el cual debe estar enfriado previamente en la nevera.
3. En el electroporador poner la opción “FUNGI” y luego “*Saccharomyces cerevisiae*” a condiciones 1200 voltios V y 200 Ω .
4. Al tener la cubeta y el programa listo se coloca la cubeta en el electroporador y se oprime “PULSE”, inmediatamente colocar 1 mL de Sorbitol, resuspender y pasarlo a tubo cónico de 15 mL.
5. Incubar 3 horas a 37°C sin agitación.
6. Sembrar 200 μ L en superficie en medio MD (YNB 1,43%, Biotina 4×10^{-5} %, Dextrosa 2%) y MDH (YNB 1,43%, Biotina 4×10^{-5} %, Dextrosa 2%, Histidina 10X).
7. Incubar a 30°C hasta cuando crezcan colonias.

C: EXTRACCION DE PROTEÍNA INTRACELULAR PARA *P. pastoris*

1. Realizar buffer de lisis (Tris HCl 50 mM, PMSF 1mM, EDTA 1mM a pH 7,2)
2. Centrifugar a 4000 rpm, 4°C por 15 minutos y resuspender el pellet con una solución de NaCl 0,85% (p/v) dos veces.
3. Resuspender el pellet en buffer de lisis y centrifugar a 13000 rpm, 4°C por 15 minutos
4. Agregar perlas de vidrio y realizar 15 ciclos de: 1 minuto de vórtex y 1 minuto en hielo
5. Sonicar las células en 30% amplitud, 15 ciclos de: 15 segundos ON y 45 segundos OFF a 4°C
6. Centrifugar a 4000 rpm a 4°C por 20 minutos
7. Medir proteína y actividad específica según corresponda

D: ELISA INDIRECTA

1. Sensibilizar con 50 μ L de antígeno cada pozo en una solución con PBS 1X en una concentración de 1 μ g/mL incluyendo la curva patrón.
2. Incubar en cámara húmeda a 37°C por 18 horas.
3. Descargar fuertemente una vez y retirar el exceso.
4. Agregar 200 μ L de solución de bloqueo.
5. Incubar a 37°C por dos horas en cámara húmeda.
6. Realizar 3 lavados con frasco lavador con la solución de lavado.
7. Realizar la solución de anticuerpo antiGALNS en una concentración de 1/1000, en una solución de PBS 1X, Tween 20 al 0,005% y leche descremada al 2,5%.
8. Adicionar 100 μ L de la solución anterior a cada pozo.
9. Incubar por una hora a 37°C en cámara húmeda.
10. Realizar 4 lavados con la solución de lavado.
11. Realizar una dilución 1/2000 del anticuerpo antirabbit en una solución de PBS 1X, Tween 20 al 0,005% y leche descremada al 2,5%.
12. Incubar como en el numeral 9.
13. Realizar 3 lavados con la solución del numeral 10.
14. Adicionar 100 μ L del sustrato Sure Blue ReserveTM tmb Microwell Peroxidase a cada pozo.
15. Incubar por 5-10 minutos en oscuridad.
16. Adicionar 100 μ L a cada pozo de HCl
17. Leer a 450 nm y ajustando el blanco con PBS 1X

REACTIVOS:

PBS 10X para 500 mL

Na_2HPO_4 : 5,97g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1,28 g

Disolver los dos fosfatos en 400 mL de agua desionizada

NaCl : 43,83 g

Aforar a 500 mL

Solución de lavado: PBS 1X, Tween 20 al 0,005%

Solución bloqueo: PBS 1X, Tween 20 al 0,005%, leche descremada 2,5%

Solución anticuerpo: PBS 1X, Tween 20 al 0,005%, leche descremada 2,5%

Solución parada: HCl 1N ó Ácido sulfúrico 0,6 N

E: SDS-PAGE

1. Preparar material y reactivos.
2. Ensamblar los vidrios en los soportes correspondientes.
3. Preparar el gel de separador. (Recordar agregar al mismo tiempo el persulfato de amonio y el TEMED) y mezclar suavemente.
4. Agregar el gel separador inmediatamente con ayuda de una pipeta Pasteur entre los vidrios, dejando 1 cm de espacio por debajo del borde superior.
5. Agregar agua desionizada suavemente hasta rebozar y dejar solidificar.
6. Descartar el exceso de agua y secar con una servilleta
7. Preparar el gel de almacenamiento. (Recordar agregar al mismo tiempo el persulfato de amonio y el TEMED) y mezclar suavemente.
8. Adicionar entre los vidrios, hasta rebozar y poner el peine de muestras. Dejar solidificar.
9. Quitar el peine suavemente
10. Preparar las muestras: En condiciones reductoras: Buffer de muestra 20 μ L y muestra 20 μ L. (La cantidad de muestra depende de la concentración de proteína)
11. Llevar las muestras a ebullición por 5 minutos.
12. Asegurar los soportes con los vidrios a la cámara y llenarla de buffer de corrido de adentro hacia afuera.
13. Colocar el separador de pozos y cargar el gel con las muestras(20 μ L)
14. Correr las muestras a 200 Voltios hasta que el azul de bromofenol llegue al borde inferior del gel.
15. Desmontar la cámara y sacar los geles.
16. Dejar los geles sumergidos en solución colorante por 10 horas.
17. Descartar la solución colorante y decolorar con solución decolorante.

REACTIVOS:

Solución poliacrilamida

Acrilamida: 29,2 g

Bisacrilamida: 0,8 g

Agua desionizada: 100 mL

Almacenar en frasco ambar a 4°C

Buffer TrisHCl pH 6.8 1.5M

Tris base: 9,075 g

Agua desionizada: 40 mL

Ajustar el pH con HCL hasta 6,8

Almacenar en frasco ambar a 4°C

SDS 10%

SDS: 10 g

Agua desionizada: 80 mL

Ajustar el pH a 7,2 con NaCl 10 N

Aforar a 100 mL

Buffer de corrido 1X

Tris base: 3 g

Glicina: 14,4 g

SDS: 0,2 g

Agua desionizada: 1 litro

Buffer de Muestra:

Azul laemli: 950 μ L

β -Mercaptoetanol: 50 μ L

Solución colorante

Azul de Coomasie R-250: 0,25 g

Ácido acético: 20 mL

Metanol: 80 mL

Agua desionizada: 100 mL

Solución decolorante

Ácido acético: 20 mL

Metanol: 80 mL

Agua desionizada: 100 mL

GELES DE POLIACRILAMIDA

Gel separador 10%

Agua desionizada: 3,9 mL

Buffer Tris pH 8.8: 2,5 mL

SDS 10%: 0,1 mL

Acrilamida/bisacrilamida: 3,3 mL

Persulfato de amonio: 60 μ L

TEMED: 20 μ L

Gel de almacenamiento

Agua desionizada: 3 mL

Buffer ph 6,8: 1,25 mL

SDS 10%: 0,1 mL

Acrilamida/bisacrilamida: 0,7mL

Persulfato de amonio: 50 μ L

TEMED: 10 μ L

F: TINCION DE PLATA

1. Realizar SDS-PAGE de las muestras a evaluar.
2. Colocar el gel con 20 mL de solución de fijado y agitar lentamente por 10 minutos.
3. Descartar la solución de fijado y lavar dos veces con agua desionizada por 5 minutos.
4. Descartar el agua desionizada y agregar 20 mL de solución tiosulfato de sodio durante 1 minuto.
5. Descartar la solución anterior y lavar dos veces con agua desionizada por 20 segundos.
6. Descartar el agua desionizada y poner el gel en solución nitrato de plata por 10 minutos.
7. Lavar como en 5.
8. Agregar 20 mL de solución de revelado, agitando lentamente hasta observar la intensidad de las bandas.
9. Lavar con agua desionizada y detener la reacción con ácido cítrico 2,3 M

REACTIVOS:

Solución de lavado

Etanol 10 % (v/v)

Glicerol 4% (v/v)

Solución de fijado

Metanol al 40% (v/v)

0,5 mL de formaldehído al 37% por L de solución

Solución tiosulfato de sodio

0,2 g por L de solución

Solución nitrato de plata

0,1 % de nitrato de plata

Solución de revelado

3% (p/v) carbonato de sodio

0,0004% (p/V) tiosulfato de sodio

0,5 mL de formaldehído al 37% por L de solución

G: WESTERN BLOT

1. Realizar SDS-PAGE de las muestras a evaluar bajo condiciones reductoras.
2. Cortar la membrana de nitrocelulosa y dejar 5-10 minutos en buffer de transferencia junto con las esponjas y el papel filtro.
3. Montar la cámara de transferencia.
4. Colocar la cámara con agitador sobre una plancha agitadora y con hielo en su interior. Dejar dos horas a 350 mA y 100 V.
5. Desmontar y dejar la membrana una hora en buffer de bloqueo.
6. Realizar un lavado con solución de lavado para quitar el exceso de leche.
7. Preparar la solución de anticuerpo (según recomendación de fabricante) y dejar esta solución por una hora a temperatura ambiente.
8. Preparar la solución de bloqueo.
9. Realizar lavados con la solución de lavados hasta quitar el exceso de leche.
10. Agregar la solución de conjugado (Anticuerpo GALNS monoclonal de ratón) en dilución 1/5000
11. Lavar con la solución de lavado
12. Adicionar el sustrato peroxidasa con Diaminobenzidina

REACTIVOS

Buffer de transferencia

Tris base: 303 g

Glicina: 14,04

SDS: 1 g

Metanol: 200 mL

Agua desionizada: 1 L

Ajustar a pH: 8,3 con HCl

TBS 5X

Tris base: 20 mM

NaCl: 500 mM

Agua desionizada: 200 mL

Ajustar a pH: 7,5 con HCl

TTBS (Solución de lavado)

TBS 1X

Tween 20 a 0,2%

Solución de bloqueo y anticuerpo

TTBS 1X

Leche 5%

Sustrato peroxidasa (Diaminobenzidina)

Inidazol 0,1%

Diaminobenzidina 0,001%

Triton X100 al 0,1%

PBS 1X

Peroxido de hidrogeno 30%

