



**Universitat
Autònoma
de Barcelona**

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA

Producció recombinant de la gonadotrofina coriònica equina amb el llevat *Pichia pastoris*.

Directors: Francisco Valero Barranco i Pau Ferrer Alegre

Programa de Doctorat: **Biotecnologia**

Memòria per a optar al grau de Doctora per la Universitat Autònoma de
Barcelona

Anna Ubach Font

FRANCISCO VALERO BARRANCO, Catedràtic del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, i PAU FERRER ALEGRE, Professor Agregat del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFIQUEM:

Que la llicenciada en Biotecnologia Anna Ubach i Font ha dut a terme sota la nostra direcció el treball amb el títol “Producció recombinant de la gonadotrofina coriònica equina amb el llevat *Pichia pastoris*”, que es presenta en aquesta memòria i que constitueix la seva Tesi per optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

I perquè es prengui coneixement i consti als efectes oportuns, presentem a l'Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi, signant el present certificat a

Bellaterra, juny de 2009

Dr. Francisco Valero Barranco

Dr. Pau Ferrer Alegre

A l'Esteve,
la Jana
i el Magí, que està en camí

Agraïments

Set anys donen per molt. Durant aquest temps de la meva tesi he conegut a molta gent. Gent que s'han convertit en veritables amics, d'altres en companys, d'altres en simples coneguts.

Agrair als meus directors de tesi que m'han donat l'oportunitat d'afrontar el repte d'una tesi. Als companys de grup i de departament que m'han fet les vetllades més divertides i amenes.

A la família, sempre incondicional, al meu costat.

Als amics, també incondicionals, donant-me un cop de mà quan l'he necessitat, alleugerint el pes de les preocupacions i mals de cap.

Agrair a la gent de Calier la confiança dipositada en el nostre grup per començar junts aquest projecte i a BioIngenium pel suport econòmic en alguns anàlisis.

I com no, agrair als projectes on he format part “Sistema integrado de producción de proteínas heterólogas en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* para la obtención de productos de interés farmacéutico y veterinario” (CICYT CTQ2004-00300) i “Aplicación de estrategias de ingeniería de bioprocesos y metabólica en *Pichia pastoris* para optimizar la producción de proteínas heterólogas y su utilización en biotransformaciones” (CICYT CTQ2007-60347/PPQ). Al grup de recerca “Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi aplicada” (SGR2005-00698) i a la Xarxa de Referència en Biotecnologia, XRB, Unitat d'Enginyeria Bioquímica.

També agraeixo al Ministeri d'Educació la concessió d'una beca predoctoral FPI que ha estat el suport econòmic per portar a terme aquest treball.

A tots vosaltres, moltes gràcies.

Anna

Índex.....	9
Resum.....	15
Objectius.....	19
Introducció.....	23
A.1. <i>Pichia pastoris</i> com a sistema d'expressió.....	25
A.1.1 Breu història	
A.1.2 Proteïnes produïdes en <i>P. pastoris</i>	
A.1.3 Metabolisme del metanol i promotor <i>AOX1</i>	
A.1.4 Construcció de les soques d'expressió	
A.1.5 plegament i modificacions posttraduccionals	
A.1.6 Millores en l'expressió de la proteïna	
A.1.7 Cultiu d'alta densitat	
A.2. eCG i les gonadotropines.....	37
A.2.1. Fets històrics	
A.2.2. Gonadotropines	
A.2.3. Estructura de la eCG	
A.2.4. Activitat biològica	
A.2.5. Tecnologia de l'expressió recombinant de gonadotrofines de mamífers	
Capítol 1. Obtenció dels gens sintètics.....	47
1.1 Introducció.....	49
1.2 Materials i mètodes.....	50
1.2.1 Disseny dels oligonucleòtids per la síntesi dels gens	
1.2.2 PCR de Síntesi del gens	
1.2.3 PCR d'amplificació	
1.2.4 PCR d'inserció del senyal Kex2	
1.2.5 Gels d'agarosa	
1.3 Resultats i discussió.....	56
1.3.1 Disseny dels oligonucleòtids per la síntesi dels gens	
1.3.2 Síntesi dels gens	
1.3.2.1 Síntesi del gen α	
1.3.2.2 Síntesi del gen β	
1.3.3 Inserció del senyal Kex2	
1.4 Conclusions.....	69

Capítol 2. Obtenció de les soques productores.....	71
2.1 Introducció.....	73
2.2 Materials i mètodes.....	74
2.2.1 Soques	
2.2.2 Vectors	
2.2.3 Reaccions de modificació de DNA	
2.2.3.1 Purificació de DNA	
2.2.4 Introducció del DNA a les cèl·lules (Transformació)	
2.2.5 Cultiu en placa	
2.2.5.1 Selecció de clons d' <i>E. coli</i> amb <i>pUC18</i>	
2.2.5.2 Selecció de clons amb <i>pPICZα</i>	
2.2.6 Comprovació dels clons transformats	
2.2.7 Comprovació de la seqüència dels gens	
2.2.7.1 Comprovació de la integració dels gens al cromosoma de <i>P. pastoris</i>	
2.2.8 Gels d'agarosa	
2.3 Resultats i discussió.....	84
2.3.1 Clonatge a <i>E. coli</i>	
2.3.2 Clonatge a <i>P. pastoris</i> : aïllament de soques productores de eCG α i eCG β	
2.3.3 Construcció soques d'expressió de l'hormona sencera	
2.4 Conclusions.....	93
Capítol 3. Cultius de producció.....	95
3.1 Introducció.....	97
3.2 Materials i mètodes.....	98
3.2.1 Cultiu en erlenmeyer	
3.2.2 Cultiu en discontinu	
3.2.2.1 Descripció de l'instrumental	
3.2.2.2 Procés	
3.2.3 Cultiu en discontinu alimentat	
3.2.3.1 Descripció de l'instrumental	
3.2.3.2 Procés	
3.2.4 Anàlisi de les mostres	
3.2.4.1 Proteïna total	
3.2.4.2 Biomassa	
3.2.4.3 Metanol	
3.2.4.4 Anàlisi qualitatiu de eCG	
3.2.5 Gels d'acrilamida	
3.2.5.1 Preparació gels	
3.2.5.2 Tinció dels gels	

3.2.6	Transferència de punts (<i>Dot-blot</i>)	
3.2.7	Transferència Western	
3.3	Resultats i discussió.....	118
3.3.1	Cultiu en <i>erlenmeyer</i>	
3.3.1.1	<i>Soques que produeixen eCG</i>	
3.3.1.2	<i>Comparació entre una soca productora de eCG amb una soca productora de la lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i> (ROL) i la soca de fenotip salvatge</i>	
3.3.2	Cultius en discontinu	
3.3.2.1	<i>Medi ric BMMY</i>	
3.3.2.2	<i>Medi mínim BMM</i>	
3.3.2.3	<i>Comparació dels cultius en discontinu</i>	
3.3.3	Cultius en discontinu alimentat	
3.3.3.1	<i>Cultiu en Biostat B</i>	
3.3.3.2	<i>Comparació del cultiu discontinu i en discontinu alimentat</i>	
3.3.3.3	<i>Cultiu en Biostat ED</i>	
3.3.3.4	<i>Comparació del cultiu en discontinu i en discontinu alimentat</i>	
3.4	Conclusions.....	142
Capítol 4.	Detecció i quantificació de eCG.....	143
4.1	Introducció.....	145
4.2	Materials i mètodes.....	146
4.2.1	Anàlisi per transferència de punts	
4.2.1.1	<i>Protocol</i>	
4.2.1.2	<i>Detecció quimioluminescent</i>	
4.2.1.3	<i>Detecció colorimètrica</i>	
4.2.1.4	<i>Patrons d'eCG</i>	
4.2.1.5	<i>Anticossos primaris</i>	
4.2.1.6	<i>Anticossos secundaris</i>	
4.2.2	ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	
4.2.2.1	<i>Kit comercial d'ELISA per la detecció de eCG</i>	
4.2.2.2	<i>ELISA per la detecció de eCG recombinant</i>	
4.2.2.2.1	Preparació plaques	
4.2.2.2.2	Anàlisi	
4.2.2.2.3	Revelat amb fosfatasa alcalina.	
4.2.2.2.4	Revelat amb peroxidasa	

4.3 Resultats i discussió.....	152
4.3.1 Transferència de punts	
4.3.1.1 <i>Detecció de heterodímer</i>	
4.3.1.1.a Experiment control	
4.3.1.1.b Canvi de sistema de revelat	
4.3.1.1.c Anticòs de captura per l'ELISA	
4.3.1.2 <i>Detecció específica de cada cadena</i>	
4.3.1.2.a Primera aproximació	
4.3.1.2.a Anticossos monoclonals	
4.3.1.2.b Anticossos policlonals desenvolupats en cabra	
4.3.1.2.c Anticossos policlonals desenvolupats en conill	
4.3.1.2.d Anticossos anti-His ₆ i anti-c-myc	
4.3.1.2.f Resum dels resultats en la selecció d'anticossos	
4.3.2 ELISA	
4.3.2.1 <i>ELISA amb un Kit comercial</i>	
4.3.2.2 <i>ELISA</i>	
4.3.2.2.a <i>ELISA directa</i>	
4.3.2.2.b <i>ELISA en sandvitx</i>	
4.4 Conclusions.....	165
Capítol 5. Procés de purificació.....	167
5.1 Introducció.....	169
5.2 Materials i mètodes.....	170
5.2.1 Centrifugació i filtració	
5.2.2 Concentració i diafiltració	
5.2.2.1 <i>Primera concentració</i>	
5.2.2.2 <i>Diafiltració</i>	
5.2.2.3 <i>Segona concentració</i>	
5.2.3 Cromatografia d'afinitat	
5.2.3.1 <i>Sartobind®</i>	
5.2.3.2 <i>FPLC</i>	
5.2.3.3 <i>AKTA</i>	
5.2.4 Cromatografia de bescanvi iònic	
5.2.4.1 <i>Vivapure Mini L</i>	
5.2.4.2 <i>AKTA</i>	
5.2.5 Cromatografia de sedàs molecular (gelfiltració)	
5.2.6 Determinació del contingut en sucres del preparat comercial de eCG (Foligon d'Intervet)	
5.2.7 Altres tècniques utilitzades	
5.2.6.1 <i>Gels d'acrilamida, transferència de punts i de proteïnes</i>	

5.3 Resultats i discussió.....	181
5.3.1 Concentració i diafiltració	
5.3.1.1 <i>Determinació del tall de pes molecular de la membrana més adequada</i>	
5.3.1.2 <i>Anàlisi conductivitat</i>	
5.3.2 Purificació per cromatografia d'afinitat	
5.3.2.1 <i>Sartobind®; purificació per gravetat a petita escala</i>	
5.3.2.2 <i>Purificació amb el sistema FPLC</i>	
5.3.2.3 <i>Purificació amb el sistema AKTA</i>	
5.3.3 Purificació per bescanvi iònic	
5.3.3.1 <i>Columnes Vivapure</i>	
5.3.3.2 <i>Purificació amb el sistema AKTA i columna de 1 ml</i>	
5.3.3.3 <i>Purificació amb el sistema AKTA i columna de 50 ml</i>	
5.3.4 Purificació per sedàs molecular (gel filtració)	
5.3.5 Determinació del contingut en sucres del preparat comercial de eCG (Foligon d'Intervet)	
5.4 Conclusions.....	204
Capítol 6. Caracterització i comparació eCGr i eCGn.....	205
6.1 Introducció.....	207
6.2 Materials i mètodes.....	208
6.2.1 Desnaturalització ens gels SDS-PAGE	
6.2.1.1 <i>Urea com a agent desnaturalitzant</i>	
6.2.1.2 <i>β-mercaptoetanol com a agent reductor</i>	
6.2.1.3 <i>DTT com a agent reductor</i>	
6.2.2 Seqüenciació de l'extrem N-terminal de proteïnes	
6.2.3 Estimació del pes molecular de la eCGr	
6.2.3.1 <i>SDS-PAGE i anàlisi de transferència Western</i>	
6.2.3.2 <i>MALDI-TOF</i>	
6.2.4 Desglicosilació enzimàtica de proteïnes	
6.2.5 Estimació del punt isoelèctric de proteïnes	
6.2.5.1 <i>Predicció del pI in silico</i>	
6.2.5.2 <i>Determinació del pI en gels bidimensionals</i>	
6.2.6 Activitat <i>in vitro</i>	
6.2.7 Activitat <i>in vivo</i>	

6.3 Resultats i discussió.....	215
6.3.1 Anàlisi de la eCG en gels SDS-PAGE	
6.3.1.1 Urea com a agent desnaturalitzant	
6.3.1.2 β -mercaptoetanol com a agent reductor	
6.3.1.3 DTT com a agent reductor	
6.3.2 Identificació de les cadenes α i β i determinació del pes molecular a partir del gel SDS-PAGE	
6.3.2.1 Determinació de la seqüència N-terminal	
6.3.2.2 Determinació del pes molecular	
6.3.3 Estimació del pes molecular de la eCGr	
6.3.3.1 SDS-PAGE	
6.3.3.2 MALDI-TOF	
6.3.4 Desglicosilació enzimàtica de proteïnes	
6.3.5 Estimació del punt isoelèctric de proteïnes	
6.3.5.1 Predicció del pI in silico	
6.3.5.2 Determinació del pI en gels bidimensionals	
6.3.6 Activitat <i>in vivo</i>	
6.4 Conclusions.....	230
Conclusions.....	231
Bibliografia.....	235
Abreviatures.....	247
Annex.....	251

Resum

En aquest estudi es presenta el procés d'obtenció d'una proteïna recombinant, l'hormona gonadotrofina coriònica equina (eCG) en el llevat metilotròfic *Pichia pastoris*.

El Grup de recerca d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi Aplicada de la UAB fa anys que treballa amb aquest llevat i s'ha volgut avaluar la possibilitat de produir una proteïna d'interès veterinari i com a model de producte d'elevada complexitat. L'hormona escollida és un heterodímer (cadena α i β de 17 i 44 kDa, respectivament) i per tan, s'han de coproduir dues polipèptids i aquests s'han de plegar conjunta i correctament per obtenir una proteïna activa. També té un elevat contingut en sucres, una altra complexitat que, afegida als ponts disulfur, la fan un bon repte.

El treball s'ha iniciat amb la decisió de sintetitzar els gens mitjançant la tècnica de PCR, ja que les seqüències són relativament curtes, 294 i 472 nucleòtids pels gens codificadors de la cadena α i β , respectivament. Això ha permès poder modificar la seqüència per tal d'adaptar-la a l'ús codons més utilitzats per *P. pastoris*, eliminar i afegir dianes de restricció per facilitar el clonatge, eliminar la seqüència senyal pròpia i treure els introns que conté la seqüència genòmica de la cadena β .

D'acord amb la seqüència de DNA optimitzada obtinguda s'han dissenyat una sèrie d'oligonucleòtids amb una petita part de seqüència solapada i que serviran per la síntesi de cada un dels dos gens. La tècnica de PCR ha permès la fusió d'aquests oligonucleòtids per obtenir els dos gens, els quals s'han clonat al plasmidi d'expressió pPICZ α sota el control del promotor *AOX*.

A partir dels plasmidis que contenen només un dels dos gens s'han obtingut dues construccions que contenen els dos cassets d'expressió en els dos ordres possibles: pPICZ α -eCG α + β i pPICZ α -eCG β + α .

L'electroporació ha estat la tècnica emparada per introduir el DNA plasmídic a les cèl·lules de *P. pastoris*, permetent una recombinació del vector amb el genoma del llevat, de manera que el casset de producció s'integra de manera estable.

S'han obtingut cinc transformants amb cada construcció, se n'ha avaluat la seva capacitat productiva amb cultius en erlenmeyer i una transferència de punts. Amb base a experiments d'expressió a petita escala (cultius en erlenmeyer) s'ha observat que els transformants amb la construcció α + β mostren nivells d'expressió lleugerament superiors que els β + α , per això s'han escollit, per aquest treball, el clon α + β 1.

S'han fet cultius en discontinu i en discontinu alimentat per produir suficient hormona per poder desenvolupar un procés de purificació i poder caracteritzar parcialment l'hormona recombinant. Tot i els problemes operacionals associats al tipus de soca utilitzada (com l'augment de temperatura degut a l'elevat calor

metabòlic generat o la limitació en el subministra d'oxigen degut a l'elevada demanda de la soca) s'ha produït suficient eCG per a la seva caracterització.

El plasmidi utilitzat en el clonatge permet incorporar una cua de 6 histidines a la part C-terminal de la proteïna expressada, en aquest estudi només s'ha mantingut a la cadena α , per tal de distorsionar la proteïna al mínim. Aquesta cua havia de permetre fer una purificació en un sol pas amb una cromatografia d'afinitat amb metalls quelants, però no ha estat així; la proteïna era incapaç d'unir-se a la resina i per tan, no s'ha pogut separar de la resta de proteïnes del brou mitjançant aquesta tècnica.

Per això s'ha plantejat un procés de purificació més complex, tot i que s'ha procurat minimitzar-ne el nombre d'etapes. La concentració inicial del brou obtingut permet treballar amb volums més reduïts. Segueix una diafiltració que permet disminuir l'alt contingut en sals del brou de cultiu i tenir la proteïna en un tampó estàndard. D'aquesta manera també s'han eliminat les proteïnes de pes molecular més petit de 10 kDa.

Segueixen dues etapes de cromatografia, la primera de bescanvi iònic. S'ha fet a un pH de 8,0 i s'ha augmentat la força iònica per eluir les proteïnes, així s'eliminen la majoria de proteïnes que ha secretat *P. pastoris*. La segona ha estat de sedàs molecular, ha permès canviar el tampó i fer un refinat final. Amb aquest procés s'ha aconseguit un producte final bastant pur, tot i que alguns dels resultats de la caracterització apunten que encara hi pot haver quedat alguna proteïna no desitjada de propietats físico-químiques molt semblants a la eCG.

S'ha caracteritzat, breument, l'hormona recombinant parcialment purificada, comparant-la amb l'hormona nativa. S'ha determinat el pes molecular, el punt isoelèctric i el grau de glicosilació.

Amb una preparació de eCG recombinant en solució salina s'ha fet les proves d'activitat *in vitro*, que han donat positives i d'activitat *in vivo*, que han donat negatives.

Així doncs, podem dir que s'ha aconseguit produir l'hormona eCG amb el llevat *P. pastoris*, tot i que falta perfeccionar el procés de purificació per a obtenir-la en quantitat i qualitat adequada.

Objectius

L'objectiu general d'aquest treball és avaluar la viabilitat d'un procés de producció recombinant de la gonadotrofina coriònica equina en el llevat *Pichia pastoris*.

Per assolir-lo s'ha plantejat els següents objectius específics:

- Dissenyar i optimitzar la seqüència dels dos gens que codifiquen per l'hormona gonadotrofina coriònica equina (eCG) i dissenyar els oligonucleòtids que s'utilitzaran per la seva síntesi per PCR.
- Clonar els dos gens en el plasmidi d'expressió pPICZ α per obtenir els plasmidis pPICZ α -eCG $\alpha+\beta$ i pPICZ α -eCG $\beta+\alpha$ i insertar-los en una soca de *P. pastoris* X-33 i avaluar-ne els transformants.
- Desenvolupar un mètode de detecció i quantificació de la eCG.
- Utilitzar el millor transformant en cultius en bioreactor operat en discontinu i discontinu alimentat per produir eCG recombinant.
- Dissenyar i implementar un procés de purificació de la eCG a partir del brou de cultiu.
- Caracteritzar fisicoquímicament l'hormona recombinant (pes molecular, punt isoelectric, grau de glicosilació) i comparar-la amb l'hormona nativa.
- Avaluar l'activitat biològica de l'hormona recombinant *in vitro* i *in vivo*, comparant-la amb la nativa.

Introducció

A.1 *Pichia pastoris* com a sistema d'expressió

Durant els últims quinze anys hi ha hagut un creixement exponencial de la utilització de *Pichia pastoris* com a sistema d'expressió de proteïnes recombinants. L'existència d'aquest llevat capaç de créixer amb el metanol com a única font de carboni i energia, no era coneguda fa 35 anys. Això contrasta amb el llevat de forner, *Saccharomyces cerevisiae*, que ha estat utilitzat pels humans durant segles.

Aquest sistema d'expressió és molt útil quan *Escherichia coli*, extensament utilitzat com a hoste productor de proteïnes recombinants de qualsevol origen, presenta limitacions, ja que la seva maquinària de procariota sovint no és capaç de produir una proteïna correctament plegada i funcional. Un altre sistema també molt utilitzat i conegut és *S. cerevisiae*, però aquest també pot presentar limitacions a l'hora de produir glicoproteïnes d'eucariotes superiors degut al seu patró de hiperglicosilació. La ràpida acceptació de *P. pastoris* ha estat afavorida per diferents factors (Jahic M *et al.*, 2006):

- Les tècniques de biologia molecular i genètica que necessita són molt similars a les de *S. cerevisiae*, un dels organismes més ben caracteritzats.
- El promotor més utilitzat és el derivat del gen de l'alcohol oxidasa I de *P. pastoris*. És fortament induïble per metanol i fortament reprimat per fonts de carboni com la glucosa, glicerol i etanol i permet elevades velocitats de transcripció.
- *P. pastoris* prefereix el creixement respiratori (i quan creix en metanol és un aerobi obligat), això facilita molt les tècniques de cultiu d'alta densitat.
- Té capacitat de secreció de les proteïnes recombinants i en secreta molt poques d'endògenes, fet que facilita el procés de purificació.
- Pot créixer en un medi molt simple, una mescla de salts, fet que abarateix el procés.
- Presenta menys tendència a hiperglicosilar que *S. cerevisiae* (Cregg JM *et al.*, 1993).

P. pastoris és un llevat unicel·lular fàcil de manipular i cultivar. A més, és eucariota i això el fa capaç de fer moltes de les modificacions posttraduccionals presents en els eucariotes superiors, tal com el trencament proteolític, plegament, ponts disulfur i glicosilacions. Per això moltes proteïnes que acaben com a cossos d'inclusió inactius en les bacteries, en *P. pastoris* poden ser expressades i no cal recórrer a altres sistemes derivats d'eucariotes superiors que tenen un cultiu molt més complex, com cèl·lules d'insectes o de teixits animals (Cereghino JL *et al.*, 2000).

A.1.1 Breu història

Fa uns quaranta anys es van descriure els primers llevats capaços d'utilitzar el metanol com a única font de carboni i energia (Ogata K *et al.*, 1969). Aquests organismes metilotròfics van atraure l'interès com a potencial font de *Single Cell Protein* (SCP), per l'alimentació animal. Per això la Phillips Petroleum Company va desenvolupar metodologia i medis pel creixement de *P. pastoris* en cultius continus d'alta densitat cel·lular de fins a 130g/l de pes sec (Wegner G, 1990). No obstant, la crisi del petroli dels anys 70 va augmentar molt el preu del metanol i van fer que el procés no fos rendible.

Tot i així, la Phillips Petroleum Company, contractada per Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc. (SIBIA, La Jolla, CA) va continuar investigant *P. pastoris* com a organisme productor de proteïnes recombinants; van aïllar el gen i el promotor de l'alcohol oxidasa (enzim que catalitza el primer pas d'assimilació del metanol) i van construir vectors d'expressió, soques i protocols de manipulació genètica de *P. pastoris*.

La combinació d'aquesta tecnologia de manipulació genètica i l'optimització del seu cultiu controlat pel promotor de l'alcohol oxidasa van donar alts nivells de producció de la proteïna recombinant.

El 1993 Philips Petroleum va vendre les patents del sistema d'expressió en *P. pastoris* a Research Corporation Technologies (Tucson, AZ) i va donar llicència a Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA) per vendre els components del sistema. Cal afegir, que actualment aquestes patents han vençut, motiu pel qual la utilització de *P. pastoris* encara s'està estenent més.

Recentment s'ha seqüenciat el genoma complet d'aquest llevat (Mattanovich D *et al.*, 2009. De Schutter K *et al.*, 2009).

A.1.2 Proteïnes produïdes en *Pichia*

Unes 1000 proteïnes s'han aconseguit produir satisfactòriament en *P. pastoris* (<http://faculty.kgi.edu/cregg>, 2009), ja siguin bacterianes, com un fragment de la toxina del Tètanus (Clare JJ *et al.*, 1991), fúngiques, com la β -glicosidasa d'*Aspegillus niger* (Dan S *et al.*, 2000), de plantes, com l' α -amilasa de l'arròs (Kumagai MH *et al.*, 2000), d'invertebrats, com l'adenosina desaminasa de la mosca de la fruita (Palladino MJ *et al.*, 2000), de mamífers, com la carboxipeptidasa de porc (Ventura S *et al.*, 1999) i humanes: antigen de superfície de d'hepatitis B (Cregg JM *et al.*, 1987), Factor de Necrosi Tumoral (Sreekrishna K *et al.*, 1989), Col·lagen tipus III (Vuorela A *et al.*, 1997) i moltes altres. Recentment s'ha aconseguit expressar un complex proteic com és un anticòs monoclonal (Potgieter TI *et al.*, 2009).

Pel que fa a la família de gonadotrofines se n'ha aconseguit expressar més d'una amb èxit, tot i que només s'han fet anàlisis d'activitat *in vitro*.

A.1.3 Metabolisme del metanol i promotor *AOX1*

Com a llevat metilotròfic, *P. pastoris* és capaç de créixer amb metanol com a única font de carboni. Aquest sistema de control es basa en què alguns dels enzims necessaris pel metabolisme del metanol només s'expressen en presència de metanol al medi i alguns d'ells són exclusius d'aquesta via.

En la figura A.1.1 es mostra l'esquema del metabolisme del metanol dins la cèl·lula. El metanol entra dins el peroxisoma, on és degradat a formaldehid i peròxid d'hidrogen per l'alcohol oxidasa en el primer pas d'assimilació (Cregg JM *et al.*, 1989a). El peròxid d'hidrogen és degradat a aigua i oxigen per la catalasa encara dins el peroxisoma. Una part del formaldehid generat surt del peroxisoma per ser oxidat, al citosol, a format i diòxid de carboni, reaccions que generen energia pel creixement de la cèl·lula. La resta es queda dins el peroxisoma on l'enzim peroxisomal dihidroxicetona sintasa el fusiona amb xilulosa-5-fosfat donant gliceraldehid-3-fosfat i dihidroxicetona, que surten del peroxisoma i al citosol regeneren la xilulosa-5-fosfat i generen, per cada 3 cicles, una molècula neta de gliceraldehid-3-fosfat que entra a formar part de les reaccions que donaran constituents cel·lulars.

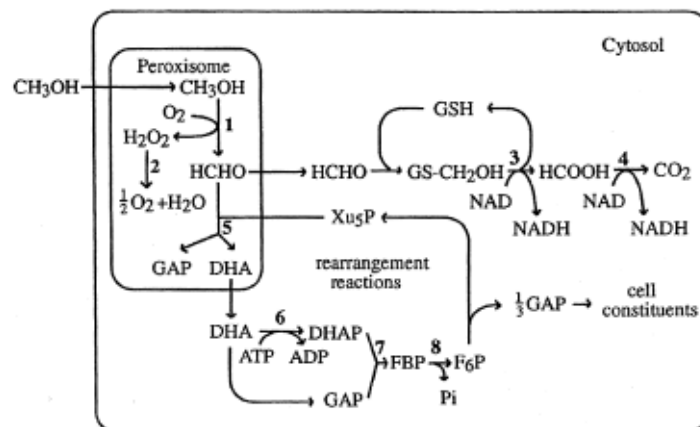


Fig. A.1.1 Esquema del metabolisme del metanol en els llevats metilotròfics. 1: alcohol oxidasa, 2: catalasa, 3: formaldehid deshidrogenasa, 4: format deshidrogenasa, 5: dihidroxicetona sintasa, 6: dihidroxicetona cinasa, 7: fructosa 1,6-bisfosfat aldolasa, 8: fructosa 1,6-bisfosfatasa.

S'ha vist que quan les cèl·lules creixen en metanol, alguns enzims que participen en aquest metabolisme, com l'alcohol oxidasa (Aox) i la dihidroxicetona sintasa (Dhas) estan presents en grans quantitats (Egli T *et al.*, 1980. Veenhuis M *et al.*, 1983).

S'ha observat que alguns dels enzims són exclusius d'aquesta via, com és el cas de l'alcohol oxidasa. S'ha vist que a *P. pastoris* hi ha dos gens que la codifiquen: *AOX1* i *AOX2*. El primer és el responsable del 80% de l'alcohol oxidasa produïda. La seva expressió és controlada a nivell transcripcional (el pas de DNA a mRNA). La presència de metanol en el medi és essencial per la inducció i

expressió d'aquests gens, mentre que la presència de glucosa n'inhibeix la producció (Ellis SB *et al.*, 1985. Cregg JM *et al.*, 1989b).

A.1.4 Construcció de les soques d'expressió

Moltes de les manipulacions genètiques que es fan a *S. cerevisiae* es poden fer a *P. pastoris*. També s'ha vist que presenta recombinació homòloga del genoma i es poden introduir artificialment, en el nucli, molècules de DNA. Tot i que es dona en menys freqüència que *S. cerevisiae*, es poden utilitzar aquestes propietats per integrar el gen desitjat al genoma, d'aquesta manera no cal mantenir pressions selectives per mantenir un plasmidi que es manté de forma episomal (auxotrofisme i resistència a antibiòtics, bàsicament) (Cregg JM and Russell K, 1998).

Per a la construcció de soques que expressin un gen desitjat calen tres passos bàsics:

1. Inserció del gen en el vector d'expressió.
2. Introducció del vector al genoma de *P. pastoris*.
3. Selecció (*screening*) del potencial d'expressió del gen per part de les soques obtingudes.

Vectors d'expressió

Hi ha molts tipus de vectors que es poden utilitzar a *Pichia*, tots ells estan disponibles comercialment (www.invitrogen.com), amb diferents promotors (constitutius o induïbles), amb diferents marcadors de selecció (auxotròfies, resistència a antibiòtics).

La majoria s'han dissenyat com a vectors llançadora *E. coli* -*P. pastoris*, és a dir, es poden replicar de manera autònoma en *E. coli*, mentre que en *P. pastoris* s'integren en el seu genoma. D'aquesta manera es pot obtenir gran quantitat de vector en *E. coli* abans de transformar *P. pastoris*.

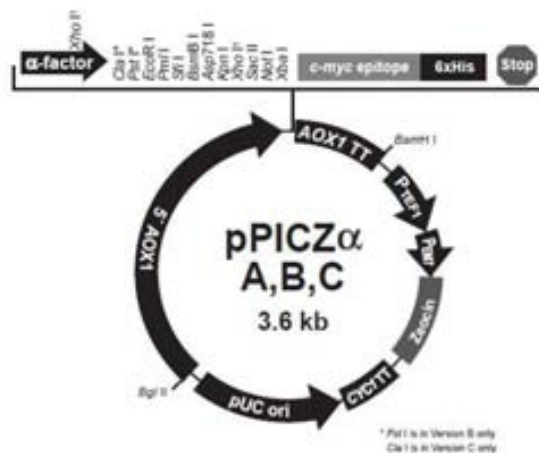


Fig. A.1.2 Esquema del plasmidi pPICZ α . Es mostra el promotor *AOX1*, part 5' i el seu terminador (TT). Entremig hi ha la regió de clonatge múltiple amb el factor d'excreció α a 5' i l'epítip c-myc (antigen de reconeixement per un anticòs), la cua de 6 histidines i la senyal STOP de traducció. P_{TEF1} és l'origen de replicació del plasmidi en *E. Coli*. També es mostra el gen que codifica per la resistència a la zeocina.

En la figura A.1.2 es mostra un exemple de vector d'expressió molt utilitzat a *P. pastoris*: pPICZ α .

La majoria de vectors contenen un fragment de 0.9 Kb del promotor *AOX1* i un fragment de la regió terminal de la transcripció del mateix gen (Koutz P *et al.*, 1989). Entremig hi ha la regió de clonatge múltiple, que consta d'unes quantes dianes de restricció.

També hi ha vectors amb altres promotors (Macauley-Patrick S *et al.*, 2005): *GAP* (Gliceraldehid 3-Fosfat Deshidrogenasa). Aquest promotor és constitutiu; per tant, en un cultiu no es pot induir o reprimir per controlar la producció de la proteïna recombinat.

FLD (Formaldehid Deshidrogenasa). Aquest enzim està involucrat en el metabolisme del metanol, concretament en les vies per reduir la toxicitat del formaldehid generat. És induït tan pel metanol com per la metilamina, per tant es pot induir canviant la font de carboni i/o de nitrogen.

ICLI (Isocitrat Liasa). El promotor d'aquest gen ha estat recentment estudiat com a alternativa a l'*AOX* i *FLD*. És induïble per etanol i reprimat per glucosa. No es tenen dades de nivells d'expressió de proteïna recombinant produïda, però sí que se n'ha produït (Mendez J *et al.*, 2003).

Per la correcta expressió extracel·lular de la proteïna, els vectors també poden tenir una seqüència que codifica per a una senyal de secreció, normalment la del factor α de *S. cerevisiae*.

Marcadors de selecció

Els primers marcadors genètics utilitzats en *P. pastoris* eren auxotròfics, com el *HIS4*; només les cèl·lules que tenien el vector amb aquest gen eren capaces de créixer en un medi mínim sense histidina, la resta no podien créixer. Un altre exemple de marcador auxotròfic és l' *ARG4*.

No obstant, els marcadors que més s'utilitzen actualment són els que confereixen resistència a un antibiòtic, com el gen *Sh ble* que dona resistència a la zeocina, un derivat de la bleomicina (Cregg JM *et al.*, 1985. Cregg JM and Madden KR, 1989. Higgins DR *et al.*, 1998). L'avantatge principal és que la mida dels vectors amb aquest marcador es veu substancialment reduïda.

Soques hoste

Totes les soques de *P. pastoris* deriven de la soca salvatge NRRL-Y 11430 (Northern Regional Research Laboratories, Peoria, IL, USA). S'han fet variants auxotròfiques, que permeten la utilització dels vectors amb marcadors de selecció com els abans esmentats: *HIS4* o *ARG4*.

Pel que fa a la utilització del metanol (*Methanol utilization, Mut*), hi ha tres fenotips que es diferencien en la mutació de cap, un o els dos gens *AOX*.

- Mut⁺. Utilització de metanol igual que la soca *wild type*. Té els dos gens *AOX* funcionals.

- Mut^s. Utilització lenta de metanol. Té el gen *AOX1* inactivat (*knock out*).
- Mut⁻. No creix en metanol. Té els dos gens *AOX* inactivats (*knock out*).

Normalment, les soques amb el gen *AOX1* mutat (Mut^s) permeten un millor control de les condicions operacionals que les Mut⁺, ja que creixen més lentament sobre metanol i poden tenir més facilitat per produir (Tschopp JF *et al.*, 1987. Cregg JM *et al.*, 1987. Chiruvolu V *et al.*, 1997).

També s'han obtingut una gran quantitat de soques de diferents característiques, com les deficientes de proteases SMD1163, SMD1165 i SMD1168, que poden reduir la degradació de la proteïna recombinant produïda en el cultiu (Brierley RA, 1988. White CE *et al.*, 1995), aquest fet és més notable en els cultius en bioreactors d'elevada densitat cel·lular, ja que l'alta densitat fa que hi hagi més lisi cel·lular i, per tant, alliberació de proteases que degraden el producte.

Integració al genoma

Els vectors s'integren al genoma de *P. pastoris* per establir les soques d'expressió. Es pot fer de dues maneres:

- A. Es linealitzava el plasmidi per la regió del promotor *AOX1* o el marcador (la segona opció només és vàlida per a vectors amb marcadors auxotròfics). Els extrems lliures de DNA estimulen la recombinació homòloga en una alta freqüència. Hi ha un sol esdeveniment de recombinació, el qual dóna lloc a la integració del plasmidi linealitzat. Hi ha doncs doble dosi del promotor *AOX1*, una del gen *AOX1* propi de la cèl·lula i l'altre del casset (gen de la proteïna recombinant i marcador).

La recombinació també pot ser en dos punts (tot i que es dóna en menys freqüència) si es digereix el plasmidi en un sol punt de manera que el casset quedi flanquejat per seqüències 5' (regió promotor) i 3' *AOX1* (regió terminador) d'aquesta manera el gen *AOX1* propi de la cèl·lula queda substituït pel del casset, obtenint una soca de fenotip Mut^s. Aquestes soques utilitzen menys metanol i solen produir més proteïna.

- B. També es pot introduir el vector en forma circular, però la freqüència d'integració és molt baixa, ja que costa que entri dins la cèl·lula. Tot i així hi ha tècniques de millora d'eficiència de transformació que permeten aïllar algun transformant.

A.1.5 plegament i modificacions posttraduccionals

Una de les avantatges de *P. pastoris*, com a cèl·lula eucariota que és i respecte les bacteries, cèl·lules procariotes, és la capacitat de fer modificacions posttraduccionals associades als eucariotes superiors, com el processament de

pre i pro pèptids, plegament, ponts disulfur, addició de lípids, N- i O-glicosilacions.

El plegament de les proteïnes sol començar amb una ràpida formació dels ponts disulfur al reticle endoplasmàtic. En aquest orgànul també s'hi porta a terme la glicosilació. Moltes proteïnes, especialment les que són secretades, contenen una pro regió que ajuda el procés de plegament i l'oligomerització, quan calgui, fins i tot, ja en la molècula de mRNA, ajuda a estabilitzar-la i evitar la degradació. La pro proteïna és transportada a l'aparell de Golgi, on la regió pro és eliminada, normalment per la proteïna Kex2. Aquí la proteïna madura és empaquetada en vesícules i secretada fora de la cèl·lula. Per dirigir la proteïna a la via de secreció cal una senyal, normalment a l'extrem N-terminal (Daly R *et al.*, 2005).

Senyal de secreció

Les proteïnes es poden expressar tan intracel·lular com extracel·lularment. La secreció és més desitjada, ja que *P. pastoris* excreta molt poques proteïnes pròpies i la proteïna heteròloga sol ser la major part de la proteïna total excretada si s'aconsegueix que aquesta sigui excretada al medi. Així es facilita la purificació ja que no cal llisar les cèl·lules per recuperar la proteïna, obtenint així un brou de composició molt més simple. Per això es clona el gen de la proteïna heteròloga al vector i seguidament, a l'extrem N-terminal, una seqüència senyal de secreció, la més típica és el pro pèptid factor α de *S. cerevisiae* (Kurjan J and Herskowitz I, 1982). Durant el procés de secreció aquest pèptid senyal es talla de la resta de la proteïna, així no pot influir en les propietats ni activitat de la proteïna madura secretada.

També s'ha descrit el senyal fosfatasa àcida de *P. pastoris* (*PHO1*) (Cereghino JL and Cregg JM, 2000).

Ponts disulfur

S'han aconseguit expressar amb èxit proteïnes que contenen ponts disulfur en la seva estructura terciària, com els anticossos monoclonals (Potgieter TI *et al.*, 2009), la ROL (Minning S, 1998) i la gonadotrofina coriònica humana (Gupta CS and Dighe RR, 1999).

Glicosilació

P. pastoris és capaç d'afegir tan N-glicosilacions com O-glicosilacions (Goochee CF *et al.*, 1991).

És capaç d'unir els oligosacàrids O-units al grup hidroxils de treonines i serines. Els mamífers tenen les O-GLICOSILACIONS compostades per molts monosacàrids, incloent N-acetilgalactosamina, galactosa i àcid siàlic, en canvi els eucariotes inferiors, entre ells *P. pastoris*, els addicionen formats per residus únicament de manosa. Sembla que no hi ha una seqüència consens com

a punt de O-glicosilació, *P. pastoris* és capaç de glicosilar punts de proteïnes que en la seva forma nativa no tenen sucres units, com passa amb el IGF-I humà (Brierley RA, 1998).

Pel que fa a les N-GLICOSILACIONS, en tots els eucariotes comencen al reticle endoplasmàtic, on uneixen un cor de 3 molècules de glucosa, 9 de manosa i 2 de N-acetilglucosamina a les asparagines que tenen la seqüència de reconeixement Asn-X-Ser/Thr (on X pot ser qualsevol aminoàcid). Un cop unit és modificat, però els camins són diferents si es tracta d'un eucariota inferior o d'un superior. *S. cerevisiae*, ja en l'aparell de Golgi, afegeix cadenes de manosa en aquest cor inicial, aquestes cadenes poden tenir una llargada diferent, això fa que la proteïna secretada sigui heterogènia. La llargada d'aquestes cadenes de manosa pot variar entre 50 i 100 residus, aquest fenomen es coneix com a hiperglicosilació.

S'ha vist que en algunes proteïnes recombinants expressades en *P. pastoris* estan hiper-N-glicosilades, igual que en *S. cerevisiae*, això pot donar problemes en el plegament final de la proteïna. En la indústria farmacèutica té un problema afegit ja que poden tenir caràcter antigènic o no tenir l'activitat esperada.

Però s'ha vist que en les proteïnes excretades per *S. cerevisiae* i *P. pastoris* hi ha diferències de N-glicosilació:

- o *P. pastoris* no hiperglicosila tant com *S. cerevisiae*, aquesta és la més important. A més, el cor de sucres de *P. pastoris* és Man₈GlcNAc₂ o Man₉GlcNAc₂ (Montesino R *et al.*, 1998). Això fa que les proteïnes recombinants tinguin un pes molecular més semblant al de la proteïna nativa.
- o *P. pastoris* presenta unions manosa α -1,6 al cor central, tal i com s'ha vist en proteïnes com la invertasa (Trimble RB *et al.*, 1991), un domini de l'activador de plasminogen (Miele RG *et al.*, 1997) i altres proteïnes (Montesino R *et al.*, 1996).
- o Els oligosacàrids de *P. pastoris* no tenen cap manosilació terminal α -1,3, aquesta unió fa que la proteïna no pugui ser utilitzada amb finalitats farmacèutiques humanes per problemes d'antigenicitat (Montesino R *et al.*, 1998. Verostek MF and Trimble RB, 1995. Romanos MA *et al.*, 1992).

A.1.6 Millores en l'expressió de la proteïna

El fet d'obtenir un gen que codifica per una proteïna, introduir-lo en un vector i aquest a un organisme no significa obtenir un 100% d'èxit. L'expressió d'una proteïna heteròloga per part d'una cèl·lula no es resumeix en aquests tres passos. Durant el procés d'expressió hi ha molts mecanismes que poden influir en el resultat (Romanos MA *et al.*, 1992). Ara se'n destaquen alguns que es

poden modificar per tal d'assegurar l'èxit en l'expressió de la proteïna, tot i que no sempre és factible fer-ho.

Transcripció (DNA→mRNA)

La quantitat de mRNA present el citosol va molt lligada a la quantitat de proteïna que s'obté, per això interessa obtenir mRNA de gran estabilitat. El temps de vida mitja d'una molècula de mRNA en llevats pot ser de 1 a 100 min, per això pot influir tant. S'ha vist que algunes seqüències poden estabilitzar o desestabilitzar el mRNA, però no hi ha resultats concloents, ja que depèn del mRNA que s'hagi analitzat (Brown AJP, 1989).

Si es detecta que el mRNA de la nostra proteïna té poca estabilitat es poden fer millores en altres nivells, com utilitzar un promotor més fort (en farà augmentar el nombre de còpies), un promotor d'inducció més ràpida o sintetitzar el gen amb altres codons o eliminar la regió 3' no traduïda, esperant que l'estabilitat augmenti.

Traducció (mRNA→Proteïna)

El sistema de traducció és universal i degenerat; tenim més d'un codó (triplet de bases del mRNA) que codifica per un aminoàcid. En la traducció participen molècules de tRNA que contenen l'anticodó (triplet complementari al del mRNA) i l'aminoàcid corresponent. La diferència entre els organismes és la proporció dels tRNA de diferent anticodó però que porten unit el mateix aminoàcid. Per això quan s'intenta expressar una proteïna d'un organisme en un altre evolutivament bastant diferent es pot trobar que el mRNA contingui codons que l'organisme té en molt baixa freqüència, alentint molt el procés de traducció.

Si l'obtenció del gen es per síntesi *in vitro* es pot modificar la seqüència del gen per tal que tingui els menors codons possibles amb pocs representats en l'organisme productor, en aquest cas *P. pastoris*. Aquest canvi s'anomena ADAPTACIÓ DE L'ÚS DE CODÓ.

Secreció i excreció

En molts vectors d'expressió s'insereix una seqüència que facilita l'excreció de la proteïna al medi. Aquest punt ja s'ha mencionat en l'apartat dels vectors d'expressió.

Les proteïnes naturals de *P. pastoris* que han de ser secretades són transportades de l'aparell de Golgi a l'exterior amb vesícules específiques. Abans de la secreció cal que el complex procés de plegament s'hagi completat. Aquesta complexitat de tot el procés de plegament i secreció fa que hi intervinguin molt components i que sigui difícil de controlar a nivell genètic, per aquest motiu una petita modificació d'un dels elements es pot traduir en un coll d'ampolla, que fa que la producció minvi. S'han fet estudis de com afecten les condicions ambientals en el plegament de la proteïna, com la temperatura, l'oxigenació, el pH o l'osmolaritat del medi, així com la sobreexpressió de

proteïnes involucrades en aquest procés com la PDI, BiP i HAC. (Gasser B *et al.*, 2008).

Una manera de facilitar l'excreció és augmentat la porositat de la paret cel·lular del llevat, com pot ser l'expressió recombinant d'enzims que la degradin parcialment com les β -1,3-glucanases (Ferrer P, *et al.*, 1998). S'han fet estudis de sobre expressió de diversos d'aquests enzims en *S. cerevisiae* i tot i obtenir una alliberació al medi de les proteïnes periplasmàtiques també s'ha vist una disminució en el creixement cel·lular quan s'expressen la glucanasa de *Nicotiana plumbaginifolia* o la BGL2 (Demolder J *et al.*, 1993. Mrša V *et al.*, 1993, respectivament). Però la sobreexpressió de la glucanasa EXG1 no ha donat una inhibició de creixement. (Cid VJ *et al.*, 1994).

Cal esmentar que aquells punts que influeixen negativament en el nivell de producció de la proteïna són anomenats [COLL D'AMPOLLA](#).

A.1.7 Cultiu d'alta densitat cel·lular

P. pastoris pot ser cultivada a una densitat cel·lular realment alta (100 g/l de pes sec). Les condicions de fermentació són molt importants per la secreció de la proteïna. La concentració de proteïna secretada al medi és, generalment, proporcional a la concentració cel·lular.

En la bibliografia es troben moltes combinacions de les tècniques bàsiques de cultiu (Jahic M *et al.*, 2006). Batch o fed-batch amb metanol com a font de carboni limitant. Invitrogen Corporation (*Pichia* Fermentation Process Guide) proposa una estratègia mixta:

1. [BATCH DE GLICEROL](#) (40 g/l) per obtenir biomassa. S'espera un rendiment de biomassa de 0,5 g de biomassa/g de glicerol. El batch finalitza quan s'esgota el glicerol del medi. En aquesta fase no s'obté proteïna recombinant ja que el promotor *AOX* no està induït.
2. [FED-BATCH DE GLICEROL](#). S'afegeix glicerol en condicions limitant per seguir produint biomassa. Quan s'aconsegueix la biomassa desitjada s'acaba la fase i es comença a alimentar amb metanol.
3. [FED-BATCH DE METANOL](#). Cal esperar que el glicerol estigui totalment consumit abans de començar l'alimentació de metanol, així s'indueix completament el promotor *AOX*. És important fer la inducció lentament, per afavorir l'adaptació a la nova font de carboni. El creixement de les soques Mut⁺ amb metanol genera molta temperatura, per tal cal tenir un bon control d'aquest paràmetre i un bon sistema de refrigeració.

Una adaptació que ha donat mol bon rendiment de creixement i producció és la que també consta de tres etapes (Cos O *et al.*, 2006);

1. [BATCH](#). L'objectiu d'aquesta fase és obtenir el màxim de biomassa en el mínim temps abans d'iniciar la producció. S'utilitza glicerol com a font de carboni i a una concentració de 40 g/l, per sobre d'aquest valor el

creixement s'inhibeix. Aquesta font de carboni inhibeix el promotor de l'alcohol oxidasa, per tan no hi ha producció de proteïna recombinant. La finalització d'aquesta fase es detecta per un augment sobtat de la concentració d'oxigen dissolt, senyal de l'esgotament del glicerol. És la senyal per a començar la següent fase. La biomassa obtinguda al final d'aquesta fase és de 20 g/l aproximadament, ja que el rendiment biomassa/substrat ($Y_{(X/S)}$) és de 0,5.

2. TRANSICIÓ. Aquesta fase té l'objectiu de canviar la font de carboni de glicerol a metanol d'una manera gradual, d'aquesta manera es produeix una adaptació al canvi de font de carboni, minimitzant el temps necessari per què la cèl·lula adapti el seu metabolisme a la degradació del substrat inductor, el metanol. Aquest canvi fa que el promotor de l'alcohol oxidasa es desreprimeixi lentament i es comenci a produir proteïna, tot i que hi ha autors que es decanten per una addició constant de glicerol (Curvers S *et al.*, 2002) i d'altres per una d'exponencial, en aquesta estratègia s'opta per una addició primer constant i després decreixent, acompanyada d'una addició constant de metanol. Així el glicerol està sempre a una concentració limitant i s'evita la repressió del promotor *AOX*. Aquesta addició combinada dels dos substrats fa que la fase de latència quedi reduïda (Minning S *et al.*, 2001).
3. INDUCCIÓ. Aquesta fase és el propi fed-batch. L'estratègia d'addició de metanol és la que determinarà la taxa de creixement i la producció de proteïna heteròloga, ja que les reaccions de producció van relacionades directa o indirectament al creixement. Per aquest motiu cal tenir ben controlada la concentració de metanol dins el bioreactor, a més, una concentració elevada de metanol pot ser tòxica per les cèl·lules i pot inhibir el creixement i la producció (Zhang W *et al.*, 2000) i una concentració massa baixa serà insuficient per induir la producció (Cereghino JL and Cregg JM, 2000). S'ha vist que mantenir constant la concentració de metanol durant el procés és el que dóna millors resultats de producció (Chiruvolu V *et al.*, 1997).

RA. Brierley i col·laboradors (1990) i K. Sreekrishna i col·laboradors (1989) han experimentat que una alimentació mixta de glicerol i metanol funciona molt bé per la producció de proteïnes recombinants amb soques *Mut^s*, per això s'ha modificat l'estratègia recomanada per Invitrogen per una tècnica de cultiu que dóna molt bon rendiment: en una primera etapa es realitza un batch, que permet obtenir una biomassa inicial important (amb glicerol com a font de carboni). Després d'una etapa de transició, es passa al batch alimentant amb metanol (o

una barreja de glicerol i metanol) per a induir la producció de la proteïna recombinant (Brierley RA, 1998).

Les condicions de creixement de *P. pastoris* són ideals per poder fer cultius a gran escala: els components del medi són barats (font de carboni: glicerol o metanol, biotina, salts, elements traça i aigua). El fet que *P. pastoris* pugui créixer a pH baixos i el medi contingui metanol com a única font de carboni fa que les contaminacions siguin difícils.

A.2. Gonadotrofina Coriònica equina (equine Chorionic Gonadotropin, eCG)

L'hormona gonadotrofina coriònica equina (eCG) és una hormona proteica, glicosilada i d'origen placentari. Està involucrada en el manteniment de l'embaràs primerenc (els tres primers mesos) de les eugues. El nom li ve per la gran semblança que té amb l'hormona humana corresponent (hCG), tan pel que fa a estructura com a activitat fisiològica. De fet, s'ha vist que els èquids, els primats i els humans són els únics mamífers que expressen aquesta hormona, del grup de les glicoproteïnes, a la placenta.

La eCG té unes característiques úniques molt interessants, com l'habilitat, a nivell endocrí, d'actuar com la FSH i com la LH en espècies que no siguin el cavall. L'altra és el seu gran contingut en sucres, que és el més alt en aquest tipus d'hormona.

A.2.1. Fets històrics

El 1930, dos investigadors, Harold Cole i George Hart, del departament de Ciència Animal de la Universitat de Califòrnia, van descobrir l'existència d'una substància present en el sèrum de les eugues embarassades que era capaç d'induir el creixement dels ovaris en rates i ratolins, la van anomenar *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) (Cole HH and Hart GH, 1930). Només feia dos anys que dos obstètrics alemanys havien descrit la presència de gran quantitat d'una hormona en el sèrum i la orina de les dones en el primer trimestre d'embaràs (Ascheim S and Zondek B, 1928). Uns anys més tard va ser anomenada *human Chorionic Gonadotropin* (hCG), per això el 1978 es va proposar el canvi de nom de l'hormona equina de *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* a *equine Chorionic Gonadotropin* (eCG) (Papkoff H. *et al*, 1978).

Els anys següents del descobriment de l'hormona humana i equina els endocrinòlegs van buscar hormones similars a la sang i l'orina d'altres espècies, com al rata, l'ovella, la vaca, la truja, la gossa, la gata.

Inicialment es va creure que era d'origen pituitari, com la resta d'hormones d'estructura similar, però el 1934, Catchpole i Lyons van concloure que era secretada pel còrion i emmagatzemada a l'endometri. Al cap d'uns anys es va demostrar que és secretada per les cèl·lules dels cubs de l'endometri (Cole HH and Goss H, 1943. Clegg MT *et al*, 1954).

El 1966, es van descriure els nivells de gonadotrofina coriònica durant l'embaràs primerenc de la mona (Tullner WW and Hertz R, 1966). Durant aquells anys també es va descriure que l'activitat de l'hormona humana, hCG, mimetitzava la de l'hormona LH (Luteinizing Hormone), una hormona secretada a la glàndula pituitària anterior, en canvi, l'hormona equina, eCG, tenia activitat

d'una altra hormona de la mateixa família també d'origen pituïtari, la FSH (Follicle Stimulating Hormone) però amb una petita activitat LH afegida (Cole HH *et al.*, 1946). Una fracció de 0,1ml de sèrum d'euga en el dia 60 de gestació i injectat a una rata immadura era capaç d'induir-li l'ovulació.

Uns anys més tard es va descobrir que les cèl·lula encarregades de la seva síntesi i excreció eren les de l'endometri de la placenta (Allen WR, 1980). Aquestes cèl·lules segreguen l'hormona de forma constitutiva, això pot ser així perquè només hi són durant el primer trimestre de l'embaràs, quan cal l'acció de la eCG. La concentració màxima en el plasma es troba al 50è dia d'embaràs i decreix ràpidament, al dia 90 la concentració és pràcticament nul·la.

S'ha vist que l'hormona s'elimina molt poc per l'orina (1%) i la llet (0,2%), essent la metabolització i degradació la principal via d'eliminació (85%).

A.2.2. Gonadotrofines

La gonadotrofina coriònica (Corionic Gonadotrophin, CG) pertany al grup de les gonadotrofines, també anomenades hormones glicoproteïques, com indica el seu nom són un grup de glicoproteïnes format per quatre hormones: Lutropina o *Luteinizing Hormone* (LH), Tirotropina o *Thyroid Stimulating Hormone* (TSH) Fol·litropina o *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) i Coriogonadotrofina o *Chorionic Gonadotropin* (CG).

Aquestes quatre hormones s'han trobat en tots els mamífers que s'han estudiat i s'han trobat hormones amb propietats similars en vertebrats inferiors, incloent alguns peixos (Farmer SW *et al.*, 1979. Licht P *et al.*, 1977).

Mentre que la lutropina, la fol·litropina, i la tirotropina són d'origen pituïtari, la coriogonadotrofina és d'origen placentari. Les dues primeres (LH i FSH) tenen el paper d'estimular els ovaris i els testicles, induint la gametogènesi i la síntesi d'estrògens en les gònades masculines (Catt KJ *et al.*, 1978). La TSH regula una gran varietat de processos bioquímics i fisiològics a la glàndula tiroïdes que donen com a resultat la síntesi i la secreció de les hormones tiroïdals (Field JB, 1978). La CG ha estat molt estudiada i s'ha vist que, en termes generals, té una funció molt similar a l'hormona pituïtària LH.

Totes quatre s'uneixen a un receptor de membrana específic que es troba en la seva cèl·lula diana (Roche P *et al.*, 1985). S'ha vist que la transducció de senyal cap a dins de la cèl·lula es fa per la via de l'AMP_c (Hunzicker-Dunn MH and Birnbaumer L, 1985), tot i que també hi ha evidències de l'activació del sistema de l'inositol trifosfat-diacilglicerol (Davis JS *et al.*, 1986).

S'ha vist que tenen una estructura química bastant més complexa de la resta d'hormones proteïques (Pierce JG and Parsons TF, 1981. Strickland TW *et al.*, 1985. Sairam MR, 1983). Tenen dues subunitats que s'uneixen amb enllaços no covalents. La subunitat α és comuna en les quatre hormones de la mateixa espècie, mentre que la β és específica per cada hormona (això és el que

confereix diferent activitat a cada hormona), tot i que tenen un cert grau d'homologia, sobretot en les regions d'unió amb la cadena α .

hLH i hCG tenen propietats biològiques comunes, per això les seves subunitats β tenen un grau d'homologia molt elevat, només es diferencien en l'extrem carboxil terminal de la hCG.

Cada subunitat està codificada per un gen independent i es sintetitzen en forma de propèptid; tenen una regió al N-terminal que en la forma madura s'ha eliminat. S'han aconseguit aïllar els gens de les dues subunitats de diferents espècies. La seqüència d'aminoàcids es coneix per unes 10 espècies o més (Pierce JG and Parsons TF, 1981. Strickland TW *et al.*, 1985. Sairam MR, 1983). Un altre grau de complexitat va associat al gran nombre de punts disulfur que presenten (Pierce JG and Parsons TF, 1981. Strickland TW *et al.*, 1985. Sairam MR, 1983); la cadena α té 10 Cys que estan molt conservades en les diferents espècies, mentre que la β en té 12, també molt conservades en les diferents espècies i en les quatre hormones. No hi ha grups tiol lliures. Tot i la difícil tasca d'establir aquests punts disulfur n'hi ha alguns de ja coneguts, sempre entre cisteïnes de la mateixa cadena.

La tercera gran complexitat són les cadenes de glicosilació (Sairam MR, 1983), en tenen dels dos tipus: N-glicosilacions, unides a través de l'àtom de Nitrogen de les asparagines i O-glicosilacions, unides a través de l'àtom d'oxigen de les serines. Les N-glicosilacions es troben tan en la cadena α com en la β , són d'estructura complexa, amb un cor central de manosa i branques que acaben amb àcid siàlic i galactosa o galactosa i sulfat, depenent del teixit d'origen de l'hormona. Les O-glicosilacions només es troben en l'extrem carboxil terminal de la cadena β , són d'estructura relativament simple i no són necessàries per l'activitat biològica ja que la lutropina no en té.

El fet de tenir la seqüència d'aminoàcids de les hormones de diverses espècies permet estudiar les regions conservades que poden ser importants en el manteniment de l'estructura secundària i terciària de la molècula, les interaccions entre les subunitats o punts necessaris per l'activitat biològica. A part de les cisteïnes, que ja s'ha mencionat abans, també cal afegir que la regió que comprèn de l'aminoàcid 27 al 67 de la cadena α és idèntica en sis espècies i que en altres només hi ha un màxim de 5 aminoàcids diferents. L'extrem carboxil terminal de la cadena α també és una regió conservada, la seqüència que es diferencia més és la de les hormones equines, on només hi ha dos aminoàcids diferents.

Quan es comparen les cadenes β de les quatre hormones humanes es troben dues regions conservades; de l'aminoàcid 16 al 38 i del 56 al 100. Aquestes regions són bones candidates per ser importants en la unió amb la cadena α (Stewart M and Stewart F, 1977). En la resta de regions no conservades hi ha certa homologia, aquestes regions són candidates a ser el punt d'unió amb el receptor.

Diversos experiments han aconseguit formar molècules híbrides (molècules on cada una de les dues cadenes és d'una espècie diferent), això ha permès determinar que la cadena β determina l'especificitat i que l'espècie d'origen afecta l'afinitat pel receptor. L'espècie d'origen de la cadena α modula la potència.

Els anàlisis de dicroisme circular indiquen que hi ha molt poca o gens estructura d'hèlix α , la majoria de l'estructura secundària és fulla β i sense estructura (*random coil*).

A.2.3. Estructura de la eCG

La gonadotrofina coriònica equina segueix l'estructura tridimensional bàsica de les gonadotrofines: dues cadenes proteiques diferents unides per enllaços no covalents (Papkoff H and Samy TSA, 1967), la cadena α és comuna per les quatre hormones d'aquesta espècies i la cadena β és diferent per cada una d'elles, tot i que en el cavall la de eLH i eCG són exactament igual.

S'ha vist que aquestes dues cadenes β idèntiques estan codificades pel mateix gen (Stewart F and Maher JK, 1990), que és diferent per la resta d'hormones, per això s'ha acceptat que aquesta és la base de la diferent activitat (Pierce JG and Parsons TF, 1981).

Primària

A l'annex es mostra la seqüència d'aminoàcids de les dues cadenes un cop han sigut excretades (no tenen pèptid senyal).

La CADENA α té 96 aminoàcids (Ward DN *et al.* 1982). Té 10 Cys que formen ponts disulfur, que ajuden a tenir un bon plegament i a la unió de les dues cadenes. El 22% del seu pes molecular és dels sucres que s'hi uneixen (Christakos S and Bahl OP, 1979). Estudis amb pèptids sintètics i comparació amb la seqüència d'altres espècies han mostrat que hi ha dues regions importants, que com ja s'ha esmentat estan molt conservades: de l'aminoàcid 26 al 46 i l'extrem carboxil terminal, que s'ha vist que és important per la unió al receptor.

La CADENA β és essencial per l'especificitat i acció de l'hormona. Té 149 aminoàcids i 12 Cys per formar ponts disulfur. El 50% del seu pes molecular són sucres. En aquesta subunitat s'han caracteritzat dos *loops* formats per un pont disulfur (un entre les Cys 38 i 57 i l'altre entre la 93 i 100) també essencials per la unió amb el receptor i la interacció amb la cadena α (a través d'una fosforilació).

S'ha vist que hi ha una petita heterogeneïtat electroforètica entre les eCG de diferents espècies, això pot ser atribuït a petites diferències de l'estructura primària i el contingut de sucres (Papkoff H *et al.*, 1978. Martinuk SD *et al.*, 1990. Roder JF *et al.*, 1984).

Glicosilació

La eCG és una de les glicoproteïnes amb un grau de glicosilació més alt, amb aproximadament un 45% de la seva massa atribuït a aquestes estructures (Papkoff H *et al.*, 1978). Les dues unitats estan glicosilades, tan tenen N-glicosilacions unides a asparagines (Asn) com O-glicosilacions, unides a Serines (Ser) o Treonines (Thr). S'ha vist que els punts de glicosilació són comuns per totes les gonadotrofines, però no l'estructura de la glicosilació ni la seva composició. Pel que fa la composició, la diferència més notable és l'augment del monosacàrid àcid siàlic en la hormona de cavall respecte les altres espècies.

A la cadena α s'han descrit dos grups de N-glicosilació a les Asn 56 i 82, que són quasi el 25% del pes total de l'hormona. La subunitat β té una sola N-glicosilació a l'Asn 13 i quatre o més O-glicosilacions, bàsicament a la cua (aminoàcids 122-149). En la figura se'n mostra un esquema.

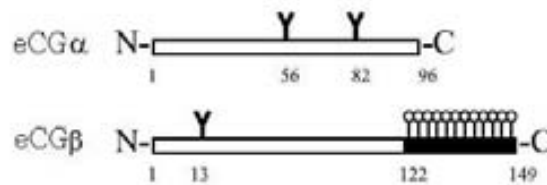



Fig. A.2.1 Esquema de les dues cadenes de eCG amb els punts de glicosilació assenyalats, amb una **Y** s'assenyalen les N-glicosilacions i amb  les O-glicosilacions.

S'ha vist que l'estructura primària de la eLH i eCG és idèntica, però tenen un pes molecular diferent, degut a la diferent glicosilació, tan en quantitat com en composició. Això influeix en la unió del receptor i l'activitat de cada hormona (Bousfield GR *et al.*, 1987. Sugino H *et al.*, 1987).

Estructura tridimensional

Les unions no covalents entre les dues subunitats es trenquen quan s'arriba a un pH de 4,0 o inferior o amb agents caotròpics (Urea 10M o Guanidina HCl 6M) (Parsons TF *et al.*, 1985. Papkoff H, 1974. Moore Jr WT and Ward DN, 1980). Però les dues subunitats es poden reassociar si es posen en condicions de pH (5,3-9,5), temperatura i concentració òptimes i es deixa suficient temps, donant una hormona altre cop activa (Papkoff H, 1974).

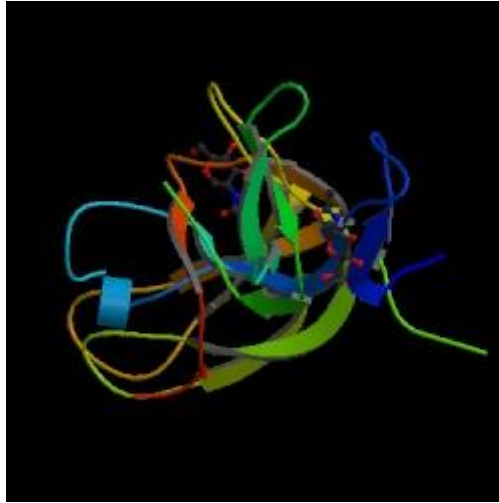


Fig. A.2.2 Esquema del plegament de la hCG.

La eCG no s'ha pogut cristal·litzar, segurament degut al seu alt contingut en sucres (Ryan RJ *et al.*, 1987), per això no se'n té cap esquema en 3D, però la humana (hCG) sí que s'ha pogut cristal·litzar, fent un tractament previ per treure'n els sucres, en la figura A.2.2 es mostra un esquema de la hormona humana. La similitud entre la eCG i la hCG permet que la informació obtinguda de la hCG pugui ser aplicada per inferir l'estructura terciària i la interacció entre les subunitats de la eCG (<http://www.rcsb.org>).

L'anàlisi per dicromisme circular (Combarous Y *et al.*, 1981) mostra que tan hi ha plegaments en forma de hèlix α com fulles β . També s'han vist *loops* a la superfície, tal com tenen altres glicoproteïnes.

Es creu que la unió no covalent entre les dues subunitats no es fan en un sol punt, però tampoc s'han aconseguit identificar aquests punts d'unió en la eCG. S'ha trobat una seqüència d'aminoàcids molt conservada en la cadena β (Cys-Ala-Gly-Tyr), que sembla que és un punt d'unió amb la cadena α . Pel que fa la cadena α , hi ha una Tyr també bastant conservada, però no s'ha corroborat la seva funció d'unió amb l'altra subunitat. S'ha vist que part dels grups de glicosilació també intervenen en la unió de les subunitats (Ryan RJ *et al.*, 1987).

A.2.4. Activitat biològica

En èquids s'ha vist que la eCG quasi no té efecte sobre els ovaris de l'euga, a no ser que aquesta estigui prenyada. La seva funció mimetitza la FSH; estimula la producció d'estrògens i progesterona, però ho fa durant l'embaràs; estimulants la formació i manteniment del segon cos luti que és qui realment produeix aquestes dues hormones.

La gran similitud entre eCG i eLH suggereix que la primera es podrà unir als receptors de la LH en els testicles i ovaris (Licht P *et al.*, 1979. Stewart F and Allen WR, 1979), però s'ha vist que no és així, menys d'un 10% de la eCG s'uneix a aquests receptors. Sembla que és degut a la inhibició per part de

grups de sucres a la perifèria de la eCG. Una altra explicació seria que a les gònades hi ha dues poblacions de receptors (un per cada hormona) i la composició depèn de l'estat reproductiu de l'euga.

S'ha vist que la cadena α per si sola només té un 4% de l'activitat de l'hormona sencera, la β un 6%. Quan es fa la reassociació de les dues cadenes només es recupera un 30% de l'activitat inicial (Papkoff H, 1974).

S'ha mostrat que en els mamífers no èquids, l'hormona eCG té una dualitat d'acció: té activitat FSH i LH (Cole HH *et al.*, 1946. Gospodarowicz and Papkoff H, 1967. Ward DN and Moore Jr WT, 1979), fet encara inexplicable tot i que s'han fet assaigs d'unió a receptors de FSH i LH de diferents espècies que ho mostren (Christakos S and Bahl OP, 1979. Papkoff H, 1974. Moore WT and Ward DN, 1980). Sembla que aquesta dualitat va associada a la regió dels aminoàcids 90-110 de la cadena β .

Aquesta hormona té aplicació en el camp de la reproducció animal (tan animals domèstics com d'investigació), pot ser administrada en femelles per induir-les a produir més òvuls que els esperats en condicions normals i facilitar així l'èxit de la inseminació artificial posterior. Això funciona en mamífers no èquids, a més s'ha vist que la seva activitat és moltes vegades superior a les gonadotrofines coriòniques d'altres animals.

A.2.5. Tecnologia de l'expressió recombinant de gonadotrofines de mamífers

En l'actualitat s'extreu eCG de materials animals procedents de les eugues (Passeron EJ, 1978). També s'extreu Gonadotrofina Coriònica humana (*Human Chorionic Gonadotropin*, hCG) per a ús en la reproducció animal (per a ús humà s'expressa de manera recombinant en cèl·lules animals), de l'orina de dones en el primer trimestre d'embaràs, tot i que l'orina només conté un 1% de l'hormona total sintetitzada. Però és que la resta és metabolitzada, per tant no es pot extreure d'altre lloc.

Pel que fa a la producció de compostos de salut humana, s'ha prohibit l'extracció d'aquests de fonts humanes o animals. Pel que fa a la salut i reproducció animal, aquest tipus de processos d'obtenció d'hormones també s'estan eliminant; per això és interessant poder produir la hormona de forma recombinant.

Per a produir una proteïna recombinant, el primer que cal fer és obtenir el seu gen codificant. La manera tradicional de fer-ho és aïllar el mRNA de teixits que solen expressar la nostra proteïna. La retrotranscripció (pas de seqüències de RNA a DNA) permet obtenir el cDNA (no es pot anomenar DNA, ja que no és la seqüència original present en el genoma de les cèl·lules del teixit utilitzat,

aquest presenta seqüències no codificants de la proteïna, en canvi el cDNA és tot codificant).

Aquest cDNA s'ha d'introduir en l'organisme que farà la producció. Aquest pas de clonatge requereix vectors d'expressió, que permeten que l'organisme puguin reconèixer la seqüència de DNA que ha d'expressar, sol portar seqüències d'inici de transcripció i traducció, així com terminadors. Els vectors d'organismes unicel·lulars solen portar seqüències que faciliten l'excreció de la proteïna en el medi, així es facilita el procés de purificació.

A l'hora de triar l'organisme que produirà la proteïna recombinant cal tenir en compte la complexitat d'aquesta; hi ha diferents tipus d'organisme i diferent complexitat de cultiu, però això va associat a la complexitat de les seves proteïnes, per tant condiciona les modificacions posttraduccionals que pot fer.

Un bacteri és fàcil de cultivar i creix en medis senzills i barats, però és incapaç de fer la majoria de modificacions dels eucariotes, com glicosilacions, ponts disulfur, amidacions,... A l'altre extrem tenim els cultius de cèl·lules de teixits animals, com a eucariotes, permeten l'expressió de qualsevol proteïna, ja que com a cèl·lules eucariotes que són tenen tota la maquinària per fer-ho, però el seu cultiu és molt complex i lent, les cèl·lules són molt delicades i el seu temps de duplicació és de l'ordre de 24h (un bacteri es pot dividir en 1 h), els medis de cultiu són complexos i solen tenir components que l'encareixen. Entremig tenim els llevats, que com a organismes eucariotes poden fer un gran nombre de modificacions posttraduccionals, a més, com a organismes unicel·lulars, permeten un cultiu relativament fàcil; el medi no és massa complex, tot i contenir algun component car i les cèl·lules no són delicades com les de teixits animals. Dins el llevats hi ha diferents organismes, el més utilitzat ha estat *S. cerevisiae*, però també cal destacar *P. pastoris*, l'organisme que s'ha utilitzar per elaborar aquest treball.

Com a antecedents a aquest treball, es poden citar altres treballs que han aconseguit expressar, en *P. pastoris*, hormones de la família de les gonadotrofines de diversos mamífers, incloent l'home. En la taula A.2.1 se'n recullen alguns exemples. Cal destacar que, fins a dia d'avui, no s'ha expressat cap hormona equina en *P. pastoris*.

Taula A.2.1 Referències bibliogràfiques dels treballs d'expressió de gonadotrofines en *Pichia pastoris*.

	CG	LH	FSH	TSH
Bovina			Samaddar M <i>et al.</i> , 1997	
Humana	Gupta CS and Dighe RR, 1999	Gadkari R <i>et al.</i> , 2003		
Ovina			Fidler AE, <i>et al.</i> , 1998	
Porcina			Richard F <i>et al.</i> , 1998	

De totes maneres cal esmentar que en tots aquests estudis només s'ha arribat a fer un anàlisi funcional *in vitro*, no *in vivo*.

Cal esmentar també que la gonadotrofina coriònica equina s'ha aconseguit expressar amb èxit en altres sistemes d'expressió, concretament en diferents línies de cèl·lules d'insectes, com són les Sf9 (Legardinier S *et al.*, 2005a) o les Mimic™ (Legardinier S *et al.*, 2005b), totes dues amb activitat de l'hormona recombinant analitzada *in vitro*. També s'ha produït com una sola proteïna (cadena α i β fusionades) en la llet de conills transgènics (Galet C *et al.*, 2000). L'hormona resultant té activitat FSH i LH *in vitro*, però no *in vivo*, això pot ser degut a una ràpida eliminació de l'hormona en sang (*clearance*), ja que el temps de vida mitja en sang observat és de 10 min.

També s'ha expressat la eLH com a una sola proteïna (fusió de cadenes) en cèl·lules CHO. La proteïna resultant ha obtingut un patró d'unió al receptor similar al de l'hormona nativa. També s'ha fet una anàlisi d'activitat, tan *in vitro* com *in vivo*, obtenint un resultat de 15 vegades més de producció de testosterona que la nativa, això vol dir que l'hormona recombinant té una potència 15 vegades superior a la nativa (Jablonka-Shariff A *et al.*, 2006).

Actualment, la casa Merck Serono, S.A. (www.merckserono.com) comercialitza diversos preparats de gonadotrofines recombinants humanes, entre elles la gonadotrofina coriònica (Ovidrel®), que està produïda en cèl·lules CHO.

Fins ara no hi ha cap empresa que comercialitza cap gonadotrofina recombinant animal.

Capítol 1. Obtenció dels gens sintètics

1.1 Introducció

Un cop s'ha escollit la proteïna que es vol produir cal obtenir el gen que la codifica per poder-lo introduir al sistema d'expressió. Aquest gen es pot obtenir a partir d'un teixit de l'organisme que produeix la proteïna de forma natural o obtenir el gen per síntesi *in vitro*. En el nostre cas, hem optat per la segona alternativa ja que, com s'explicarà, aquesta tècnica permet adaptar la seqüència als nostres requeriments.

En aquest capítol presentem com hem modificat la seqüència del gen original segons les nostres necessitats i com l'hem sintetitzat amb la tècnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

1.2 Materials i mètodes

1.2.1 Disseny dels oligonucleòtids per la síntesi dels gens

S'ha utilitzat el programa VectorNTi, que ajuda en la determinació teòrica de la temperatura d'hibridació d'una seqüència de DNA; ho fa amb paràmetres termodinàmics o contingut de G+ C, el primer és el mètode que s'ajusta més a la temperatura real, comparat amb el càlcul segons el contingut de G+ C i segons s'ha pogut comprovar el aquest treball.

1.2.2 PCR de Síntesi del gens

Com a *DNA polimerasa* s'utilitzen tres enzims diferents: *Expand High Fidelity*

α 1:5'CgTTCACCTcAgTTTCCTgATggAgAgTTTACAACCTCAAATgTCCAgAATgTAAgTTgAgAgAAAAACAAgTACTTCTCAAATTgggTgTTCCAATTTACCAATgTAAgggTTgTTgTT3'

α 2:5'TTggCAACACAACATgTgGATTCTgAggTgATgTTCTTTggAACCAACATTgTCTTCCTggATCTTgCTggAgTTgggTAAgCTCTggAgAAAAACAACCTTACATTgg3'

α 3:5'TCCACATgTTgTgTTgCCAAAgCATTTATCagAgTTACAgTTATgggAAACATCAAATgTgAgAACCCACACCAATgTTATTgTTCgACTTgTTATCACCACAAGATTgCggCCgCATCCAg3'

α 4:5'CTggATgCggCCgCAATCTTg3'

β 1:5'CCTATTCTCgAgTCCAgAggTCCATTgAgACCATTgTgTAGACCAATCAACgCCACTTTggCTgCTgAgAAggAggCCTgTCCAATCTgTATCACTTACCACCTCTATCTgTgCCggTTACTgTCCATCTATggT3'

β 2:5'TgggTCAACACCAggTggACAACCTggCAATCTgATggAAgCAAATCTCagCTCTCTgTAggTACAAACTggTTgTggAATggCTggCagggCagCTggCATAACTCTAACCATAgATggACAgTAACCC3'

β 22:5'gggAAGgAAACCATTgggTCAACACCAggTggACAACCTggCAATCTgATggAAgCAAATCTCagCTCTCTgTAggTACAAACTggTTgTggAATggCTggCagggCagCTggCATAACTCTAACCATAgATggACAgTAACCgCgCACAgATAgAggTggTggTgAAgg3'

β 3:5'gTCCACCTggTgTTgACCCAATggTTTCCTTCCCAgTTgCCTTgAgTTgTCACTgTggTCCATgTCAGATCAAgACCACTgACTgTggTgTTTTTCagAgACCAACCATTggCCTgTgCCCCACAAGCC3'

β 33:5'gTCCACCTggTgTTgACCCAATggTTTCCTTCCCAgTTgCCTTgAgTTgTCACTgTggTCCATgTCAGATCAAgACCACTgACTgTggTgTTTTTCagAgACCAACCATTggCCTgTgCCCCACAAGCCTCCTCTTCC3'

β 4:5'gCCTAAgCggCCgCTAAgAAgTCTTAATTggCAATggATgAgAggATCTTCTggAggCACCAGgAgTTgggTggATgTggATgTCAAAGgTTgggATggTggATCTTTAgAggAAGAggAggCTTgTgggCACAggCCA3'

Fig. 1.1.1 Seqüència dels oligonucleòtids utilitzats per la síntesi dels gens α i β de eCG. En blau s'indica la seqüència que hibrida amb un altre oligonucleòtid. En groc es mostra la seqüència afegida a un dels extrems del nucleòtid que hi hibrida per augmentar la temperatura d'hibridació

PCR System, que és una mescla de la *Taq* DNA polimerasa i una *Tgo* DNA polimerasa amb activitat *proof reading*, de Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 1 732 641), KOD HiFi DNA Polymerase (100 % activitat *proof reading*) de Novagen (Cat. No. 71085-3) i *Pwo* DNA polymerase, polimerasa aïllada de *Pyrococcus woesei*, amb activitat *proof reading*, de Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 1 644 947).

Els *dNTPs* són de la casa Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 1 581 295).

S'ha encarregat la síntesi dels *oligonucleòtids* a Roche Molecular Biochemicals. Les seqüències es mostren en la figura 1.1.1. L'escala de síntesi és de 0,2 μmol , s'ha demanat una purificació per HPLC, ja que són molècules molt llargues i la mateixa síntesi deixa molts fragments no desitjats. En la taula 1.1.1 es mostren algunes propietats d'aquests oligonucleòtids; la llargada en nombre de nucleòtids, el % de G+ C i el pes molecular (PM).

Taula 1.1.1 Propietats dels oligonucleòtids, obtingudes amb el programa Vector NTi.

Encebador	Nucleòtids	% G+ C	PM (Da)
α 1	121	38,0	37513,6
α 2	111	45,1	34193,4
α 3	122	43,4	37626,7
α 4	21	61,9	6478,2
β 1	137	50,4	42061,6
β 2	129	50,4	39699,9
β 22	166	51,2	50821,3
β 3	128	53,2	39333,8
β 33	137	53,3	41996,5
β 4	142	53,5	43144,3

La concentració de cada oligonucleòtid en les reaccions de síntesi és entre 100 nM i 400 nM, la de la polimerasa 2,5 U/100 μl i la dels *dNTPs* 0,2mM. La concentració de MgCl_2 és 1,5 mM, la recomanada per cada enzim, en tots els casos els tampons de reacció ja en porten. En el cas de *Pwo* DNA polymerase, el Mg està en forma de MgSO_4 , a una concentració de 20 mM.

El programa que s'indica a la figura 1.1.2 és el final. En la taula 1.1.2 s'indiquen les temperatures de fusió calculada (T_m indica temperatura de *melting* o fusió del DNA). S'ha calculat de dues maneres; termodinàmicament i segons el contingut en G+ C, pel programa Vector NTi. A la mateixa taula també es

mostra la temperatura d'hibridació trobada experimentalment (T_a), que sol ser 5 °C per sota de la T_m .

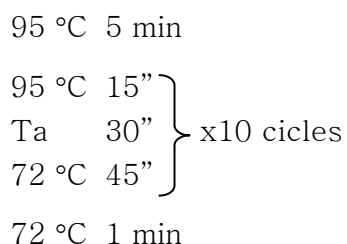


Fig. 1.1.2 Esquema del programa final utilitzat.

Taula 1.1.2. Temperatura d'hibridació, ja optimitzada, per cada reacció de síntesi dels dos gens. Temperatures de fusió teòriques calculades amb el programa Vector NTi tenint en compte el contingut de G+C i termodinàmicament.

Reacció	T_a (°C)	T_m % G+C (°C)	T_m Therm (°C)
α 1-2	50	42,6	46,6
α 3-4	60	53,1	64,2
α 2-3	55	44,6	52,8
β 1-2	No s'ha trobat*	44,6	42,7
β 1-22	70	65,2	74,5
β 3-4	No s'ha trobat*	54,9	64,6
β 33-4	70	63,5	74,9
β 22-33	70	63,0	74,4
Amplificació β	55	53,4	60,3

* Aquestes dues temperatures no s'han aconseguit determinar perquè no s'han aconseguit fusionar els dos oligonucleòtids en qüestió i ha calgut el seu redisseny que ha sigut suficient per poder-los unir.

1.2.3 PCR d'amplificació

Aquestes reaccions s'utilitzen per amplificar fragments de DNA prèviament sintetitzats per PCR (corresponents a un fragment de gen o el gen sencer) amb un major grau de puresa, ja que la reacció de síntesi inicial pot tenir un baix rendiment del producte desitjat.

Com a *DNA polimerasa* s'utilitza Expand High Fidelity PCR System, que és una mescla de la *Taq* polimerasa i un *Tgo* DNA polimerasa, amb activitat *proof reading*, de Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 1 732 641).

Els *dNTPs* són de la casa Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 1 581 295).

Els *encebadors* s'han fet sintetitzar per Roche Molecular Biochemicals i les seqüències es mostren en la figura 1.1.3. L'escala de síntesi és 0,01 µmol.

α4:5'CTggATgCggCCgCAATCTTg3'
α5:5'CgTTCACCTCgAgTTTCCTgATggAgAgTTT3'
β6:5'gTCCACCTggTgTTgACCCAATg3'
β7:5'gCCTAAgCggCCgCTTAAgAAg3'
β8:5'CCTATTCTCgAgTCCAgAggTCC3'

Fig. 1.1.3 Seqüència dels encebadors utilitzats per l'amplificació dels gens de eCG (α4, α5, α6, α7 i α8).

En la taula 1.1.3 es mostren les propietats dels encebadors.

Taula 1.1.3. Propietats dels encebadors, obtingudes amb el programa Vector NTi.

Encebador	Nucleòtids	% G+ C	PM (Da)
α 4	21	61,9	6.478,2
α 5	30	46,7	9.281,1
β 6	23	56,5	7.077,6
β 7	22	59,1	6.764,4
β 8	27	51,9	8.288,4

Els encebadors estan a una concentració de 100 nM, la polimerasa 2,5 U/100 µl i els dNTPs 0,2 mM. La concentració de MgCl₂ és l'estàndard per cada enzim (1,5 mM), en tots els casos els tampons de reacció ja el porten. S'utilitzen 40 µl de la reacció de PCR de síntesi que conté el fragment que s'ha d'amplificar.

95 °C 2 min
 95 °C 15" }
 59 °C 30" } x10 cicles
 72 °C 45" }
 72 °C 1 min

Fig. 1.1.4 Esquema del programa utilitzat pel gen α.

Per l'amplificació del gen α s'ha fet una PCR estàndard; amb 0,2 μM dels encebadors $\alpha 4$ i $\alpha 5$ i 10 μl de la reacció de síntesi. El programa ha estat de 10 cicles amb un *hot start* de 2 min, temperatura d'hibridació 59 °C i extensió final de 1 min, tal com mostra l'esquema de la figura 1.1.4.

1.2.4 PCR d'inserció del senyal Kex2

Com s'explicarà en el capítol 2, a la seqüència dels gens cal afegir el senyal de tall de la proteasa Kex2. Per aquest motiu es fa una PCR per cada gen per afegir aquesta seqüència a l'extrem 5 min del gen. La figura 1.1.5 mostra les seqüències dels oligonucleòtids dissenyats amb aquesta finalitat i la taula 1.1.4 les propietats. La PCR es fa amb cada un dels encebadors i $\alpha 4$ o $\beta 7$, segons el gen.

54

Kex2_a: 5'AgTACTgCCTCgAgAAAAgAgAggCTgAAgCTTTTCCTgATggAgAgTTTACAACCTCAAgATTgTC3'
Kex2_b: 5'AgTACTgCCTCgAgAAAAgAgAggCTgAAgCTTCCAgAggTCCATTgAgACCATTg3'

Fig. 1.1.5 . Encebadors utilitzats per la inserció de el senyal Kex2 a cada gen.

Taula 1.1.4 Propietats dels encebadors utilitzats, obtingudes amb el programa Vector NTi.

Encebador	Nucleòtids	% G+ C	PM (Da)	Tm (°C)	Ta (°C)
Kex2_a	66	43,9	20.502,4	63,6	59
Kex2_b	56	50,0	17.408,4	59,9	54

Com a *DNA polimerasa* s'ha utilitzat la *Pwo* DNA polymerase, polimerasa aïllada de *Pyrococcus woesei*, amb activitat *proof reading*, de Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 1 644 947).

Els encebadors estan a una concentració de 100 nM, la polimerasa 2,5 U/100 μl i els dNTPs 0,2 mM. La concentració de MgSO_4 és 20 mM, la recomanada per aquest enzim i que el tampó ja porta.

95 °C 5 min
 95 °C 1min }
 Ta 1 min } x15 cicles
 72 °C 1 min }
 72 °C 5 min

Fig. 1.1.6 Esquema del programa utilitzat.

1.2.5 Gels d'agarosa

Per comprovar la mida dels fragments sintetitzats per PCR s'utilitzen gels d'agarosa al 1,5 % (p/v). S'utilitza agarosa de Sigma-Aldrich (Cat. No. A9311) i es dissol amb el tampó electroforètic TAE 1X. Com a marcador de pes molecular (MW) s'utilitza *Molecular Weight Marker XIII* de Roche Biochemicals (Cat. No. 1 721 925), a la figura 1.1.7 es mostra una fotografia amb la mida de les bandes.

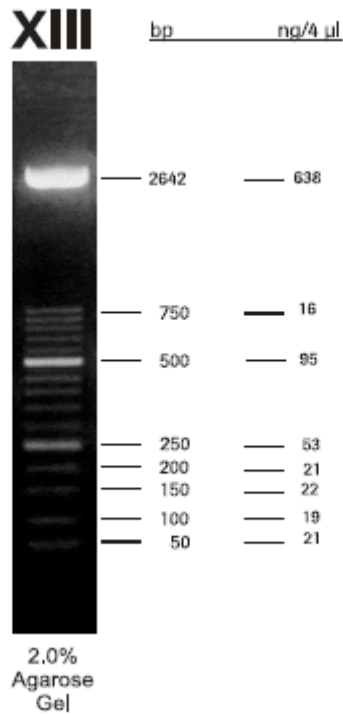


Fig. 1.1.7 Foto de les bandes del marcador *molecular weight marker XIII* de Roche Biochemicals (Cat. No. 1 721 925)

TAMPÓ TAE (TRIS/ACETAT/EDTA) 50X (1L)

- 242 g Tris base (Merck, Cat. No. 1.08382)
- 57.1 ml Àcid acètic glacial (Panreac, Cat. No. 211008)
- 37.2 g de Na₂EDTA·H₂O (Panreac, Cat. No. 131669)

Dissoleu amb aigua destil·lada.

1.3 Resultats i discussió

1.3.1 Disseny dels oligonucleòtids per la síntesi dels gens

Per a obtenir *in vitro* els gens codificadors de les dues cadenes de l'hormona gonadotrofina coriònica equina (*equine chorionic gonadotropin*, eCG) s'ha utilitzat la tècnica de PCR.

La tècnica més clàssica és la obtenció del gen (DNA) a partir d'un teixit o cèl·lules de l'organisme necessari, en aquest cas el cavall. L'obtenció dels gens a partir del DNA genòmic fa que sovint s'obtingui una seqüència més llarga que la que realment es tradueix a proteïna, ja que els gens dels organismes eucariòtics, contenen introns (seqüències que no es tradueixen). És el cas dels gens que s'han d'obtenir en aquest treball, només el de la cadena β en té, l' α no. Per evitar la presència dels introns es podria obtenir el mRNA corresponent a partir del teixit on s'expressa el gen, en aquest cas la placenta d'una euga en el primer trimestre de gestació i retrotranscriure'l a cDNA. L'obtenció del teixit d'origen és difícil.

Per aquest motiu i sabent que les seqüències dels dos gens es troben al *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), s'ha decidit fer la síntesi *in vitro* mitjançant la tècnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Les seqüències disponibles a *Genbank* (*access number* AB000200 per eCG α i S41704 per eCG β) correspon a la seqüència de DNA genòmic de la eCG. No obstant, la variabilitat (polimorfismes) de la seqüència proteica d'aquesta hormona entre les diferents races de cavall que hi pugui haver s'ha assumit que és inexistent o irrellevant.

Fent la síntesi dels gens amb aquesta tècnica es pot manipular la seqüència segons convingui, traient i/o posant dianes de restricció, punts de glicosilació, fusió a altres polipèptids, fusió de les dues cadenes..., així com adaptar l'ús de codó original al de l'hoste. Per aquest últim punt s'ha buscat l'abundància de cada codó en *P. pastoris*, treta de la web www.genscript.com/cgi-bin/tools/codon_freq_table.

Així doncs, hem partit de les seqüències de eCG disponibles al GenBank, mostrades a l'annex 1.2. Són seqüències de DNA, ja que la β conté introns (Sherman GB *et al.*, 1992. Sherman GB *et al.*, 2001). La seqüència de la cadena β se sap que és de *Equus caballus*, mentre que la de la α

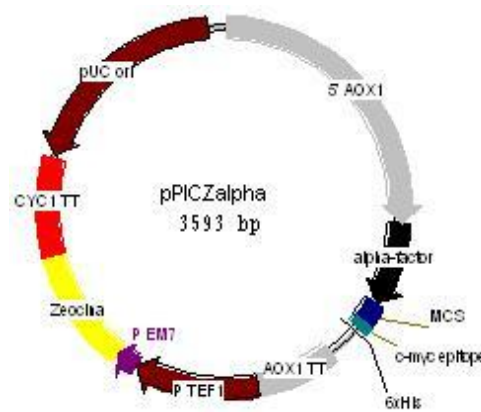


Fig. 1.2.1 Esquema del plasmidi pPICZ α .

només se sap que és de la família dels èquids. Tal com es mostra en l'annex 2, la taxonomia de la família *equidae* té un sol gènere, els diferents components es distingeixen pel subgènere: cavall, ase i zebra.

El primer que s'ha fet amb les seqüències és eliminar els introns del gen β , reduint la seqüència de 1613 bp a 555 bp (figura 1.2.2).

Un cop aquí s'ha eliminat el pèptid senyal i el senyal d'inici de cada gen, ja que el vector d'expressió pPICZ α ja conté els més òptims per l'expressió en llevat.

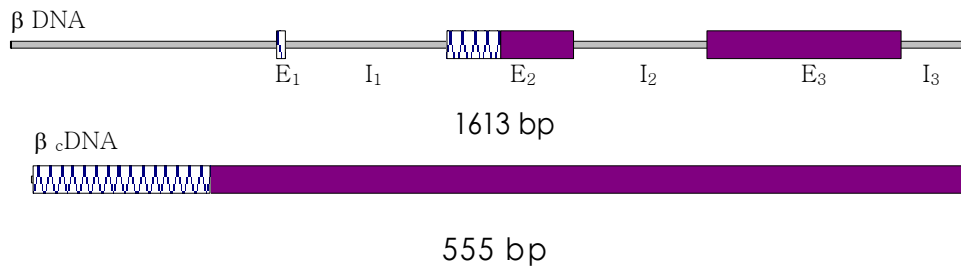


Fig. 1.2.2 Esquema del gen β . Les caixes de quadres representen el pèptid senyal, les de color morat la seqüència codificant. Les línies de color gris són els introns, seqüència no codificant per la proteïna que s'elimina.

A la cadena α també se li ha eliminat el senyal STOP, d'aquesta manera, quan sigui clonada al vector d'expressió pPICZ α (mostrat en la figura 1.2.1) i expressada tindrà la cua d'histidines (cua de 6 histidines que permet la purificació de la proteïna en una columna cromatogràfica d'afinitat en un sol pas). En la cadena β el senyal STOP no s'ha eliminat, està abans de la seqüència codificadora de la cua d'histidines, per tant quan sigui expressada no en tindrà.

Després s'ha adequat la seqüència a l'ús de codó de *P. pastoris*; s'ha analitzat cada codó i comparat amb la freqüència d'ús en *P. pastoris*, mostrada en la taula 1.2.1, les dades de la qual s'han extret de la web http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/codon_freq_table. Aquestes dades es van obtenir el setembre de 2002, moment en què el genoma de *P. pastoris* no estava seqüenciat, per tan, es basava en les seqüències que en aquell moment hi havia disponibles de l'organisme.

S'han substituït els codons segons el criteri explicat en la nota de la taula 1.2.1. S'han fet un total de 28 canvis en la cadena α i 57 a la cadena β d'un total de 96 i 149 codons totals per cada una dels gens. Aquests canvis representen, pel gen de la cadena α , un 89% d'homologia entre la seqüència inicial i la final. Pel gen β , representen un 83% d'homologia.

A més, s'ha eliminat el triplet que indica el punt d'inici de la traducció, AUG, ja que aquestes seqüències s'insereixen en el lloc de clonatge múltiple del pPICZ α de manera que el producte es sintetitza fusionat al pèptid senyal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae*.

Taula 1.2.1 Usatge de codó per *Pichia pastoris*. Els valors són % de cada codó respecte el 100 % de codons que codifiquen per un mateix aminoàcid. Com a codó principal s'anomena el codó més representat per cada aminoàcid. Els codons que es canvien són aquells que la seva representació és inferior al 30 % i els canvis sacrificables són d'aquells codons que tenen una representació entre el 30 i el 50 % i en cas de fer-se donen seqüències no desitjades com dianes de restricció o més de 5 bases iguals seguides.

aa	codó	%	aa	codó	%	aa	codó	%
Ala A	GCA	24,49	Gly G	GGA	32,38	Pro P	CCA	40,46
	GCC	25,47		GGC	13,85		CCC	15,08
	GCG	5,26		GGG	9,77		CCG	9,09
	GCU	44,78		GGU	43,99		CCU	35,37
Arg R	AGA	47,80	His H	CAC	46,69	Ser S	AGC	8,94
	AGG	15,97		CAU	53,31		AGU	14,87
	CGA	10,25	Ile I	AUA	18,45		UCA	18,81
	CGC	5,47		AUC	30,97		UCC	19,90
	CGG	4,40		AUU	50,58		UCG	8,27
	CGU	16,10		CUA	11,75		UCU	29,20
Asn N	AAC	52,68	Leu L	CUC	7,86	Stop -	UAA	53,03
	AAU	47,32		CUG	15,96		UAG	27,27
Asp D	GAC	41,87		CUU	16,59		UGA	19,70
	GAU	58,13		UUA	14,94	Thr T	ACA	24,51
Cys C	UGC	34,57		UUG	32,90		ACC	24,15
	UGU	65,43		Lys K	AAA		46,30	ACG
Gln Q	CAA	62,36	AAG		53,70		ACU	40,92
	CAG	37,64	Met M	AUG	100,00	Trp W	UGG	100,00
Glu E	GAA	57,60	Phe F	UUC	44,45	Tyr Y	UAC	55,44
	GAG	42,40		UUU	55,55		UAU	44,56
						Val V	GUA	15,48
							GUC	22,80
							GUG	19,79
							GUU	41,93

GCU

Codó principal.

Codó que es canvia.

Canvi de codó "sacrificable".

En l'actualitat s'ha seqüenciat el genoma complet de *P. pastoris* (De Schutter *et al.*, 2009) i això ha permès calcular l'ús de codó. Comparant el que s'ha utilitzat en aquest treball i el recentment calculat, cal destacar quatre aminoàcids on la freqüència d'ús dels codons no és el mateix: Asn, Lys i Tyr tenen dos possibles codons amb una representació bastant semblant, però el codó principal és diferent segons quina de les dues fonts s'utilitza. La Gly té quatre possibles codons, els dos més abundants canvien segons la font. Aquests quatre canvis no fan que s'hagi mantingut cap codó minoritari, només que enlloc de tenir el codó principal es tingui un codó secundari, que té una abundància del 30 %.

S'utilitza la diana *Xho* I per fer el clonatge a l'extrem 5' de la seqüència perquè, com mostra la figura 1.2.3, és l'única diana que permet que hi hagi el senyal de tall de la proteasa Kex2 sense que hi hagin aminoàcids addicionals a l'extrem N-terminal del producte secretat. D'aquesta manera, durant el procés de secreció de la proteïna fusionada a el senyal de secreció, factor α , aquesta diana és reconeguda i permet la separació de la proteïna del factor α , obtenint, així, la proteïna sense cap seqüència addicional. Aquesta seqüència s'afegirà un cop es tingui cada gen sintetitzat.

Però quan es digereix el plasmidi amb l'enzim *Xho* I, s'elimina aquesta seqüència, per això cal afegir-la a l'extrem 5' dels dos gens.

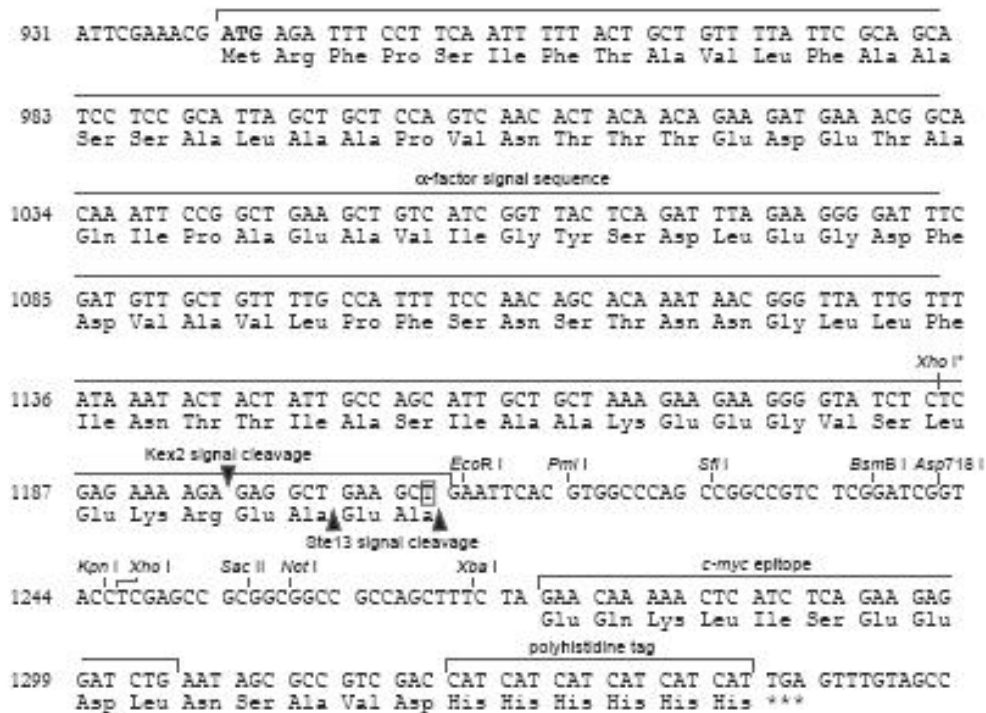


Fig. 1.2.3 Seqüència de la regió de clonatge múltiple del plasmidi pPICZ α . La primera regió és la seqüència del senyal de secreció, el segueix la diana de la proteasa Kex2, després la regió que serà l'epítoc de reconeixement de l'anticòs C-myc i la cua de 6 histidines.

Un cop fetes aquestes modificacions, s'han analitzat les dianes de restricció presents. A la cadena α no n'hi havia cap d'enzims utilitzats freqüentment en experiments de manipulació de DNA, mentre que a la β hi havia quatre dianes rellevants, dues de les quals s'han eliminat perquè són d'enzims àmpliament utilitzats i podrien dificultar-nos la seva clonació. Finalment s'afegeixen les dianes *Xho* I i *Not* I a 5' i 3', respectivament, per poder-los clonar al plasmidi. L'esquema del gen β es mostra en la figura 1.2.4, la seqüència resultant per cada gen es mostra a l'annex 1.3.



Fig. 1.2.4 Esquema de la seqüència del gen β . En el dibuix superior es veuen les dianes més rellevants resultants després del canvi de codons, en el dibuix inferior es mostren les dues dianes que s'han deixat, les dues que s'han afegit pel clonatge i com també s'ha eliminat el codó d'inici, que ja porta el plasmidi pPICZ α .

Tot i aquestes modificacions el la seqüència de cada un dels gens s'ha mantingut una homologia del 89 i 83 % pel gen α i β , respectivament. Aquests canvis han implicat, també, una reducció en el contingut de G+C de cada una de les seqüències; d'un 64, % al 50,4 % per la cadena α i d'un 48,6 % a un 39,2 % per la cadena β . Cal afegir que el contingut en G+C del genoma complet de *P. pastoris* és del 41,1 % (De Schutter K *et al.*, 2009), així doncs, les modificacions fetes en les dues seqüències ha permès que aquest valor s'aproximi més al del genoma complet.

Un cop les seqüències dels gens eCG α i β han estat modificades segons els nostres requeriments, s'ha fet el disseny dels oligonucleòtids per la seva síntesi (figura 1.2.5): Els oligonucleòtids tindran de 110 a 120 bp i cal que hi hagi un solapament d'uns 20 nucleòtids entre ells (Mattos AP *et al.*, 2002). A més, caldrà tenir en compte que hi hagi extrems 3' que permeten l'extensió de la polimerasa i pugui completar la síntesi; hi haurà d'haver dos oligonucleòtids amb la seqüència reversa (groc i blau) que s'alternen amb els de la seqüència original. S'han dissenyat 4 oligonucleòtids per cada gen:

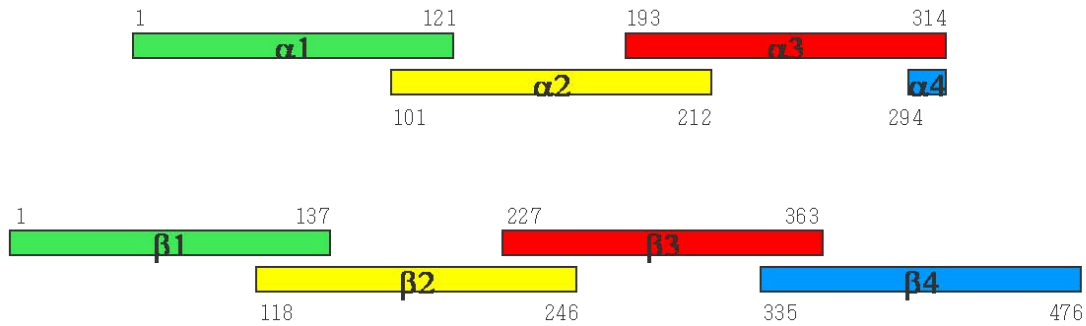


Fig. 1.2.5 Esquema dels oligonucleòtids per la síntesi de cada gen. A l'inici i al final de cada un s'indica la posició dins el constructe un cop sintetitzat.

En el cas del gen α , el quart primer (blau) només és dels 20 nucleòtids que es solapen, no aporta més llargada al gen, com es veu en la figura 1.2.5.

1.3.2 Síntesi dels gens

1.3.2.1 Síntesi del gen α

Un cop sintetitzats els oligonucleòtids d'acord amb el disseny, es comencen a fer les proves per unir els diferents fragments: la primera estratègia seguida és realitzar una sola reacció de PCR amb una barreja dels quatre oligonucleòtids a concentracions equimolars amb una temperatura d'hibridació que s'adeqüi a les tres fusions (figura 1.2.6 A).

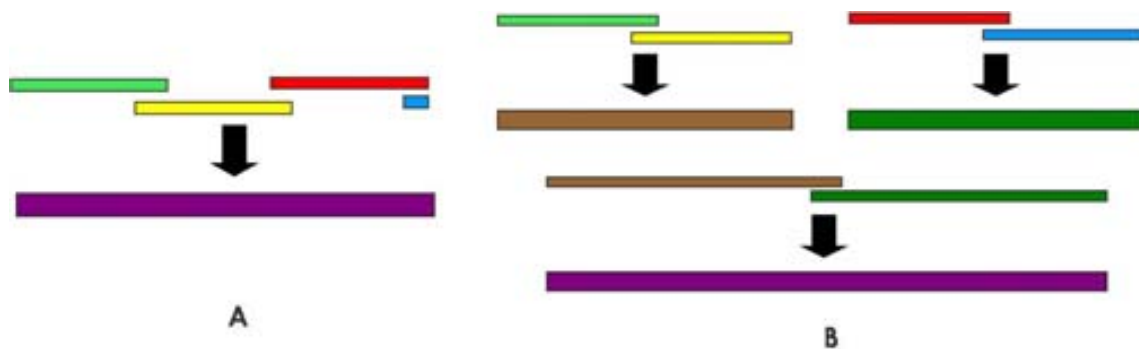


Fig. 1.2.6 Esquema de les dues estratègies de síntesi seguides. A: Síntesi en un sol pas. B: Síntesi seqüencial.

Com que no resulta, es decideix passar a la segona estratègia, fer les unions dels oligonucleòtids seqüencialment: es fan parelles d'oligonucleòtids com mostra la figura 1.2.6 B: 1 i 2 en una reacció i 3 i 4 en una altra i per cada gen. Un cop s'obtenen els nous fragments d'unió es purifiquen des d'un gel d'agarosa i es passa a la següent reacció de fusió que ha de donar el gen sencer. Aquest també es purifica d'un gel d'agarosa, per assegurar que no hi hagi restes dels oligonucleòtids ni subproductes de la reacció.

Taula 1.2.2 Temperatures d'hibridació de les diferents reaccions de PCR fetes per sintetitzar el gen α . S'han determinat amb polimerasa *High Fidelity Expand*.

Reacció	T hibridació (°C)
α 1-2	50
α 3-4	60
α 1-4	55
Amplificació α	59

Inicialment, s'han establert les condicions òptimes per cada reacció amb la polimerasa *High Fidelity* de Roche, bàsicament la temperatura d'hibridació, que es mostra en la taula 1.2.2. Un cop establertes s'ha volgut repetir amb la polimerasa KOD, però els resultats no han sigut els esperats; la puresa dels productes obtinguts no és massa bona i això es visualitza amb les bandes més difoses en el gel d'agarosa mostrat en la fig. 1.2.7.

62

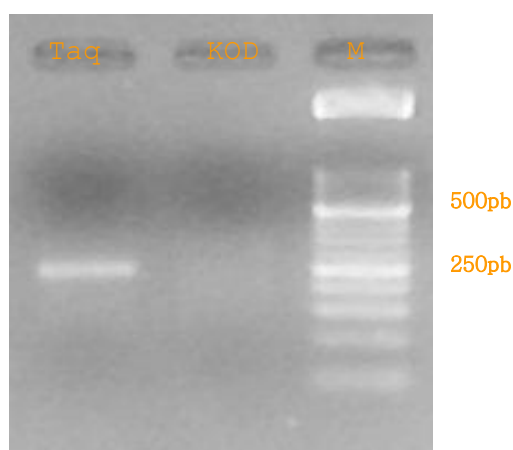


Fig. 1.2.7 Gel d'agarosa al 1,5 % que mostra el resultat de la síntesi d'un fragment de DNA corresponent a eCG β 1-2 amb les dues DNA polimerases, utilitzant la Taq (*High Fidelity* de Roche) obtenim una banda molt ben definida, utilitzant la KOD (Bionova) la banda és molt difosa i costa de veure per ser poc intensa.

Tot i obtenir fragments de DNA menys purs, es canvia de polimerasa perquè la KOD té una fidelitat de còpia més alta que la *High Fidelity*.

Tot i que la figura mostra el resultat per un fragment de eCG β , amb la síntesi del gen α passa el mateix; el DNA que s'obté no és prou pur i es veu un *smear* (figura 1.2.8).

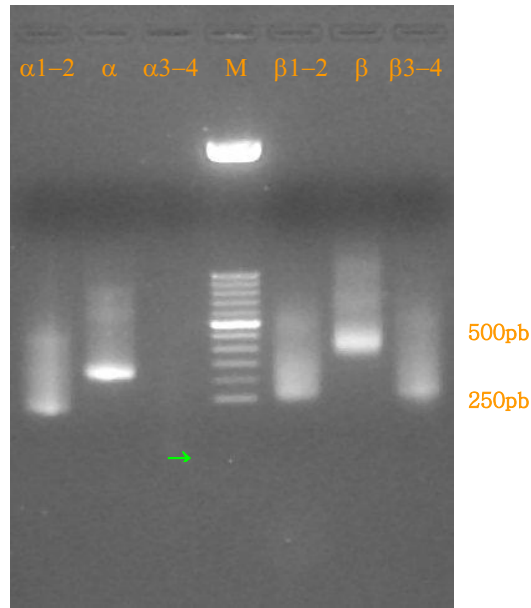


Fig. 1.2.8 Gel d'agarosa al 1,5 % que mostra els productes d'amplificació de les diferents parts de la síntesi dels gens amb la polimerasa KOD seguint l'estratègia descrita en la figura 1.2.6B. El producte $\alpha 3-4$ no es veu perquè és un fragment petit, igual que les bandes més petites de 250 bp del marcador, però està marcat amb \rightarrow .

Per tal d'amplificar el fragment de DNA corresponent al gen eCG α a partir del DNA generat en aquesta reacció, es dissenya un nou encebador, $\alpha 5$, per amplificar el gen sencer juntament amb l' $\alpha 4$ (figura 1.2.9). D'aquesta manera enriqueim el fragment corresponent al producte desitjat i apareix com una banda més ben definida en el gel (figura 1.2.10).

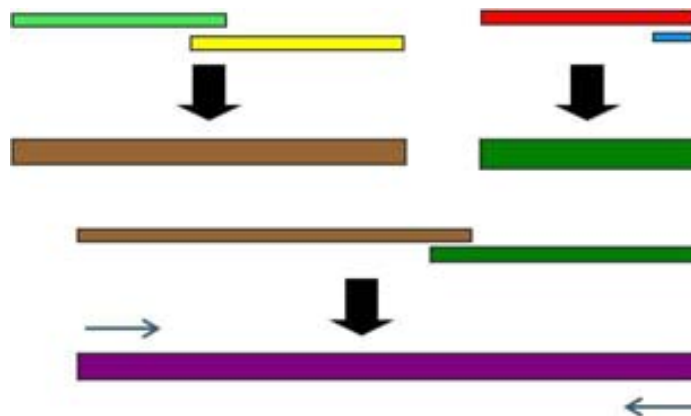


Fig. 1.2.9 Esquema de la síntesi del gen α amb la polimerasa KOD: un cop sintetitzat el gen es fa una amplificació amb els encebadors $\alpha 4$ i $\alpha 5$, mostrats com a fletxes blaves en el producte final de color morat.

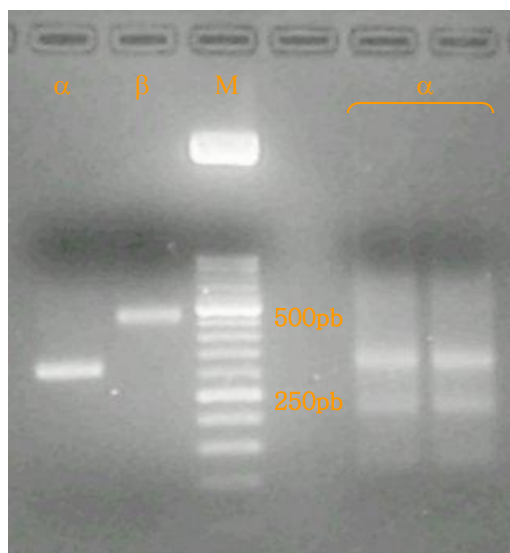


Fig. 1.2.10 Gel d'agarosa al 1,5 %. En els carrils de l'esquerra del marcador (M) es veuen els dos gens, en els carrils de la dreta hi ha el gen α sense amplificar.

Tot i que s'ha arribat a clonar el gen eCG α obtingut amb la polimerasa *KOD*, els resultats de seqüenciació mostren que hi ha canvis de bases, mutacions possibles en la tècnica de PCR, però també hi ha insercions i delecions, mutacions gens freqüents en aquesta tècnica. Aquest tipus de mutacions indiquen un problema en la hibridació entre els encebadors: la temperatura d'hibridació no és suficientment alta perquè la reacció sigui totalment específica i doni el producte desitjat. Per tal d'obtenir millors resultats es canvia la polimerasa altre cop; ara s'utilitza *Pwo*, també amb activitat *proof reading* i, com que porta un tampó diferent, s'espera que la reacció pugui tenir lloc en unes condicions tals que afavoreixin la reducció dels errors de polimerització. Però l'ús de la polimerasa *Pwo* no és suficient per resoldre aquests problemes; per això es canvia el programa de PCR (figura 1.2.11), on els 10 cicles finals de la PCR són a una temperatura més alta per fer la reacció d'hibridació dels encebadors més astringent, és a dir, minimitzar el nombre de possibles hibridacions de replicons no homòlegs als encebadors. Durant els primers cicles de la PCR, els fragments de DNA majoritaris són els encebadors originals, entre els quals hi ha un solapament de només 20 bp, però a mida que transcorren els cicles de síntesi, la fracció de fragments de DNA corresponents al producte fusionat esdevé cada vegada major. Per tant, les regions de solapament entre aquests fragments (que actuen ara com a DNA motlle) i els oligonucleòtids ara serà de 110 bp; per això es puja la temperatura d'hibridació en els darrers cicles de la PCR, això afavoreix que el nou tipus d'hibridació es doni en condicions més astringents, minimitzant així les hibridacions entre regions sense 100 % de semblança de seqüència. Al mateix temps, en aquestes condicions, la hibridació entre els encebadors originals no serà possible.

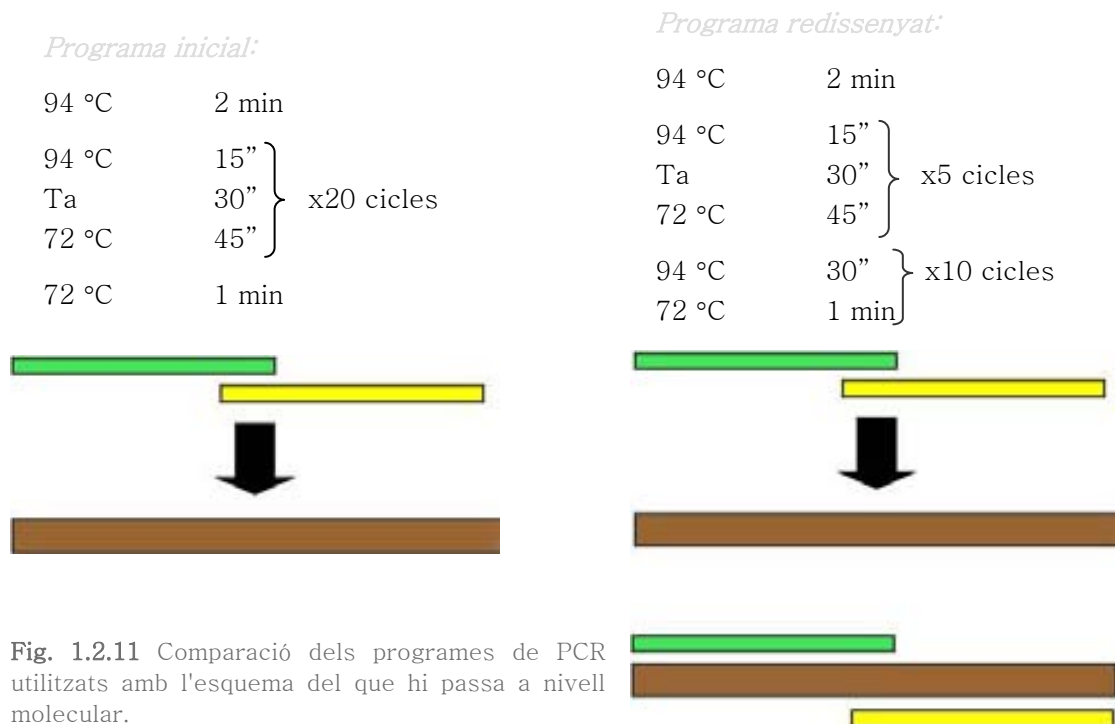


Fig. 1.2.11 Comparació dels programes de PCR utilitzats amb l'esquema del que hi passa a nivell molecular.

Aquest canvi en el programa ha fet que els fragments obtinguts en cada una de les etapes de síntesi no siguin tan purs, com ho mostren les bandes del gel de la figura 1.2.12, però el rendiment de la reacció ha permès retallar i purificar-ne els fragments d'interès. No s'ha fet amplificació d'aquests fragments purificats per evitar fer més cicles de PCR, que poden introduir més mutacions.

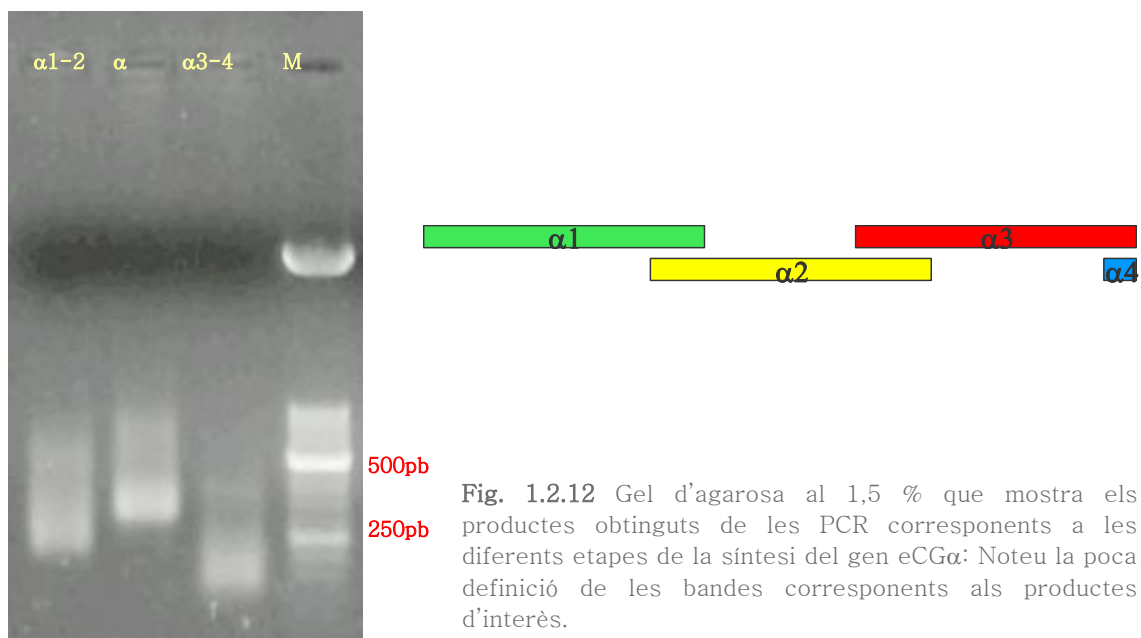


Fig. 1.2.12 Gel d'agarosa al 1,5 % que mostra els productes obtinguts de les PCR corresponents a les diferents etapes de la síntesi del gen eCG α : Noteu la poca definició de les bandes corresponents als productes d'interès.

Tot i la purificació ha calgut amplificar el producte final obtingut; les reaccions segueixen el programa mostrat a la figura 1.2.13 i la taula 1.2.3. Per la reacció de amplificació s'ha utilitzat el programa estàndard, explicat en el capítol de materials i mètodes.

94 °C	2 min	
94 °C	15"	} x5 cicles
Ta	30"	
72 °C	45"	
94 °C	30"	} x10 cicles
72 °C	1 min	
72 °C	1 min	

Fig. 1.2.13 Esquema del programa seguit en la síntesi del gen α .

Taula 1.2.3 Temperatures d'hibridació utilitzades en cada reacció de la síntesi del gen α .

Reacció	T hibridació (°C)
α 1-2	50
α 3-4	60
α	55
Amplificació α	59

1.3.2.2 Síntesi del gen β

La síntesi del gen β ha estat realitzada amb una estratègia per etapes equivalent a la implementada pel gen α , és a dir, ja no s'ha intentat realitzar la síntesi directa amb els quatre encebadors junts en una sola reacció.

L'optimització inicial de condicions amb la primera polimerasa *High Fidelity* de Roche ha estat més problemàtica que pel cas del gen α : a part de les proves a diferents temperatures d'hibridació, com s'ha fet pel gen α , pel gen β també s'ha provat d'afegir diverses substàncies a la reacció de PCR que en poden modificar les condicions i donar un resultat diferent: DMSO al 10 % (v/v), formamida al 2.5% (v/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 o 30 mM. També s'han canviat les concentracions de MgCl_2 : 0,75, 1,5 o 3 mM. Cap d'aquestes modificacions ha millorat el resultat, però.

Com que en la síntesi del gen α s'ha vist que les condicions establertes amb la *High Fidelity* de Roche no són les mateixes que per la polimerasa KOD s'han continuat fent proves amb el nou enzim. Per la unió β 1-2 si que s'han mantingut les mateixes, però per la unió β 3-4 no, que es detallen a continuació. El rendiment de la síntesi del fragment β 3-4, ja feta amb la nova polimerasa, ha sigut molt baix, per tal d'augmentar-lo s'ha dissenyat un nou encebador ($\beta 33$) més llarg que $\beta 3$ (figura 1.2.14), així la regió d'unió amb $\beta 4$ és 9 nucleòtids més llarg i la temperatura d'hibridació és més alta, d'aquesta manera l'especificitat o astringència de la reacció de PCR és més gran i el fragment resultant hauria de ser més pur, donant una banda més ben definida.



Fig. 1.2.13 Diferències entre els encebadors $\beta 3$ i $\beta 33$.

Però tot i així, no s'obtenen bons resultats. Per això es dissenyen nous oligonucleòtids per amplificar aquest fragment ($\beta 6$ i $\beta 7$). El fragment $\beta 3-4$ amplificat amb aquesta parella d'oligonucleòtids s'utilitza en el següent pas de síntesi del gen β .

No obstant, les bandes mostrades en el gel d'agarosa de la figura 1.2.8 han mostrat que el rendiment de la síntesi de la cadena β no és prou bo. Per això, igual que en el gen α , es dissenyen dos encebadors per reamplificar el gen sencer: $\beta 8$ i el mateix $\beta 7$.

D'aquesta manera s'obté el gen sencer i es clona a pPICZ α . Però els resultats de seqüenciació de les construccions pPICZ α eCG β mostren el mateix que amb el gen α : hi ha els tres tipus de mutacions. Per tant, es s'ha decidit canviar la polimerasa, utilitzant ara la *Pwo*, tal i com s'ha fet amb la síntesi del gen α .

El procés de síntesi segueix la mateixa estratègia que el gen α ; s'ha canviat de programa i s'ha fet l'amplificació del gen sencer. Però el que dóna un resultat bo pel gen α no ha resultat pel β : cap dels quatre clons seqüenciats té la seqüència completament correcta. Encara ha calgut fer més modificacions: s'ha substituït l'oligonucleòtid $\beta 2$, de 129 nucleòtids, per $\beta 22$, de 165. Aquest nou oligonucleòtid té una seqüència de solapament amb $\beta 1$ i $\beta 3$ més llarga, per tant la temperatura d'hibridació és més alta (de 50-55 °C a 70 °C) i la reacció més astringent o específica (figura 1.2.15). També s'ha reduït la concentració de dNTPs de 400 a 200 nM i s'ha reduït el nombre de cicles (de 30 a 15). La reducció de dNTPs es fa perquè un excés pot donar errors de seqüència sintetitzada i redueix l'especificitat de la reacció. Com que així dóna més bon rendiment es pot reduir el nombre de cicles, que també reduirà la possibilitat de trobar mutacions.

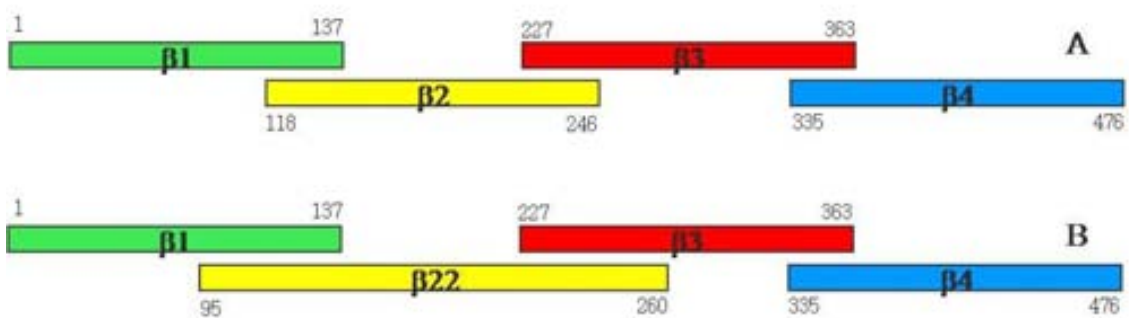


Fig. 1.2.14 Esquema dels oligonucleòtids utilitzats per la síntesi del gen β . A mostra l'esquema original, B mostra el nou esquema, on $\beta 2$ s'ha allargat perquè la zona de solapament amb $\beta 1$ i $\beta 3$ sigui més llarga i la temperatura d'hibridació sigui més alta. A l'inici i al final de cada un s'indica la posició dins el constructe un cop sintetitzat.

Amb aquests nous oligonucleòtids només es fa un sol tipus de cicle (figura 1.2.11), a 70 °C de temperatura d'hibridació, ja que el nou oligonucleòtid ja s'ha fet perquè totes les temperatures d'hibridació entre oligonucleòtids siguin la mateixa. Les bandes dels fragments obtinguts no són molt netes, però el rendiment és suficient per fer la lligació amb el plasmidi pUC18 (s'ha canviat

per facilitar el clonatge que, com s'explica en el capítol 2, també ha presentat certes dificultats) i fer-los seqüenciar. La seqüenciació mostra que un dels cinc clons seleccionats té la seqüència correcta. Així doncs, el programa utilitzat per la síntesi del gen β es recull en la figura 1.2.16. En aquest cas no cal especificar temperatures d'hibridació per cada reacció, ja que són la mateixa. A més no ha calgut una amplificació final, fet que podria perjudicar el bon resultat de la seqüència. L'esquema de síntesi pel gen β és el que es planteja a la figura 1.2.6B.

	94 °C	5 min	
	94 °C	15"	
Fig. 1.2.16	70 °C	30"	x15 cicles
Esquema del	72 °C	45"	
programa de PCR utilitzat per la	72 °C	1 min	
síntesi del gen β .			

1.3.3 Inserció del senyal Kex2

Com ja s'ha comentat abans, la seqüència que donarà el senyal de diana Kex2 s'afegeix un cop ja es tenen els dos gens sintetitzats, però abans de clonar-los al plasmidi. L'amplificació del gen α s'ha fet tal com es mostra en l'apartat de materials i mètodes, però pel gen β ha calgut allargar la PCR de 15 a 20 cicles. Pels dos gens es fa la PCR que funciona per triplicat, així s'obté prou quantitat per poder-los clonar. No es té cap fotografia del gel que mostra l'amplificació dels dos gens

1.4 Conclusions

S'han obtingut els dos gens que codifiquen per l'hormona eCG mitjançant la seva síntesi *in vitro* basada en la tècnica de PCR. A partir de l'estratègia original de disseny d'oligonucleòtids i condicions de PCR (polimerasa, concentració de dNTPs i altres additius, N^o de cicles), ha calgut optimitzar tots el paràmetres per tal d'arribar a sintetitzar els dos gens amb suficient grau de puresa i quantitat.

La síntesi *in vitro* ha permès optimitzar les seqüències dels gens α i β per a ser expressades extracel·lularment en *P. pastoris*.

Capítol 2. Obtenció de les soques productores

2.1 Introducció

Un cop tenim sintetitzats els dos gens que codifiquen per l'hormona eCG, cal clonar-los al vector d'expressió, en el nostre cas pPICZ α . Ha calgut un pas previ de clonatge en el vector pUC18, per poder obtenir suficient DNA per obtenir els vectors finals amb els dos gens de eCG i, finalment, el vector que conté els dos gens alhora. Aquest vector s'introduirà a les cèl·lules de *P. pastoris* per poder produir eCG recombinant.

2.2 Materials i mètodes

2.2.1 Soques

Com a soca de *E. coli* s'utilitza DH5 α . El seu genotip és F⁻ ϕ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1*, però les modificacions genètiques més importants són:

→ Deleció en el gen *lacZ*, això permet ser utilitzada amb vectors que tenen el sistema de detecció de colònies blaves i blanques que s'explica més endavant.

→ Mutació en el gen *recA1* que augmenta l'estabilitat dels inserts.

→ Mutació en el gen *endA1* permet l'obtenció d'una gran quantitat de plasmidi i de bona qualitat.

Per *P. pastoris* s'utilitza la soca X-33, de fenotip salvatge.

74

2.2.2 Vectors

El vector d'expressió que s'utilitza és pPICZ α A de Invitrogen (Cat. No. V195-20). En la figura 2.1.1 es mostra l'esquema del vector.

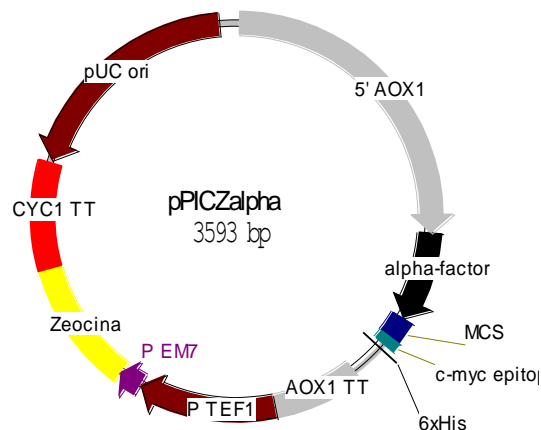


Fig. 2.1.1 Esquema del vector d'expressió pPICZ α . En gris es mostra el promotor *AOX1* i el seu terminador, en negre el factor d'excreció original de *S. cerevisiae*. MCS és el lloc de clonatge múltiple, c-myc és un epítop de reconeixement per un anticòs. En groc es mostra el gen que codifica per la resistència a la zeocina, utilitzat com a marcador de selecció. En marró s'indica l'origen de replicació del plasmidi en *E. coli*.

En la figura 2.1.2 es mostra la seqüència de la regió de clonatge múltiple del plasmidi. S'hi pot veure la seqüència del factor α , un senyal per tal que la proteïna sigui excretada al medi, aquesta seqüència conté el codó d'inici de

traducció de la proteïna (ATG), per tant no cal posar-la en la seqüència del gen. També inclou el senyal de tall Kex2 i Ste13, dues proteases que tallen en el punt indicat amb una fletxa negra i que eliminen tota aquesta senyal de la proteïna madura. Cal clonar la proteïna a *Xho* I per evitar agregar aminoàcids a l'extrem N-terminal, ja que la resta de dianes de restricció no permeten la presència d'aquestes dianes de tall de les proteases Kex2 i Ste13 i la proteïna madura inclouria tot el factor α .

Com s'explica més endavant els enzims que s'utilitzen per insertar els gens són *Xho* I i *Not* I. El fet d'utilitzar el primer s'eliminen les seqüències que reconeixen les proteases Kex2 i Ste13, per tant caldrà restituir-les al clonar-hi els gens α o β .

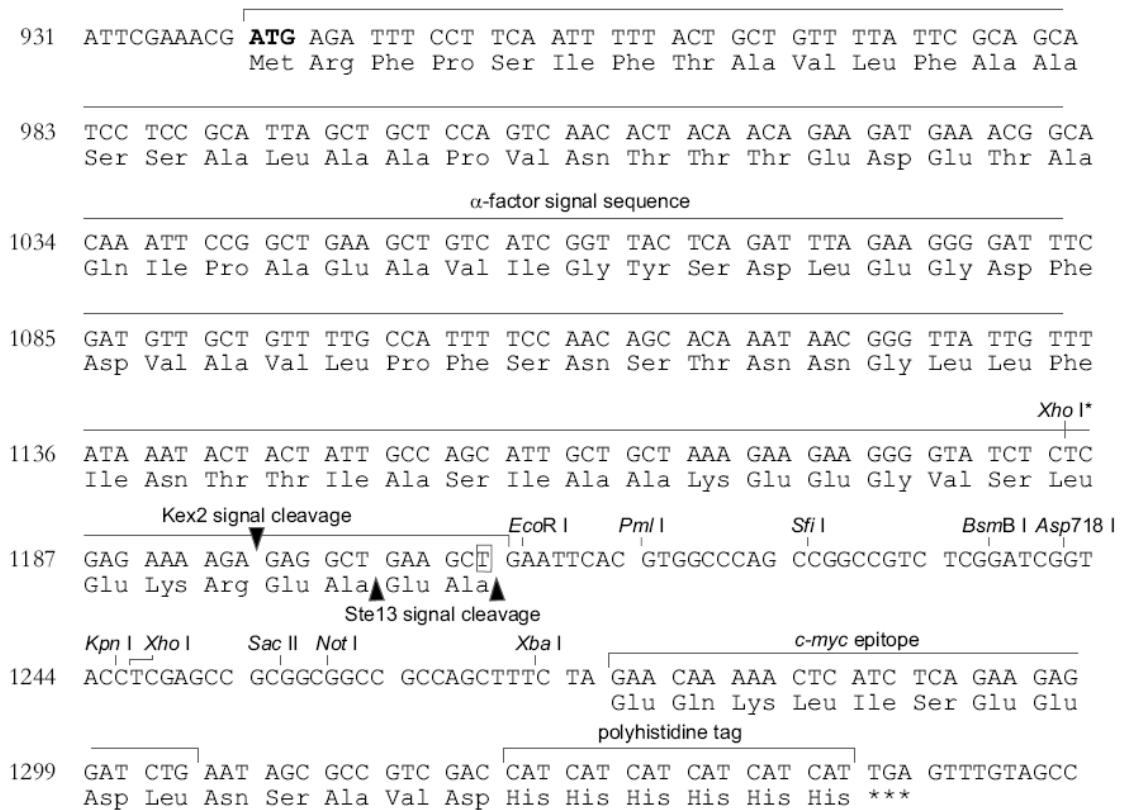


Fig. 2.1.2 Regió de clonatge múltiple del plasmidi pPICZ α A.

S'ha utilitzat un kit comercial de Roche (Cat. No. 1 939 645) per a clonar productes de PCR, però com que no funciona s'utilitza el plasmidi pUC18.

El plasmidi pUC18, de Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 0885819) i mostrat en la figura 2.1.3. s'utilitza per al clonatge de fragments de PCR d'extrem rom, com a pas previ al seu clonatge al vector d'expressió D'aquí s'aïlla i es clona cada gen a pPICZ α . Com que pUC18 permet una selecció dels clons positius d'una manera visual ja en la placa (com s'explica en l'apartat de resultats) es pot agilitar el procés.

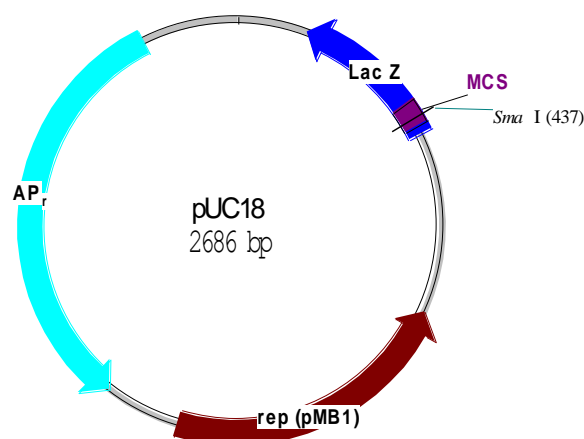


Fig. 2.1.3 Esquema del plasmidi pUC18. En blau clar es mostra el gen de resistència a l'antibiòtic ampicil·lina (marcador de selecció), en marró l'origen de replicació, en blau fosc el gen *lac Z*, que permet la diferenciació dels clons amb el plasmidi que conté el gen en el punt de clonatge múltiple (MCS), marcat en lila. També es marca la diana *Sma I*, que s'utilitza per linealitzar el plasmidi i introduir-hi el gen.

2.2.3 Reaccions de modificació de DNA

Per a la *digestió* de DNA plasmídic s'han utilitzat els enzims de restricció *BamH I*, *Xho I*, *Not I*, *Eco RI*, *Pst I*, *Sma I*, *Bgl II* i *Sac I* de Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 220 612, 899 194, 1 014 706, 703 737, 621 625, 220 566, 348 767 i 669 792, respectivament) i *Sal I* de GE Healthcare (Cat. No. E 1080Y). La reacció es fa 1h a 37 °C, excepte *Sma I* que és a temperatura ambient (25 °C), segons les especificacions del fabricant.

Per la *lligació* s'utilitza la lligasa de la casa Fermentas (Cat. No. EL0015) o de Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 481 220). La relació plasmidi:insert és 1:5-10 i 10 % del volum total de PEG 4000 al 50 % (v/v) quan es lliguen extrems roms (Sambrook J *et al.*, 1989). Es deixa la reacció tota la nit a 16 °C.

La *desfosforilació* dels extrems d'una cadena de DNA es fan amb la fosfatasa alcalina de Roche Molecular Biochemicals (Cat. No. 713 023). Es segueixen les condicions indicades: 1h d'incubació a 37 °C.

2.2.3.1 Purificació de DNA

S'han utilitzat els kits de Qiagen següents: QiA quick gel Extraction kit (Cat. No. 28706) per purificar el DNA d'un gel d'agarosa i MiniElute PCR purification Kit (Cat. No. 28004) per treure el tampó d'una reacció (PCR, lligació, digestió) i poder-ne fer una altra.

Per a l'extracció del DNA plasmídic de *E. coli* s'ha utilitzat un kit comercial de la casa Macherey-Nagel: Nucleospin Plasmid (Cat. No. 740 588).

2.2.4 Introducció del DNA a les cèl·lules (Transformació)

Per introduir en DNA dins les cèl·lules, ja sigui les de *P. pastoris* o les de *E. coli*, s'utilitza un protocol estàndard d'electroporació, mitjançant l'electroporador Gene-Pulser II de Bio-Rad, seguint les instruccions del fabricant de l'equip.

Per a preparar les CÈL·LULES COMPETENTS DE *E. COLI* s'ha seguit el següent protocol:

1. Inoculeu 100 ml de medi LB amb 100 µl del stock -80 °C i incubeu o/n (18h) a 37 °C, a 200 rpm.
2. Inoculeu 20 ml de medi YT 2x amb 200 µl del cultiu de nit. Deixeu créixer amb agitació (200 rpm) fins una OD₆₀₀ de 0,6.
3. Centrifugueu 10 min a 5000 rpm i 4 °C.
4. Decanteu el sobrenedant i resuspeneu les cèl·lules amb 5 ml d'aigua.
5. Centrifugueu 10 min a 5000 rpm i 4 °C.
6. Decanteu el sobrenedant i resuspeneu les cèl·lules amb 2 ml d'aigua.
7. Afegiu glicerol fins el 10 % del volum, feu alíquotes i congeleu a -80 °C.

Per la TRANSFORMACIÓ:

1. Deixeu descongelar les cèl·lules en gel i refredeu la cubeta d'electroporació de 0,2 cm d'amplada.
2. Afegiu 1-5 µl de DNA a les cèl·lules i passeu-ho a la cubeta.
3. Descarregueu V=2500 V, C=25 µF i R=200 Ω.
4. Afegiu de seguida, 0,5 ml de LB escalfat a 37 °C i incubeu a aquesta temperatura durant 1 h.
5. Sembreu en plaques de LB + Ampicil·lina (Sigma-Aldrich Cat. No. A9518), a una concentració final de 50 µg/ml, o LB *low salt* + Zeocina (Invitrogen Cat. No. R250-01), a una concentració final de 25-50 µg/ml.

MEDI LB

- 0,5 % (p/v) Extracte de llevat (Oxoid, Cat. No. L21)
- 1 % (p/v) Triptona (Oxoid, Cat. No. L42)
- 1 % (p/v) NaCl (Panreac, Cat. No. 141659)

Dissoleu-ho tot en aigua destil·lada i autoclaveu.

MEDI YT 2X

- 1 % (p/v) Extracte de llevat (Oxoid, Cat. No. L21)
- 1,6 % (p/v) Triptona
- 0,5 % (p/v) NaCl

Dissoleu-ho tot en aigua destil·lada i autoclaveu.

Per preparar les CÈL·LULES COMPETENTS DE *P. PASTORIS* s'ha seguit el protocol de cèl·lules electrocompetents del llibre *Pichia Protocols* (Cregg JM and Russell KA, 1998).

Per a la transformació de *P. pastoris* amb DNA circular, el mètode de preparació de les cèl·lules competents s'ha modificat, afegint en aquest cas LiAc (Sigma-Aldrich Cat. No. 450189):

1. Inoculeu 100 ml de YPD amb 50 µl un stock de cèl·lules -80 °C i incubeu o/n a 30 °C i 200 rpm d'agitació.
2. Inoculeu 100 ml de YPD fresc amb aquest cultiu de nit i incubeu a 30 °C fins a una OD₆₀₀ de 1,5.
3. Centrifugueu les cèl·lules a 4000g i a 4 °C.
4. Resuspeneu en 30 ml de LiAc 100 mM, DTT (Sigma-Aldrich Cat. No. D9779) 10 mM, Sorbitol (Sigma-Aldrich Cat. No. S-1876) 0,6 M i Tris·HCl (Merck Cat. No. 108382) 10 mM pH=7,5. Deixeu-ho a temperatura ambient durant 30 min.
5. Centrifugueu a 4000g i 4 °C.
6. Feu tres rentats amb sorbitol 1 M fred (4 °C). Renteu i centrifugueu.
7. En l'última centrifugada resuspeneu en 1,5 ml de sorbitol 1 M fred i feu alíquotes; podeu transformar directament i/o congelar a -80 °C.

Per la TRANSFORMACIÓ:

1. Deixeu descongelar les cèl·lules en gel i refredeu la cubeta d'electroporació de 0,2 cm d'amplada.
2. Afegiu 1-5 µl de DNA a les cèl·lules i passeu-ho a la cubeta.
3. Descarregueu V=1.500 V, C=25 µF i R=200 Ω.
4. Afegiu, de seguida, 1 ml de Sorbitol 1 M fred.
5. Sembreu seguidament en plaques de YPD + Zeocina, a una concentració final de 100 µg/ml.

2.2.5 Cultiu en placa

El creixement per la selecció de clons es fa en plaques, en medi LB per *E. coli* i en medi YPD per *P. pastoris*.

PLAQUES LB (200 ml)

- o 2,8 g Agar (Oxoid, Cat. No. L11)
- o 4 g Extracte de llevat (Oxoid, Cat. No. L21) (2 %, p/v)
- o 8 g Triptona (Oxoid, Cat. No. L42) (4 %, p/v)
- o 8 g NaCl (Panreac, Cat. No. 141659) (4 %, p/v)

Dissoleu tot en aigua destil·lada i autoclaveu. N'hi ha prou per fer unes 8-10 plaques.

PLAQUES YPD (200 ml)

- o 2,8 g Agar
- o 2 g Extracte de llevat (1 %, p/v)
- o 4 g Peptona (2 %, p/v)
- o 4 g Glucosa (Panreac, Cat. No. 201341) (2 %, p/v)

Dissoleu l'extracte de llevat, la peptona i l'agar en aigua i autoclaveu-ho. Dissoleu la glucosa en aigua, separada de la resta i esterilitzeu-la per filtració. Quan es refreda (sense que l'agar solidifiqui), afegiu la solució de glucosa a la resta. N'hi ha prou per fer unes 8-10 plaques.

Per obtenir un clon pur de *Pichia pastoris* cal fer un procés de RESSEMBRA; consisteix en agafar la colònies en qüestió i sembrar-la en una nova placa perquè creixin noves colònies aïllades. Aquest procés es repeteix un total de 3 vegades. Això assegura tenir un clon pur, ja que *P. pastoris* pot créixer formant agregats.

2.2.5.1 Selecció de clons d' *E. coli* amb pUC18

Quan s'utilitza el vector pUC18, derivats seus o lligacions amb aquest plasmidi, la transformació d' *E. coli* es sembla en plaques de LB amb ampil·lina i X-gal (Sigma-Aldrich, Cat. No. B4252) a la superfície: escampeu uniformement 40µl de X-gal a una concentració de 20 mg/ml (dissolt en dimetilformamida (Sigma-Aldrich, Cat. No. D4551)). Els clons que creixen a la placa és que contenen el plasmidi; a més es poden distingir dos tipus de clons: colònies blanques i blaves; les primeres corresponen a transformants en els quals el plasmidi té el gen forà incorporat i, per tant, s'ha interromput el gen de *lacZ* del vector. Aquestes cèl·lules no podran sintetitzar β-galactosidasa i com a resultat no podran degradar el compost X-gal. Els transformants que tinguin el plasmidi sense insert produiran β-galactosidasa, degradaran el compost X-gal, donant un compost de color blau (les colònies d'aquest tipus seran de color blau).

La comprovació dels clons s'explica més endavant, en aquest mateix capítol i apartat.

2.2.5.2 Selecció de clons amb pPICZα

Per fer la selecció cal posar ZEOCINA (Invitrogen Cat. No. R250-01), un antibiòtic que permet la selecció dels clons que han incorporat el plasmidi pPICZα dels que no (aquests no en són resistents i no poden créixer en presència d'aquest antibiòtic).

La Zeocina és un derivat de la Fleomicina D1. És un quelat de coure bàsic i soluble en aigua que s'ha aïllat de *Streptomyces verticillus*. Aquesta forma és inactiva, però quan entra a la cèl·lula perd l'àtom de coure i és capaç d'unir-se

al DNA i trencar-lo, causant la mort de la cèl·lula. La seva complexa estructura es mostra a la figura 2.1.4.

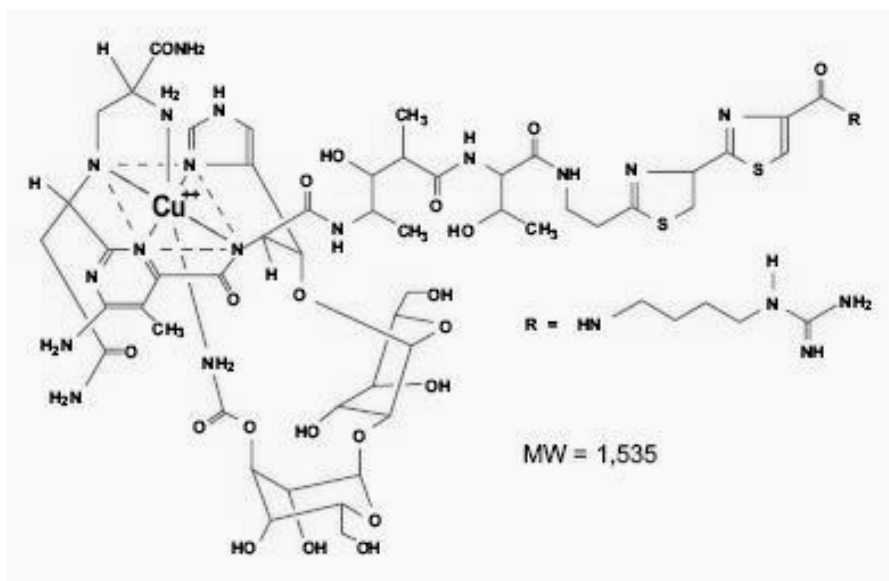


Fig. 2.1.4 Esquema de la molècula de zeocina.

2.2.6 Comprovació dels clons transformats

Per verificar que els transformants (d'*E. coli*) aïllats com a positius contenen el plasmidi pUC18 i el gen íntegre, es fa una extracció plasmídica amb el kit de Qiagen i el DNA es digereix amb *Pst* I i *Eco* RI. En el gel d'agarosa es veu la mida del fragment, que ha de coincidir amb la mida d'un dels dos gens (eCG α o eCG β). Quan s'utilitza pPICZ α , també es fa una doble digestió del plasmidi, però amb *Xho* I i *Bam*H I. El resultat de la digestió també s'analitza en un gel d'agarosa; les mides de les bandes diuen si hi ha insert o no.

Amb els dos plasmidis, també es fa una segona comprovació per PCR del DNA plasmídic extret per amplificar els gens. Els encebadors utilitzats són 5pUC18 i 3pUC18 quan s'utilitza el plasmidi pUC18 i Seq5' i Seq3' quan s'utilitza el plasmidi pPICZ α . A la figura 2.1.5 es mostren les seqüències d'aquests encebadors.

<p>5pUC18: 5'CgTTgTAAAACgACggCCAgTg3'</p> <p>3pUC18: 5-TCACACAggAAACAgCTATgACCATg3'</p> <p>Seq5': 5'CATTgCTgCTAAAgAAgAAggggTATC3'</p> <p>Seq3': 5'TTCAgATCCTCTTCTgAgATgAgTTTTTg3'</p>

Fig. 2.1.5 Seqüència dels encebadors utilitzats per la seqüenciació dels clons transformats de *E. Coli*.

Les propietats d'aquests encebadors es recullen a la taula 2.1.1.

Taula 2.1.1 Propietats dels encebadors, obtingudes amb el programa Vector NTi.

Encebador	Nucleòtids	% gC	PM (Da)
5pUC18	22	54,5	6.846,5
3pUC18	26	46,2	8.019,3
Seq5'	27	44,4	8.434,5
Seq3'	29	37,9	8.941,9

Els encebadors estan a una concentració de 100 nM, la polimerasa 2,5 U/100 µl i els dNTPs 0,2 mM. La concentració de MgCl₂ és l'estàndard. Es posen 5 µl de l'extracció plasmídica obtinguda.

El programa utilitzat per l'amplificació dels gens, tan en pUC18 com en pPICZα, és de 30 cicles de 30" a 95 °C, 30" a 54 °C i 30" a 72 °C, amb un *hot start* de 5 min a 95 °C, tal com esquematitza la figura 2.1.6.



Fig. 2.1.6 Esquema del programa final utilitzat.

2.2.7 Comprovació de la seqüència dels gens

Per comprovar que no hi ha hagut alteracions de la seqüència dels gens, s'envien els plasmidis al servei de seqüenciació de l'IBMB-CSIC, adjuntant els encebadors adequats; 5pUC18 i 3pUC18 quan utilitzem el plasmidi pUC18 i Seq5' i Seq3' quan utilitzem el plasmidi pPICZα.

Per a comprovar el resultat de les seqüenciacions cal fer un alineament de les seqüències obtingudes amb la seqüència teòrica. S'utilitza el programa *Clustal W*, obtingut a la pàgina *web* del *European Bioinformatics Institute*: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>.

2.2.7.1 Comprovació de la integració dels gens al cromosoma de *P. pastoris*

Primer de tot cal extreure el DNA genòmic.

1. Cultiu de nit de la soca en YPD.
2. Centrifugueu 10 ml a 3500g durant 5 min.
3. Resuspeneu en 1 ml d'aigua MiQ i centrifugueu 30''.
4. Resuspeneu en 150 µl de medi SZB fresc.
5. Incubeu 30-40 min en un bany a 37 °C (s'obtenen esferoplasts).
6. Centrifugueu a 300g 10 min.
7. Continueu amb el pas 4 de la pàgina 30 del DNeasy *Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Cat. No. 69504). Seguiu el protocol fins el final.
8. Prepareu una reacció de PCR per cada gen seguint les proporcions següents:

DNA genòmic	5 µl
Encebador 1 (0,01µm)	1 µl
Encebador 2 (0,01µm)	1 µl
dNTPs	1 µl
Tampó 10X	5 µl
Taq	1 µl
Aigua	36 µl
	50 µl

9. Feu la PCR de 30 cicles que indica a la figura 2.1.6 amb els encebadors indicats per cada gen; $\alpha 4$ i $\alpha 5$ pel gen α i $\beta 7$ i $\beta 8$ pel gen β . Les temperatures d'hibridació pel gen α i β són 59 °C i 55 °C, respectivament.
10. Comproveu la mida del fragment amplificat en un gel d'agarosa al 0,8 %.

MEDI SZB

- o 4,55 g Sorbitol
- o 0,765 g Citrat sòdic
- o 0,56 g EDTA

Dissoleu-ho tot en 25 ml d'aigua i autoclaveu. Afegiu 11 µl de zymolasa 5000 U/ml (Sigma, Cat. No. L2524) i 12 µl 2-mercaptoetanol (Sigma, Cat. No. M6250) per cada 150 µl totals de medi abans d'utilitzar.

2.2.8 Gels d'agarosa

Per visualitzar els plasmidis es fan gels d'agarosa al 0,8 %. S'utilitza agarosa de Sigma-Aldrich (Cat. No. A9311) i es dissol amb el tampó electroforètic TAE 1X. Com a marcador de pes molecular (MW) s'utilitza el *1KB DNA Ladder* de

Invotrogen (Cat. No. 15615-016) a la figura 2.1.7 es mostra una fotografia amb la mida de les bandes.

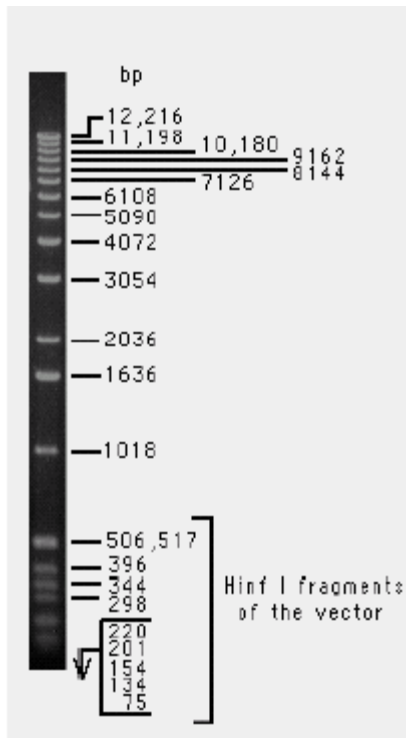


Fig. 2.1.7 Foto de les bandes del marcador *1KB DNA Ladder* de Invotrogen (Cat. No. 15615-016).

TAMPÓ TAE (TRIS/ACETAT/EDTA) 50X (1L)

- o 242 g Tris·HCl (Merck, Cat. No. 1.08382)
- o 57,1 ml Àcid acètic glacial (Panreac, Cat. No. 211008)
- o 37,2 g de Na₂EDTA·H₂O (Panreac, Cat. No. 131669)

Dissoleu amb aigua destil·lada.

2.3 Resultats i discussió

2.3.1 Clonatge a *E. coli*

Inicialment, s'ha provat de fer el clonatge dels gens eCG α i eCG β obtinguts per PCR, segons l'esquema de la figura 2.2.1A directament a pPICZ α , però l'eficiència de lligació dels productes de PCR digerits en els seus extrems ha estat molt baixa. Per tant, dels clons resultants de la transformació, molt pocs o cap tenen un dels dos gens insertats i costa aïllar-los de la resta.

També s'ha provat la utilització d'un kit comercial de la casa Roche per a clonar productes de PCR d'extrems roms, en el qual s'utilitza un vector suïcida que no deixa créixer les cèl·lules si no han incorporat el gen, facilitant la identificació les colònies amb el plasmidi que conté l'insert.

Donat que no s'obtenen resultats positius amb el kit de Roche es decideix utilitzar una nova estratègia convencional de clonar els productes de PCR obtinguts (sense prèvia digestió dels seus extrems) directament en el plasmidi pUC18 prèviament digerit amb *Sma* I, enzim que genera extrems roms (fig. 2.2.1B).

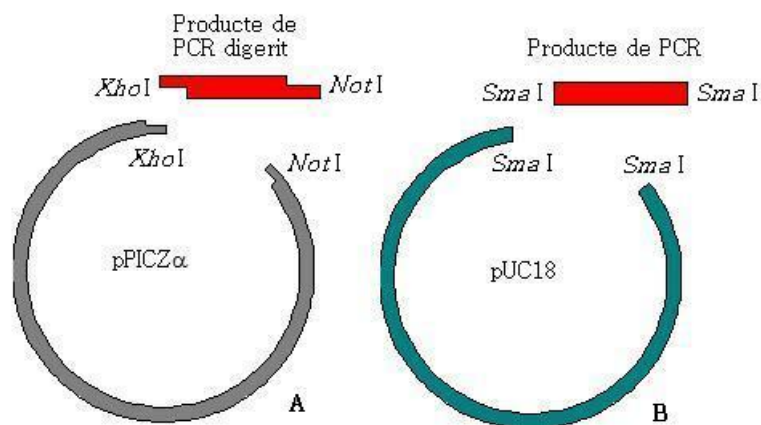


Fig. 2.2.1 Esquema de les lligacions que es fan per inserir el producte de PCR en els dos plasmidis utilitzats; A: pPICZ α , B: pUC18.

Aquest plasmidi, com ja s'ha explicat, permet distingir visualment, a la placa, les colònies que tenen el plasmidi recircularitzat sense insert (colònies blaves), de les que han incorporat un fragment de DNA en el lloc de clonatge (colònies blanques). D'aquesta manera s'ha agilitzat el procés de clonatge dels productes obtinguts per PCR (figura 2.2.2).

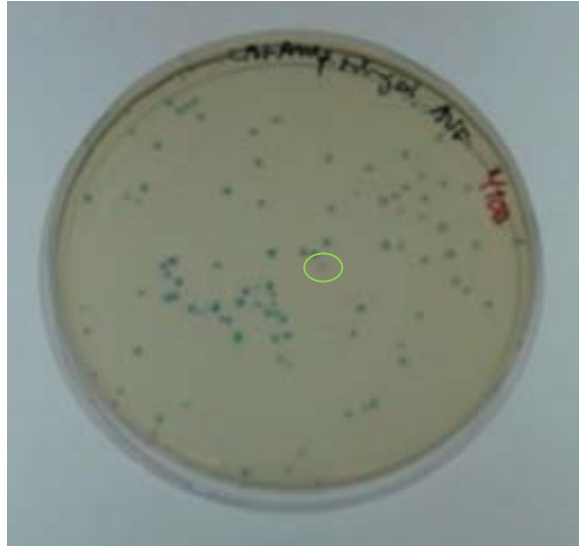


Fig. 2.2.2 Placa de medi LB + ampil·lina + X-gal. La majoria de colònies són de color blau, no contenen el gen insertat. Amb un cercle es marca una colònia diferent, és de color blanc, aquesta sí que conté el pUC18 amb el gen inserit.

El procés de clonatge de productes de PCR a pUC18 és el següent: el primer que es fa és la linearització del plasmidi amb l'enzim *Sma* I que, com mostra la figura 2.2.1B, dona extrems roms. En segon lloc, es fa una estimació de les quantitats de plasmidi i de cada fragment de PCR (també d'extrems roms) que es posarà a la reacció de lligació. Aquesta estimació es farà a partir de les intensitats relatives que tenen les bandes corresponents al plasmidi linearitzat i els productes de PCR després de corre'ls en un gel d'agarosa. El fet que la KOD polimerasa generi fragments de DNA amb extrems roms permet la clonació directa d'aquests productes de PCR (no totes les polimerases acaben l'extensió quan s'acaba el DNA motlle, n'hi ha que segueixen afegint nucleòtids, aquestes polimerases no aniran bé en aquest procés). La reacció de lligació es fa tal i com es descriu a materials i mètodes, i afegint PEG 4.000, component que millora l'eficiència de la lligació quan els extrems són roms (el protocol de la casa comercial Fermentas esmenta aquesta modificació). Els transformants que creixen en presència d'ampicil·lina i X-gal poden ser fàcilment distingits segons el seu color, tal i com s'observa a la figura 2.2.2.

En general, la fracció de colònies blanques ha estat baixa, aproximadament de 50 colònies 1 és blanca. Per això, per poder obtenir el clon transformant amb la seqüència del gen correcta ha calgut fer més d'una transformació amb cada constructe.

Un cop aïllades aquestes colònies blanques, 12 pel gen α i 48 pel gen β , se'n ha fet un cultiu en medi LB+ ampil·lina per poder-ne extreure el DNA plasmídic. Del DNA genòmic obtingut se n'ha fet una amplificació per PCR per poder comprovar que realment hi ha el gen inserit. Del gen α , 8 no tenien l'insert sencer i 4 sí. Del gen β , 25 no i 23 sí.

Els que tenien insert han estat enviats al servei de seqüenciació, 4 del gen α i 23 del β . La seqüència obtinguda s'ha comparat amb la seqüència teòrica esperada mitjançant un alineament de la seqüència original amb les dues resultants de seqüenciació (sempre es seqüencien les dues cadenes del DNA: la codificant i la complementària). A l'annex 3 es mostra un exemple d'alineament per cada un dels dos gens, un de correcte i un d'incorrecte, on es mostren les dues cadenes obtingudes en la seqüenciació 5' i 3' (complementària i reversa) i la teòrica. Les mutacions que han aparegut han estat substitucions, insercions i delecions.

A la taula 2.2.1 es mostra un resum de tot el procés.

Taula 2.2.1 Taula que mostra el nombre de clons, de cada gen, que es tenen en cada part del procés d'aïllament del clon amb la seqüència correcta.

Part del procés	Gen α	Gen β
Nº clons aïllats	12	48
Nº clons que tenen insert	4	23
Nº clons seqüència correcta	1	1

86

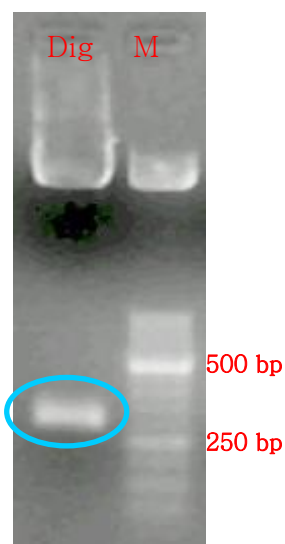


Fig. 2.2.3 Gel d'agarosa amb el resultat de la digestió de PUC18-eCG α al primer carril (Dig), en el segon hi ha el marcador de pes molecular, les bandes més intenses corresponen a les mides de 250 i 500 bp, com està indicat; la resta de bandes corresponen a mides de 50pb de diferència. La banda petita del carril de la digestió, marcada amb un cercle blau, és el gen α , està lleugerament per sobre de la primera banda després dels 250, que correspon a 300pb, això coincideix amb la mida teòrica de 317pb.

Un cop comprovades que les seqüències dels gens α i β són correctes, aquests gens s'han clonat a pPICZ α ; aquesta etapa ha consistit en fer una doble digestió dels dos plasmidis, pUC18-eCG α i pUC18-eCG β , amb *Xho* I i *Not* I. Els productes de la digestió han estat separats electroforèticament en un gel d'agarosa i se'n ha purificat les bandes de mida més petita, corresponents als gens α i β (317 bp en el cas de α i 417 bp en el cas de β); com a exemple, el gel de la digestió d'uns dels plasmidis es mostra en la figura 2.2.3.

La concentració de les preparacions obtingudes de plasmidi *pPICZ α* linearitzat i els fragments corresponents als gens α i β purificats s'ha estimat a partir d'un gel d'agarosa. D'aquesta manera s'ha establert la quantitat de cada insert i de plasmidi que s'ha posat en les lligacions (figura 2.2.4), amb les quals s'ha fet posteriorment la transformació de cèl·lules d'*E. coli* competents.

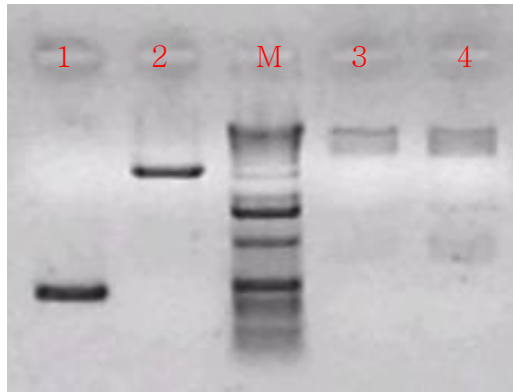


Fig. 2.2.4 Gel d'agarosa al 0,8%. En el carril 1 hi ha eCG- β , en el 2 hi ha pPICZ α linearitzat amb *Xho* I i *Not* I. Els carrils 3 i 4 són el resultat de la lligació, en el carril 3 hi ha una relació plasmidi : insert 1:5, en el 4 la relació és 1:10. No hi ha massa diferència, tot i que és lleugerament millor 1:5, ja que hi ha menys *smear* per sota. M és el marcador de pes molecular.

Un cop feta la transformació s'han seleccionat 6 clons de cada transformació que han crescut en plaques de LB+ zeocina; d'aquests clons se n'ha extret el seu DNA plasmídic per a comprovar la presència del gen sencer mitjançant una anàlisi de restricció (doble digestió amb *Xho* I i *Not* I). Dels clons positius se'n ha fet un cultiu per extreure prou DNA plasmídic per a transformar *P. pastoris*. La figura 2.2.5 mostra un esquema dels dos plasmidis utilitzats per fer el clonatge, en aquest cas del gen β , però pel gen α és exactament el mateix.

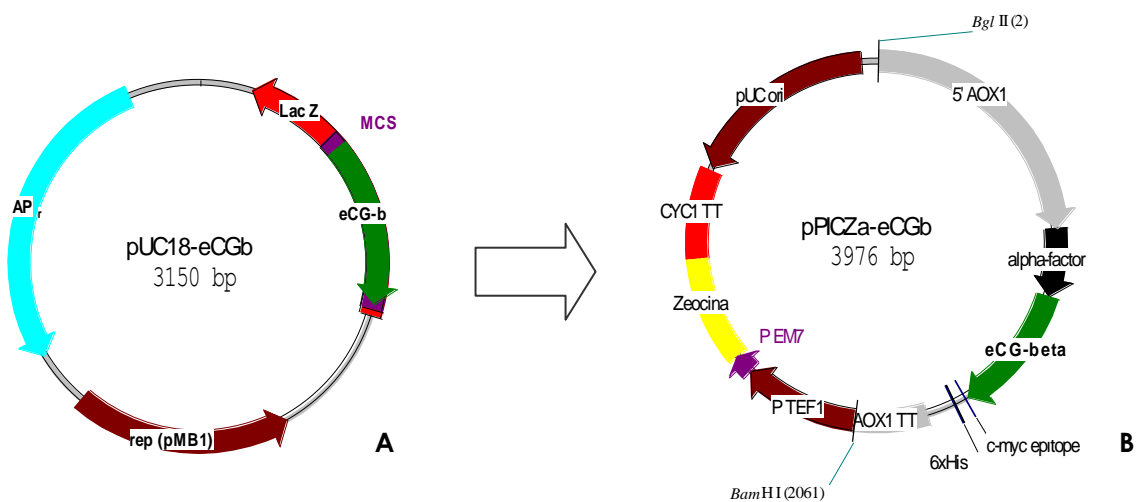


Fig. 2.2.5 Esquema de la construcció pUC18-eCG β (A) i pPICZ α -eCG β (B).

2.3.2 Clonatge a *P. pastoris*: aïllament de les soques productores de eCG α i eCG β

S'ha fet una transformació de cèl·lules de *P. pastoris* per cada construcció (pPICZ α -eCG α i β) separatament. Els plasmidis s'han linealitzat prèviament amb *Sac* I. Els transformants s'han seleccionat en plaques que contenen medi YPD i zeocina; d'aquests, se'n han triat 6 de cada transformació i se'n han fet ressembres també en plaques de YPD amb zeocina. Aquest procés de ressembres en sèrie és important per a l'obtenció de clons completament purs, ja que les cèl·lules de *P. pastoris* tenen tendència a créixer en forma d'agregats, fent probable que algunes de les colònies que apareixen en placa hagin estat originades a partir de més d'una cèl·lula original. Tot i que s'ha partit de 6 clons per cada gen, s'ha finalitzat amb la meitat, ja que alguns dels transformants inicials han resultat ser falsos positius (el transformant inicial era en realitat una mescla de cèl·lules transformades i no transformades, les quals poden créixer quan es troben barrejades amb cèl·lules resistents a zeocina (capaces de degradar l'antibiòtic present en el medi).

Així doncs, el procés de selecció ha resultat en l'obtenció de 3 clons d' α i 3 de β , amb els que s'han fet, com s'explica en el capítol 3, uns cultius preliminars en *erlenmeyer* per a veure si era possible determinar l'expressió del gens recombinants.

2.3.3 Construcció de les soques d'expressió de l'hormona sencera

Paral·lelament a l'obtenció de les construccions pPICZ α -eCG α i pPICZ α -eCG β , també s'han obtingut les construccions pPICZ α -eCG α + β i pPICZ α -eCG β + α . Les construccions són les mostrades en les figures 2.2.6 i 2.2.7.

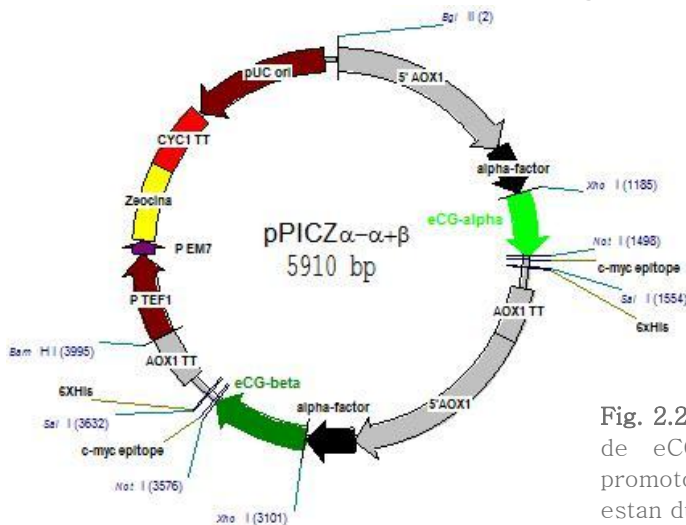


Fig. 2.2.6 Construcció que conté els dos gens de eCG en l'ordre dels gens α + β . El promotor, terminador i factor d'excreció estan duplicats, n'hi ha un per cada gen.

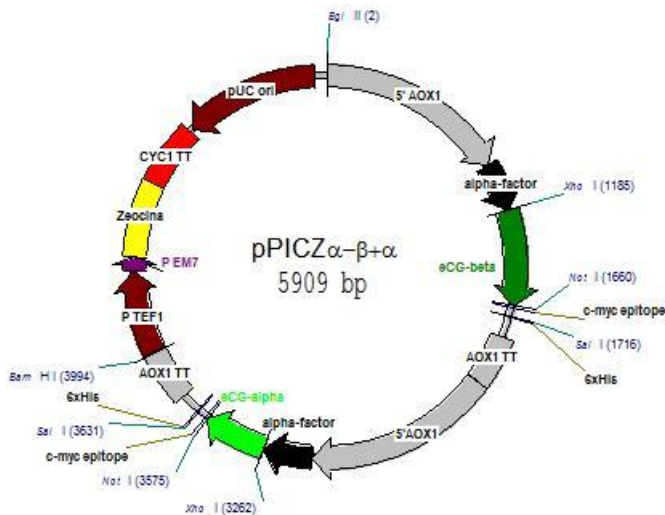


Fig. 2.2.7 Construcció que conté els dos gens de eCG en l'ordre dels gens $\alpha + \beta$. El promotor, terminador i factor d'excreció estan duplicats, n'hi ha un per cada gen.

Es volen obtenir dues soques, una que contingui els gens $\alpha + \beta$ i l'altre en l'ordre invers, $\beta + \alpha$. Així es podrà comparar si aquest canvi d'ordre afecta als nivells d'expressió de l'hormona completa (heterodímer).

A continuació es descriu el procés realitzat per a la construcció de $pPICZ\alpha-eCG\alpha + \beta$, tot i que el procés de producció de la construcció $pPICZ\alpha-eCG\beta + \alpha$ és el mateix.

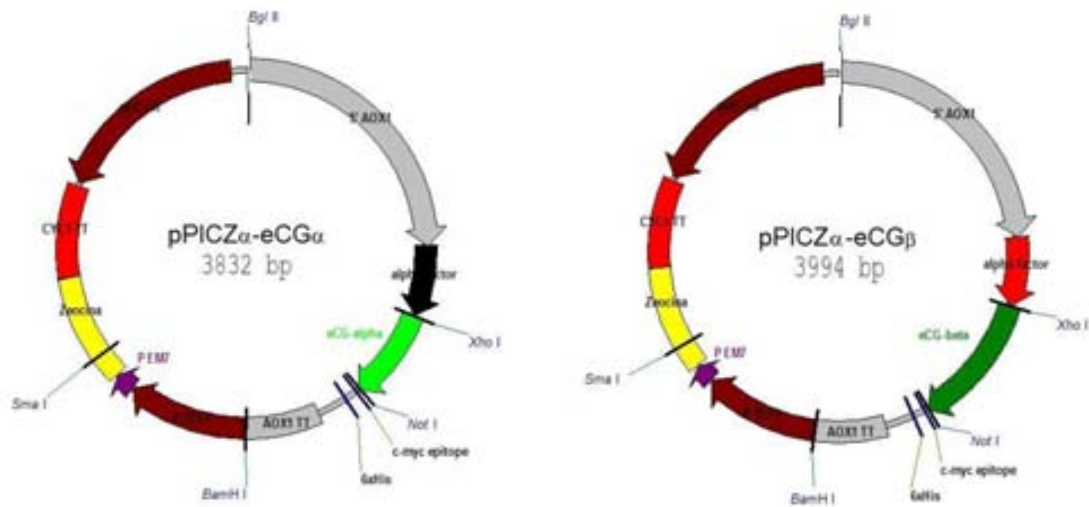


Fig. 2.2.7 Construccions de $pPICZ\alpha-eCG\alpha$ i $pPICZ\alpha-eCG\beta$, utilitzades com a base per fer la construcció amb els dos gens. Les lletres blaves assenyalen els punts de tall dels enzims utilitzats en cada reacció.

Per a construir els nous vectors d'expressió de l'heterodímer de l'eCG s'ha partit de les construccions $pPICZ\alpha-eCG\alpha$ i $pPICZ\alpha-eCG\beta$ (figura 2.2.7). La primera s'ha linealitzat amb *BamH* I i se n'han desfosforilat els extrems per evitar una recircularització del plasmidi sense incorporar l'insert. La segona s'ha digerit amb *BamH* I, *Sma* I i *Bgl* II. Ha calgut digerir amb tres enzims per poder distingir els dos fragments obtinguts que serien quasi de la mateixa mida i no es podrien separar electroforèticament, dificultant així el procés de construcció en el pas de la lligació. De la segona digestió, s'ha aïllat el fragment

de 1903 bp que conté el casset amb el gen. Aquest fragment s'utilitza com a insert de l'altre plasmidi digerit (figura 2.2.8), el resultat de la lligació és un nou plasmidi (pPICZ α - α + β) que conté els dos gens. Aquesta lligació s'ha utilitzat per a transformar *E. coli*.

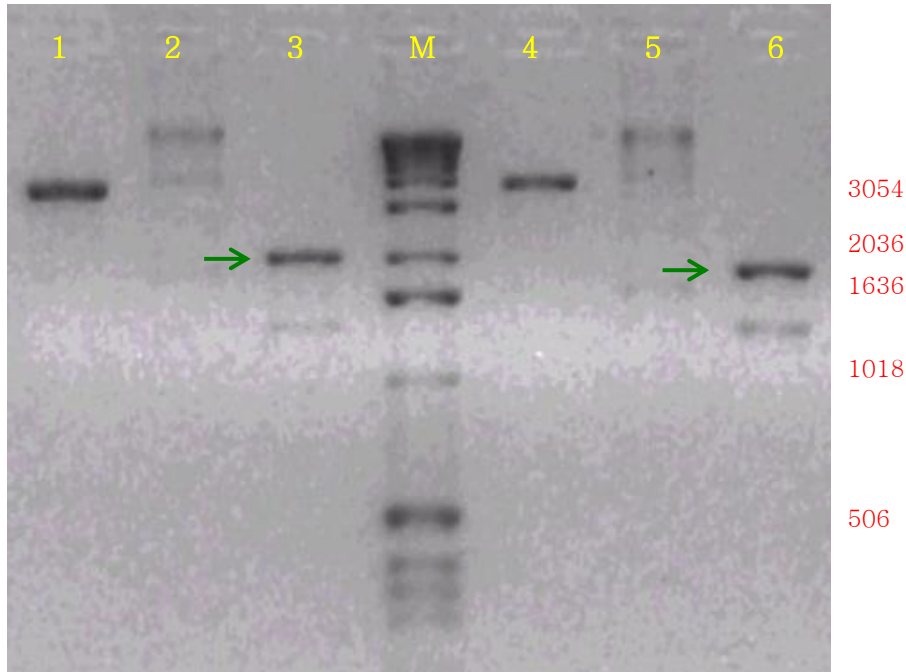


Fig. 2.2.8 Gel d'agarosa al 0,8 % que mostra les bandes dels fragments que s'utilitzaran en la lligació per obtenir les construccions pPICZ α -eCG α + β i pPICZ α -eCG β + α . El carril M conté el marcador de pes molecular 1Kb, a la dreta de la foto es mostren les mides de les bandes més rellevants. Els carrils 2 i 5 contenen les dues lligacions. Els carrils 1 i 4 contenen pPICZ α -eCG α i pPICZ α -eCG β digerits amb *Bam*H I, respectivament. Els carrils 3 i 6 contenen pPICZ α -eCG α i pPICZ α -eCG β digerits amb *Bam*H I, *Sma* I i *Bgl* II, respectivament. En aquests s'hi veuen dues bandes, la que interessa és la gran (assenyalada amb una fletxa verda) de 1903 i 2065 bp, respectivament. La petita tampoc fa nosa ja que encara que es lligués només ho faria per un extrem, per tant mai donarà una construcció circular.

Abans de fer la transformació de *P. pastoris* cal distingir els transformants que contenen la construcció amb els dos gens, per això s'ha fet una extracció plasmídica i una digestió amb *Sal* I: el patró de bandes ens permet distingir els plasmidis que tenen els dos gens dels que només en tenen un; les mides de les bandes permeten distingir, dels que han incorporat el segon gen, els que ho han fet en l'orientació correcta. Els resultats es mostren en el gel de la figura 2.2.9.

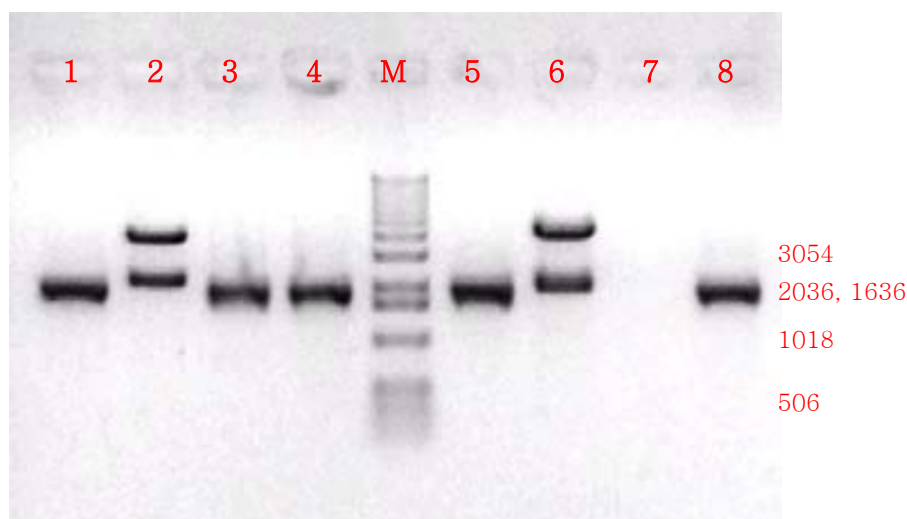


Fig. 2.2.9 Gel d'agarosa al 0,8 % que mostra la digestió amb *Sal I* de vuit clons transformants, quatre de $\alpha+\beta$ (carrils 1-4) i quatre de $\beta+\alpha$ (carrils 5-8). M indica el marcador de pes molecular, a la dreta de la foto s'indiquen les mides de les bandes més importants. En els carrils 2 i 6 es veu la doble banda deguda a la presència de dos gens, la resta només en tenen un. La mida de la banda petita indica que el segon gen està ben orientat per la correcta expressió, si hagués sigut de 700 bp indicaria una mala orientació.

Així doncs, després d'aquest procés ja es tenen dues construccions correctes a punt per a transformar *P. pastoris*. No obstant, no es pot seguir el protocol estàndard de transformació, ja que la linearització d'aquests plasmidis compostos amb *Sac I* donaria dos fragments i, per tant, la seva transformació a *P. pastoris* molt probablement resultaria en la incorporació de només un dels dos fragments. Per això, s'ha fet la transformació amb el plasmidi circular, fet que fa baixar molt l'eficiència de transformació. Aquest és el motiu pel qual s'ha decidit modificar el protocol de transformació, concretament el de producció de les cèl·lules competents (veure pàgina 74 d'aquest mateix capítol). Enlloc de fer una incubació només amb DTT per augmentar la competència de les cèl·lules, s'ha fet amb DTT i LiAc seguint les indicacions de S Wu i GJ Letchworth (2004), que encara l'augmenta més. Un cop obtingudes aquestes noves cèl·lules, s'han fet les transformacions corresponents; els transformants s'han aïllat en plaques de YPD + zeocina.

Aquest mètode ha permès obtenir uns 40 transformants per a cada una de les construccions. S'han seleccionat 7 clons de cada tipus ($\alpha+\beta$ i $\beta+\alpha$) i se'n han fet les tres ressembres estipulades. Dels 7 clons inicials s'ha acabat amb tres clons de cada.

Per comprovar que les soques de *P. pastoris* hagin integrat els dos gens al seu genoma es fa una extracció del DNA genòmic i es comprova, per PCR, la presència de cada gen. El resultat es comprova en un gel d'agarosa al 0,8%, se'n mostra un exemple a la figura 2.2.10.

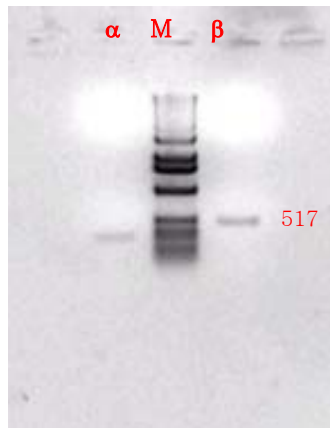


Fig. 2.2.10 Gel d'agarosa al 0,8% que mostra el resultat de l'amplificació per PCR dels dos gens del clon $\alpha+\beta$ 3. El primer carril (α) mostra l'amplificació del gen α , el segon (M) el marcador de 1Kb i el tercer (β) l'amplificació del gen β . En vermell s'indica la mida, en bp, d'una de les bandes del marcador. La banda del gen β correspon a 476bp i la del gen α a 314bp.

2.4 Conclusions

S'han obtingut quatre tipus de soques de *P. pastoris*; una capaç de produir la cadena α de eCG, una la cadena β i dues que haurien de produir l'hormona sencera, l'ordre dels gens dins el plasmidi és deferent, una té l'ordre $\alpha+\beta$ i l'altra $\beta+\alpha$.

Per obtenir aquestes soques ha calgut un clonatge previ en el plasmidi de *E. coli* pUC18 per facilitar la generació de fragments de DNA amb el gen α o β amb els extrems correctament digerits i poder ser insertats eficientment en el vector d'expressió pPICZ α .

La integració del plasmidi amb els dos gens s'ha fet en forma circular, això ha fet disminuir l'eficiència de transformació, però suficient per aïllar cinc clons de cada construcció ($\alpha+\beta$ i $\beta+\alpha$).

Capítol 3. Cultius de producció

3.1 Introducció

Un cop obtingudes diverses soques transformants de *P. pastoris* cal comprovar que expressin eCGr. Per això, es fan cultius en erlenmeyer. Aquests cultius permeten fer una primera avaluació de tots els clons aïllats amb l'objectiu d'identificar els millors de manera qualitativa.

Els cultius en discontinu serveixen per comprovar la producció i tenir un primer lot de eCG per treballar en la purificació, però la quantitat obtinguda és petita, per això es canvia al cultiu discontinu alimentat.

Els cultius en discontinu alimentat es fan seguint l'estratègia de cultiu establerta en els treballs precedents del grup i que han donat bons resultats. S'ha fet un seguiment de la producció i creixement del cultiu. També s'han comparat les dues estratègies de cultiu utilitzades: batch i fed-batch, així com medi ric i mínim. Finalment també s'han comparat els dos bioreactors utilitzats.

3.2 Materials i mètodes

3.2.1 Cultius en erlenmeyer

S'utilitza la metodologia descrita als manuals de Invitrogen: *P. pastoris* Expression Kit, Version F, pàg. 43 (Cat. No. K1710-01), utilitzant els medis BMGY o BMG i BMMY o BMM.

1. Inoculeu 25 ml de medi BMGY en un erlenmeyer de 250 ml i fenedures amb una colònia o 50 µl de glicerinat. Incubeu en agitació de 200 rpm i a 30 °C durant 16-18 h. S'utilitza un agitador orbital de la casa SANYO, model *Orbi-safe orbital Incubator*.
2. Centrifugueu les cèl·lules a 3000 xg durant 5 min a 4 °C i utilitzeu-les per inocular un erlenmeyer amb fenedures i de 1 l de volum, amb 200 ml de medi BMMY. Considereu aquí t=0.
3. Deixeu a 30 °C i a 200 rpm durant uns 3-4 dies, afegiu cada 24 h 1 ml de metanol (equivalent a un 0,5 % (v/v)), per mantenir la inducció. Podeu prendre una mostra cada 24 h per fer un seguiment de la producció.
4. L'últim dia preneu una mostra per fer l'anàlisi d'expressió.

Aquest és el protocol estàndard, però també s'han fet cultius amb menys volum de producció (medi BMMY), concretament 50 ml.

Per analitzar el creixement de la soca s'utilitza YPD, el procés és el mateix, però sense fer el canvi de medi.

YPD

- o 1 % (p/v) Extracte de llevat (Oxoid, Cat. No. L21).
- o 2 % (p/v) Peptona (Oxoid, Cat. No. L37).
- o 2 % (p/v) Glucosa (Panreac, Cat. No. 201341).

Dissoleu 10 g d'extracte de llevat i 20 g peptona en 900 ml d'aigua i autoclaveu. Quan es refreda barregeu amb la solució del glucosa preparada a part (20 g en 100 ml d'aigua destil·lada) i esterilitzada per filtració.

Per preparar els medis BMGY, BMMY, BMG i BMM cal tenir a punt les següents solucions estoc:

TAMPÓ FOSFAT POTÀSSIC 1 M PH=5,5. Barregeu 132 ml de K₂HPO₄ 1 M i 868 ml de KH₂PO₄ 1 M. Confirmeu el pH=5,5. Esterilitzeu a l'autoclau.

YNB 10X (13,4 %). Dissoleu 134 g de YNB sense aminoàcids en 1 l d'aigua. Esterilitzeu per filtració. Guardeu a 4 °C.

GLICEROL 10X (10 %). Barregeu 100 ml de glicerol amb 900 ml d'aigua. Esterilitzeu a l'autoclau.

METANOL 10X (5 %). Barregeu 5 ml de metanol amb 95 ml d'aigua. Esterilitzeu per filtració. Guardeu a 4 °C.

BIOTINA 500X (0,02 %). Dissoleu 20 mg de biotina en 100 ml d'aigua. Esterilitzeu per filtració. Guardeu a 4 °C.

MEDI BMGY

- 1 % (p/v) Extracte de llevat (Oxoid, Cat. No. L21)
- 2 % (p/v) Peptona (Oxoid, Cat. No. L37)
- 100 mM Fosfat potàssic, pH=6.0
- 1,34 % (p/v) YNB (Difco Laboratories, Cat. No. 29 1940)
- 4×10^{-5} % (p/v) Biotina (Sigma, Cat. No. B-4501)
- 1 % (v/v) Glicerol (Panreac, Cat. No. 201339)

Dissoleu l'extracte de llevat i la peptona en 700 ml d'aigua i autoclaveu. Deixeu-ho refredar i afegiu 100 ml del tampó fosfat 1 M, 100 ml de glicerol 10X, 100 ml de YNB 10X i 2 ml de biotina 500X. Homogeneïtzau.

MEDI BMMY

- 1 % (p/v) Extracte de llevat (Oxoid, Cat. No. L21)
- 2 % (p/v) Peptona (Oxoid, Cat. No. L37)
- 100 mM Fosfat potàssic, pH=6.0
- 1,34 % (p/v) YNB (Difco Laboratories, Cat. No. 29 1940)
- 4×10^{-5} % (p/v) Biotina (Sigma, Cat. No. B-4501)
- 0,5 % (v/v) Metanol (Panreac, Cat. No. 131091)

Dissoleu l'extracte de llevat i la peptona en 700 ml d'aigua i autoclaveu. Deixeu-ho refredar i afegiu 100 ml del tampó fosfat 1 M, 100 ml de metanol 10X, 100 ml de YNB 10X i 2 ml de biotina 500X. Homogeneïtzau.

MEDI BMG

- 100 mM Fosfat potàssic, pH=6.0
- 1,34 % (p/v) YNB (Difco Laboratories, Cat. No. 29 1940)
- 4×10^{-5} % (p/v) Biotina (Sigma, Cat. No. B-4501)
- 1 % (v/v) Glicerol (Panreac, Cat. No. 201339)

Autoclaveu 700 ml d'aigua destil·lada i deixeu refredar. Afegiu 100 ml del tampó fosfat 1 M, 100 ml de glicerol 10X, 100 ml de YNB 10X i 2 ml de biotina 500X. Homogeneïtzau.

MEDI BMM

- 100 mM Fosfat potàssic, pH=6.0
- 1,34 % (p/v) YNB (Difco Laboratories, Cat. No. 29 1940)
- 4×10^{-5} % (p/v) Biotina (Sigma, Cat. No. B-4501)
- 0,5 % (v/v) Metanol (Panreac, Cat. No. 131091)

Autoclaveu 700 ml d'aigua destil·lada i deixeu refredar. Afegiu 100 ml del tampó fosfat 1 M, 100 ml de metanol 10X, 100 ml de YNB 10X i 2 ml de biotina 500X. Homogeneïtzau.

D'aquests cultiu no se'n fa el seguiment de cap paràmetre com pH o pO_2 , ja que són difícils de controlar. Pel que fa a la quantitat de proteïna recombinant, només s'analitza la producció final de manera qualitativa amb gels d'acrilamida i transferència Western i de punts.

3.2.2 Cultiu en discontinu

3.2.2.1 Descripció de l'instrumental

Per aquest tipus de cultiu s'ha utilitzat el bioreactor Biostat[®] B de la casa B. Braun Biotec International (Melsungen, Alemanya). S'ha utilitzat la cuba de 5l de volum total per fer cultius de 3l de volum útil.

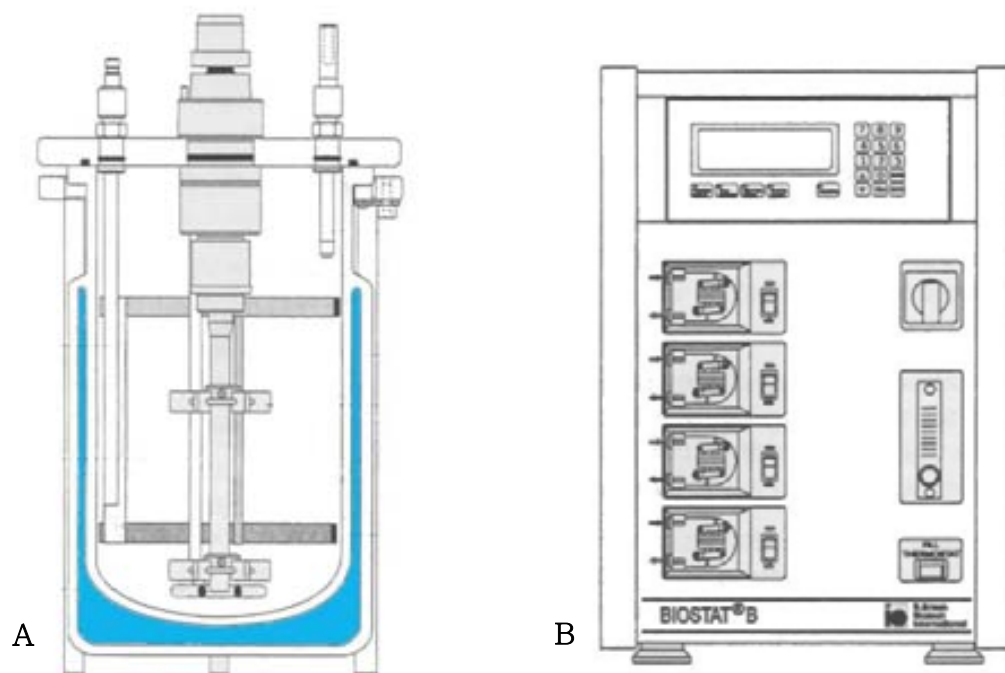


Fig. 3.1.1 Esquema del bioreactor utilitzat. **A.** Cuba. En blau s'ha assenyalat la camisa per controlar la temperatura, en gris el sistema d'agitació. **B.** DCU. En gris hi ha les quatre bombes per addicionar el que calgui.

Aquest reactor consta d'una cuba de vidre amb una camisa (també de vidre) on es porta a terme el cultiu. La tapa d'acer inoxidable permet l'entrada de diferents elements, com són les tres sondes per seguir diferents paràmetres del bioprocés (temperatura, pH i oxigen), un punt d'entrada de líquids pels additius que facin falta, una sortida de líquid per prendre mostres i una entrada (*sparger*) i sortida de gasos que permeten la oxigenació del brou de cultiu. A l'interior hi ha l'eix del motor amb les pales que permeten agitar el medi. En la figura 3.1.1 se'n mostra un esquema.

La part de control i monitoratge del bioreactor es mostra, també, en la figura 3.1.1. En aquesta unitat de control es marquen els valors desitjats dels paràmetres que volem tenir ajustats durant el procés; temperatura (30 °C), pH (5,5) i pressió d'oxigen (30 %).

TEMPERATURA. El sensor utilitzat per a la mesura d'aquesta variable és de tipus PT-100. Tant el refredament com l'escalfament del reactor es realitzen mitjançant el pas d'un fluid (H₂O) a la temperatura desitjada a través de la camisa ja descrita. El refredament utilitza aigua de xarxa a temperatura ambient, per tant, no es poden realitzar cultius a temperatures inferiors a aquesta. Per escalfar es fa passar prèviament l'aigua de xarxa per una resistència elèctrica que augmenta la temperatura del fluid.

OXIGEN DISSOLT. El sensor és un elèctrode d'oxigen polarogràfic esterilitzable (Ingold, Cat. No. 322756800). El control d'aquesta variable es pot fer augmentant l'agitació o incrementant el cabal d'aire d'entrada dins el reactor. Aquests canvis es fan de forma manual, no es programen en la unitat de control.

PH. L'element de mesura emprat és un elèctrode de vidre combinat amb un elèctrode de referència Ag/AgCl (Crison Inpro 300/120, Cat. No. 52000193) i l'electròlit es troba en forma de gel. Aquesta característica evita la mescla de l'electròlit amb el medi de cultiu durant l'esterilització o el cultiu. Com que la tendència del cultiu és acidificar-se, només hi ha una actuació en la bomba de base. La base utilitzada és KOH 5 M (Panreac, Cat. No.141515).

3.2.2.2 Procés

Preparació de l'inòcul.

Inoculeu, en un erlenmeyer amb fenedures de 1 l, 100 µl del glicerinat de la soca desitjada en 100 ml de medi YPD i 100 µl de zeocina. Deixeu en agitació de 200 rpm i a 30 °C de 24 a 48 h. S'utilitza un agitador orbital de la casa SANYO, model *Orbi-safe orbital Incubator*.

Preparació bioreactor

- Netegeu la cuba i assegureu que el *sparger* no està embussat.
- Calibreu la sonda de pH.
- Prepareu 1 l del medi que s'utilitzarà BMM o BMY. No afegir ni els elements termolàbils ni els volàtils com la biotina i el metanol.
- Prepareu solucions accessòries com la base (KOH 5 M) o antiespumant.
- Poseu filtres a les entades i sortides.
- Esterilitzeu el fermentador en l'autoclau amb un programa estàndard de 20 min a 120 °C.
- Connecteu sonda pO₂ perquè polaritzi 24 h abans del calibrat.
- Connecteu mànegues camisa per refredar el medi.
- Calibreu la sonda d'oxigen dissolt.
- Connecteu el criòstat perquè passi aigua freda pel condensador de la sortida d'aire i evitar la pèrdua de metanol per arrossegament (*stripping*).

Procés

- Afegiu els elements termolàbils del medi, com les sals traça, YNB i biotina. Afegiu, també, unes gotes d'antiespumant.
- Afegiu el metanol (font de carboni) perquè quedi a concentració de 10 g/l.
- Centrifugueu la biomassa de l'inòcul a 4000 xg durant 10 min. Resuspeneu-la en la mínima quantitat d'aigua estèril i transvaseu-la a una ampolla.
- Inoculeu el fermentador amb la biomassa.
- Preneu la primera mostra d'uns 20 ml. Es prenen mostres periòdicament cada 6-8h.

3.2.3 Cultiu en discontinu alimentat

Aquest cultiu s'ha fet tan en el Biostat B de 5 l com en fermentador ED de la casa B.Braun Biotec International (Melsungen, Alemanya).

3.2.3.1 Descripció de l'instrumental

Com que el fermentador Biostat B ja s'ha descrit pels cultius en discontinu i l'equipament és el mateix només es detalla el fermentador ED:

Com es mostra en la figura 3.1.2, el bioreactor consta de dues parts ben diferenciades; per un cantó la unitat de control (DCU), on es poden establir els paràmetres o condicions de treball. En el nostre cas es controlen temperatura, pH i oxigen dissolt.

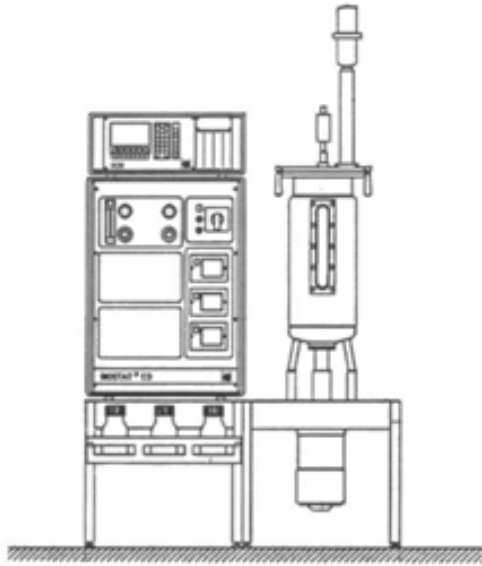


Fig. 3.1.2 Esquema del bioreactor ED.

L'altre part és la cuba de treball, aquesta també és de vidre, però amb un volum total de 6,4 l i 5 l de volum útil. En lloc de camisa exterior de vidre per poder controlar la temperatura, aquest conté un serpentí a l'interior de la cuba. L'agitador també està a la part central, però el motor es troba sota la cuba. Les sondes entren per la part inferior, no per la tapa. Per la part superior hi ha l'entrada i la sortida de gasos, així com un vàlvula de seguretat que salta en cas de sobrepressió.

Una altra gran diferència d'aquest reactor és l'esterilització; en aquest es pot fer in situ, no cal posar el fermentador a l'interior de l'autoclaui.

Pel control dels paràmetres temperatura, pH i oxigen dissolt es fan servir les mateixes sondes que en el bioreactor Biostat B.

Un paràmetre que es segueix en línia i que no es feia en els cultius en discontinu és el METANOL. S'utilitza l'analitzador de metanol *Methanol detector and sensor unit* (Raven Biotech Inc.). Aquest equip es compon d'una sonda sucada al cultiu per l'interior de la qual circula un cabal constant d'aire sintètic, aquest arrossega el metanol que es difon a través d'una membrana específica per compostos volàtils. Aquest corrent d'aire arrossega el metanol, fins l'element de detecció. El sensor donarà com a resposta una senyal de voltatge que es correlacionarà amb la concentració de metanol present en el cultiu. L'aparell té un temps de resposta de 120 segons. Aquesta mesura és recollida per un ordinador que aplica una llei de control determinada (Cos, O *et al.*, 2006) i que envia l'acció corresponent a una microbureta motoritzada microBUR 2031 (Crison) que dispensa la quantitat corresponent per mantenir el punt de consigna de la concentració de metanol.

Prèviament a la utilització de l'aparell en cultius, es realitza un calibrat per trobar una relació entre el voltatge i la concentració de metanol que es mostra en l'annex 5.

Per l'adició de glicerol (i també del metanol) s'utilitza una microbureta motoritzada microBUR 2031 (Crison). El control de les dues microburetes es fa des d'un PC independent.

3.2.3.2 Procés

El procés en discontinu alimentat és, realment, un procés en tres etapes:

- A. Cultiu en discontinu de 40 g/l de glicerol. Aquesta fase és per obtenir biomassa, per això s'utilitza, com a font de carboni, un compost que reprimeix el promotor *AOX*.
- B. Transició. En aquesta fase, que dura 5 h, es vol evitar un canvi bruscat de la font de carboni, per això es disminueix el glicerol i augmenta el metanol, paulatinament.
- C. Discontinu alimentat. En aquesta fase s'elimina totalment el glicerol, ja només s'utilitza el metanol com a font de carboni, així el microorganisme segueix creixent i hi ha producció.

Preparació del reactor

El procés de preparació del reactor és equivalent pel Biostat B, tot i que calen més elements accessoris. L'esterilització no es fa en l'autoclau, sinó *in situ*, com ja s'ha esmentat.

- Netegeu la cuba i assegureu-vos que el *sparger* no està embussat.
- Calibreu la sonda pH.
- Poseu la sonda de temperatura i connecteu-la.
- Poseu la sonda pO₂ i connecteu-la perquè polaritzi.
- Poseu la sonda de metanol i protegiu-la per l'autoclavat.
- Canvieu el septe de la presa de mostra.
- Prepareu 3,5 l medi *Invitrogen*, no afegiu els elements termolàbils o volàtils, com la biotina i el metanol.
- Esterilitzeu el fermentador amb el programa estàndard; 120 °C durant 20 min.

Altres materials que cal tenir a punt:

NH₃ AL 30 % (Panreac, Cat. No. 141130). Base per la fase discontinua. Dissoleu 300 ml en 700 ml d'aigua destil·lada. No cal autoclavar.

KOH 5 M (Panreac, Cat. No. 141515). Base per la transició i el discontinu alimentat. Com que l'analitzador de metanol és sensible a NH₃ cal eliminar-lo del sistema per eliminar les interferències. Peseu 280,5 g i dissol·leu en 1 l d'aigua destil·lada, esterilitzeu a l'autoclau.

ANTIESPUMANT 204 10 G/L (Sigma, Cat. No. A6426). És una mescla de components orgànics no derivats de la silicona i basats en polipropilè i dispersos en polièter. No conté oli mineral i és totalment sintètic, no té cap derivat animal o de plantes. Peseu 2,5 g i dissol·leu en 250 ml d'aigua destil·lada, esterilitzeu a l'autoclau.

NH₄CL 4 M (Panreac, Cat. No. 141121). Font de nitrogen pel discontinu alimentat com que ha calgut eliminar el NH₃, cal una nova font de nitrogen.

Peseu 53,5 g i dissoleu en 250 ml d'aigua destil·lada, esterilitzeu a l'autoclau. Prepareu-ne dues ampolles.

METANOL (Panreac, Cat. No. 141091). S'afegeix conjuntament amb les salts traça. S'utilitza per la transició i el discontinu alimentat. Afegiu 4,4 ml de salts traça a 1 l de metanol pur.

GLICEROL 50 % (Panreac, Cat. No.141339). S'utilitza en la fase de transició. Peseu 250 g de glicerol i dissoleu en 500 ml d'aigua destil·lada, esterilitzeu a l'autoclau.

SOLUCIONS PER L'ESTERILITZACIÓ QUÍMICA DE LES MICROBURETES

aigua destil·lada.

HCL 1 M. Peseu 36,5 g de HCl (Panreac, Cat. No. 131020) i dissoleu en 1 l d'aigua destil·lada

NAOH 1 M. Peseu 40,0 g de NaOH (Panreac, Cat. No. 141687) i dissoleu en 1 l d'aigua destil·lada

ETANOL 100 %. (Panreac, Cat. No. 161086).

Esterilitzeu a l'autoclau l'aigua destil·lada, HCl, NaOH i un pot buit pel rebuig.

- Esterilització microburetes. Ompliu i buideu la microbureta 10 vegades amb cada compost seguint el següent ordre:

Aigua ☞ HCl ☞ Aigua ☞ NaOH ☞ Aigua ☞ Etanol ☞ Aigua

☞ Deixeu amb glicerol o metanol, segons convingui.

105

Preparació de l'inòcul.

Es preparen 2 erlenmeyer de 1 l amb fenedures:

200 ml de medi YPD (descriu en la part de l'inòcul del cultiu en discontinu).

200 µl Zeocina (Invitrogen, Cat. No. R250-01).

150 µl de glicerinat de la soca.

Incubeu en agitació a 200 rpm i a 30 °C durant unes 24. S'utilitza un agitador orbital de la casa SANYO, model *Orbi-safe orbital Incubator*.

Procés

- Afegiu 15,5 ml de la solució de salts traça, 7,0 ml de solució de biotina 500X i 2 ml d'antiespumant. Tots aquests elements s'esterilitzen per filtració en el moment d'afegir-los al reactor.
- Ajusteu el pH=5,5 amb NH₃ al 30 %.
- Calibreu la sonda d'oxigen dissolt (0% amb N₂ i 100% amb aire sintètic).
- Inoculeu. Utilitzeu el volum d'inòcul suficient perquè al fermentador hi quedi una densitat òptica de 3. Com que no es vol afegir molt volum al reactor, inoculeu en un volum de 100ml, per tant necessitareu una DO de 96;

$$DO = \frac{3.200 \text{ ml} \times 3}{100 \text{ ml}} = 96$$

Segons la DO mesurada en l'inòcul, se sabrà el volum que cal centrifugar i redissol·leu en els 100ml d'aigua destil·lada;

$$V_{inòcul} = \frac{100 \text{ ml} \times 96}{DO_{inòcul}}$$

Amb aquesta densitat òptica inicial, el cultiu en discontinu sol durar unes 20 h, temps necessari perquè s'esgoti tot el glicerol del medi.

- Condicions operacionals: Temperatura: 30 °C
pH: 5,5
Agitació: 800 rpm
Cabal d'aire: 4 l/min (1vvm aproximadament)

Transició

- Connecteu l'aire del sensor del metanol perquè s'estabilitzi la lectura.
- Canvieu la base; treure NH₃ 30 % i poseu KOH 5 M.
- Transició. Per canviar la font de carboni es segueix la pauta d'alimentació indicada a la taula 3.1.1.

106

Taula 3.1.1 Cabal d'alimentació de les fonts de carboni en la transició.

Hora	Cabal de metanol (µl/min)	Cabal de glicerol (µl/min)
1	0	300
2	0	300
3	100	160
4	100	100
5	100	65

Discontinuu alimentat

- Quan acaba la transició es para la microbureta del glicerol i s'activa el control de metanol. Cal introduir els paràmetres de calibrat (taula 3.1.2) i els del controlador (taula 3.1.3).

Taula 3.1.2 Paràmetres del calibrat de la sonda de metanol.

Y _o	-0,21903
a	0,08849
b	0,81258

Taula 3.1.3 Paràmetres del controlador de metanol. S'indiquen per les dues microburetes utilitzades: de volum màxim de 1,0 o 2,5 ml.

	1ml	2,5ml
τ	2,5	1,0
K_p	0,08	0,1

- Afegiu metanol perquè el fermentador estigui a la consigna de 2 g/l (9 ml), així no costa tan que el sistema s'estabilitzi.
- Quan la biomassa arriba a 40 i 80 g/l afegiu una ampolla de 250 ml de NH_4Cl per aportar font de N. Durant la fase de cultiu en discontinu s'utilitza amoníac com a base i font de nitrogen, però com que crea interferències al sensor de metanol, es canvia per KOH, d'aquesta manera ens quedem sense font de nitrogen que s'aporta en forma d'aquesta salt.
- Preneu mostres periòdicament per anar analitzant.

SALTS TRAÇA (1l)

- 6,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Cat. No. 2790)
- 0,08 g NaI (Panreac, Cat. No. 131542)
- 3,0 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Panreac, Cat. No. 131413)
- 0,2 g $\text{NaMo} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, Cat. No. 141701)
- 0,02 g Bòric Àcid (Panreac, Cat. No. 131015)
- 0,915g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, Cat. No. 141232)
- 0,5 g CoCl_2 (Panreac, Cat. No. 141257)
- 20,0 g ZnCl_2 (Panreac, Cat. No. 131779)
- 65,0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, Cat. No. 141362)
- 5,0 ml H_2SO_4 (Panreac, Cat. No. 211058)

Dissoleu tots els compostos en 1 l d'aigua destil·lada, esterilitzeu per filtració.

MEDI INVITROGEN (3,5 l)

- 90,17 ml H_3PO_4 , 85% (Panreac, Cat. No. 141032)
- 3,26 g CaSO_4 (Panreac, Cat. No. 141235)
- 63,70 g K_2SO_4 (Panreac, Cat. No. 141532)
- 52,15 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Panreac, Cat. No. 141404)
- 14,46 g KOH (Panreac, Cat. No. 141515)
- 140,0 g Glicerol (Panreac, Cat. No. 141339)
- 15,5ml de salts traça.
- Biotina 500X (Sigma, Cat. No. B4501)

1. Dissoleu els sis primers compostos en un volum final de 3,5 l d'aigua destil·lada.
2. Autoclaveu en un programa a 121 °C durant 20 min.
3. Afegiu els 15,5 ml de la solució de salts traça al medi estèril i fred i 7,0ml de solució de biotina 500X.

3.2.4 Anàlisi de les mostres

De les mostres s'analitzen diferents paràmetres: proteïna total, biomassa, concentració de metanol i producció de eCG.

3.2.4.1 Proteïna total

S'utilitza l'assaig de Bradford en microplaques de 96 pous. Es segueixen les instruccions del kit comercial de la casa Pierce (Cat. No. 23236). L'anàlisi es pot fer en dos rangs; alt (de 100 a 1500 µg/ml) i baix (de 1 a 25 g/ml).

RANG ALT:

1. Prepareu els patrons del rang desitjat segons les indicacions de la taula 3.1.4. Es parteix d'un estoc de BSA de concentració de 2000 µg/ml.

Taula 3.1.4 Proporcions de BSA i diluent per preparar els patrons del rang alt.

Vial	Concentració BSA (µg/ml)	Quantitat solució BSA (µl)	Quantitat Aigua destil·lada (µl)
A	2000	300 (Estoc)	0
B	1500	375 (Estoc)	125
C	1000	325 (Estoc)	325
D	750	175 (vial B)	175
E	500	325 (vial C)	325
F	250	325 (vial E)	325
G	125	325 (vial F)	325
H	25	100 (vial G)	400
I	0 (Blanc)	0	400

2. Poseu 5 µl de cada patró i cada mostra per triplicat en un pou de la microplaca.
3. Amb una micropipeta multicanal, afegiu 250 µl del reactiu de *Comassie*.
4. Agiteu la placa i deixeu un màxim de 10 min a temperatura ambient.
5. Feu la lectura a 595 nm.
6. Dibuixeu una recta de regressió amb els patrons del rang lineal.
7. Calculeu la concentració de proteïna total de les mostres a partir de les lectures obtingudes. Calculeu la mitjana amb els valors que entrin dins del calibrat, els que quedin per sota, utilitzar el rang baix, els que quedin per sobre feu una dilució i repetiu l'anàlisi en aquest mateix rang.

RANG BAIX:

1. Prepareu els patrons segons les indicacions de la taula 3.1.5. Es parteix d'un estoc de BSA a una concentració de 2000 µg/ml.

Taula 3.1.5 Proporcions de BSA i diluent per preparar els patrons del rang baix.

Vial	Concentració BSA ($\mu\text{g/ml}$)	Quantitat solució BSA (μl)	Quantitat Diluent (μl)
A	25	30 (Estoc)	2370
B	20	50 (Estoc)	4950
C	15	30 (Estoc)	3970
D	10	2500 (vial B)	2500
E	5	2000 (vial D)	2000
F	2,5	1500 (vial E)	1500
G	0 (Blanc)	0	5000

2. Poseu 150 μl de cada patró i cada mostra per triplicat en un pou de la microplaca.
3. Amb una micropipeta multicanal, afegiu 150 μl del reactiu de Comassie.
4. Seguiu com en el rang alt.

3.2.4.2 Biomassa

La quantitat de biomassa es mesura de dues maneres; mentre es porta a terme el cultiu es mesura la densitat òptica a 600 nm. Un cop s'ha acabat es mesura el pes sec d'algunes mostres.

ABSORBÀNCIA. Es mesura a 600 nm. Feu la dilució adequada perquè la lectura d'absorbància sigui inferior a 1,0.

Per saber el pes sec aproximat durant el cultiu i a partir de la mesura d'absorbància es fa una recta que relacioni els dos paràmetres. En l'annex 4 es mostra aquest calibrat.

PES SEC. Es fa un sol anàlisi per mostra. Cal recollir el volum adequat de cada mostra segons en el moment del cultiu que s'ha pres, tenint en compte la quantitat de biomassa esperada (calculada a partir de la DO, com ja s'ha esmentat); com més biomassa s'espera menys volum cal agafar.

1. Utilitzeu filtres de fibra de vidre de 1,2 μm de diàmetre de por (Millipore, Cat. No. APFC04700). Marqueu-los i deixeu-los a l'estufa a 100 °C durant un mínim de 24 h.
2. Abans d'utilitzar-los, deixeu-los al dessecador un mínim de 2 h.
3. Tareu els filtres (F_t).
4. Centrifugueu els 5ml de mostra a 12000 xg durant 5 min.
5. Resuspeneu el pellet amb 5 ml de solució isotònica (NaCl 0,9 %. Panreac Cat. No. 121659.1211).
6. Repetiu els passos 4 i 5 dues vegades més. L'última vegada, resuspeneu el pellet amb aigua destil·lada.
7. Filtreu la solució resultant.

8. Renteu el filtre amb 10 ml d'aigua per eliminar les possibles salts provinents del medi que puguin quedar.
9. Assequeu el filtre a l'estufa a 100 °C fins que el pes sigui constant.
10. Deixeu al dessecador durant 2 h.
11. Peseu el filtre amb la mostra (F_m).
12. Calculeu el pes sec, en g/l, amb la següent fórmula:

$$Pes\ sec\ (g/l) = \left[\frac{F_m - F_t}{V} \right] \cdot \frac{1000\ ml}{1l}$$

3.2.4.3 Metanol

EL metanol s'analitza per cromatografia de gasos (Hewlett Packard 5890Cap). S'utilitza la columna HP-Innowax 30 m x 0,53 mm x 1,00 µm de pel·lícula (Agilent).

1. Preparació de la mostra. Centrifugueu la mostra a 12000 xg durant 5 min.
2. Filtreu el sobrenedant a través d'un filtre de nitrocel·lulosa de 0,45 µm de por (Millipore Cat. No. HAWP01300)
3. Barregeu, a parts iguals, la mostra filtrada i el patró intern d'isopropanol a 4 g/l (SDS, Cat. No. P0953721). Ja podeu analitzar la mostra.
4. El cromatògraf té un programa associat per poder fer l'anàlisi. Feu, prèviament un calibrat de 0 a 5 g/l de metanol.
5. Les condicions cromatogràfiques per fer l'anàlisi és el següent:
 - a. Portador: Heli a 15 KPa.
 - b. Flux de la columna: 8,0 ml/min.
 - c. Flux divisió: 24,4 ml/min.
 - d. Flux septe: 4,9 ml/min.
 - e. Injecció: 1 µl, split.
 - f. Temps d'anàlisi: 12 min.
 - g. Injector A: 220 °C.
 - h. Detector B: FID a 280 °C.
 - i. La temperatura del forn segueix el perfil indicat en la figura 3.1.3.
 - j. Amb el programari Empower Pro es fa l'adquisició i tractament de les dades obtingudes.

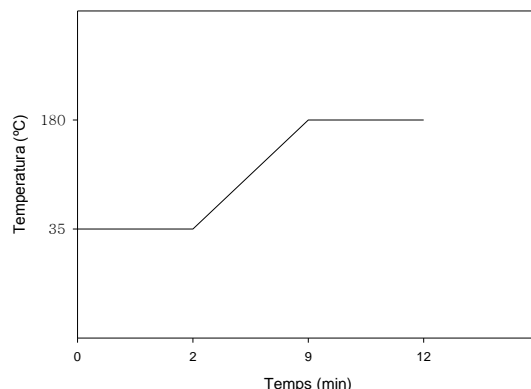


Fig. 3.1.3 Gràfic amb el perfil de temperatura que hi ha d'haver en el forn per l'anàlisi de metanol.

3.2.4.4 Anàlisi qualitatiu de eCG

Es fa un gel d'acrilamida i una transferència Western, seguint el protocol detallat a continuació.

3.2.5 Gels d'acrilamida

3.2.5.1 Preparació gels

Per analitzar la producció de eCG s'utilitzen gels d'acrilamida a diferent concentració: 7,5; 12 i 15 %.

Taula 3.1.6 Quantitat de cada element necessària per preparar els gels d'acrilamida a diferents concentracions.

	Gel apilador		Gel separador	
	4%	7,5%	12%	15%
Aigua destil·lada	6,1 ml	4,85 ml	3,35 ml	2,35 ml
Tris·HCl 1,5 M pH<8,8*		2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Tris·HCl 0,5 M pH<6,8*	2,5 ml			
SDS 10% (p/v) (Sigma, Cat. No. L-5750)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Acrilamida/Bis (30%) (BioRad Cat. No. 161-0156)	1,33 ml	2,5 ml	4,0 ml	5,0 ml
Persulfat amònic 10% (p/v) (Sigma, Cat. No. A3678)**	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED (Pharmacia Biotech Cat. No. 17-1312-01)	10 µl	5 µl	5 µl	5 µl

* Preparar les solucions de Tris(Hidroximetil)aminometà (Panreac, Cat. No. 141940) amb aigua i ajustar el pH amb HCl concentrat.

** Preparar la solució de persulfat amònic (Pharmacia Biotech Cat. No. 17-1311-01) en fresc abans de ser utilitzada. També es pot congelar.

Es fa un gel separador al 7,5 o 12 o 15 % d'acrilamida, Tris·HCl 0,375 M, pH 8,8, i un gel apilador al 4 %, Tris·HCl 0,125 M, pH 6,8. En la taula 3.1.6 es mostren les quantitats de cada component en cada gel.

Amb aquestes quantitats s'obté prou preparat per fer dos gels de 0,75 mm de gruix.

Un cop preparats els vidres que contindran el gel en el suport, fer la barreja posant els elements en l'ordre de la taula. Un cop ple fins el nivell desitjat posar n-butanol (SDS, Cat. No. 0170521) saturat amb aigua perquè el gel polimeritzi bé (interfase llista) i més ràpidament. Un cop polimeritzat, treure el n-butanol i afegir la barreja pel gel apilador, posar la pinta que farà els pous i procurar que no hi quedin bombolles d'aire. Un cop polimeritzat posar a la cubeta i carregar les mostres.

Barrejar les mostres amb el tampó de càrrega a proporció 1:4 i escalfar a 95 °C durant 10 min.

Omplir la cubeta amb 300 ml del tampó de correguda 1X, cal fer la dilució ja que la solució estoc és 5X.

Córrer els gels a 20 mA (constants) durant 1h aproximadament. Procurar que el front electroforètic no surti del gel.

TAMPÓ DE CÀRREGA SDS-PAGE (8 ml)

- o 3,8 ml Aigua destil·lada
- o 1,0 ml Tris 0,5 M pH 6,8 (Panreac, Cat. No. 141940)
- o 0,8 ml Glicerol (Panreac, Cat. No. 141339)
- o 1,6 ml SDS 10 % (p/v) (Sigma, Cat. No. L-5750)
- o 0,4 ml β -mercaptoetanol (Sigma, Cat. No. M-6250)
- o 0,4 ml Blau de bromofenol 1 % (p/v) (Merck, Cat. No. 8122.0005)

EL TAMPÓ DE CORREGUDA 5X

- o 15 g/l Tris Panreac, Cat. No. 141940)
- o 72 g/l Glicina (Merck, Cat. No. 1.04201)
- o 5 g/l SDS (Sigma, Cat. No. L-5750)

Com a marcador de pes molecular de proteïnes s'han utilitzat els marcadors pretenyits de la casa Bio-Rad: rang baix (Cat. No. 161-0305), rang alt (Cat. No. 161-0309) i rang ampli (Cat. No. 161-0318). En la figura 3.1.4 es mostren les bandes que contenen cada un.



Fig. 3.1.4 Distribució de les bandes dels marcadors de pes molecular utilitzats en els gels d'acrilamida i les transferència Western. Al costat s'hi mostra la proteïna i el seu pes molecular aproximat.

3.2.5.2 Tinció dels gels

Comassie col·loïdal

1. Poseu els gels en una placa de petri gran i cobriu amb la solució fixadora. Deixeu 1 h en agitació suau.
2. Traieu la solució fixadora cobriu el gel amb solució de tinció. Deixeu o/n en agitació suau.
3. Renteu amb aigua destil·lada durant 10 min.

SOLUCIÓ FIXADORA

- o 45 % Metanol (Panreac, Cat. No. 141091)
- o 1 % Àcid acètic (Panreac, Cat. No. 211008)

SOLUCIÓ DE TINCIÓ (1l)

- o 170 g Sulfat amònic (Panreac, Cat. No. 141140)
 - o 1 g *Comassie* (BioRad, Cat. No. 161-0400)
 - o 0,5 % àcid acètic (5 ml) (Panreac, Cat. No. 211008)
 - o 34 % Metanol (340 ml) Cat. No. 141091
1. Dissoleu, en un vas de precipitats, el persulfat amònic en la mínima quantitat d'aigua.
 2. Afegiu el metanol poc a poc en el vas agitant-se, es formarà una emulsió de color blanc.
 3. Afegiu lentament el *Comassie* dissolt en una mica d'aigua i l'acètic.
 4. Acabeu d'afegir l'aigua, lentament, fins arribar a un litre.

Tinció de plata

1. Poseu els gels en una placa de petri gran i cobriu amb la solució fixadora un mínim de 30 min. Es pot deixar o/n. En els dos casos en agitació suau.
2. Cobriu el gel amb solució oxidant durant 5 min i en agitació suau.
3. Renteu amb aigua destil·lada fins que el gel perdi totalment el color groc (màxim 15 min). Canvieu l'aigua tantes vegades com sigui necessari.
4. Cobriu el gel amb el reactiu de plata durant 20 min i en agitació suau.

5. Feu un rentat ràpid amb aigua d'un màxim de 30 segons.
6. Cobriu el gel amb la solució de revelat. Canvieu la solució quan apareix un precipitat de color marró o cada 5 min. Repetiu fins que la intensitat de les bandes del gel sigui la desitjada.
7. Cobriu amb la solució stop durant 15 min.
8. Renteu amb aigua destil·lada.

SOLUCIÓ FIXADORA

- o 40 % Metanol (Panreac, Cat. No. 141091)
- o 10 % Àcid acètic (Panreac, Cat. No. 211008)

SOLUCIÓ OXIDANT

- o 5 ml de solució concentrada (Bio-Rad, Cat. No. 161-0444)
- o 45 ml d'aigua destil·lada.

REACTIU DE PLATA

- o 5 ml de solució concentrada (Bio-Rad, Cat. No. 161-0445)
- o 45 ml d'aigua destil·lada.

SOLUCIÓ DE REVELAT

- o 3,2 g de revelador (Bio-Rad, Cat. No. 161-0447)
- o 100 ml d'aigua destil·lada.

SOLUCIÓ STOP

- o 5 % Àcid acètic (Panreac, Cat. No. 211008)

3.2.6 Transferència de punts (*Dot-blot*)

1. Poseu gotes de 2 µl de cada mostra i del control positiu (hCG a 100 mg/ml, Sigma, Cat. No. C0434) sobre la membrana (Amersham, Cat. No. RPN303D). Deixeu adsorbir la proteïna durant 1h.
2. Renteu amb PBS-tween una vegada.
3. Incubeu amb PBS-tween amb llet descremada (Oxoid, Cat. No. LP0031) al 5 % durant 1 h o o/n i amb agitació.
4. Renteu amb PBS-tween una vegada.
5. Incubeu amb l'anticòs primari Rabbit anti-hCG (Sigma, cat. No. C8534) en PBS-tween amb llet descremada al 1 % durant 1 h i amb agitació. Dilució 1:500.
6. Renteu amb PBS-tween tres vegades durant 5min.
7. Incubeu amb l'anticòs secundari anti-rabbit Peroxidase conjugated (Sigma, Cat. No. A8275) en PBS-tween i llet descremada al 1 % durant 1 h i amb agitació. Dilució 1:5000.

8. Renteu amb PBS-tween tres vegades.
9. Incubeu amb 5 ml de cada un dels reactius del kit SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Cat. No. 34078) durant 5 min.
10. Reveleu fotogràfica o colorimètricament seguint els protocols dels apartats 4.2.1.2 i 4.2.1.3.

PBS-TWEEN 0,1 %

- o 1 ml Tween 20 (Sigma, Cat. No. P7949)
- o 8 g NaCl (Panreac, Cat. No. P7949)
- o 0,2 g KCl (Panreac, Cat. No. 131494)
- o 0,619 g Na₂HPO₄·12H₂O (Panreac, Cat. No. 141678)
- o 0,2 g KH₂PO₄ (Panreac, Cat. No. 141509)

Dissoleu totes les sals en 750 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu el pH a 7,3 i el volum a 1 l. Afegiu el Tween 20.

3.2.7 Transferència Western

Un cop realitzada l'electroforesi, es prepara el següent sandvitx per fer la transferència de les proteïnes del gel a una membrana de nitrocel·lulosa (Amersham, Cat. No. RPN303D).

1. Prepareu el sandvitx segons mostra la figura 3.1.4.

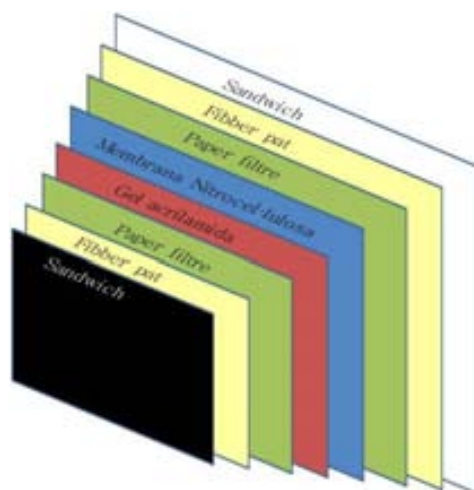


Fig. 3.1.5 Esquema del sandvitx per fer la transferència de proteïnes del gel d'acrilamida a la membrana de PVDF.

2. Poseu el sandvitx en la cubeta i ompliu-la amb tampó transferència.
3. Connecteu la cubeta 150 mA (constant) durant 1 h.
4. Desmuntar el sandvitx.
5. Poseu la membrana en una placa de vidre, s'ha de tenir en compte que la cara que té les proteïnes unides quedi a la part superior.

6. Cobriu la membrana amb solució de bloqueig, per tal d'evitar la unió inespecífica dels anticossos a la membrana. Deixeu en agitació suau durant 1 h o o/n.
7. Renteu amb PBS-Tween una vegada.
8. Incubeu amb la solució d'incubació i l'anticòs primari: anti-hCG produït en conill (Sigma, Cat. No. C8534) a una dilució de 1/1000 durant 2 h i amb agitació suau.
9. Renteu amb PBS-Tween tres vegades durant 5 min en agitació suau.
10. Incubeu amb la solució d'incubació i l'anticòs secundari: anti-conill amb fosfatasa alcalina unida (Sigma, Cat. No. A0418) a una dilució 1/10000 durant 2h i amb agitació suau.
11. Renteu amb PBS-Tween tres vegades durant 5 min en agitació suau.
12. Incubeu amb la solució de substrat 15-30 min amb agitació suau. Es forma un precipitat morat-marró ens els punts on hi havia la proteïna reconeguda per l'anticòs primari.

TAMPÓ DE TRANSFERÈNCIA

- 20 mM Tris (Panreac, Cat. No. 141940)
- 150 mM Glicina (Merck, Cat. No. 1.04201)
- 20% (v/v) metanol (Panreac, Cat. No. 141091)

Dissoleu-ho tot en aigua i ajusteu el pH a 8,1-8,5.

PBS (1 l)

- 8g NaCl (Panreac, Cat. No. 141659)
- 0,2g KCl (Panreac, Cat. No. 131494)
- 0,619g Na₂HPO₄ (Panreac, Cat. No. 141678)
- 0,2g KH₂PO₄ (Panreac, Cat. No. 141509)

Dissoleu-ho tot en aigua destil·lada, ajusteu el pH a 7,5.

PBS-TWEEN 0,1%

- 0,1 % (v/v) Tween (Aldrich, Cat. No. 27.434-8)

Dissoleu en PBS.

SOLUCIÓ DE BLOQUEIG

- 3 % de *Milk skim* (Oxoid, Cat. No. LP0031)

Dissoleu en PBS-tween 0,1 %.

SOLUCIÓ D'INCUBACIÓ

- 1 % de *Milk skim* (Oxoid, Cat. No. LP0031)

Dissoleu en PBS-tween 0,1 %.

SOLUCIÓ DE SUBSTRAT *Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit* (Bio-Rad, Cat. No. 170-6432).

- 4 ml *AP substrate 4X*
- 1 ml reactiu A
- 1ml reactiu B

Dissoleu els 4 ml de solució concentrada. Un cop homogeneïtzat, afegiu 1 ml dels reactius A i B.

3.3 Resultats i discussió

3.3.1 Cultiu en *erlenmeyer*

Amb aquests cultius es vol comprovar el fenotip Mut⁺ de les soques obtingudes (la integració del cassat pot donar, en una petita proporció, una recombinació en dos punts eliminant un dels gens *AOX* del genoma). També es vol avaluar les possibles efectes negatius que pot tenir l'expressió de la eCG en el creixement de les soques obtingudes.

En darrer lloc es col·leccionar el millor clon productor per fer els cultius en bioreactor.

3.3.1.1 Soques que produeixen eCG

S'han construït quatre tipus de soques; les que produeixen una única cadena, α o β , i les que produeixen les dues cadenes. D'aquestes darreres se'n tenen de dos tipus; les que tenen clonat primer el gen de la cadena α i després el de la β ($\alpha+\beta$) i les que tenen clonats els gens a la inversa ($\beta+\alpha$).

Es fan cultius en medi BMMY d'una de les soques de cada tipus per veure si pot sorgir algun problema de creixement associat a la producció de la proteïna heteròloga amb alguna d'aquestes construccions. En la figura 3.2.1 se'n mostren les corbes de creixement en medi BMMY utilitzant metanol com a font de carboni i substrat inductor del producte heteròleg.

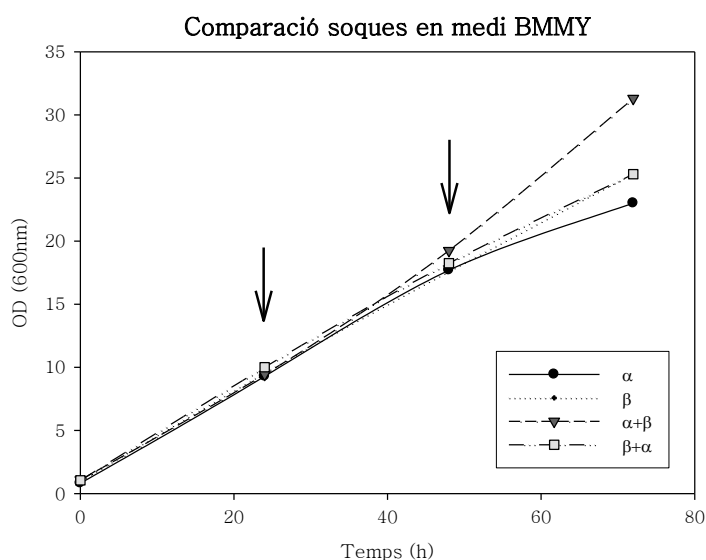


Fig. 3.2.1 Evolució de la biomassa expressada com absorbància. Les fletxes indiquen quan s'afegeixen els 5g/l de metanol.

Tal com mostra la figura 3.2.1, sembla que no hi ha efecte negatiu sobre el creixement pel fet de produir una cadena o totes dues; totes quatre creixen d'una manera similar i tenen un temps de latència similar. Sembla que la producció del producte final de dues cadenes no comporta un estrès addicional per a la cèl·lula comparat amb la producció de les cadenes individuals.

A la vista d'aquests resultats es treballa únicament amb les soques de construccions ($\alpha+\beta$) i ($\beta+\alpha$). De la selecció de clons s'han obtingut cinc clons que contenen la construcció $\alpha+\beta$ i cinc que contenen la $\beta+\alpha$.

Amb aquest deu clons s'han fet cultius en erlenmeyer com experiment preliminar per avaluar i comparar les diferents soques obtingudes i verificar, si n'hi ha diferents nivells d'expressió entre clons i construccions. S'han fet en un agitador orbital, primer en medi BMGY per produir biomassa i després s'han passat a medi BMMY per induir la producció de eCGr. Cada 24 h s'ha afegit metanol a una concentració final de 5 g/l per mantenir la producció de eCGr. Els cultius han durat 72 h.

S'ha extret una mostra cada 24 h, d'aquestes s'ha fet un anàlisi qualitatiu de la proteïna del sobrenedant en un gel SDS-PAGE que es mostra en la figura 3.2.2 i una transferència de punts de la eCGr que es mostra en la figura 3.2.3.

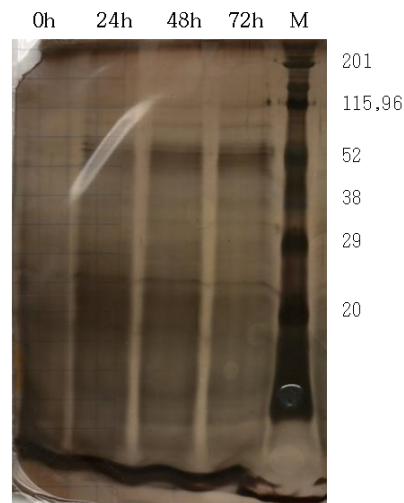


Fig. 3.2.2 Gel d'acrilamida al 12 % tenyit amb plata. Els quatre primers carrils indiquen les hores del cultiu $\alpha+\beta$ 1, M és el marcador de pes molecular, a la dreta s'indiquen les mides en kDa.

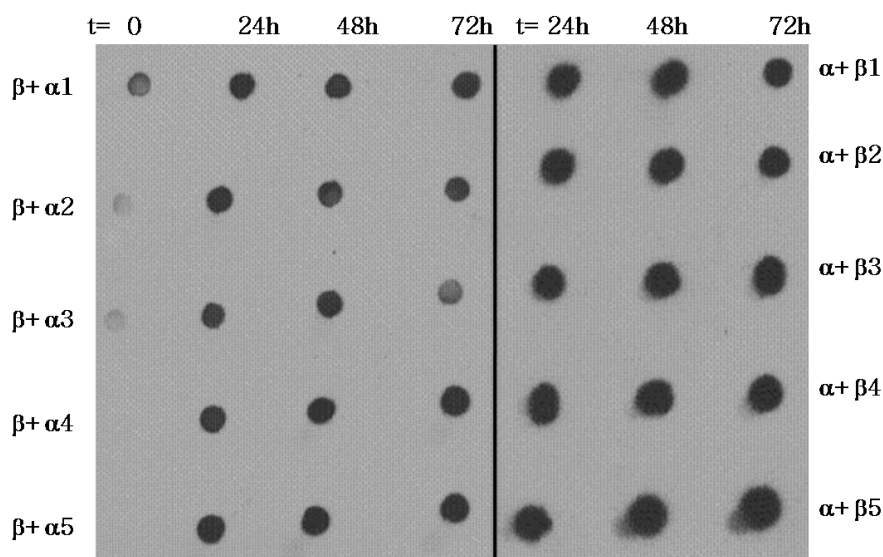


Fig. 3.2.3 Transferència de punts amb detecció fotogràfica de les mostres dels cultius fets amb les diferents soques (indicades a l'esquerra) a diferents temps (indicats a la part superior).

En el gel i a temps 0 h, quasi no hi ha proteïna en el brou de cultiu, en aquesta mostra tot just s'han posat les cèl·lules en el medi amb metanol, per tant l'única proteïna que hi pot haver és l'adsorbida a la paret cel·lular o a l'espai periplasmàtic que pot haver passat al medi per un efecte de rentat de les cèl·lules al ser resuspeses en el nou medi de cultiu. Tot i així, en la mateixa mostra de la mateixa soca de la transferència de punts, l'anticòs sembla ser capaç de reconèixer nivells molt baixos d'alguna proteïna en el brou dels transformants 1, 2 i 3. Una possible explicació del senyal detectat a t=0 podria ser que l'anticòs pot reconèixer de manera inespecífica estructures glicosilades d'elevada mida de proteïna (tal com es discuteix a l'apartat 4.2.2.1a). No obstant, el secretoma de *P. pastoris* no sembla contenir proteïnes altament glicosilades (Mattanovich D *et al.*, 2009).

Taula 3.2.1 Dades de proteïna total i biomassa en l'últim punt del cultiu de les diferents soques obtingudes. També es mostra la relació entre la proteïna total i la biomassa, en cada cultiu.

Soca	Absorbància (A ₆₀₀)	Proteïna total (mg/l)	Prot. Total/Biomassa
$\alpha + \beta 1$	25,5	156,9	6,17
$\alpha + \beta 2$	25,1	156,9	6,27
$\alpha + \beta 3$	24,9	163,0	6,54
$\alpha + \beta 4$	27,2	162,3	5,97
$\alpha + \beta 5$	32,3	171,8	5,33
$\beta + \alpha 1$	27,8	95,64	3,47
$\beta + \alpha 2$	26,8	102,4	3,83
$\beta + \alpha 3$	28,1	109,8	3,91
$\beta + \alpha 4$	27,8	101,1	3,64
$\beta + \alpha 5$	25,1	80,84	3,23

A la taula 3.2.1 es mostren els resultats d'absorbància, proteïna extracel·lular total i rendiment proteïna/absorbància dels diferents cultius. Cal destacar, en aquest punt, que al no disposar d'un mètode d'anàlisi quantitatiu de la eCGr produïda i amb l'objectiu de disposar d'alguna mesura que es pugui correlacionar amb la eCGr produïda, en aquest capítol s'utilitzarà la mesura de la proteïna extracel·lular total com a mesura indirecta, suposant que la producció de la eCGr d'alguna manera va relacionada amb aquesta magnitud.

El primer que cal destacar és que els clons $\alpha+\beta$ sembla que són més bons secretors de proteïna que els $\beta+\alpha$, ja que la intensitat de les taques de l'anàlisi de la transferència de punts són més grans. Això es correlaciona també amb els nivells de proteïna extracel·lular assolits; 1,5 vegades més gran en les construccions $\alpha+\beta$.

Un altre fet que cal destacar és que en la majoria de les soques i en la mostra de temps d'inducció 0 (just acabat d'inocular el medi d'inducció amb cada una de les soques) sembla que hi ha presència de eCGr. Com s'ha esmentat abans, això pot ser degut a un problema analític associat a la tècnica de la transferència de punts, però també pot ser degut a un motiu genètic; al final d'aquesta fase sense presència de metanol no hi hauria d'haver producció de proteïna. S'ha vist en altres estudis de producció de productes heteròlegs controlats pel promotor *AOX*, que quan s'acaba la font de carboni que el reprimeix, per exemple glucosa o glicerol, hi ha un cert grau de desinhibició de promotor, donant lloc a una lleu producció de proteïna recombinant (Hartner F and Glieder A, 2006). Aquest fet justificaria els nivells basals observats a temps 0 en alguns clons. Aquest punt a $t=0$ es considera el control negatiu de la tècnica, ja que són mostres de cèl·lules crescudes en glicerol acabades de transferir, per tant, no s'hi hauria de detectar res.

Per altre banda, no es poden distingir diferències significatives en la capacitat de producció dels diferents clons del mateix grup; no es veu cap clon que sigui més productor que la resta.

Qualitativament sembla que el clon $\alpha+\beta 5$ és el més productor, però s'ha de tenir en compte (taula 3.2.1) que és el cultiu que ha assolit una concentració de biomassa més gran. Si es normalitza amb els nivells de biomassa generada, la producció es molt similar en tots els clons.

Es pot concloure que les soques $\alpha+\beta$ són més bones productores que les $\beta+\alpha$, per aquest motiu s'escollirà una soca $\alpha+\beta$ per continuar els estudis en bioreactor. Pel que fa a la selecció dels clons $\alpha+\beta$ i degut a que pràcticament no s'observen diferències en els nivells de eCGr produïts es decideix seleccionar el clon $\alpha+\beta 1$ com a clon de producció en bioreactor.

3.3.1.2 Comparació entre una soca productora de eCG amb una soca productora de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) i la soca de fenotip salvatge

Moltes vegades la producció d'un producte heteròleg suposa, per al microorganisme hoste, una càrrega extra tan gran que repercuteix negativament en el seu creixement. Per aquest motiu es fan uns cultius en erlenmeyer on es compara una de les soques productores de eCGr ($\alpha + \beta 1$) amb un altre soca, també de *P. pastoris*, que produeix ROL, i que s'ha demostrat que la seva producció afecta negativament al seu creixement (Cos O *et al.*, 2005) i la soca salvatge de *P. pastoris* X-33.

Aquesta comparació s'ha realitzat en cultius en erlenmeyer en un agitador orbital, utilitzant glicerol i metanol com fonts de carboni. Quan s'ha utilitzat glicerol com a font de carboni (medi BMGY), s'ha vist, com era d'esperar, que l'evolució del creixement per les tres soques és semblant. Com que no estan en condicions d'inducció, les tres soques degraden aquest substrats de manera equivalent.

Les diferències són més significatives quan es fan els cultius en el medi ric amb metanol com a font de carboni (BMMY), en aquestes condicions hi ha inducció i producció del producte heteròleg. A la figura 3.2.4 es presenten les corbes de creixement en experiments replicats per cada soca.

Cal destacar que la rèplica 2 de la soca salvatge X-33 no segueix el mateix perfil que la resta, segurament hi ha hagut algun problema amb el cultiu o en l'anàlisi de la biomassa, per tant no es tindrà en compte a l'hora de comentar la gràfica.

Per altra banda cal comentar que no s'ha controlat la concentració de metanol en cada cultiu, així doncs no se sap si tot el metanol ha estat consumit pel microorganisme o si part s'ha perdut per *stripping* o s'ha acumulat a l'erlenmeyer. Per la soca X-33 és probable que les pèrdues per *stripping* siguin menyspreables i segurament no s'ha produït acumulació, ja que es consumeix ràpidament. En canvi, per les soques de ROL i eCG no és tan segur ja que els nivells finals de biomassa assolits són inferiors als de la soca salvatge i el metanol es consumeix més lentament

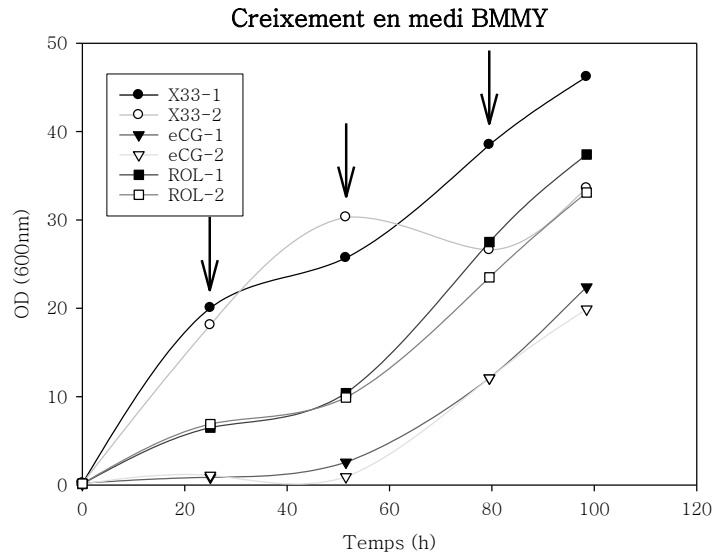


Fig. 3.2.4 Evolució de la biomassa. Les fletxes indiquen quan s'afegeix metanol a una concentració final de 5 g/l.

L'inòcul dels tres experiments va ser el mateix; es va partir d'un cultiu en medi BMGY i es va inocular el volum suficient per començar el cultiu en medi BMMY amb la mateixa biomassa. No obstant, el TEMPS DE LATÈNCIA de cada soca és bastant diferent. La soca salvatge té un temps de latència quasi nul, en aquesta soca no hi ha cap producció de proteïna recombinat sota el control del promotor *AOX*. En canvi, en les altres dues soques els temps de latència és significativament important, essent més gran en la producció recombinant de eCG que de ROL.

Aquest temps de latència en la primera fase de la inducció també s'ha observat en l'etapa d'inducció de cultius en discontinu alimentat per produir ROL, tant en soques de fenotip Mut^s com Mut^+ i associats a condicions d'alts nivells de producció (Cos O *et al.*, 2006. Surribas A, 2009. Ramon R, 2007).

Per tant els canvis observats en el temps de latència semblen ser, majoritàriament, funció de la proteïna recombinant que es produeix. Això pot ser degut al grau de complexitat de la proteïna, comparada amb la ROL, la eCG és una proteïna més petita però té dues cadenes, per tant s'han de produir dues proteïnes i s'han de plegar de manera conjunta.

La BIOMASSA FINAL assolida és més gran en la soca salvatge.

Els rendiments no s'han pogut calcular degut a la falta del seguiment de la concentració del substrat. Amb tant pocs punts tampoc s'ha calculat la velocitat específica de creixement perquè donaria una valor poc fiable i es prefereix calcular els paràmetres cinètics en condicions molt més controlades com les que s'assoleixen en un bioreactor.

3.3.2 Cultius en discontinu

Un cop seleccionat el clon i testat en erlenmeyer, es realitzen fermentacions en discontinu en un bioreactor, on les condicions físico-químiques estan molt més controlades. S'han fet cultius de 3 l de volum utilitzant dos medis diferents: el medi ric BMMY i el medi mínim BMM.

S'ha operat a una temperatura de 30 °C, el pH s'ha controlat a 5,5 mitjançant l'addició controlada de NH₃ al 30 % (v/v). L'agitació s'ha mantingut a 800 rpm, mentre que l'aeració és de 4 l/min, que equival a una mica més de 1 vvm.

3.3.2.1 Medi ric BMMY

S'ha utilitzat una soca Mut⁺, el seu fenotip fa que la velocitat d'assimilació de metanol sigui màxima. El medi ric BMMY té una concentració inicial de metanol del voltant de 8 g/l. Per poder augmentar la producció s'han afegit dos polsos de metanol al bioreactor, indicats, en les gràfiques, amb una fletxa grisa, de 38 i 19 ml, respectivament. D'aquesta manera s'ha aconseguit allargar el procés produint més biomassa i proteïna recombinant.

La decisió d'afegir metanol en un moment determinat s'ha pres en funció de la monitorització de pO₂. Les soques de fenotip Mut⁺ tenen la màxima capacitat d'assimilació de metanol ja que produeixen tant l'Alcohol Oxidasa 1 (AOX1) com la AOX2. El primer pas d'oxidació del metanol es produeix al peroxisoma i està catalitzat per la AOX, aquesta reacció comporta un consum d'oxigen molt elevat. Quan hi ha un augment de la concentració d'oxigen disponible en el reactor indica que se n'està consumint poc, per tant que no hi ha metanol, això s'utilitza com mesura indirecta per a determinar quan s'ha consumit completament el metanol. Per tant, sempre que no s'estigui a prop del valor de saturació de O₂, el consum total del metanol coincideix amb un augment sobtat del pO₂, mesura indirecta que determina quan es fa la nova adició de metanol.

Aquest fet es mostra en la figura 3.2.5 on es pot observar l'evolució de la concentració de metanol i de la concentració d'oxigen dissolt al llarg del cultiu.

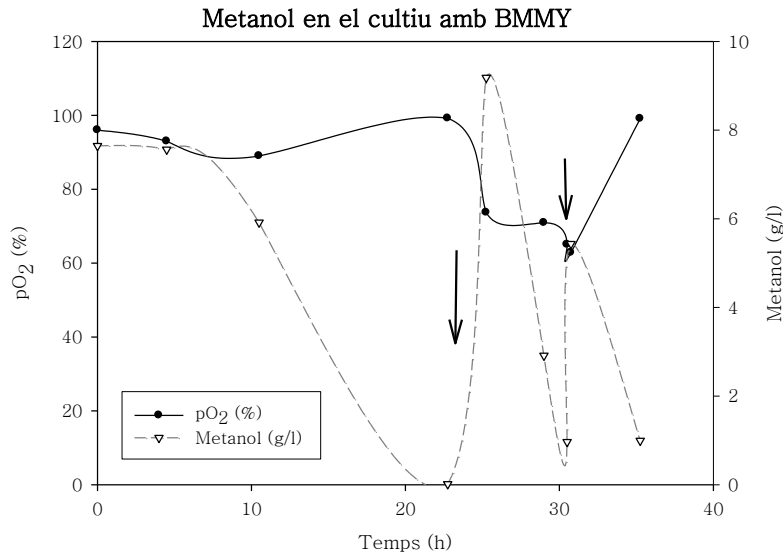


Fig. 3.2.5 Evolució de les concentracions de metanol i oxigen dissolt dins el fermentador. Les fletxes negres indiquen els punts on s'ha afegit metanol; a les 24 h i 30,5 h.

En la figura 3.2.6 es mostra el perfil del creixement, el consum de substrat i la proteïna extracel·lular total produïda en aquest procés.

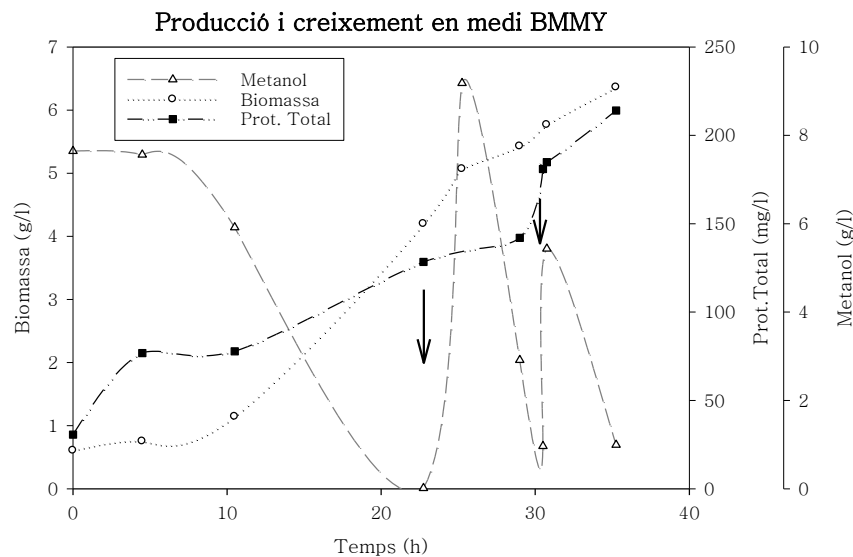


Fig. 3.2.6 Evolució de la biomassa, concentració de metanol i proteïna total produïda en un cultiu en discontinu amb medi BMMY.

L'evolució de les diferents variables analitzades segueix el comportament esperat. Després d'un període de latència, aproximadament, de 5 hores, es produeix el creixement de la biomassa de manera exponencial i pràcticament mantingut al llarg del cultiu, excepte el tram entre les 10 h i 20 h, on sembla que hi ha una segona latència i la biomassa no augmenta. Aquest fet mostra que les addicions de metanol s'han produït al poc temps de consumir-se completament el substrat sense alentir el creixement per efecte d'una manca perllongada de substrat, exceptuant el tram ja esmentat, entre les 15 i 20 h.

L'evolució de la proteïna extracel·lular total és similar a la de la biomassa generada, sembla per tant que es trobi associada al creixement. No obstant cal recordar que aquesta mesura pot ser que no estigui correlacionada amb la eCG recombinant.

Per comprovar que almenys una part de la proteïna total que s'ha mesurat es eCGr es fa una transferència de punts de les mostres del cultiu sense resultats positius. Per això s'ha repetit amb la mostra final concentrada 20 vegades. La figura 3.2.7 mostra una transferència de punts amb un control positiu de hCG a una concentració de 100 µg/ml en el que es mostra que hi ha producció de eCGr, tot i que a baixes concentracions.

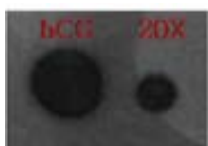


Fig. 3.2.7 Transferència de punts amb detecció fotogràfica de la mostra M9 concentrada 20 vegades. hCG és el control positiu.

Els resultats dels paràmetres característics del cultiu, tals com els rendiments, velocitat específica de creixement i productivitat, es presenten en la taula 3.2.2 i es comentaran conjuntament amb el resultats obtinguts amb el medi mínim.

3.3.2.2 Medi mínim BMM

La soca utilitzada, les condicions del cultiu en discontinu i l'estratègia d'adició de polsos de metanol utilitzant medi mimin han estat similars a les del medi ric. Cal destacar que es s'han addicionat dos polsos més de metanol, de manera que la quantitat total de substrat addicionada en medi mínim ha estat de 38,5 g/l mentre que en medi ric ha estat de 22,25 g/l. En la figura 3.2.8 es mostra el perfil.

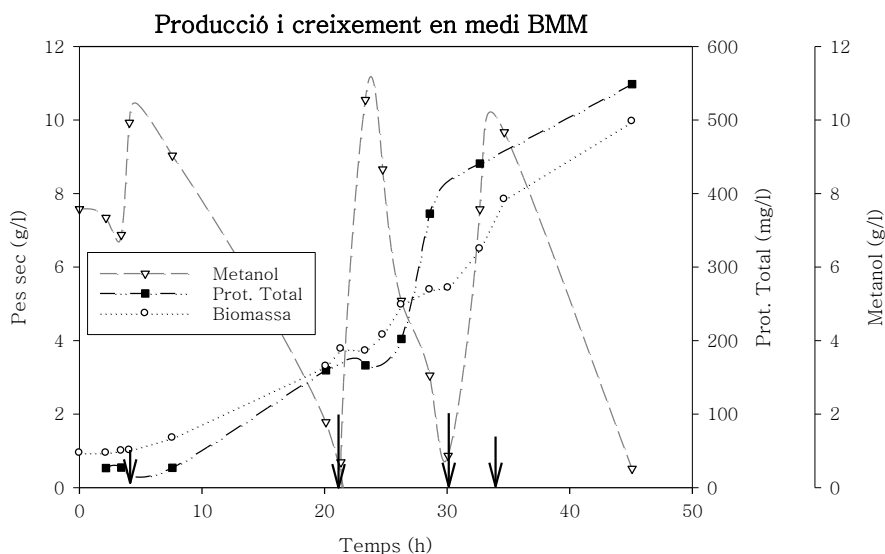


Fig. 3.2.8 Evolució de la biomassa, concentració de metanol i proteïna total en un cultiu en discontinu amb medi mínim.

El TEMPS DE LATÈNCIA es pràcticament el doble que amb medi ric, probablement com a conseqüència d'utilitzar un medi més pobre. Una vegada el cultiu es troba en fase exponencial de creixement, l'evolució de la biomassa i la proteïna extracel·lular es qualitativament semblant al medi ric.

Amb les mostres del cultiu s'ha fet una transferència de punts, mostrada a la figura 3.2.9 per verificar la presència de eCGr. S'ha canviat el mètode de detecció pels problemes que duia la detecció fotogràfica, tal com s'explica en el capítol 4. No es presenten totes les mostres, només a partir de les 21 h i sense concentrar. Es pot veure que si que hi ha hagut producció, tot i que no s'aprecia un augment significatiu d'intensitat de les taques a partir de les 29 h.

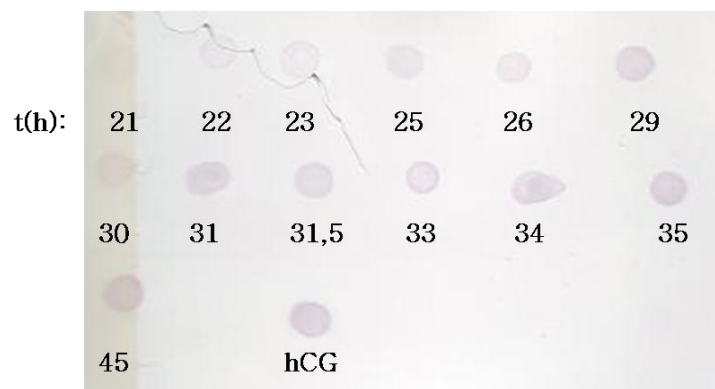


Fig. 3.2.9 Membrana de la transferència de punts realitzat amb la tècnica de detecció colorimètrica. Les mostres del cultiu són diferents temps, indicats en hores. hCG és el control positiu a una concentració de 100 µg/ml.

S'ha provat de fer una transferència Western, però la poca quantitat de eCGr produïda i la baixa sensibilitat que presenta el nou mètode de detecció (com es comentarà al capítol 4) no ha permès discernir cap banda.

Tot i que la transferència de punts es un anàlisi qualitatiu, sembla indicar que els nivells de producció són baixos, inferiors als 100 µg/ml.

3.3.2.3 Comparació dels cultius en discontinu

Per comparar els dos processos i veure les possibles influències de la composició del medi en els paràmetres característics del bioprocés s'han calculat el rendiments, velocitats específiques de creixement i productivitat presentats en la taula 3.2.2.

La durada dels cultius en medi BMMY i BMM descomptant el temps de latència és de 30,8h i 37,5h, respectivament. El temps de latència utilitzant medi mínim és més llarg, tenint en compte que els inòculs eren similars, sembla que l'ús d'aquest medi augmenta el temps de latència.

Taula 3.2.2 Característiques i paràmetres finals dels dos cultius en discontinu, realitzats en medi ric (BMMY) i medi mínim (BMM).

Paràmetre	Medi BMMY	Medi BMM
Durada (h)	35,3	45,1
Proteïna total (mg/l)	183,4	522,0
Pes sec (g/l)	5,8	9,0
Metanol afegit (g)	22,3	38,5
Velocitat específica de creixement (h^{-1})	0,064	0,062
Rendiment $Y_{(X/S)}$ (g/g)	0,26	0,23
Rendiment $Y_{(P/X)}$ (mg/g)	31,6	58,0
Productivitat (mg/l·h)	5,2	11,6

Els valors de biomassa i proteïna total mostrats són la diferència entre la mesura final i la inicial.

Els RENDIMENTS BIOMASSA/SUBSTRAT ($Y_{(X/S)}$) obtinguts són molt similars entre tots dos medis (0,23 i 0,26 gX/gS) i semblants als obtinguts per una soca de mateix fenotip (Mut⁺) produint la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) (0,27 gX/gS) (Cos O *et al.*, 2005).

L'efecte del medi de cultiu sobre el creixement del microorganisme s'ha avaluat determinant la màxima VELOCITAT ESPECÍFICA DE CREIXEMENT (μ_{max}).

En les figures 3.2.10 i 3.2.11 es mostren les regressions lineals obtingudes en el medi ric (BMMY) i en el medi mínim (BMM), respectivament.

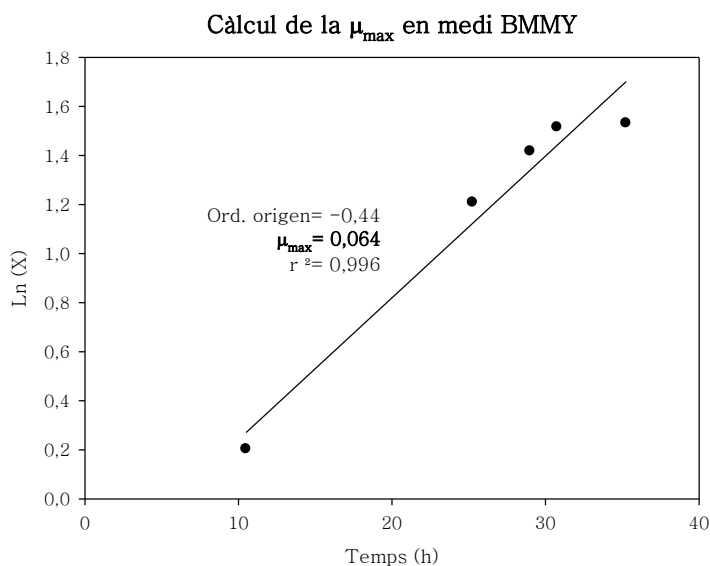


Fig. 3.2.10 Recta de regressió lineal per calcular la velocitat específica de creixement en el medi ric BMMY.

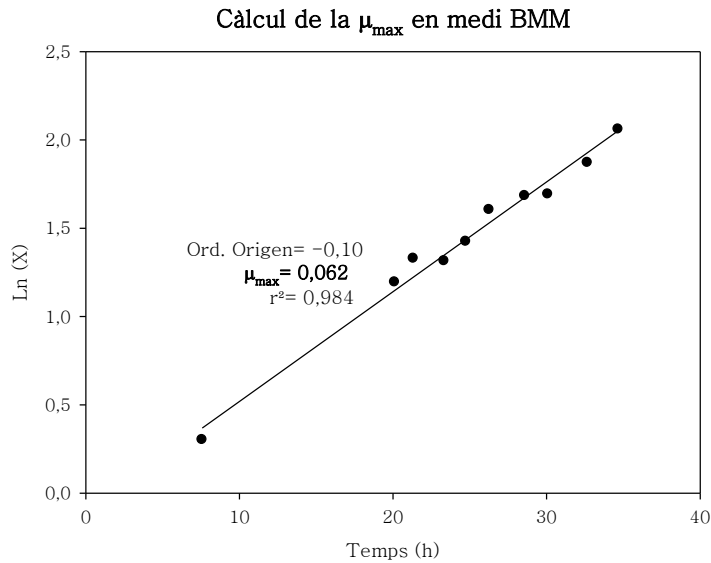


Fig. 3.2. 11 Recta de regressió lineal per calcular la velocitat específica de creixement en medi mínim (BMM).

Les múltiples addicions de metanol no afecten significativament al càlcul d'aquest paràmetre i els valors obtinguts són similars per tots dos medis; $0,065 \text{ h}^{-1}$. Aquest resultat és prou important perquè no hi ha diferències significatives en la velocitat específica de creixement per el fet de treballar amb un medi ric o mínim.

No obstant, cal esmentar que la màxima velocitat específica de creixement de la soca salvatge és entre $0,13$ i $0,14 \text{ h}^{-1}$ (Brierley RA *et al.*, 1990). Sembla clar que la producció de la eCG afecta negativament el creixement del microorganisme. La disminució d'aquest paràmetre també s'ha observat en la producció heteròloga de moltes proteïnes, entre elles la ROL, una lipasa molt estudiada per el grup de recerca, el seu valor és similar, $0,06 \text{ h}^{-1}$ (Cos O *et al.*, 2005).

La producció de ROL en cultius en discontinu alimentat d'altas densitats cel·lulars ha suposat problemes de plegament o UPR (*unfolding protein response*) (Resina D *et al.*, 2007) que són un seguit de mecanismes que es posen en marxa dins la cèl·lula com a resposta de l'acumulació de proteïna mal plegada dins la cèl·lula. A partir d'aquesta dada sembla que la producció de eCG recombinant pot tenir els mateixos problemes de UPR observats amb la ROL.

La proteïna extracel·lular total és més gran en medi mínim, la major producció de biomassa no compensa l'augment de la producció de proteïna, essent el RENDIMENT PROTEÏNA/BIOMASSA ($Y_{(P/X)}$) en medi mínim 1,8 vegades superior al de medi ric. És difícil fer una correlació amb eCGr produïda a partir d'aquesta dada, ja que no es coneix el percentatge de eCG en la proteïna total.

Pel que fa a la PRODUCTIVITAT, referida a la proteïna total, el medi mínim és 2,2 vegades més productiu.

A partir de la transferència de punts feta amb les mostres de cada cultiu es pot fer una aproximació de la quantitat de eCGr que s'ha produït. En la figura 3.2.7

es veu com la taca corresponent a 100 µg/ml de hCG és unes quatre vegades més gran que la de la mostra concentrada 20 vegades de eCGr. Si es considera que l'afinitat de l'anticòs per les dues hormones és semblant es podria assumir que la concentració de la mostra concentrada és de 25 µg/ml, per tant que en l'última mostra del cultiu en medi ric hi ha una concentració de eCGr de 1,25 µg/ml.

Fent un procés equivalent amb la transferència de punts de la figura 3.2.9 es podria dir que la concentració del control positiu (hCG) i de l'última mostra del cultiu són la mateixa, per tant de 100 µg/ml. Aquests nombres no es poden agafar com a reals, però, a grans trets, confirmen el que mostra l'anàlisi de proteïna total; el medi mínim dona una millor producció.

Com a conclusió general, podem dir que el medi mínim té un comportament similar al medi ric en termes de creixement, excepte el temps latència que és major. Però la producció de proteïna extracel·lular és major.

3.3.3 Cultius en discontinu alimentat

130

Abans de tot cal esmentar que la intenció d'aquesta part del treball no és optimitzar la producció de l'estratègia de cultiu seleccionada sinó obtenir la suficient quantitat de producte heteròleg per poder-lo caracteritzar i avaluar la seva activitat biològica.

Els treballs anteriors a aquest, fets dins el grup de recerca d'Enginyeria de Bioprocessos i Biocatàlisi aplicada, han definit la millor estratègia d'operació i aquesta és la que s'ha volgut aplicar (Surribas A, 2009. Ramon R, 2007. Resina D, 2006. Cos O, 2005).

L'estratègia d'operació utilitzada consta de 3 fases (assenyalades en els gràfics amb línies verticals i les inicials del nom de cada una):

1. DISCONTINU (D). Utilitza com a font de carboni glicerol a una concentració de 40 g/l. L'objectiu d'aquesta fase és obtenir el màxim de biomassa en el mínim temps possible. Tal com s'explica en la introducció el glicerol inhibeix el promotor de l'alcohol oxidasa, per tant en aquesta fase no es produeix producte heteròleg. La finalització d'aquesta fase es detecta per un augment sobtat de la concentració d'oxigen dissolt, senyal de l'esgotament del glicerol. És la senyal per a començar la fase de transició.
2. TRANSICIÓ (T). Aquesta fase té l'objectiu de canviar la font de carboni de glicerol a metanol d'una manera gradual, en l'apartat de materials i mètodes d'aquest capítol (apartat 3.2.4.2, taula 3.1.1) s'explica en detall aquesta fase. D'aquesta manera es produeix una adaptació gradual al canvi de font de carboni, minimitzant el temps necessari per què la

cèl·lula adapti el seu metabolisme a la degradació del substrat inductor, el metanol.

3. INDUCCIÓ (I). Aquesta fase és el propi discontinu alimentat. S'alimenta metanol de manera controlada per mantenir constant la seva concentració dins el reactor al voltant de 1,5 g/l. Aquest valor s'ha escollit a partir de les dades obtingudes, dins el grup de recerca, com el òptim per a la producció d'altres proteïnes com la ROL o la Lipasa 2 de *Candida rugosa*.

S'han fet diferents cultius en dos reactors diferents. Es mostrarà un cultiu fet en el bioreactor Biostat B i un en el bioreactor ED. En l'apartat de materials i mètodes ja s'esmenten les limitacions i avantatges de cada un. En tots els cultius s'utilitza el medi Invitrogen, medi mínim i definit. La soca escollida es la $\alpha+\beta 1$.

3.3.3.1 Cultiu en Biostat B

El cultiu en el reactor Biostat B té bastants problemes d'operació, això fa que sigui difícil poder reproduir les condicions del bioprocés. La transferència de calor està limitada, igual que la d'oxigen. Les característiques d'aquest bioreactor fan que quan es comença la fase de discontinu alimentat, el subministra d'oxigen mitjançant aire no sigui suficient per a mantenir la consigna del pO_2 per sobre del mínim del 20 % amb un cabal màxim d'aire de 3 vvm. Aquesta mancança limita el creixement del microorganisme i la producció. Si s'enriqueix l'aire d'alimentació amb oxigen pur la temperatura del cultiu puja com a conseqüència del consum d'aquest substrat per part del microorganisme per a les seves necessitats metabòliques. El sistema de refrigeració del bioreactor, una camisa externa que utilitza aigua de xarxa, és incapaç, d'eliminar tot el calor generat durant el creixement del microorganisme en la fase d'inducció, podent arribar a temperatures de cultiu properes als 37 °C. Per això cal refredar l'aigua de la camisa per sota de la temperatura de l'aigua de xarxa utilitzant un criòstat. El problema amb aquesta adaptació és que no es disposa d'un control de temperatura, l'aigua del circuit de refrigeració no passa per dins del sistema de control de temperatura del bioreactor per tant, per mantenir la temperatura del bioreactor al voltant dels 30 °C, s'ha anat variant de manera manual la consigna de temperatura del criòstat. En la figura 3.2.12 es mostra el seguiment de l'aeració i part de la temperatura. Tot i que no es tenen les dades del cultiu sencer, es mostra com, ja en la transició, s'ha de començar a enriquir l'aire amb oxigen pur i la temperatura ja comença a desviar-se dels 30 °C. Com que ja s'han fet altres cultius, quan es posa l'oxigen ja s'ha connectat el criòstat, però com que l'ajust s'ha de fer manualment és més difícil mantenir la temperatura del cultiu als 30 °C i, per això hi ha més oscil·lacions. En aquest cultiu la temperatura s'ha mantingut entre els 26 i els 30 °C.

En alguns casos s'ha plantejat una estratègia operacional disminuint la temperatura de cultiu, per minimitzar l'activitat proteolítica de *P. pastoris* que podria afectar el producte heteròleg. Tot i així, també suposa una menor velocitat específica de creixement amb l'efecte negatiu sobre la productivitat del cultiu (Zhang W *et al.*, 2005. Gasser B *et al.*, 2008).

Pel que fa l'aeració, a mida que s'augmenta el cabal d'oxigen es pot disminuir el d'aire, així es mantén l'aeració global a uns 5 vvm que entren en el reactor i l'oxigen dissolt en el cultiu es manté per sobre del mínim del 20 %.

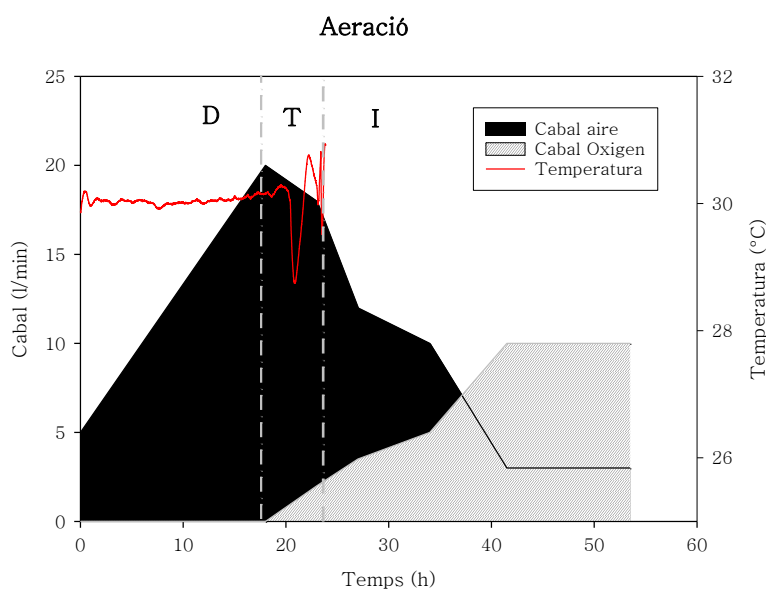


Fig. 3.2.12 Seguiment de l'aeració del cultiu i la temperatura del cultiu dut a terme en el reactor Biostat B.

La consigna de la concentració de metanol escollida durant la fase d'inducció és al voltant de 1,5 g/l. El creixement de *P. pastoris* en metanol segueix una cinètica amb inhibició per substrat. Aquest valor és un compromís per treballar a una velocitat específica de creixement alta sense que es produeixin els efectes inhibitoris per altes concentracions de metanol i que en altres proteïnes sembla que l'òptim es troba entre 1 i 3 g/l (Zhang W *et al.*, 2000. Curvers S *et al.*, 2001)

Aquest valor es va mantenir per l'acció d'un algoritme de control, desenvolupat pel grup de recerca, basat en el balanç del substrat en el cultiu i que permet establir, a temps real, el consum de metanol que té el microorganisme. Aquest balanç treballa conjuntament amb un controlador proporcional integral per poder respondre davant les pertorbacions i canvis de consigna (Cos O *et al.*, 2006) per a soques de creixement lent Mut^s.

El manteniment de la concentració de metanol al voltant del punt de consigna ha estat poc precís per aquest primer cultiu degut a dos problemes importants:

- a. S'ha utilitzat una sonda de metanol nova, que va ser provada per primer cop en aquesta fermentació. Tal com es pot apreciar a la figura 3.2.13, el calibrat no va ser massa precís. Hi ha una estimació de la concentració

per sobre del que s'analitza per cromatografia de gasos. La metodologia de calibrat de la sonda s'ha millorat en posteriors cultius minimitzar aquest problema.

- b. Per altre banda els paràmetres del controlador PI no han estat els adequats; els utilitzats estaven optimitzats per soques de creixement lent Mut^s, i tal com es pot apreciar a la figura 3.2.13 el manteniment del punt de consigna va patir oscil·lacions importants degut a la dinàmica de consum molt més gran per aquest fenotip Mut⁺, sent necessari una sintonia dels paràmetres més adient.

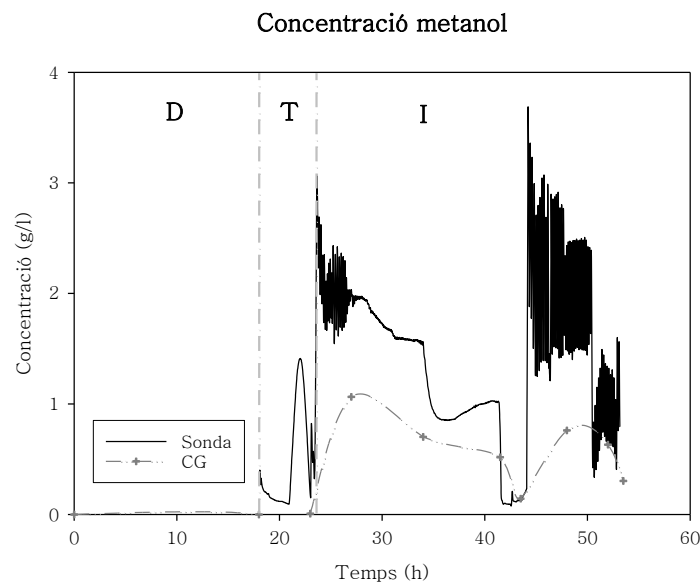


Fig. 3.2.13 Comparació de la concentració de metanol obtingudes amb la sonda o per cromatografia de gasos.

En la figura 3.2.14 es mostra l'evolució de la concentració de metanol, el volum acumulat que s'ha afegit i el cabal addicionat. En la gràfica es pot observar com la quantitat de metanol afegida és bastant constant fins a les 44 h, on el pendent augmenta, això és degut a que la microbureta de 1 ml no és suficient per aportar tot el metanol que requereix el microorganisme, per això es canvia per una de 2,5 ml, així l'aportació de metanol és suficient i la concentració de metanol pot arribar als 1,5 g/l que li marca la consigna.

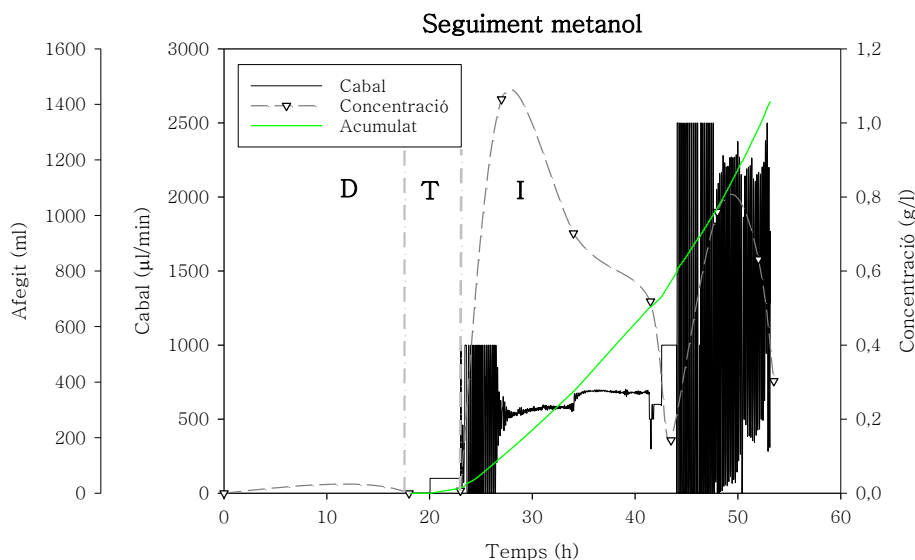


Fig. 3.2.14 Evolució de la concentració, cabal i volum afegit acumulat de metanol.

En la figura 3.2.15, es mostra la evolució de les concentracions de biomassa, metanol i proteïna total. Amb fletxes negres s'indiquen els dos punts on s'ha afegit 125 ml NH_4Cl 4 M. Al canviar la base de NH_3 a KCl per les interferències que dona el primer amb el sensor de metanol, no hi ha subministrat continu de font de N, per això cada 40 g/l de biomassa generats cal afegir-ne.

134

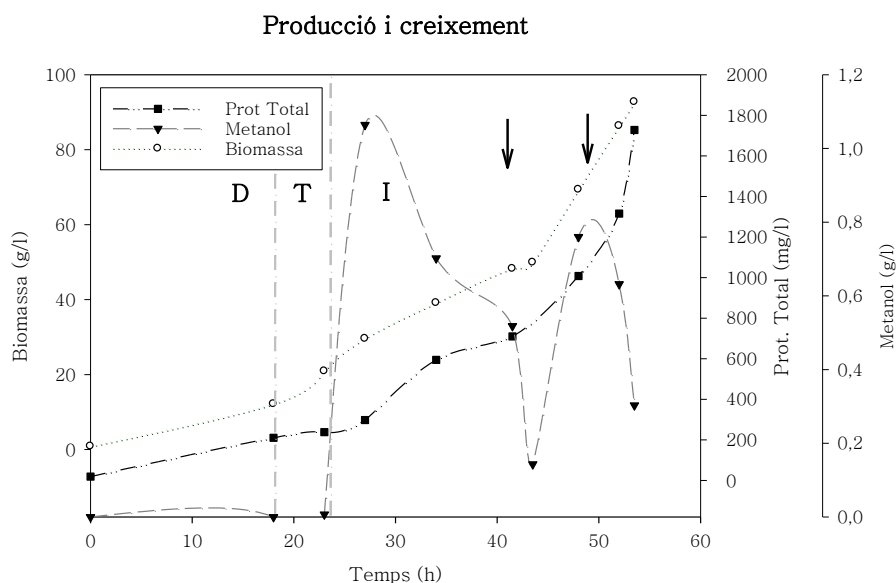


Fig. 3.2.15 Evolució del creixement de la biomassa, consum de metanol i producció de proteïna total.

Clarament hi ha dues zones de creixement, abans i després de les 44 hores. Fins a les 44 hores el cabal d'addició de metanol està limitat per la capacitat del volum de la microbureta, a partir del canvi de microbureta el creixement és molt més alt. La proteïna extracel·lular segueix una evolució paral·lela a la de la biomassa. No es pot apreciar amb claredat la influència que les variacions de la temperatura que al llarg del cultiu tenen sobre el creixement i producció.

El seguiment de la eCG recombinant es presenta en la figura 3.2.16, es mostra el gel d'acrilamida al 15 % i tenyit amb *Comassie* col·loïdal i la transferència Western amb les mostres del cultiu. Amb un cercle vermell s'assenyalen les bandes del gel que donen positives en la transferència Western, per tant eCGr. Les fletxes taronges indiquen les bandes de hCG que corresponen a la cadena α i β (15 kDa i 23 kDa, respectivament (Bellisario R *et al.*, 1973. Carlsen RB *et al.*,1973. Full especificacions hCG de Sigma)). En el gel també es veu que hi ha diferents formes de hCG de pes molecular elevat que podrien correspondre a agregats de la proteïna. En els carrils de eCGr també hi ha aquestes bandes de pes molecular elevat. En verd s'indica on haurien d'aparèixer les bandes de les dues cadenes de eCG: 17 kDa i 44 kDa per la cadena α i β , respectivament i la de l'hormona sencera de 61 kDa (Ferguson K.A, 1964).

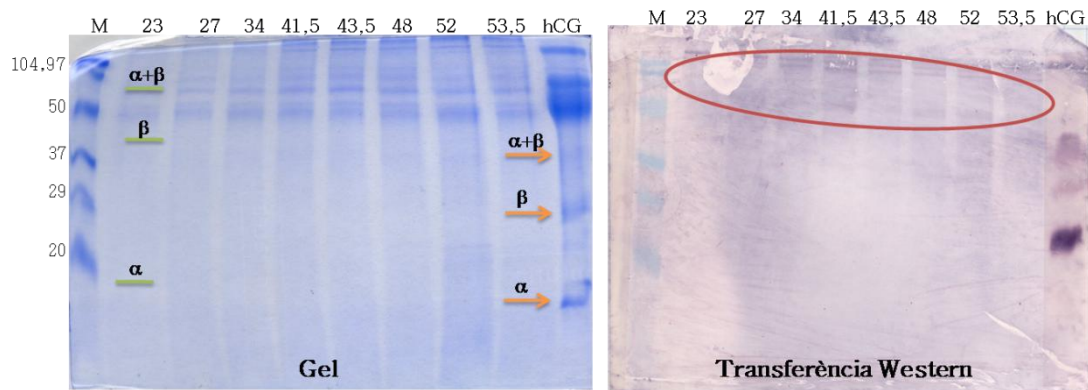


Fig. 3.2.16 Imatges del gel d'acrilamida al 15% i la transferència Western (detectat amb l'anticòs policlonal anti- $\alpha+\beta$) de les mostres a diferents temps del cultiu, indicats en la part superior. Al primer carril s'hi mostra el marcador de pes molecular i la mida de les bandes en kDa i en l'últim l'hormona humana nativa. En verd s'indiquen les posicions teòriques de l'hormona equina i en taronja les de l'hormona humana. En la transferència Western, s'encerclen en vermell les bandes del gel que surten positives.

Tot i les dificultats operacionals, en la figura 3.2.16 es pot veure que s'ha produït eCGr en el cultiu, tot i que no es veu un augment apreciable de les bandes que donen positiu en la transferència Western a mida que avança el cultiu. Tot i no veure les cadenes de l'hormona per separat si que es pot veure una banda per sobre dels 50 kDa, que surt positiva en la transferència Western. Com que el gel és al 15 % d'acrilamida no permet determinar bé la mida de les bandes en aquesta alçada, per tant pot ser que estigui al voltant dels 64 kDa, que és el pes esperat. En el capítol 6 es discuteix sobre la dificultat de detectar les cadenes de eCGr per separat en un gel, tot i ser en condicions desnaturalitzants.

A la part alta del gel i a partir dels 50 kDa es veu un grup de bandes. Al fer un gel d'acrilamida al 15 % per poder visualitzar les bandes de les cadenes per separats fa que aquest grup de bandes no es distingeixin massa i costa identificar quines donen positiu en la transferència Western. El que segurament representen aquest grup de bandes és l'hormona i possibles agregats. Una de

les bandes que sembla que no surt positiva a la transferència Western és la que està a l'alçada teòrica del dímer, tot i així més endavant es confirmarà aquesta mida teòrica. Cal afegir que segons D Mattanovich i col·laboradors (2009), *P. pastoris* secreta proteïnes endògenes d'aquest pes molecular, per tant, pot ser que la eCG quedi barrejada amb aquestes.

3.3.3.2 Comparació del cultiu en discontinu i en discontinu alimentat

En la taula 3.2.3 es mostra un recull de dades del cultius fet en discontinu i aquest darrer fet en discontinu alimentat. A l'hora de comparar els valors de productivitat i creixement, cal tenir en compte que els medis utilitzats són diferents, tot i que tots dos són medis mínims; BMM pel cultiu en discontinu i medi recomanat per Invitrogen pel discontinu alimentat. La durada considerada en tots dos cultius és des de que s'inocula.

Les dades de proteïna total i pes sec que es mostren a la taula són la resta del valor final menys l'inicial.

La velocitat específica de creixement i els dos rendiments del discontinu alimentat estan calculats en la fase d'inducció, ja que és l'única fase on s'addiciona metanol que és el substrat que indueix la producció de eCGr. El càlcul de la productivitat es fa per tot el cultiu.

Taula 3.2.3 Característiques i paràmetres finals de dos cultius, un en discontinu i medi mínim (BMM) i l'altre en discontinu alimentat i en medi Invitrogen. Els paràmetres associats a la producció són de proteïna total.

Paràmetre	Discontinuu	Discontinuu alimentat
Durada (h)	45,1	53,5
Proteïna extracel·lular total final (mg/l)	522,0	1708,8
Pes sec final (g/l)	9,0	91,9
Metanol afegit (g)	38,5	1116
Velocitat específica de creixement (h^{-1})	0,062	0,045
Rendiment $Y_{(X/S)}$ (g/g)	0,23	0,29
Rendiment $Y_{(P/X)}$ (mg/g)	58,0	20,7
Productivitat (mg/l·h)	11,6	31,9

El RENDIMENT BIOMASSA/SUBSTRAT ($Y_{(X/S)}$) és similar en les dues estratègies de cultiu.

La VELOCITAT ESPECÍFICA DE CREIXEMENT del discontinu alimentat és més baixa que la velocitat específica de creixement màxima, segurament perquè a la concentració de metanol que es treballa no és suficientment alta per assolir-la. S'ha preferit treballar una mica per sota d'aquesta concentració per evitar una possible inhibició de la producció pel substrat.

El RENDIMENT PRODUCTE/BIOMASSA ($Y_{(P/X)}$) és més petit en el discontinu alimentat, tot i que la PRODUCTIVITAT és 3 vegades superior.

Cal tenir en compte que el cultiu en discontinu alimentat va tenir problemes operacionals, com el control de la temperatura, per tant és difícil reproduir-lo i comparar-lo amb la resta de cultius amb condicions més controlades.

Com era d'esperar, l'estratègia de producció en discontinu alimentat és més efectiva en termes de productivitat.

3.3.3.3 Cultiu en Biostat ED

El que s'intenta en aquest fermentador és millorar la transferència de calor i d'oxigen, els dos problemes operacionals més importants detectats en el Biostat B. La seva configuració amb un serpenti intern enlloc d'una camisa externa fa més efectiva la transferència de calor, i la seva geometria afavoreix la transferència d'oxigen. D'aquesta manera es podran mantenir més estables els paràmetres bàsics, com temperatura i pO_2 i aconseguir un bioprocés molt més reproduïble.

Tot i així es necessita enriquir el cabal d'aire d'entrada amb oxigen. En aquest cas el cultiu està més avançat quan es fa aquest enriquiment, a les 30 h (com es mostra la figura 3.2.17) mentre que en el primer cultiu ja era a les 20 h (figura 3.2.12) i la temperatura es manté en la consigna de 30 °C. Tot i aquesta millora en la transferència d'oxigen hi ha moments en què baixa del 20 % aconsellable.

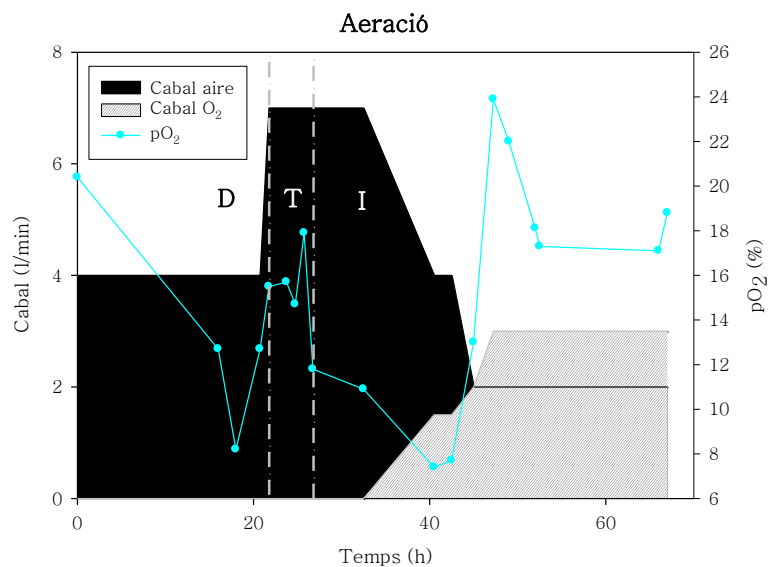


Fig. 3.2.17 Evolució del % d'oxigen dissolt en el cultiu i els cabals d'aire i oxigen utilitzats en cada moment.

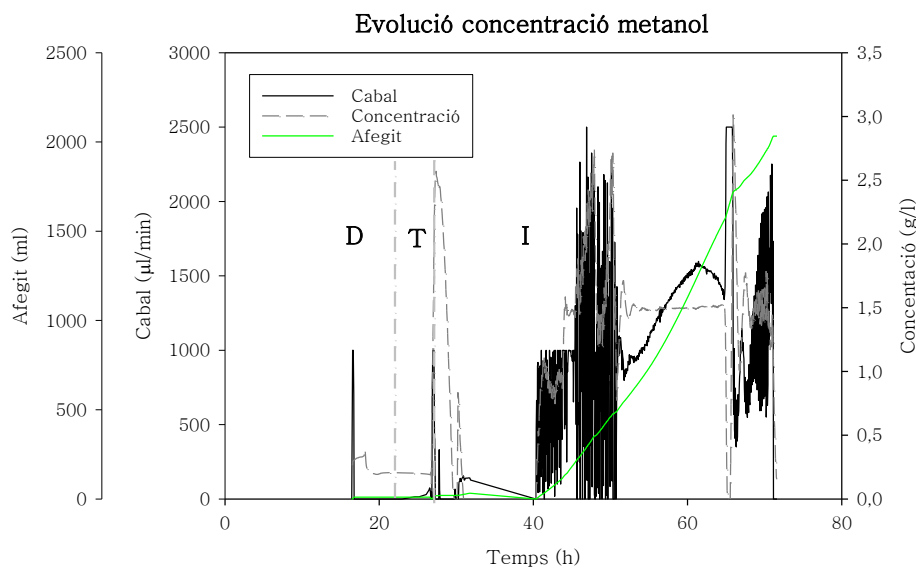


Fig. 3.2.18 Evolució de la concentració, acumulació i addició de metanol en el brou de cultiu.

Tot i marcar la consigna de la concentració de metanol a 1,5 g/l és difícil mantenir-la; el metabolisme de les soques Mut⁺, com ja s'ha esmentat, és molt més gran que el de les soques Mut^s, això fa que en alguns moments l'aportació de metanol a través de la microbureta sigui insuficient, a més costa establir la concentració al voltant del punt de consigna tal com es pot observar a la figura 3.2.18. També cal esmentar que a l'iniciar la fase d'inducció hi ha problemes amb l'ordinador del controlador de metanol, per això no se n'ha afegit amb les conseqüències que això comporta.

Una vegada superat aquest problema s'observa unes fluctuacions de la consigna de metanol important abans d'estabilitzar-se entre les 55 i 65 hores al voltant del valor de la consigna (1,5 g/l). La sintonia dels paràmetres del controlador abans d'aquest període no era l'adequada, com ja s'ha explicat anteriorment. Una vegada modificats els paràmetres, el controlador és capaç de mantenir la consigna de metanol al voltant de la consigna.

El cabal d'addició de metanol mostra, com en l'anterior cultiu, el canvi de xeringa de la microbureta, un cop ajustats els paràmetres del controlador amb la mida de la xeringa és quan s'aconsegueix establir la concentració de metanol; el sistema pot subministrar el metanol requerit pels microorganismes. En la figura 3.2.19, es mostra l'evolució de les concentracions de biomassa, metanol i proteïna total. L'evolució de la biomassa i de la proteïna extracel·lular, altre cop s'observa que són dos paràmetres que van associats.

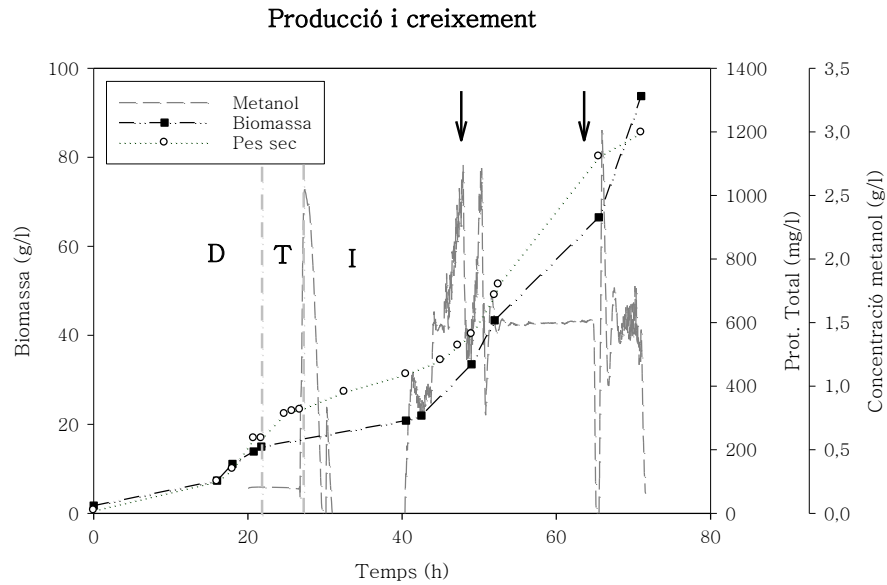


Fig. 3.2.19 Evolució del creixement de la biomassa, consum de metanol i producció de proteïna total.

Al voltant dels 40 i 80 g/l de biomassa cal afegir font de N, en la figura es mostra el punt on s'afegeix en forma de salt d'amoni amb una fletxa negra, després d'aquests punts la concentració del metanol fa un descens brusc, pot ser degut a un simple interferència de la sal en la lectura de la sonda. En els dos casos s'han afegit 250 ml de NH_4Cl de cop.

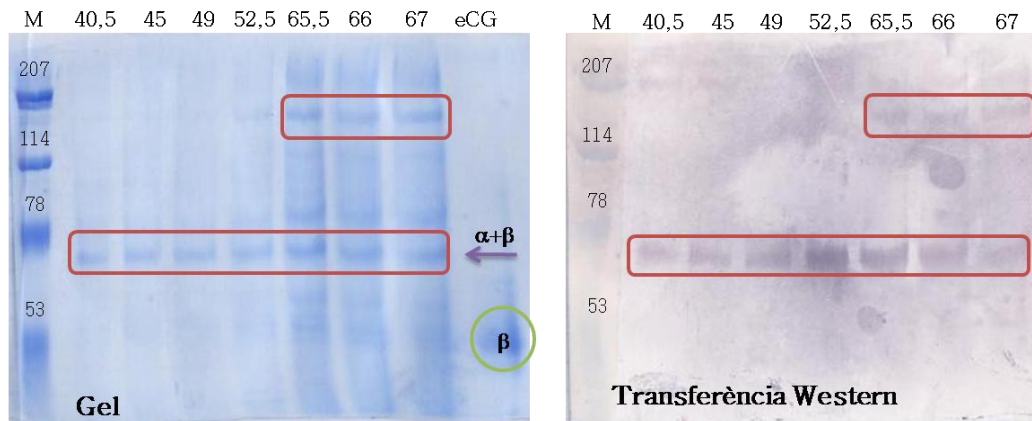


Fig. 3.2.20 Gel d'acrilamida al 7,5% i transferència Western de les mostres del cultiu a diferents temps. A l'últim carril s'hi carrega eCG nativa, al primer marcador de pes molecular i la mida de les bandes en kDa. En vermell s'encerclen les bandes del gel que donen positiu en la transferència Western la fletxa morada la posició teòrica del dímer de eCG. Amb verd s'encercla el que podria ser la cadena β .

Finalment, en la figura 3.2.20 es mostra el gel i la transferència Western de les últimes mostres del cultiu. El gel es fa al 7,5 % d'acrilamida perquè és més informatiu; reduint la quantitat d'acrilamida del gel (del 15 al 7,5 %) es perden les molècules de baix pes molecular, però, com es veu en la figura 3.2.16, en la part baixa del gel, on hi ha les molècules de baix pes molecular, no hi apareixen

bandes. D'aquesta manera s'aconsegueix separar millor les molècules d'alt pes molecular de la part de dalt dels gels.

En l'últim carril del gel s'hi ha carregat eCG nativa, amb un cercle verd s'assenyala la banda que possiblement correspon a la cadena β , la cadena α no es veu en aquest gel. La fletxa morada indica la posició teòrica de l'hormona sencera.

En la transferència Western no s'ha posat eCG nativa perquè, tal i com es comentarà en el capítol 4, sembla ser que l'anticòs comercial anti-hCG reconeix la part glicosilada de l'hormona, diferent en èquids i en humans.

Amb rectangles vermells s'encerclen les bandes que possiblement corresponguin a eCGr, ja que apareixen tan en el gel com en la transferència Western. En el gel es veu un augment d'intensitat de les bandes a mida que avança el cultiu. En canvi, en la transferència Western no s'aprecia aquest augment d'intensitat corresponent a l'augment de quantitat de proteïna expressada. Ja s'ha esmentat que és degut a la poca sensibilitat de l'anticòs.

Quan es fa la transferència Western es veu com una de les bandes d'uns 78 kDa no és eCG, ja que no és detectada per l'anticòs. Aquesta banda es podria associar a una endoquitinasa de *P. pastoris* d'uns 72 kDa (annex 7, Mattanovich D *et al.*, 2009).

Tot i que aquest gel està fet amb menys acrilamida, no hi ha tantes bandes d'alt pes molecular com en els gel del primer cultiu (figura 3.2.16), això pot ser degut a que el primer cultiu hi ha degradació, tal com sembla indicar el *smear*.

3.3.3.4 Comparació del cultiu en discontinu i en discontinu alimentat

Com a resum es mostra un recull dels principals paràmetres dels diferents cultius per comparar les estratègies utilitzades. En la taula 3.2.4 es presenta la comparació del cultiu en discontinu en medi mínim i els dos en discontinu alimentat en els diferents reactors, Biostat B i ED.

Taula 3.2.4 Característiques i paràmetres finals de tres cultius: discontinu en medi mínim (BMM), discontinu alimentat en el reactor Biostat B i discontinu alimentat en el reactor ED.

Paràmetre	Discontin	Biostat B	Biostat ED
	u		
Durada (h)	45,1	53,5	71,0
Proteïna extracel·lular total final (mg/l)	522,0	1.708,8	1.288,2
Pes sec final (g/l)	9,0	91,9	84,9
Metanol afegit (g)	38,5	1.116	1.607
Velocitat específica de creixement (h^{-1})	0,062	0,045	0,040
Rendiment $Y_{(X/S)}$ (g/g)	0,23	0,29	0,25
Rendiment $Y_{(P/X)}$ (mg/g)	58,0	20,7	17,5
Productivitat (mg/l·h)	11,6	31,9	22,3

En els cultius en discontinu alimentat els paràmetres s'han calculat, només, de la fase d'inducció, ja que és quan hi ha presència de metanol i producció de eCGr.

En els dos cultius en discontinu alimentat s'ha buidat parcialment el fermentador per no sobrepassar el nivell màxim aconsellat de brou dins el bioreactor. Aquest volum s'ha tingut en compte a l'hora de calcular els rendiments.

Per tots els càlculs del cultiu en discontinu alimentat en el bioreactor ED s'han descomptat les 13,25 primeres hores de la fase d'inducció, ja que no es va addicionar metanol per un problema en el controlador de la bomba d'addició i és com una pseudofase de latència (fig. 3.2.18).

Els RENDIMENTS BIOMASSA/SUBSTRAT ($Y_{(X/S)}$) dels tres cultius són bastant similars. Els RENDIMENTS PRODUCTE/SUBSTRAT ($Y_{(P/S)}$), basats en dades de proteïna total, no de eCG, dels cultius en discontinu alimentat són del mateix ordre, però el del discontinu és més gran, quasi tres vegades. Però quan es compara la PRODUCTIVITAT, la dels discontinus alimentats és millor, i entre els dos reactors millor el Biostat B. Tot i així, els problemes operacionals associats a aquest bioreactor fa que es prefereixi operar amb el Biostat ED.

Les VELOCITATS ESPECÍFIQUES DE CREIXEMENT en els cultius en discontinu alimentat són del mateix ordre, però menors que la del discontinu, com ja s'ha comentat abans, és perquè la concentració consigna de metanol fa que es treballi per sota de la velocitat màxima.

Com s'ha esmentat en l'apartat de materials i mètodes (3.1.3.1) el disseny del bioreactor ED és millor per obtenir millors resultats del cultiu que el Biostat B. Els problemes operacionals que s'han tingut ho confirmen, per tant cal tenir en compte la reproductibilitat d'aquest cultiu.

Caldria verificar, també, que els resultats de proteïna total no hagin quedat emmascarats per certa lisi cel·lular que dona una mesura de proteïna extracel·lular més alta que no es traduirà en una producció de eCGr més gran.

3.4 Conclusions

Els cultius en erlenmeyer permeten fer una primer distinció de les diferents soques; Les soques $\alpha+\beta$ són més bones productores que les $\beta+\alpha$, sembla que l'ordre del gens a i b en el vector d'expressió afecta als nivells d'expressió. Dins les soques $\alpha+\beta$ s'escull la $\alpha+\beta1$.

Al comparar la soca productora de eCG amb la que produeix ROL, es veu que la productors de eCG té un temps de latència més llarg. Aquesta observació suggereix que l'expressió de eCG podria provocar UPR similars als observats en la soca que produeix ROL.

Tot i pensar que un medi ric dona millor productivitat, en els dos cultius en batch es mostra que el medi mínim dona més bons resultats.

Per dur a terme els cultius en fed-batch, amb millor rendiment, tant en productivitat com en biomassa és millor utilitzar el bioreactor ED que el Biostat B. Això és degut a que l'ED té un K_{La} (Valenzuela, 2008) que permet cultivar la soca Mut⁺ en condicions òptimes d'oxigenació i d'una manera més robusta.

Capítol 4. Detecció i quantificació de eCG

4.1 Introducció

Per poder determinar si les soques de *P. pastoris* aïllades secreten o no hormona recombinant, cal poder-la detectar, ja sigui de forma qualitativa com quantitativa en les diferents mostres obtingudes durant el procés de producció com en el de purificació.

Així doncs, cal posar a punt un mètode que permeti la detecció i la quantificació de eCG. S'han escollit mètodes immunològics, ja que tenen una alta especificitat i, normalment, sensibilitat. Per la tècnica d'anàlisi qualitatiu s'utilitza la transferència de punts (dot-blot) i de proteïnes (Western-blot) i pel quantitatiu l'ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).

En aquest capítol ens centrem en la posada a punt de la tècnica *transferència de punts* per la detecció de eCG, ja que aquesta tècnica és més senzilla i ens haurà de permetre seleccionar les millors condicions per la tècnica de la transferència de proteïnes i ELISA.

Aquests experiments s'han dut a terme en paral·lel amb els cultius i el protocol utilitzat en el capítol 3 és el resultat d'aquest capítol.

4.2 Materials i mètodes

4.2.1 Anàlisi per transferència de punts

Aquesta tècnica s'ha utilitzat tan per fer un anàlisi qualitatiu previ de les mostres de cultiu o del procés de purificació per detectar la presència d'eCG o no, com per posar a punt la tècnica d'anàlisi per transferència Western.

Consisteix en adsorbir la mostra que es vol analitzar a una membrana. Seguidament, s'utilitza un anticòs primari específic per a gonadotrofina coriònica combinat amb l'anticòs secundari específica pel primari i que conté un enzim unit que permetrà la detecció quimioluminescent o colorimètrica i visualitzar quines mostres contenen eCG.

En el capítol 3 es mostra el resultat dels experiments d'aquest capítol, un cop s'han escollit els millors anticossos i les millors condicions.

4.2.1.1 Protocol

1. Poseu 2 µl de cada mostra a la membrana (Amersham, Cat. No. RPN303D).
2. Deixeu absorbir la proteïna durant 1 h.
3. Renteu amb PBS-tween 0,1 % (v/v) 1 vegada.
4. Incubeu amb PBS-tween 0,1 % (v/v) amb llet descremada (Oxoid, Cat. No. LP0031) al 5 % (p/v) durant 1h o o/n i amb agitació suau.
5. Renteu amb PBS-tween 0,1 % (v/v) tres vegades.
6. Incubeu amb l'anticòs primari en PBS-llet descremada al 1 % (p/v) durant 1 h o 2 h i amb agitació. Feu les dilucions adequades segons indiqui el fabricant de l'anticòs.
7. Renteu amb PBS-tween 0,1 % (v/v) tres vegades (el primer rentat de 10 min).
8. Incubeu amb l'anticòs secundari en PBS-llet descremada al 1 % (p/v) durant 1 h o 2 h i amb agitació. Feu les dilucions adequades segons indiqui el fabricant de l'anticòs.
9. Renteu amb PBS-tween 0,1 % (v/v) tres vegades.
10. Detecció quimioluminescent o colorimètrica, segons l'anticòs secundari utilitzat.

Les incubacions amb els anticossos es fan entre 1 i 2 hores, depenent dels resultats obtinguts. En general, es fa la incubació de 1 h quan es fa el revelat fotogràfic i de 2 h quan el revelat és colorimètric.

PBS

- o 8 g NaCl (Panreac, Cat. No. P7949)
- o 0,2 g KCl (Panreac, Cat. No. 131494)
- o 0,62 g Na₂HPO₄·12H₂O (Panreac, Cat. No. 141678)
- o 0,2 g KH₂PO₄ (Panreac, Cat. No. 141509)

Dissoleu totes les sals en 750 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu el pH a 7,3 amb HCl i el volum a 1 l.

PBS-TWEEN 0,1%, 1L

- o 1 ml Tween 20 (Sigma, Cat. No. P7949)
- o 1 l de PBS

Afegiu el Tween 20 a 1l de PBS.

Pel revelat s'han utilitzat dues tècniques de detecció; quimioluminescent i colorimètrica. El primer més sensible que el segon.

4.2.1.2 Detecció quimioluminescent

Per aquest revelat s'utilitza el kit de revelat fotogràfic SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Cat. No. 34080).

Cal que l'anticòs secundari estigui conjugat amb l'enzim peroxidasa. Un cop es té la membrana amb els dos anticossos units per afinitat es posa en una placa de petri de vidre. Tot aquest procés cal fer-lo en una càmera fosca amb llum vermella, ja que els reactius són fotosensibles.

- a. Barregeu 5 ml de cada un dels reactius presents en el kit. Deixeu 5 min en agitació suau.
- b. En el sandvitx de revelat poseu en contacte la membrana amb el film fotogràfic (Pierce, Cat. No. 34090). Deixeu un mínim de 30 segons.
- c. Prepareu el líquid fixador i revelador segons indica el subministrador (normalment dilució 1/10).
- d. Traieu la pel·lícula del sandvitx i submergiu-la en la solució reveladora. Espereu que es desenvolupi el color.
- e. Submergiu en la solució fixadora fins que la pel·lícula quedi transparent.
- f. Renteu amb aigua i deixeu assecar.

4.2.1.3 Detecció colorimètrica

Per aquest revelat s'utilitza el kit comercial Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad, Cat. No. 170-6432).

Cal que l'anticòs secundari estigui conjugat amb l'enzim Fosfatasa alcalina. Un cop es té la membrana amb els dos anticossos units per afinitat es posa en una placa de petri de vidre i es segueixen les instruccions del kit.

4.2.1.4 Patrons d'eCG

Com a mostres patró s'han utilitzat dues gonadotrofines coriòniques humanes; la comercial de la casa Sigma (Cat. No. C0434) i una de no comercial facilitada per l'empresa Calier, totes dues extretes de l'orina de dones embarassades.

També s'ha utilitzat l'hormona equina comercial de la casa Sigma (Cat. No. G4877 i el producte Foligon 6000 que s'utilitza en veterinària i és de la casa Intervet. Totes dues són preparats d'hormona nativa, extreta del sèrum i l'orina d'eugues prenyades, respectivament.

4.2.1.5 Anticossos primaris

No s'han trobat anticossos comercials dirigits a l'hormona equina, eCG, per això s'han utilitzat els dirigits a la humana, hCG.

S'han provat anticossos monoclonals i policlonals comercials, desenvolupats en diferents organismes. Se n'han obtingut per detectar l'hormona humana sencera i per a una de les dues cadenes.

També s'han provat dos anticossos dirigits a detectar proteïnes recombinants, ja que detecten la cua d'histidines i un epítip (c-myc). En l'hormona recombinant hi ha presència d'aquests dos components només en la cadena α .

Tota la informació es recull a la taula 4.1.1.

Taula 4.1.1 Anticossos primaris utilitzats per la tècnica de transferència de punts i Western.

Antigen	Tipus	Organisme de producció	Subministrador	No. Cat.
hCG $\alpha + \beta$	Policlonal	Conill	Sigma	C8534
hCG $\alpha + \beta$	Policlonal	Pollastre	AbCam	ab14301
hCG α	Monoclonal	Ratolí	Calbiochem	230744
hCG β	Policlonal	Ratolí	Calbiochem	230746
hCG α	Policlonal	Cabra	AbCam	ab20712
hCG β	Policlonal	Cabra	AbCam	ab20866
hCG α	Policlonal	Conill	USbiological	C5069-46
hCG β	Policlonal	Conill	USbiological	C5069-84
hCG α	Monoclonal	Ratolí ME.109	AbCam	ab9502
hCG β	Monoclonal	Ratolí 5H4-E2	AbCam	ab9582
His ₆	Monoclonal	Ratolí	Roche	11 922 416
c-myc	Monoclonal	Ratolí	Invitrogen	R951-25

4.2.1.6 Anticossos secundaris

S'han utilitzat anticossos dirigits als anticossos dels organismes utilitzats per fer els anticossos primaris: conill, rata, cabra o pollastre. Aquests estan desenvolupats en un organisme diferent que el primari. Se n'han utilitzats amb la peroxidasa o la fosfatasa alcalina conjugades, segons el mètode de detecció utilitzat. En la taula 4.1.2 se'n recullen les característiques.

Taula 4.1.2 Anticossos secundaris utilitzats per la tècnica de transferència de punts i Western.

Antigen	Organisme de producció	Enzim conjugat	Subministrador	No. Cat.
Anticossos de conill	Cabra	Peroxidasa	Pierce	34460
Anticossos de conill	Cabra	Peroxidasa	Sigma	A8275
Anticossos de conill	Cabra	Fosfatasa alcalina	Sigma	A0418
Anticossos de cabra	Ratolí	Peroxidasa	Pierce	32430
Anticossos de cabra	Conill	Peroxidasa	Sigma	A8919
Anticossos de ratolí	Cabra	Peroxidasa	Pierce	31430
Anticossos de pollastre	Cabra	Fosfatasa alcalina	AbCam	ab6878

4.2.2 ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

Aquesta tècnica permet quantificar proteïnes en mostres biològiques.

S'ha provat un kit comercial basat en aquest mètode per a la detecció d'eCG en mostres de sang de cavall. Tal i com es descriu en l'apartat de resultats, també s'ha provat de posar a punt un protocol ELISA adequat a la eCG recombinant.

149

4.2.2.1 Kit comercial d'ELISA per la detecció de eCG

El kit comercial per quantificar eCG en mostres de sang és de la casa Paramedical, Cat. No. PDO221298. Tots els reactius i patrons els subministra el kit.

Un cop preparades les dilucions de les mostres que s'han d'analitzar amb dilucions seriades de les mostres per tenir un rang de concentració entre 5 i 750 µg/ml es segueixen les instruccions del kit.

4.2.2.2 ELISA per la detecció de eCG recombinant

Per a posar a punt un protocol d'ELISA adequat a la eCG recombinant s'ha utilitzat la variant anomenada sandvitx, on s'utilitza un anticòs, que s'uneix a la placa d'anàlisi, per capturar la molècula que es vol analitzar, en aquest cas eCG recombinant. S'utilitza un segon anticòs que s'uneix a la molècula unida a l'anticòs de captura. A aquest anticòs de detecció s'hi uneix un tercer anticòs, que porta conjugat l'enzim que permet la reacció colorimètrica per quantificar, en aquest cas s'utilitza un anticòs secundari que porta la fosfatasa alcalina o la peroxidasa.

Els anticossos utilitzats i algunes de les seves característiques es recullen en la taula 4.1.3.

Taula 4.1.3 Anticossos utilitzats per posar a punt la tècnica d'ELISA.

Antigen	Organisme de producció	Tipus o Enzim conjugat	Funció	Subministrador	No. Catàleg
hCG $\alpha+\beta$	Policlonal	Pollastre	Captura	AbCam	ab14301
hCG $\alpha+\beta$	Policlonal	Conill	Detecció	Sigma	C8534
Anticossos de conill	Cabra	Fosfatasa alcalina	Secundari	Sigma	A0418
Anticossos de conill	Cabra	Peroxidasa	Secundari	Jackson ImmunoResearch	111-035-003

4.2.2.2.1 Preparació plaques

S'han utilitzat plaques de 96 pous Maxisorp (Nunc, Cat. No. 442404). Aquest protocol s'ha trobat a Internet.

1. Prepareu la solució de l'anticòs de captura a una concentració de 5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS.
2. Poseu 100 μl a cada pou i deixeu o/n, a temperatura ambient (t/a) i agitació suau.
3. Traieu la solució i renteu 3 vegades amb 200 μl de PBS.
4. Poseu 100 μl de solució de bloqueig a cada pou. Deixeu a o/n, a t/a i agitació suau.
5. Traieu la solució i renteu 3 vegades amb 200 μl de PBS.
6. Deixeu assecar a temperatura ambient.

Es poden guardar amb gel de sílice, a les fosques i a 4 °C durant 6–12 mesos, depenent de la estabilitat de l'anticòs.

4.2.2.2.2 Anàlisi

Aquest protocol es basa en el subministrat per la casa AbCam.

7. Poseu 100 μl de la mostra a analitzar a cada pou (fer les dilucions que calguin en PBS) i deixeu 2 h a t/a i agitació suau. Si s'han de fer dilucions, feu-les amb PBS.
8. Traieu la solució i renteu 3 vegades amb 200 μl de PBS.
9. Poseu 100 μl de la solució amb l'anticòs de detecció diluït en PBS. La dilució serà a determinar segons l'anticòs. Deixeu 1–2 h a t/a i agitació suau.
10. Traieu la solució i renteu 4 vegades amb 200 μl de PBS.
11. Poseu 100 μl de la solució amb l'anticòs secundari diluït en PBS i a la dilució requerida segons l'anticòs. Deixeu 1–2 h a t/a i agitació suau.
12. Traieu la solució i renteu 4 vegades amb 200 μl de PBS.

PBS-TWEEN 0,1%, 1L

Composició i preparació a la pàgina 145.

SOLUCIÓ DE BLOQUEIG

PBS amb 1 % (p/v) de BSA (Sigma, Cat. No. A7906).

SOLUCIÓ RENTAT

PBS amb 0,1 % (v/v) Tween 20 (Sigma, Cat. No. P7949).

4.2.2.2.3 Revelat amb fosfatasa alcalina.

- a. Prepareu 11 ml de solució de detecció amb 2 pastilles de pNPP (10 mg/ml), ha de ser fresca ja que pNPP (Sigma, Cat. No. S0942) és fotosensible.
- b. Poseu 100 µl de solució de detecció a cada pou. Agiteu fins que aparegui el color groc (10-20 min).
- c. Llegiu la placa a 405 nm (referència a 620 nm).

SOLUCIÓ DETECCIÓ (1L), PH=9,6-9,8

- o 8,4 g NaHCO₃ (Sigma, Cat. No. S6297)
- o 4,0 g Na₂CO₃ (Sigma, Cat. No. S7795)

Dissoleu totes les salts en 750 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu el pH amb NaOH a 9,6-9,8 i el volum a 1 l.

4.2.2.2.4 Revelat amb peroxidasa

S'utilitza un kit FemtoELISA de la casa Gbiosciences (Cat. No. 786-110). Consta dels reactius necessaris per fer la detecció amb la reacció de la peroxidasa, que dona més sensibilitat que la reacció amb la fosfatasa alcalina.

- a. Afegiu 100 µl de la solució substrat a cada pou. Agiteu fins que aparegui el color blau.
- b. Pareu la reacció afegint 100 µl de H₂SO₄ 1 M. El color blau es torna groc.
- c. Llegiu la placa a 600 nm.

Les incubacions de les plaques es fan dins l'agitador de plaques de la casa *Eppendorf*, model *Thermomixer* confort a 300 rpm (el mínim).

La lectura de la placa es fa amb el lector de microplaques de la casa Whittaker Bioproducts, model Microplate reader 2001.

4.3 Resultats i discussió

La posta a punt d'aquestes tècniques dependrà de l'anticòs primari que s'utilitzi, ja que és el que marcarà l'especificitat.

El fet de no trobar cap anticòs comercial específic per la eCG pot disminuir-nos el reconeixent eficientment la eCG recombinant, ja que es tracta d'una proteïna altament glicosilada i, per tant, és possible que els anticossos comercials no puguin reconèixer epítops de sucres específics d'espècie.

4.3.1 Transferència de punts

Com ja s'ha esmentat, aquesta tècnica s'utilitza per fer un anàlisi qualitatiu de presència de l'hormona i per trobar les dilucions amb què s'ha de treballar cada anticòs per fer la transferència Western.

Com que els anticossos comercials que s'utilitzen no tenen unit cap component que permeti fer la detecció, cal treballar amb un sistema de dos anticossos; l'ANTICÒS PRIMARI és el que s'uneix de forma específica a l'hormona i l'ANTICÒS SECUNDARI és el que reconeix l'anticòs primari i porta unida una proteïna que permet la seva detecció mitjançant un anàlisi quimilouminescent o colorimètric.

D'anticossos primaris també se n'han utilitzat de dos tipus; els que reconeixen l'hormona sencera (heterodímer) i els que reconeixen únicament una de les dues cadenes; per tan se'n tindrà un per la cadena α i un per la β .

S'han utilitzat mostres dels cultius (erlenmeyer, cultiu en discontinu i discontinu alimentat) i de diferents etapes del procés de purificació. D'aquestes se n'han fet dilucions a diferents concentracions, especificades, per cada experiment.

Com a controls positius s'han utilitzat les hormones natives, humana i equina, disponibles comercialment. Com a control negatiu s'han considerat mostres de cultiu corresponents a la fase batch, abans de la transició on es comença a afegir metanol.

4.3.1.1 Detecció de l'heterodímer

Per poder posar a punt aquesta tècnica es plantegen diferents dilucions de l'anticòs primari i del secundari. Si el subministrador de l'anticòs (tan primari com secundari) en suggereix una, s'ha partit de la dilució proposada i se n'han triat dues per sobre i dues per sota, no forçosament d'un ordre de magnitud de diferència, normalment és menys. A partir dels resultats de la primera aproximació s'ha intentat disminuir la quantitat utilitzada de cada un dels anticossos mantenint la sensibilitat de l'anàlisi. En cas contrari s'han utilitzat dilucions similars a les d'anticossos ja utilitzats i que ha detectat la eCGr.

4.3.1.1.a Experiment control

En un primer experiment control, s'ha comprovat la reactivitat dels anticossos envers les hormones natives comercials.

Com a ANTICÒS PRIMARI s'ha utilitzat l'anti-hCG α + β desenvolupat en conill (Sigma, Cat No. C8534). Com a mètode de detecció s'ha utilitzat el quimioluminescent, utilitzant un ANTICÒS SECUNDARI anti-conill conjugat a la peroxidasa (Pearce, Cat. No. 34460).

Com a mostra només s'ha utilitzat la hCG nativa, per comprovar que la combinació d'anticossos és adequada.

Com que el subministrador de l'anticòs primari no suggereix cap dilució, s'ha fet un experiment que cobreixi un ampli rang dilució de l'anticòs primari: 1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000 i 1/2000. S'han provat dues dilucions del secundari: 1/5000, 1/10000.

En cada fragment de membrana s'ha posat hCGn a una concentració de 1, 10 i 100 μ g/ml (que corresponen a 200, 20 i 2 ng) i una mostra de eCGr concentrada 20 vegades i provinent d'un cultiu en discontinu, sense purificar. La quantitat de proteïna total aplicada a la membrana ha estat de 6 ng per gota.

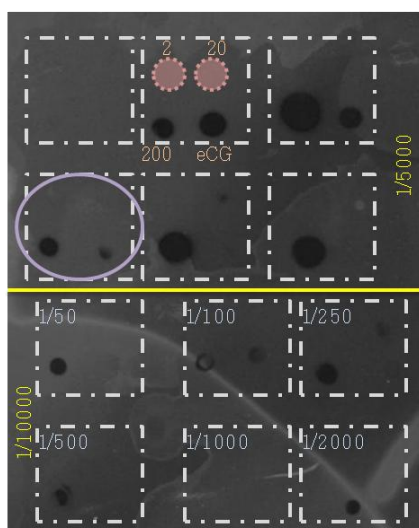


Fig. 4.2.1 Pel·lícula fotogràfica de l'experiment. En rosa s'indica la quantitat de hCG en ng i la mostra de eCGr sense purificar amb 6 ng de proteïna total. En groc la dilució de l'anticòs secundari i en blau la de l'anticòs primari (que es repeteix en les dues condicions de secundari). Els quadrats en puntets blancs mostren els fragments de membranes que s'han incubat en les mateixes dilucions dels dos anticossos. El cercle lila indica la combinació de dilucions escollida.

A la figura 4.2.1 es mostra la membrana resultant d'aquest experiment. En la part superior, on hi ha la incubació amb anticòs secundari diluït 1/5000, es veuen millor les taques i permeten un millor anàlisi dels resultats. Pel que fa al primari, s'escull la dilució 1/500, ja que és la màxima dilució de l'anticòs que permet detectar l'hormona eCGr i s'intenta reduir la quantitat d'anticòs a utilitzar per cada anàlisi, sobretot el primari que és més car.

Segons la quantitat de proteïna total disposada en cada punt de eCGr, 6 ng, i comparada amb la quantitat de hCG disposada, no és d'estranyar que costi més de detectar la eCGr, ja que se'n disposa menys, a més aquesta quantitat és de proteïna total no purificada.

Cal esmentar, com ja s'ha apuntat al capítol 3 (apartat 3.3.1.1), que aquest anticòs sembla reconèixer epítops de sucres de la gonadotropina coriònica, tal i com suggereix el fet que no és capaç de reconèixer eCG nativa (com mostra l'experiment de l'apartat 4.3.1.1.b), la qual té una estructura proteica essencialment equivalent a la hCG. Això fa pensar que l'anticòs pugui presentar certa afinitat inespecífica envers proteïnes endògenes de *P. pastoris* que poguessin estar molt glicosilades. Aquesta podria ser una de les causes per la qual en la figura 3.2.3 del capítol 3, el control negatiu (brou del cultiu a t=0 d'inducció) dóna cert senyal.

Quan es fan cultius en bioreactor passa el mateix; quan s'acaba la fase de batch on només hi ha hagut glicerol com a font de carboni (repressor del promotor, per tan no hi ha producció de proteïna recombinant) hi ha reconeixement d'alguna proteïna d'alt pes molecular, com mostra la transferència Western de la figura 4.2.2.

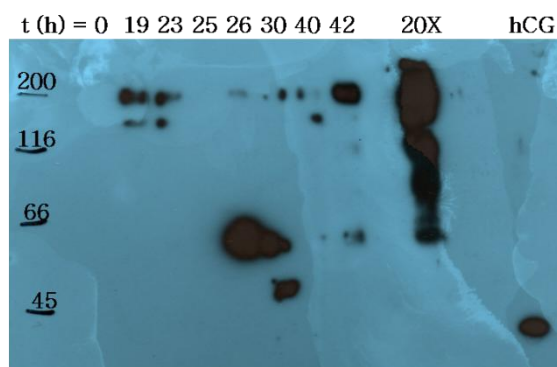


Fig. 4.2.2 Transferència Western de les mostres d'un cultiu en fed-batch. A la part superior s'indiquen les hores de cultiu. L'acabament de la fase batch correspon a les 19h. 20X indica la mostra final concentrada 20 vegades i hCG és l'hormona humana nativa a una concentració de 100 µg/ml. Al primer carril s'hi mostra el marcador de pes molecular i la mida de les bandes està expressada en kDa.

Per aquest motiu es creu que l'anticòs no és 100 % específic per gonadotropina coriònica, sinó que també reconeix, en menor grau, alguna proteïna glicosilada que produeix *P. pastoris*.

4.3.1.1.b Canvi de sistema de revelat

La poca comoditat del revelat fotogràfic en la cambra fosca i mescla dels líquids han fet que es busqués un sistema de revelat diferent. Per això ha calgut posar a punt el segon revelat basat en la fosfatasa alcalina.

S'ha plantejat l'experiment utilitzant el mateix anticòs primari, anti-hCG α + β desenvolupat en conill (Sigma, Cat No. C8534), però canviant el secundari per un que reconegués els anticossos de conill i que tingui la fosfatasa alcalina conjugada.

Les dilucions que s'han provat per l'ANTICÒS PRIMARI, com que no s'ha canviat, són l'òptima trobada amb el sistema de detecció anterior, 1/500 i una per sobre i una per sota: 1/250 i 1/1000. Pel SECUNDARI la dilució 1/20000 que aconsella el fabricant i una d'inferior, 1/10000. En aquest experiment s'ha afegit un control de eCG nativa a una concentració de 6000 i 1500 U/ml, a veure com és detectat per l'anticòs.

En la figura 4.2.3 es mostra el recull de membranes incubades en les diferents combinacions de dilucions dels dos anticossos. Com ja s'ha esmentat, en cap de les condicions ha aparegut la eCG nativa, en canvi si que han aparegut l'hormona humana i l'equina recombinat, però la primera ha donat un senyal més intens.

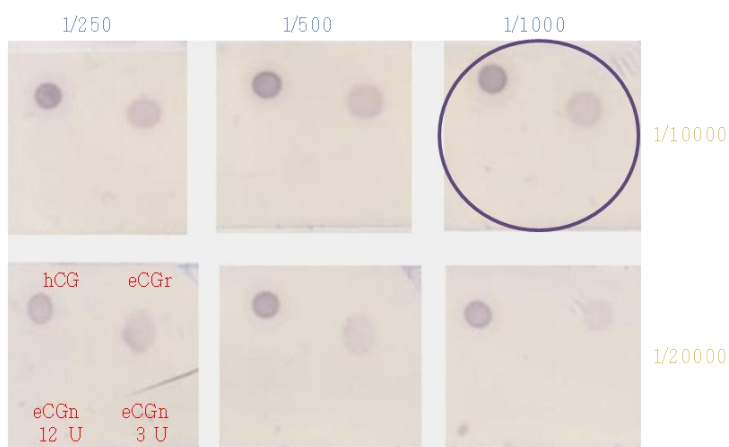


Fig. 4.2.3 Membranes de l'experiment. En vermell s'indica cada mostra; S'han disposat 200 ng de hCG, 2,5 μ g de eCGr d'un brou de cultiu concentrat i 12 i 3 U de eCG nativa d'Intervet. En groc la concentració de l'anticòs secundari i en blau la de l'anticòs primari. El cercle indica la combinació de dilucions escollida.

Les dilucions que s'han escollit pels experiments posteriors són la dilució 1/1000 pel primari i 1/10000 pel secundari. La primera s'ha escollit perquè no hi ha massa diferència entre les tres dilucions i d'aquesta manera es gasta menys anticòs. El secundari s'ha escollit perquè la taca de l'hormona eCG recombinat és més intensa quan més anticòs es posa.

Així doncs, s'han obtingut les dilucions de treball amb el nou sistema de detecció per dur a terme la tècnica de transferència Western.

4.3.1.1.c Anticòs de captura per l'ELISA

Com s'explica en l'apartat 4.3.3.2a d'aquest mateix capítol, per fer l'ELISA cal un segon anticòs capaç de reconèixer eCG i hCG. A més ha d'estar

desenvolupat en un organisme diferent al conill perquè no hi hagi reconeixement degut al mateix origen dels anticossos i no a l'especificitat.

Com ANTICÒS PRIMARI s'ha utilitzat un anticòs desenvolupat en pollastre i que reconeix l'hormona sencera: pollastre anti-hCG $\alpha+\beta$ de la casa AbCam. Les dilucions que s'han provat són 1/500, 1/1000 i 1/2000. La recomanada pel subministrador és la dilució més gran, s'han utilitzat dues dilucions més petites perquè es vol detectar eCG enlloc de hCG i en experiments anteriors s'ha vist que la sensibilitat per la eCG és inferior, per això s'ha augmentat la quantitat d'anticòs.

L'ANTICÒS SECUNDARI reconeix els anticossos de pollastre, també és de la casa AbCam, desenvolupat en cabra i amb la fosfatasa alcalina conjugada per la detecció. S'han provat les dilucions 1/500 i 1/1000, que són els límits aconsellats pel subministrador.

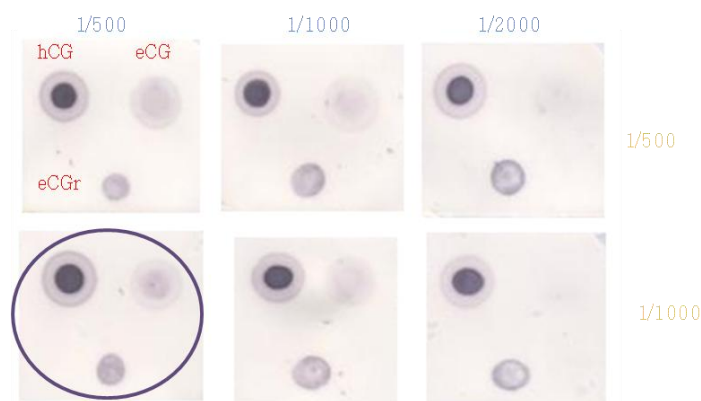


Fig. 4.2.4 Membranes de l'experiment. En vermell s'indica cada mostra; S'han disposat 200 ng de hCG, 2 U de eCG nativa de Sigma i 30 ng de eCGr purificada. En groc la concentració de l'anticòs secundari i en blau la de l'anticòs primari. El cercle indica la combinació de dilucions escollida.

En la figura 4.2.4 es mostra el recull de membranes incubades en les diferents combinacions de dilucions dels dos anticossos. Si es compara la intensitat de les taques de l'hormona humana (on s'ha disposat la mateixa quantitat en els dos experiments) en aquestes membranes i les de la figura 4.2.3, es pot veure que en aquesta és més alta, a més aquest anticòs ha estat capaç de reconèixer l'hormona equina nativa, tot i que el senyal no ha estat gaire intens, fet que amb els altres anticossos que s'havien provat fins ara no s'aconseguia. Això pot ser degut a que els epítops de reconeixement de l'anticòs són accessibles, almenys parcialment, en les tres hormones; hCG, eCGr i eCGn, mentre que les de l'anticòs desenvolupat en conill només les contenen les hormones hCG i eCGr.

Les dilucions que s'han escollit en cas de voler fer una transferència de punts i Western són 1/500 per l'anticòs primari i 1/1000 pel secundari.

Pel fet de detectar els tres tipus d'hormona sembla una bona combinació d'anticossos per fer la transferència de punts i de proteïnes, però el preu,

sobretot del primari, fan descartar-ho, un anàlisi (on es poden analitzar unes 20 mostres) costa 170 € només de l'anticòs primari. A més, el control positiu, eCGn, és reconegut feblement, fet que limita la seva aplicació com a control i patró en l'ELISA.

4.3.1.2 Detecció específica de cada cadena

L'objectiu d'utilitzar aquests anticossos específics de cadenes ha estat poder visualitzar si hi ha diferències en la producció o purificació de cada una de les cadenes i per comprovar si hi ha una cosecreció d'alguna de les cadenes per separat, a part de l'heterodímer.

El procediment ha estat el mateix que amb l'altre tipus d'anticòs, però tot s'ha hagut de fer per duplicat ja que es tenien parelles d'anticossos un per detectar la cadena α i l'altre per la β .

4.3.1.2.a Primera aproximació

S'han utilitzat els anticossos específics per cada cadena de la casa Calbiochem. Tots dos han estat desenvolupats en ratolí, això ha permès poder utilitzar el mateix anticòs secundari, que ha estat un anticòs que reconeix els anticossos de ratolí i amb la peroxidasa unida, per tan la tècnica de detecció és la quimioluminescent.

S'ha fet una transferència Western com a primera aproximació, utilitzant una dilució dels anticossos primaris de 1/300 i per l'anticòs secundari de 1/10000. Han estat reconegudes les dues cadenes. Però la casa comercial ha deixat de fabricar l'anticòs anti- α , per tan no s'ha fet cap posta a punt de la tècnica amb aquests anticossos i se n'han buscat uns altres.

4.3.1.2.b Anticossos monoclonals

S'han utilitzat els anticossos específics per cada cadena de la casa AbCam. S'han utilitzat com a ANTICOSSOS PRIMARIS, anticossos monoclonals de la casa AbCam en contra de cada cadena de la hCG i desenvolupats en ratolí. Com que el subministrador no suggereix cap dilució, s'ha optat per diluir poc l'anticòs, s'han fet les dilucions 1/50, 1/100, 1/200 i 1/300.

Com a ANTICÒS SECUNDARI s'ha utilitzat l'anticòs que reconeix els anticossos de ratolí amb la peroxidasa unida de la casa Pierce. S'ha fet una dilució 1/20000.

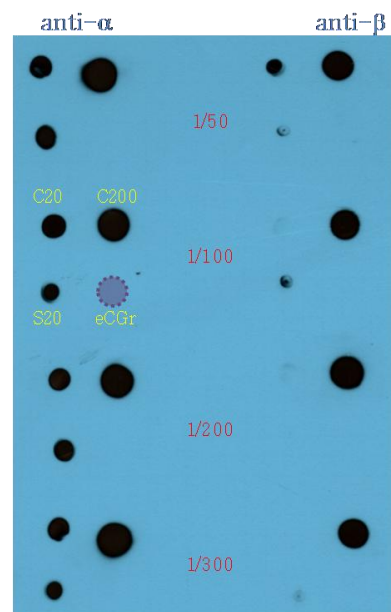


Fig. 4.2.5 Pel·lícula de l'experiment. Amb vermell s'indica la dilució de l'anticòs primari i en groc la mostra que correspon a cada taca; s'han disposat 20 (C20) i 200 ng (C200) de l'hormona humana subministrada per Calier, 20 ng de l'hormona humana de Sigma (S20) amb i 720 ng (de proteïna total) d'una mostra d'eCGr d'un brou de cultiu concentrat 20 vegades. El cercle morat indica la taca que no ha sortit.

En la figura 4.2.5 es mostra la membrana resultant d'aquest experiment. Es veu com en cap de les condicions i en cap dels dos anticossos s'ha detectat l'hormona recombinant (eCGr), tot i que se n'ha posat una quantitat bastant elevada, comparat amb els 30 ng que s'havien disposat en altres experiments. Segurament no és detectada perquè els anticossos són monoclonals; aquest tipus d'anticossos només detecten un epítop de la proteïna, per tan si aquest epítop no està present o exposat en la proteïna de cavall i recombinant, aquesta no serà reconeguda.

Les taques de l'anticòs anti- α són més intenses que les de l'anticòs anti- β , això podria ser degut, a la diferent afinitat.

De totes maneres, com que cap dels dos anticossos és capaç de detectar la eCGr, no seran utilitzats. Tampoc s'utilitzarà cap anticòs monoclonal, els següents que es provaran seran policlonals.

No s'ha posat cap mostra de eCG nativa perquè en el moment de fer aquest experiment no se'n tenia.

4.3.1.2.c Anticossos policlonals desenvolupats en cabra

A continuació, s'han provat els anticossos policlonals de la casa AbCam i produïts en cabra, un anti- α i un altre anti- β de l'hormona humana com a ANTICOSSOS PRIMARIS. El subministrador no suggereix cap dilució, s'ha optat per utilitzar 1/1000 1/2000 i 1/5000.

Com a secundari s'ha utilitzat l'ANTICÒS CONTRA anticossos de cabra de la casa Sigma amb la fosfatasa alcalina unida, per tan sistema de detecció colorimètric. S'utilitzen les dilucions 1/10000 i 1/20000.

En la figura 4.2.6 es mostren els resultats de l'experiment. Només detecta bé hCG, l'hormona equina, tan la nativa com la recombinant, només es detecta

lleugerament en algunes combinacions, per això es decideix buscar una altra parella d'anticossos.

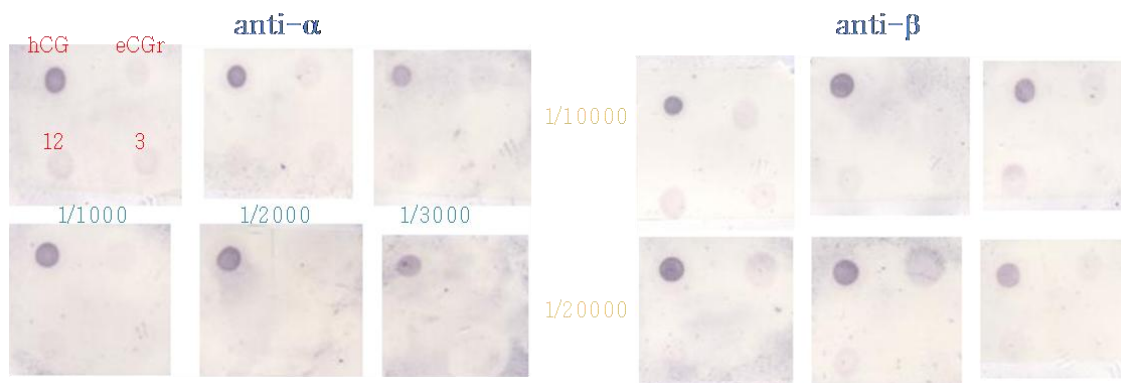


Fig. 4.2.6 Membranes de l'experiment. A la part esquerra hi ha les 6 membranes de l'anticòs anti- α , a al dreta les de l'anti- β . En vermell s'indica la mostra que correspon a cada gota; 200 ng de hCG de Sigma, 2,5 ng (de proteïna total) de eCGr d'un brou de cultiu concentrat i 12 i 3U de eCG nativa d'Intervet. En blau s'indica la dilució de l'anticòs primari i en groc la del secundari.

4.3.1.2.d Anticossos policlonals desenvolupats en conill

Aquesta vegada s'han utilitzat, com ANTICOSSOS PRIMARIS, els anticossos policlonals específics de cada cadena desenvolupats en conill i de la casa USbiological. El subministrador no suggereix cap dilució, per això s'han utilitzat les dilucions 1/250, 1/500 i 1/1000.

Com ANTICÒS SECUNDARI s'ha utilitzat un anticòs contra els anticossos de conill amb la fosfatasa alcalina unida de la casa Sigma. S'han utilitzat les dilucions 1/10000 i 1/20000, com s'ha fet amb els altres secundaris.

En la figura 4.2.7 es mostren les membranes resultants. Com es pot veure hi ha senyal en totes les mostres, la eCGr dona una senyal molt lleu i lleugerament millor amb l'anticòs anti- β que l'anti- α ; en canvi la hCG i la eCG natives són ben detectades,

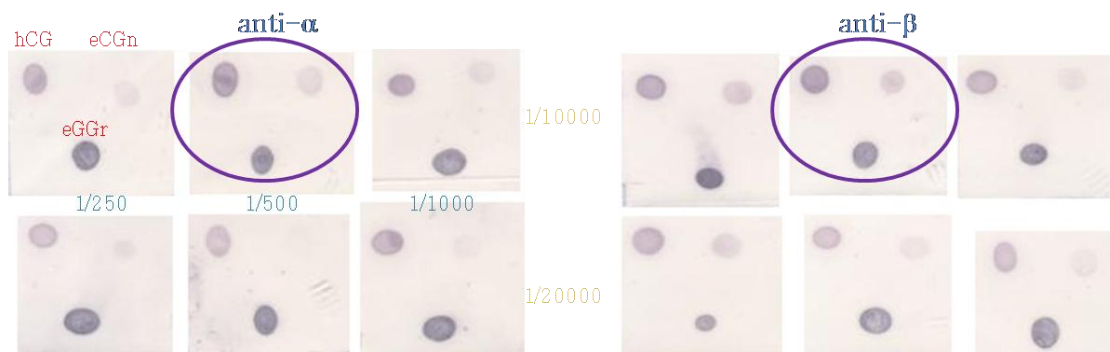


Fig. 4.2.7 Membranes de l'experiment. A la part esquerra hi ha les 6 membranes de l'anticòs anti- α , a al dreta les de l'anti- β . En vermell s'indica la mostra que correspon a cada gota; 200 ng de hCG de Sigma, 30 ng (de proteïna total) de eCGr purificada i 2 U de eCG nativa de Sigma. En blau la dilució de l'anticòs primari i en groc la del secundari. Els cercles indiquen la combinació de dilucions escollides.

S'ha escollit la mateixa combinació de dilucions pels dos anticossos: 1/500 per l'anticòs primari i 1/10000 pel secundari, s'assenyalen amb un cercle morat. Aquesta és una bona combinació per detectar les dues cadenes per separat, quan calgui, ja que permet reconèixer la eCGn, el baix senyal de la eCGr podria indicar una baixa quantitat relativa de la mostra.

4.3.1.3 Anticossos anti-His₆ i anti-c-myc

Hi ha dos anticossos comercials que ajuden a detectar les proteïnes expressades com a proteïna de fusió a una cua d'histidines i/o l'epítoc c-myc.

S'han provat tots dos anticossos a les dilucions recomanades pel subministrador. L'anticòs anti-his₆ s'utilitza a una concentració de 0,5 µg/ml i el secundari, l'anticòs anti-ratolí de Sigma a una dilució de 1/30000.

L'anti-c-myc a una dilució 1/5000 i el secundari, també l'anti-ratolí de Sigma a una dilució de 1/30000.

El sistema de detecció és el colorimètric, ja que el secundari té l'enzim fosfatasa alcalina unit.

En cada un dels dos anticossos només es detectada la concentració més alta de proteïna recombinant purificada, 215 µg/ml pel primer i 700 µg/ml pel segon.

Aquest resultat fa pensar que la seqüència d'aminoàcids, que és el que reconeixen els dos anticossos, està molt poc exposada, per tan l'anticòs no s'hi pot unir.

4.3.1.2.f Resum dels resultats en la selecció d'anticossos

En la taula 4.2.1 es mostra un resum del patró d'antigenicitat que s'ha observat per a tots els anticossos utilitzats. S'indica si l'anticòs és capaç de reconèixer la proteïna o no. No es té en compte l'anticòs secundari utilitzat, ja que no interfereix en la unió de l'anticòs i l'hormona.

En l'última columna s'hi mostren dades del preu que té l'anàlisi només referit a l'anticòs primari, així es pot fer una comparació dels preus de cada un, ja que són bastant diferents.

L'anticòs que té un patró d'antigenicitat més ampli és el desenvolupat en pollastre (AbCam), però el preu és més de 20 vegades superior al desenvolupat en conill, és per aquest motiu que s'ha utilitzat el darrer per fer els anàlisis per transferència Western. Pel que fa als anticossos específics de cadena, els d'antigenicitat més amplia són els de USbiological i els de cabra de AbCam, però quan s'observa el preu queda clar que és més barat utilitzar els primers.

Cal afegir que el grau de sensibilitat envers la eCG, paràmetre molt important, de tots els anticossos provats no és molt elevada o és nul·la, això fa pensar que reconeixen epítocs de glicans de la hCG específics d'espècie. Caldria obtenir un anticòs específic per eCG (comercial o bé obtingut per un servei especialitzat), que segurament milloraria aquest aspecte de l'anàlisi.

Taula 4.2.1 Resum del patró antigènic de les deferents variants de l'hormona gonadotrofina coriònica. El símbol + indica que l'hormona és reconeguda per l'anticòs, el signe - indica que no ho és. n/d indica que no s'ha determinat.

	hCG Calier	hCG Sigma	eCG nativa	eCGr	Preu/ anàlisi
Conill anti-hCG, Sigma	+++	++	-	+	7,34 €
Pollastre anti-hCG, AbCam	n/d	+++	+	++	170 €
Cabra anti-hCG α , AbCam	n/d	+++	+	+	170 €
Cabra anti-hCG β , AbCam	n/d	+++	+	+	0,5 €
Conill anti-hCG α , USbiological	n/d	+++	++	+	15 €
Conill anti-hCG β , USbiological	n/d	+++	++	+	15 €
Ratolí anti-hCG α , monoclonal AbCam	+	+++	n/d	-	
Ratolí anti-hCG β , monoclonal AbCam	+	+++	n/d	-	

4.3.2 ELISA

4.3.2.1 ELISA amb un Kit comercial

No ha sigut possible quantificar la eCG recombinant amb el kit comercial de la casa Paramedical. S'han provat diferents tipus de mostres: dilucions de la mostra final del cultiu, dilucions de la mostra de cultiu concentrada, dilucions de la mostra concentrada i diafiltrada, patrons subministrats amb el kit (eCG nativa) i eCG nativa Intervet. S'han analitzats a diferents graus de concentració, escala nano, micro i mili grams.

Totes les mostres que contenen l'hormona recombinant no han estat detectades pels anticossos del kit. El fet que els patrons subministrats amb el kit (eCG nativa) i la mostra de eCG nativa de la casa Intervet si que puguin ser quantificades, descarta qualsevol problema associat amb la configuració del kit. El problema, segurament, ha anat associat amb el fet que l'anticòs de captura que hi ha a les plaques sigui un anticòs monoclonal dirigit a eCG nativa, amb estructures glicosilades diferents a les produïdes en *P. pastoris*. En els experiments de transferència de punts ja s'ha vist que els anticossos monoclonals no són capaços de detectar l'hormona recombinant. Un altra possible explicació podria ser la baixa concentració de eCG recombinant que contenen les mostres i que el valor obtingut de proteïna total obtingut sigui majoritàriament degut a contaminants.

4.3.2.2 ELISA

Com que el kit comercial no ha funcionat per les mostres de eCGr, s'ha provat de posar a punt un protocol amb anticossos que sí que la reconeixin.

Com a anticòs de detecció s'ha utilitzat l'anti-hCG desenvolupat en conill de la casa Sigma i com a secundari l'anti-conill amb la fosfatasa alcalina conjugada també de la casa Sigma, tot i saber que no és gaire sensible. Com a punt de partida s'han utilitzat les mateixes dilucions que en la transferència de punts. Com a anticòs de captura s'ha utilitzat l'anticòs l'anti-hCG desenvolupat en pollastre de la casa AbCam.

S'han provat dos tipus de metodologia d'ELISA; la directa i la sandvitx.

4.3.2.2.a ELISA directa



Fig. 4.2.8 Esquema de l'ELISA directa.

En aquest experiment s'ha utilitzat la tècnica de detecció directa. Cal que la proteïna s'adsorbeixi a la placa d'ELISA, però d'aquesta manera només calen dos anticossos. En la figura 4.2.8 se'n mostra un esquema. El mètode es basa en l'adsorció de la proteïna, indicada en **verd** en la figura, directament a la placa d'ELISA. Així, no s'utilitza l'anticòs de captura, però sí el de detecció, mostrat en **vermell**, i el secundari, indicat en **blau**.

162

En el nostre cas, s'ha unit la proteïna directament a la microplaca; s'ha fet o/n a 23 °C i a 300 rpm, seguida del bloqueig durant 2 h. Finalment s'ha realitzat la detecció amb els anticossos anti-hCG α + β de Sigma, a una dilució 1/1000 i el secundari anti-conill de Sigma, a una dilució de 1/10000.

No obstant, cap de les mostres de hCG ni eCGr en cap de les seves concentracions dona senyal.

Donat que la hCG i la eCG recombinant són reconegudes en major o menor grau per l'anticòs (com s'ha vist en la transferència de punts), el problema podria ser degut a la manca d'unió de la proteïna a la placa. Per això es decideix provar la tècnica sandvitx.

4.3.2.2.b ELISA en sandvitx



Fig. 4.2.9 Esquema de l'ELISA en sandvitx.

Aquesta és una altra variant de la tècnica d'ELISA, més complexa perquè es necessiten tres anticossos. En la figura 4.2.9 es mostra un esquema dels anticossos utilitzats en aquesta tècnica; en **groc** es mostra l'anticòs de captura, aquest s'ha adsorbit a la placa i en el nostre cas és l'anticòs policlonal anti-hCG α + β desenvolupat en pollastre de la casa AbCam. En **verd** es mostra la proteïna, eCG o hCG i en **vermell** l'anticòs de detecció, si aquest no té cap enzim unit caldrà utilitzar l'anticòs secundari,

mostrat en **blau**. Aquests darrers anticossos són els mateixos que en el primer experiment.

Per posar a punt el protocol només s'han utilitzat mostres de hCG, ja que els anticossos són específica per aquesta proteïna, quan s'aconsegueixin bons resultats es seguirà amb la eCGn i la recombinant.

S'han provat diverses dilucions d'anticòs de detecció (1/500, 1/1000 i 1/2000) i de secundari (1/5000 i 1/10000), però cap de les condicions dona senyal. El fet que no es pugui detectar ni el control positiu hCG fa pensar que el protocol utilitzat no ha estat posat a punt adequadament; podria ser que el sistema de revelat no sigui prou sensible, o que les combinacions d'anticossos escollides tampoc, per això s'ha provat altres variants.

S'ha canviat el SISTEMA DE DETECCIÓ; enlloc d'utilitzar un anticòs amb la fosfatasa alcalina conjugada, se n'ha utilitzat un que tingui la peroxidasa. També s'ha utilitzat un kit de detecció per tal d'augmentar al màxim la sensibilitat: Kit FemtoELISA de la casa GBiosciences. L'anticòs de captura i el de detecció són els mateixos, només s'ha canviat el secundari per un de la casa Jackson ImmunoResearch i que reconeix els anticossos de conill. De l'anticòs de detecció se n'han fet les mateixes dilucions, mentre que del secundari s'han provat 1/5000, 1/25000, 1/50000 i 1/100000.

L'escala de hCG utilitzada és de l'ordre de $\mu\text{g/ml}$, des de 0,25 fins a 100.

No s'ha pogut obtenir una relació creixent observable entre l'absorbància i la concentració.

Com que no s'han millorat els resultats es descarta que la manca de sensibilitat del protocol sigui deguda a problemes del sistema de detecció colorimètric. L'altra possible causa dels resultats negatius obtinguts podria ser la combinació dels anticossos.

Així, s'ha provat diverses COMBINACIONS D'ANTICOSSOS. Un dels millors resultats obtinguts, tot i que no ser suficients per poder utilitzar la tècnica per quantificar, s'ha obtingut utilitzant l'anticòs anti- β policlonal desenvolupat en conill de la casa USbiological com **anticòs de captura**. Com **anticòs de detecció** s'ha utilitzat el mateix que en tots els experiments; anti-hCG $\alpha+\beta$ desenvolupat en conill de la casa Sigma a unes dilucions de 1/500, 1/1000 i 1/000 i com a **secundari** l'anticòs anti-conill de la casa Sigma a unes dilucions de 1/5000 i 1/10000. Les incubacions amb els anticossos s'han fet de 2 h.

S'ha provat de detectar hCG, eCGn a una concentració entre 0,01 $\mu\text{g/ml}$ i 10 $\mu\text{g/ml}$. No s'ha fet un anàlisi per triplicat de cada mostra, com seria l'estàndard, ja que primer s'ha volgut obtenir senyal.

En la figura 4.2.10 es mostra un dels gràfics obtinguts en aquest experiment; la relació entre l'absorbància i la concentració de les mostres de eCG nativa a

diferents combinacions de dilucions dels dos anticossos. Amb la eCG nativa no s'obté cap senyal, per això no es podrà utilitzar com a tècnica rutinària de quantificació.

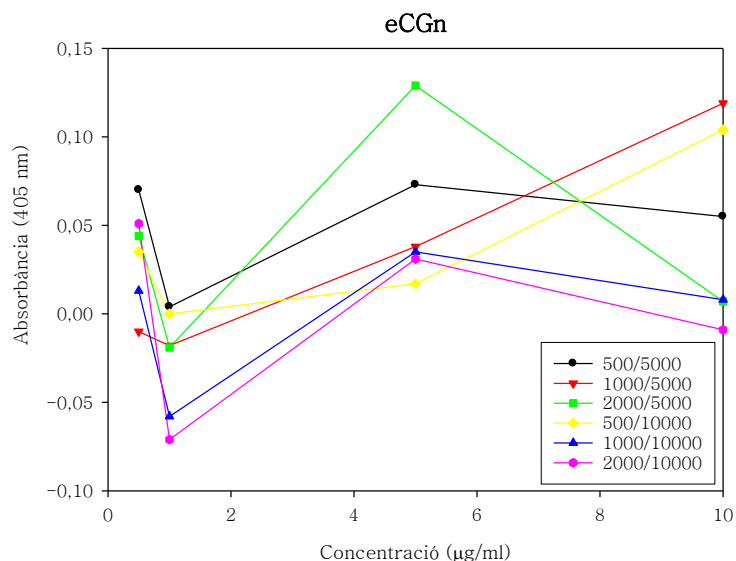


Fig. 4.2.10 Gràfica que mostra la relació entre l'absorbància a 405 nm i la concentració de les mostres de eCGn analitzades després de 10 min d'incubació. Cada línia mostra una combinació diferent d'anticossos indicada en la llegenda; primari/secundari.

La combinació que sembla donar una millor relació és la de primari/secundari 1000/5000 (línia de color vermell). El rang que es té és de 1 a 10 µg/ml.

En aquest experiment també s'ha estudiat la durada de la incubació de la placa abans de fer la lectura d'absorbància. El protocol estàndard recomana 10 min; s'han fet mesures cada 5 min fins a 30 min. Els resultats obtinguts no mostren una gran diferència en l'absorbància obtinguda, essent els millors resultats als 5 i 10 min.

També s'ha provat d'augmentar l'ordre de l'escala de concentració del patró de eCG nativa, però la poca linealitat obtinguda es perd.

En aquest punt s'ha decidit no provar cap més variant fins obtenir un anticòs que sigui capaç de detectar les tres hormones (hCG, eCGn i eCGr) amb eficiència.

4.4 Conclusions

Els anticossos comercial mono i policlonals mostren reconeixement variable dels patrons de hCG i eCG natives i poca sensibilitat aparent contra la eCGr. Això pot ser degut a diverses causes: la majoria (sinó tots) els anticossos anti-hCG semblen reconèixer epítops que són glicans, limitant el seu ús per a la eCG nativa i recombinant (tal com mostra la figura 4.2.1). Una solució futura seria aconseguir un anticòs primari contra eCG desglicosilada.

D'altra banda, els anàlisis de mostres de eCG recombinant suggereixen (quantitativament) que les concentracions relatives d'aquesta hormona són baixes. És probable que l'anticòs primari de Sigma presenti un cert grau de reconeixement inespecífic (envers els glicans de l'hormona).

No s'ha aconseguit posar a punt un mètode de quantificació amb la tècnica ELISA, segurament degut a la baixa sensibilitat, ja esmentada, dels anticossos utilitzats. Tot i així, s'ha aconseguit posar a punt un mètode de detecció, ja sigui per la transferència de punts o Western que s'ha utilitzat en el capítol 3 i s'utilitzarà en els capítols 5 i 6. Com anticòs primari s'utilitza l'anti-hCG desenvolupat en conill de la casa Sigma i com a secundari l'anti-conill amb fosfatasa alcalina de la casa Sigma o l'anti-conill amb la peroxidasa de la casa Pierce.

Capítol 5. Procés de purificació

5.1 Introducció

Un cop s'ha aconseguit dur a terme el cultiu en el bioreactor i s'ha comprovat que les soques seleccionades produeixen eCG (tot i que l'anàlisi qualitatiu del procés suggereix que els nivells d'expressió són moderats), cal dissenyar un procés de recuperació de la proteïna d'interès.

En aquest capítol s'explica com es recupera l'hormona eCG del brou de cultiu, mitjançant una etapa de centrifugació seguida d'una etapa d'ultrafiltració i diafiltració.

Hi ha moltes estratègies possibles per la purificació de proteïnes. Inicialment s'ha intentat utilitzar una tècnica basada en la fusió d'una cua de 6 histidines a la proteïna recombinant i que hauria de permetre fer una purificació en un sol pas mitjançant una cromatografia d'afinitat, no obstant, els resultats obtinguts amb aquesta tècnica no són satisfactoris. Per tan es planteja una estratègia amb tècniques cromatogràfiques convencionals. Que han permès la purificació parcial del producte, amb un grau de puresa suficient per a dur a terme proves d'activitat preliminars.

5.2 Materials i mètodes

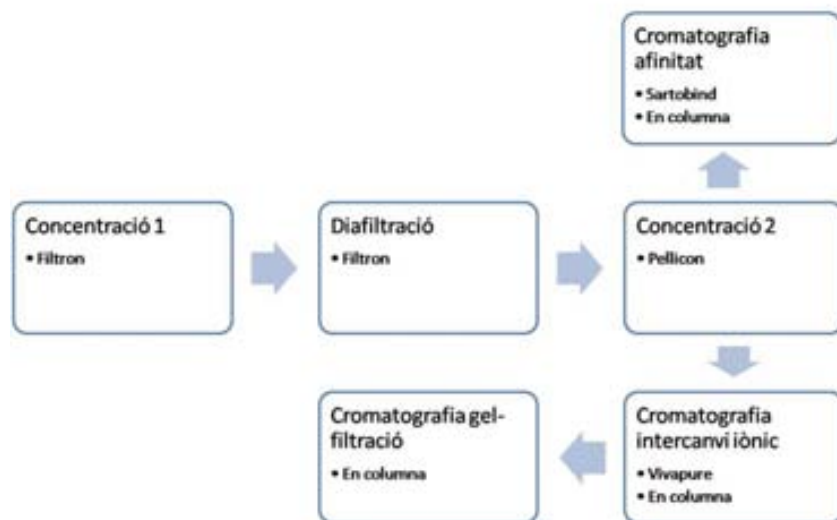


Fig. 5.1.1 Esquema del procés de purificació. Dins la caixa de cada etapa s'indiquen les diferents variants que s'han provat. La branca de la cromatografia d'afinitat queda parada perquè, com s'explicarà, no funciona.

5.2.1 Centrifugació i filtració

Per recuperar la eCG del brou de cultiu es comença amb una CENTRIFUGACIÓ del brou de cultiu recuperat del bioreactor: es fa a 8000g durant 10 min. El sobrenedant es FILTRA a través d'un filtre de fibra de vidre de 1,2 µm de diàmetre de porus (Millipore, Cat. No. APFC04700) amb l'ajuda d'un matràs de *Kitasato* i una bomba de buit. El brou filtrat recuperat és el que seguirà el procés.

Cal tenir en compte que tot aquest procés s'ha de fer per sota de 10 °C, per la nostra facilitat es fa a 4 °C, ja que tenim una cambra freda a aquesta temperatura.

Per fer un seguiment del procés es prenen mostres en els punts anterior i posterior de cada etapa.

La figura 5.1.1 es mostra un esquema del procés de purificació que s'ha establert i que facilita el seguiment de les tècniques.

5.2.2 Concentració i diafiltració

Es fan servir dos aparells de filtració tangencial diferents, segons el volum del brou de cultiu. Quan s'acaba el cultiu es fa servir el Centrasette® Pall Filtron, amb un volum mort de 300 ml, aproximadament. Per reduir aquest volum mort es treballa, després, amb el Labscale™ TFF System (Millipore, Cat. No. P73614A).

5.2.2.1 Primera concentració

S'utilitza el Centrasette® Pall Filtron amb la membrana Centrasette® 10K (Pall, Cat. No. 0S010C05), de 10k Da de tall de pes molecular. Aquesta membrana és de poliètersulfona modificada amb baixa capacitat d'unió de proteïnes.

1. Poseu la membrana a l'aparell i estreneu les femelles, en forma de creu, a 30 N. Després pugeu fins a 50 N, però sense forçar. Useu una clau anglesa que marca la força.
2. Un cop està col·locada la membrana, poseu en marxa la bomba, feu-hi circular aigua destil·lada durant 30 min. Controleu que la pressió d'entrada sigui de 20 psi i la del retingut de 15 psi. En la figura 5.1.2 se'n mostra un esquema.
3. Passeu NaOH 0,5 M, en les mateixes condicions de pressió, durant 30 min.
4. Torneu a passar aigua destil·lada en les mateixes condicions de pressió durant 15 min. Ara teniu la membrana neta i a punt.
5. Passeu el brou filtrat fins reduir el volum a 300 ml.
6. Netegeu la membrana amb aigua destil·lada durant 15 min.
7. Descargoleu les femelles i deixeu la membrana submergida en NaOH 0,1 M i a 4 °C.

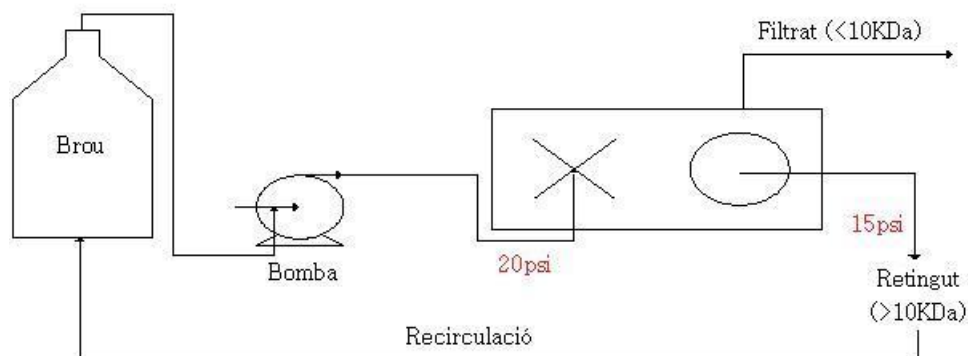


Fig. 5.1.2 Esquema de l'aparell de filtració Centrasette® Pall Filtron i les pressions que cal aplicar.

5.2.2.2 Diafiltració

Com indica l'esquema de la figura 5.1.1, aquesta etapa es porta a terme entre les dues concentracions. Es fa amb el mateix aparell que la primera concentració i el procés és el mateix, excepte les següents puntualitzacions:

- Enlloc del brou, es barregen els 300ml resultants de la primera concentració amb 3 l del tampó de diafiltrat; Tris·HCl 20 mM, pH=7,5.
- S'elimina la recirculació, es separa el dipòsit de reserva del retingut.
- Es para el procés quan l'ampolla de brou queda buida.

Per determinar el volum de tampó necessari per eliminar totalment els components del brou de cultiu de baix pes molecular es fa un seguiment de la conductivitat. Es fa una prova amb el Labscale™ TFF System. S'han utilitzat 100 ml de brou i s'ha diafiltrat amb 12 volums del tampó Tris·HCl 20 mM, pH=7,5, agafant fraccions del brou a cada volum de diafiltració i s'analitza la conductivitat.

5.2.2.3 Segona concentració

S'utilitza el Labscale™ TFF System amb la membrana Pellicon XL Biomax-10, de 10 kDa (Millipore, Cat. No. PXB010A50) de tall de pes molecular. La membrana també és de poliétersulfona. Es segueix el manual que porta l'aparell per fer la neteja i preparació. Un cop a punt, es posa el brou parcialment concentrat i diafiltrat al tanc de reserva i s'engega per concentrar fins el volum desitjat; entre 100 i 50 ml. Cal controlar bé les pressions de treball, que solen passar de les recomanades. En cas de sobrepressió en el sistema, cal disminuir la velocitat de la bomba.

En un experiment s'han utilitzat diferents filtres de tall de pes molecular, tots ells Pellicon XL Biomax: 100 kDa (Millipore, Cat. No. PXB100C50), 50 kDa (Millipore, Cat. No. PXB050A50) i 30 kDa (Millipore, Cat. No. PXB030A50).

5.2.3 Cromatografia d'afinitat

5.2.3.1 Sartobind®

S'utilitza el Sartobind® Membrane Adsorbers (Sartorius, Cat. No. 93IDA-42DB-12-V), una columna en forma de filtre amb una manipulació més simple que una columna cromatogràfica convencional. A la figura 5.1.3 se'n mostra una fotografia. S'hi acobla una xeringa de 10 ml amb el tampó adequat i es baixa l'èmbol suaument. El protocol seguit és el següent:

1. Netegeu la columna amb 10 ml del tampó EQ (equilibrat) per duplicat.
2. Carregueu la mostra prèviament filtrada a través d'un filtre de 0,22 µm.
3. Renteu la columna amb 10 ml de tampó EQ.
4. Eluïu amb 5 ml de tampó EL (elució).

Neteja i regeneració columna:

5. Passeu 10 ml de tampó EQ.
6. Passeu 10 ml de H₂SO₄ 1N.
7. Passeu 10 ml tampó EQ. Repetiu-ho un altre cop i assegureu-vos que el pH és de 4,5.



Fig. 5.1.3 Fotografia del filtre cromatogràfic.

8. Renteu amb 10 ml d'aigua destil·lada per duplicat.
9. Passeu 10 ml de tampó R (regeneració).
10. Passeu 10 ml de tampó W (rentat) per duplicat.
11. Passeu 10 ml de tampó EQ per duplicat. Ara podeu tornar-la a utilitzar.
12. Carregueu tampó S (magatzematge). Guardeu a temperatura ambient.

TAMPÓ DE REGENERACIÓ R

- 0,1 M CH₃COONa (Panreac, Cat. No. 131632)
- 0,5 M NaCl (Panreac, Cat. No. P7949)
- 0,5 M NiSO₄ (Panreac, Cat. No. 13144)

Dissoleu 6,80 g de CH₃COONa·3H₂O, 14,61 g de NaCl i 125,77 g de NiSO₄·6H₂O en 400 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu el pH a 4,5 abans d'ajustar el volum a 500 ml.

TAMPÓ D'EQUILIBRAT EQ

- 0,1 M CH₃COONa
- 0,5 M NaCl

Dissoleu 6,80 g de CH₃COONa·3H₂O i 14,61 g de NaCl en 400 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu el pH a 4,5 abans d'ajustar el volum a 500 ml.

TAMPÓ DE RENTAT W

- 50m M Na₂HPO₄ (Panreac, Cat. No. 131632)
- 0,5 M NaCl

Dissoleu 8,95 g de Na₂HPO₄·12H₂O i 14,61 g de NaCl en 400 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu el pH a 8,0 abans d'ajustar el volum a 500 ml.

TAMPÓ D'ELUCIÓ EL

- 0,1 M CH₃COONa
- 0,5 M NaCl
- 0,1 M Imidazole (Sigma, Cat. No. I5513)

Dissoleu 6,80 g de CH₃COONa·3H₂O, 14,61 g de NaCl i 17,02 g d'imidazole en 400 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu el pH a 4,5 abans d'ajustar el volum a 500 ml.

H₂SO₄ 1N

- H₂SO₄ 96 % (Panreac, Cat. No. 211058)

Diluïu 13,4 ml d'àcid en 500 ml d'aigua destil·lada.

TAMPÓ DE MAGATZEMATGE S

- 0,1 M CH₃COONa
- 0,5 M NaCl
- 0,02 % (p/v) Azida sòdica (Panreac, Cat. No. 15A866)

Dissoleu 6,80 g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 14,61 g de NaCl i 0,1 g de azida en 400 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu el pH a 4,5 abans d'ajustar el volum a 500 ml.

5.2.3.2 FPLC

S'utilitza un aparell de cromatografia líquida FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) LKB de la casa Pharmacia. La columna utilitzada té la resina *Ni Sepharose 6 Fast Flow* (GE Healthcare, Cat. No. 17-5318-02) i té una capacitat de 80 ml. La capacitat de la resina és entre 5 i 10 mg de proteïna per ml de resina. Es fa una lectura de la mostra que es carregarà a 280 nm per quantificar la proteïna que conté.

Abans d'utilitzar la mostra es filtra amb un filtre de fibra de vidre de 1,2 μm de diàmetre de porus (Millipore, Cat. No. APFC04700). El procés de purificació segueix els següents passos:

1. Renteu la columna amb 2-3 volums de columna amb aigua MiQ a un flux de 5 ml/min.
2. Equilibreu la columna amb 2-3 volums de tampó de càrrega al mateix flux.
3. Baixeu el flux a 1 ml/min i carregueu 10 ml de mostra a la columna.
4. Torneu a pujar el flux a 5 ml/min i renteu amb tampó de rentat fins que no surtin proteïnes (valor d'absorbància a 280 nm constant).
5. Eluïu la proteïna amb tampó d'elució i recolliu mostres cada 10 ml.
6. Identifiqueu les fraccions corresponents al pic d'elució i ajunteu-les.
7. Renteu la columna amb 2-3 volums amb aigua MiQ.
8. Equilibreu la columna amb 2-3 volums d'etanol al 20 %. Guardeu-la a 4 °C.

174

Per regenerar la columna s'utilitza una solució de regeneració i se'n fan passar 20 volums de columna.

TAMPÓ DE CÀRREGA

- o 20 mM Tris·HCl (Panreac, Cat. No. 141940)
- o 10 mM Imidazole

Dissoleu 2,42 g de Tris·HCl i 0,68 g d'imidazole en 950 ml d'aigua. Ajusteu el pH a 7,5 abans d'ajustar el volum a 1 l.

TAMPÓ DE RENTAT

- o 20 mM Tris·HCl
- o 20 mM Imidazole

Dissoleu 2,42 g de Tris·HCl i 1,36 g d'imidazole en 950 ml d'aigua. Ajusteu el pH a 7,5 abans d'ajustar el volum a 1 l.

TAMPÓ D'ELUCIÓ

- o 20m M Tris·HCl
- o 500 mM Imidazole

Dissoleu 2,42 g de Tris·HCl i 34,04 g d'imidazole en 950 ml d'aigua. Ajusteu el pH a 7,5 abans d'ajustar el volum a 1 l.

TAMPÓ DE REGENERACIÓ

- o 0,2 M NiSO₄ (Panreac, Cat. No. 13144)

Dissoleu 26,3 g de NiSO₄ en 500 ml d'aigua destil·lada.

Tots els tampons han d'estar filtrats i desgasificats.

5.2.3.3 AKTA

Aquests experiments s'han dut a terme en els laboratoris del Servei de Proteòmica i Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la UAB.

S'ha utilitzat un aparell de cromatografia líquida d'alta pressió AKTA Purifier de la casa GE Healthcare. La columna utilitzada conté la resina d'afinitat; *IMAC Sepharose 6 Fast Flow* (GE Healthcare, Cat. No. 17-0921-08) i té un volum de 1 ml. La capacitat de la resina és de 4 mg de proteïna pel ml (el 10 % de la seva capacitat màxima). Tot el procés es fa a un flux de 1 ml/min i es fa una lectura de la mostra resultant a 280 nm, i 254 nm per determinar la quantitat de proteïna.

Abans d'utilitzar la mostra es filtra amb un filtre de fibra de vidre de 1,2 µm de diàmetre de porus (Millipore, Cat. No. APFC04700). El procés de purificació segueix els següents passos:

1. Renteu la columna amb 5 volums de columna amb aigua MiQ.
2. Equilibreu la columna amb 5 volums de tampó de càrrega.
3. Carregueu la mostra a la columna (10 o 50 ml). Passeu 2 volums més per netejar la columna.
4. Renteu amb tampó de rentat fins que no surtin proteïnes; 20 volums.
5. Eluïu la proteïna amb 20 volums de tampó d'elució i recolliu mostres cada 1 ml.
6. Identifiqueu les fraccions corresponents al pic d'elució i ajunteu-les.
7. Renteu la columna amb 5 volums amb aigua MiQ.
8. Equilibreu la columna amb 5 volums d'etanol al 20 %. Guardeu-la a 4 °C.

Els tampons són els mateixos utilitzats en la tècnica anterior (FPLC).

5.2.4 Cromatografia de bescanvi iònic

Abans de posar a punt cap tècnica s'intenta determinar punt isoelèctric de la proteïna recombinant amb programes informàtics, s'utilitza el programari *on-line* que facilita *Swiss-prot*; <http://expasy.org>; ProtParam tool i Compute pI/MW.

5.2.4.1 Vivapure Mini L

La primera aproximació de la cromatografia de bescanvi iònic es fa amb mini columnes per ser utilitzada en microcentrífuga. S'utilitzen aquestes columnes que tenen una membrana inert on s'hi ha unit els grups reactius que permetran dur a terme la cromatografia d'interès. S'han utilitzat dos tipus de columnes:

COLUMNA S- (Sartorius, Cat. No. VS-IX01SL24). A la matriu s'hi ha unit àcid sulfònic ($R-CH_2-SO_3^- Na^+$); això li confereix propietats de bescanviador catiònic fort; la membrana adquireix una càrrega neta negativa que li permet retenir molècules amb càrrega positiva.

COLUMNA Q+ (Sartorius, Cat. No. VS-IX01QL24). A la matriu s'hi ha unit una amina quaternària ($R-CH_2-N^+-(CH_3)_3Cl^-$), conferint-li propietats de bescanviador aniònic fort; la membrana adquireix una càrrega neta positiva que li permet retenir molècules amb càrrega negativa.

De cada tipus de columna se n'utilitzen quatre, ja que es prova el mateix tampó a 4 pH diferents: NaAc 20m M a pH=4, 5, 6, 7 per la columna S i Tris·HCl 20 mM pH=8, 9, 10, 11 per la columna Q. En cada columna es farà una elució de força iònica creixent. Es parteix de l'equilibrat a força iònica 0,0 i creix fins a 2 M (concentració de NaCl).

176

El protocol seguit ha estat:

1. Equilibreu les columnes amb 400 μ l del tampó 25 mM al pH desitjat i FI=0. Centrifugueu a 2000 xg durant 5 min.
2. Prepareu la mostra. Diluïu el brou concentrat 20X, amb el tampó desitjat i al pH desitjat, a 5X, posant 100 μ l de mostra i 300 μ l de tampó.
3. Afegiu 400 μ l del brou 3X a la columna. Centrifugueu a 2000 xg durant 5 min.
4. Renteu amb 400 μ l del tampó d'equilibrat. Centrifugueu a 2000 xg durant 5 min.
5. Eluïu utilitzant un gradient de força iònica de NaCl: 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M, i 2,0 M, mantenint el pH del tampó d'equilibrat. Centrifugueu a 2000 xg durant 5 min.

TAMPONS COLUMNA S-

- o 20 mM CH₃COONa pH= 4, 5, 6, 7
- o 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M, i 2,0 M NaCl.

Peseu 0,16 g de CH₃COONa i dissoleu en 75 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu al pH desitjat i acabeu d'enrasar a 100 ml. Dividiu aquesta solució en 5 fraccions de 20 ml i afegiu la quantitat de NaCl per tenir la molaritat desitjada, segons indica la taula 5.1.1 per obtenir els cinc tampons de força iònica diferent.

COLUMNA Q+

- o 20 mM Tris·HCl pH= 8, 9, 10, 11
- o 0,5 M, 1,0 M, 1,5 M, i 2,0 M NaCl.

Peseu 0,24 g de Tris·HCl i dissoleu en 75 ml d'aigua destil·lada. Ajusteu al pH desitjat i acabeu d'enrasar a 100 ml. Dividiu aquesta solució en 5 fraccions de 20 ml i afegiu la quantitat de NaCl per tenir la molaritat desitjada, segons indica la taula 5.1.1 per obtenir els cinc tampons de força iònica diferent.

Taula 5.1.1 Quantitat de NaCl necessària per preparar els tampons a diferent força iònica.

Força iònica equivalent a [NaCl]	g de NaCl en 20 ml
0,0 M	0,00
0,5 M	0,58
1,0 M	1,17
1,5 M	1,75
2,0 M	2,34

De cada columna s'han obtingut 6 mostres: la fracció que no s'uneix a la columna (NU); la del rentat (R); i les quatre d'elució segons la força iònica (E0,5; E1; E1,5; E2).

5.2.4.2 AKTA

Aquests experiments s'han dut a terme en els laboratoris del Servei de Proteòmica i Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la UAB.

S'ha utilitzat un aparell de cromatografia líquida d'alta pressió AKTA Purifier de la casa GE Healthcare. S'han utilitzat columnes de dues mides, una de 1 ml model HR5/5 (GE Healthcare, Cat. No. 17-0549-01) per fer les proves preliminars i una de 50 ml model XK26/20 (GE Healthcare, Cat. No. 18-1000-72), totes dues plenes de la mateixa resina de bescanvi aniònic: Source 15Q (GE Healthcare, Cat. No. 17-0947-01).

La mostra que es carrega és el brou concentrat i diafiltrat. En tot el procés es manté el flux a 1 ml/min i 4 ml/min per la columna de 1 i 50 ml, respectivament. L'absorbància ens serveix per fer el seguiment del procés. Per la camisa (que nomé té la columna de 50 ml) es fa passar aigua a 4 °C per mantenir el procés a

aquesta temperatura. El protocol de purificació que s'ha seguit ha estat el següent:

1. Renteu la columna amb 5 volums de columna amb aigua MiQ.
2. Equilibreu la columna amb 5 volums de tampó de càrrega.
3. Carregueu la mostra a la columna (10 ml per la columna de 1 ml o 50 ml per la gran).
4. Passeu 2 volums de tampó de càrrega per netejar la columna.
5. Renteu amb tampó de càrrega fins que no surtin proteïnes: 20 volums.
6. Eluïu la proteïna amb 20 volums de tampó, fent un gradient creixent de 0 M a 1 M de NaCl. Recolliu mostres cada 1 o 10 ml, segons la columna.
7. Identifiqueu les fraccions corresponents al pic d'elució i ajunteu-les.
8. Renteu la columna amb 5 volums amb aigua MiQ.
9. Equilibreu la columna amb 5 volums d'etanol al 20 %. Guardeu-la a 4 °C.

TAMPÓ DE CÀRREGA

- o 20 mM Tris·HCl

Dissoleu 2,42 g de Tris·HCl en 950 ml d'aigua. Ajusteu el pH a 8,0 abans d'ajustar el volum a 1l.

TAMPÓ D'ELUCIÓ

- o 20 mM Tris·HCl
- o 1 M NaCl

Dissoleu 2,42 g de Tris·HCl i 58,44 g de NaCl en 950 ml d'aigua. Ajusteu el pH a 8,0 abans d'ajustar el volum a 1 l.

178

Tots els tampons han d'estar filtrats i desgasificats.

Es fa un gradient creixent de força iònica de 0 a 1 M, afegint gradualment el tampó d'elució i disminuint el de càrrega.

5.2.5 Cromatografia de sedàs molecular (gelfiltració)

Aquests experiments s'han dut a terme en els laboratoris del Servei de Proteòmica i Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la UAB.

S'ha utilitzat un aparell de cromatografia líquida d'alta pressió AKTA Purifier de la casa GE Healthcare. S'ha utilitzat una columna ja empacada *HiLoad Superdex 75 26/60* (GE Healthcare, Cat. No. 17-1070-01), amb un volum de 350 ml.

La mostra que es carrega són les fraccions obtingudes per bescanvi iònic.

El protocol següent és el següent:

1. Renteu la columna amb 5 volums de columna amb aigua MiQ.
2. Equilibreu la columna amb 2 volums de tampó de càrrega.
3. Carregueu la mostra a la columna (uns 40 ml).
4. Eluïu la proteïna amb 1,5 volums de tampó
5. Identifiqueu les fraccions corresponents al pic d'elució i ajunteu-les.
6. Renteu la columna amb 5 volums amb aigua MiQ.
7. Equilibreu la columna amb 5 volums d'etanol al 20 %. Guardeu-la a 4 °C.

TAMPÓ DE CÀRREGA I ELUCIÓ

- o 0,9 % (p/v) NaCl

Dissoleu 18 g de NaCl en 2 l d'aigua destil·lada.

Tots els tampons han d'estar filtrats i desgasificats.

5.2.6 Determinació del contingut en sucres del preparat comercial de eCG (Foligon d'Intervet)

S'ha utilitzat la cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC) per analitzar els sucres presents.

S'ha utilitzat el cromatògraf de la Sèrie 1050 de la casa Hewlett Packard. La columna és de la casa Transgenomic model ICE-Coregel 87H3 (Cat. No. ICE-99-9861).

S'utilitza Foligon de la casa Intervet a una concentració de 1000 U/ml per analitzar directament i 2000 U/ml per afegir-hi els sucres control.

1. Prepareu les solucions control de sucres que s'afegiran a la mostra de Foligon. Les solucions són les següents:

FRUCTOSA (10 ML)

- o 1 g/l Fructosa (Merck, Cat. No. 105323)

Dissoleu 10 mg de fructosa en 10 ml d'aigua MilliQ.

SACAROSA (10 ML)

- o 2 g/l Sacarosa (Panreac, Cat. No. 141621)

Dissoleu 20 mg de fructosa en 10 ml d'aigua MilliQ.

2. Barregeu 200 µl de Foligon 2000 U/ml i 200 µl d'una de les solucions control. Per analitzar el producte sol s'utilitzen 200 µl de Foligon a 1000 U/ml.
3. Filtreu amb un filtre d'esters de cel·lulosa de 0,45 µm de porus (Millipore, Cat. No. HAWP01300).

3. El programa utilitzat és es següent:

- Durada: 30 min.
- Temperatura: ambient.
- Detector: índex de refracció, rang 1/4 i temperatura a 40 °C.
- Elució: isocràtica a un flux de 0,6 ml/min d'àcid sulfúric 2,3 mM.

ÀCID SULFÚRIC 2,3 MM

- Àcid sulfúric qualitat anàlisi (PA-ISO, Cat. No 131058.1211)

Dissoleu 160 µl d'àcid sulfúric per anàlisi en 1 l d'aigua ultra pura. Desgasifiqueu la solució resultant.

5.2.7 Altres tècniques utilitzades

5.2.7.1 Gels d'acrilamida, transferència de punts i de proteïnes

Es fan igual i de les mateixes propietats detallades en l'apartat de materials i mètodes del capítol 3, apartats 3.2.5 i 3.2.6.

5.3 Resultats i discussió

En la figura 5.2.1 es mostra un gel d'acrilamida i una transferència Western de les últimes mostres d'un brou de cultiu en discontinu alimentat. Hi ha bandes associades a proteïnes que no són detectades per l'anticòs específic de hCG, per tant caldrà eliminar-les durant el procés de purificació.

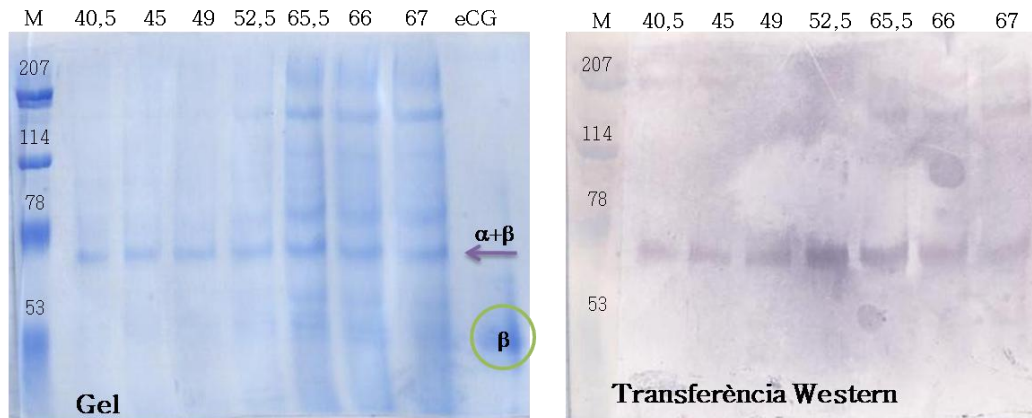


Fig. 5.2.1 Gel d'acrilamida al 7,5 % i transferència Western de les últimes mostres d'un cultiu en discontinu alimentat. En el primer carril s'hi mostra el marcador de pes molecular, s'indica la mida de les bandes en kDa. L'últim carril del gel conté eCG nativa (en la transferència Western no es mostra perquè no és reconeguda per l'anticòs utilitzat), s'indiquen les possibles bandes de la cadena β (44 kDa) i l'heterodímer (61 kDa) segons les mides indicades per KA Ferguson (1964). La resta de carrils són mostres del cultiu a diferents temps, indicat a la part superior i en hores.

Per aquest motiu es planteja un procés de purificació. En la figura 5.2.2 es mostra un esquema de les tècniques utilitzades.

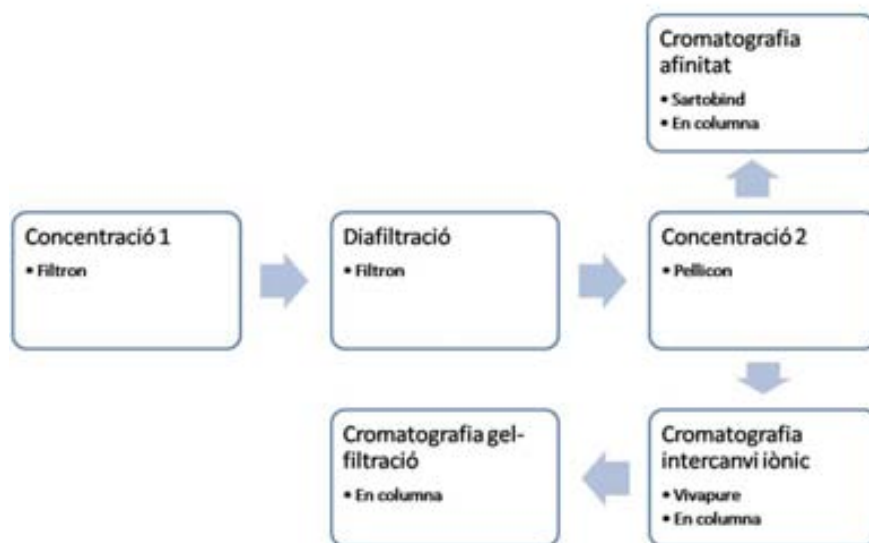


Fig. 5.2.2 Esquema del procés de purificació. Dins la caixa de cada etapa s'indiquen les diferents variants que s'han provat. La branca de la cromatografia d'afinitat queda parada perquè, com s'explicarà, no funciona.

5.3.1 Concentració i diafiltració

S'ha seguit el protocol que s'explica en l'apartat de materials i mètodes. S'ha escollit una membrana amb un tall de pes molecular de 10 kDa per assegurar que no es perd gens de proteïna; el pes molecular de la cadena α sola és de 17 kDa i el de la β de 44 kDa, tot i que les cadenes soles no són d'interès es prefereix ser conservadors i recollir-ho tot. En la figura 5.2.1 es mostra un gel on sembla que l'heterodímer amb sucres supera els 50 kDa, però no es vol ser tan restrictiu en el pas de concentrat.

En la figura 5.2.3 es mostra un esquema de les fraccions generades en aquesta etapa.

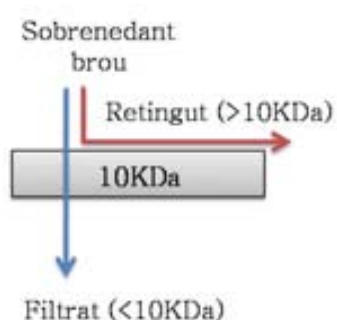


Fig. 5.2.3 Esquema de la distribució de les proteïnes segons el seu pes moleculars en el procés de concentració i diafiltració, utilitzant una membrana amb un tall de pes molecular de 10 kDa.

La concentració s'ha fet en dues etapes i en dos aparells diferents.

La PRIMERA CONCENTRACIÓ segueix un centrifugat i filtrat per eliminar la biomassa del brou obtingut en el cultiu. S'ha reduït el volum del brou a 300 ml; això significa una concentració entre 5 i 10 vegades, segons el volum de brou inicial (entre 3 i 5 l).

En la DIAFILTRACIÓ s'ha utilitzat la mateixa membrana que en la concentració. Aquesta etapa és necessària per tenir la eCG recombinat en el tampó necessari per seguir el procés de purificació. El brou de cultiu té molts salts degut a la composició del medi i poden interferir en una cromatografia de bescanvi iònic, ja que augmenten molt la força iònica del brou. També permetrà veure l'estat de la proteïna quan es redueix la força iònica del medi.

La SEGONA PART DE LA CONCENTRACIÓ s'ha fet amb el sistema Pellicon. S'ha partit dels 300 ml de brou concentrat i ja diafiltrat i s'ha reduït fins a 50-100 ml, això implica una concentració de 3 a 6 vegades.

La concentració total que s'ha fet és entre 15 i 30 vegades.

Per comprovar que durant el procés no es perd proteïna en la fracció filtrada es fa una transferència de punts de totes les fraccions, en la figura 5.2.4 es mostra la membrana dels resultats obtinguts en una de les concentracions fetes. S'ha partit de la mostra final d'un cultiu en discontinu alimentat, s'ha pres una mostra del primer i el segon concentrat i els seus permeats, així com la mostra diafiltrada i el seu permeat. La primer concentració és de

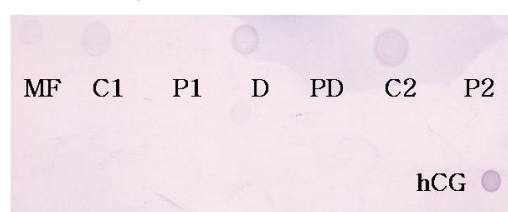


Fig. 5.2.4 Membrana de la transferència de punts feta amb les mostres de concentració d'un brou de cultiu; MF: Mostra final del cultiu, C1: primer concentrat (Filtron), P1: primer permeat, D: diafiltrat, PD: permeat de la diafiltració, C2: segon concentrat (Pellicon), P2: segon permeat. hCG és el control positiu a una concentració de 50 $\mu\text{g/ml}$.

quasi 11 vegades, mentre que la segona és de 2,5.

En la figura es veu com en cap dels permeats o filtrats s'hi detecta proteïna però si en la part retinguda, en les dues concentracions i en la diafiltració.

El fet de concentrar 11 i 2,5 vegades ho determinen els volums inicials en cada una de les concentracions i el volum mort de cada aparell; en la primera concentració partim de 3250 ml i ens quedem amb 300 ml i en la segona partim de 500 ml i ens quedem amb 200 ml.

Taula 5.2.1 Dades de les diferents etapes de concentració i diafiltració.

Etapa	Volum (ml)	Proteïna total (µg/ml)
Brou final	3250	324,01
Concentrat 1	300	1801,72
Permeat 1	3000	26,57
Diafiltrat	500	1059,17
Permeat	3600	0
Concentrat 2	200	2858,52
Permeat 2	300	22,69

En la taula 5.2.1 es recullen els volums finals de cada una de les etapes amb la proteïna total obtinguda en cada una. Els valors obtinguts són coherents amb el que s'esperaria: en els permeats hi ha poca o gens de proteïna, mentre que en les fraccions concentrades aquest valor va augmentant, excepte en la diafiltració, tècnica que manté el volum, per tant la concentració.

5.3.1.1 Determinació del tall de pes molecular de la membrana més adequada

En aquest punt se sap que la membrana amb 10 kDa de tall de pes molecular serveix per poder concentrar els brous, tot retenint el producte d'interès. Però si es pogués utilitzar un tall de pes molecular més gran s'eliminarien més proteïnes, facilitant així la resta del procés de purificació. El gel de la figura 5.2.1 mostra que el possible heterodímer està al voltant dels 70 kDa, per tant es podria utilitzar la membrana que talla als 50 kDa. Per això s'ha fet el procés de concentració amb membranes de diferent tall de pes molecular; 30, 50 i 100 kDa. S'ha utilitzat l'aparell de volum petit, Pellicon, on s'han pogut instal·lar les tres membranes en paral·lel i recollir una única fracció de retingut provinent de les tres membranes i el permeat de cada una membrana per separat. En la figura 5.2.5 es mostra un esquema del muntatge realitzat i les fraccions que s'han recollit.

De totes les fraccions recollides se n'ha fet una transferència de punts per comprovar a on hi ha proteïna i, per tant, saber quina membrana es pot utilitzar en aquesta fase. Com es veu en la figura 5.2.5, en el filtrat de 10 kDa (2) no hi

ha eCG, ha quedat en el retengut (3). Passa el mateix quan s'utilitza les membranes de tall a 30 kDa i 50 kDa; en les fraccions de filtrat (4 i 5) no hi ha proteïna, en canvi quan s'utilitza la membrana de 100 kDa es veu que en el filtrat (6) si que hi ha proteïna, per tant no es pot utilitzar aquesta membrana per concentrar i diafiltrar, però si la de 50 kDa. En la fracció 7 es veu el retengut de les tres membranes, el muntatge no permet separar-los, per tant el fet que hi hagi proteïna no aporta informació addicional, ja que no se sap en quina membrana ha quedat retinguda.

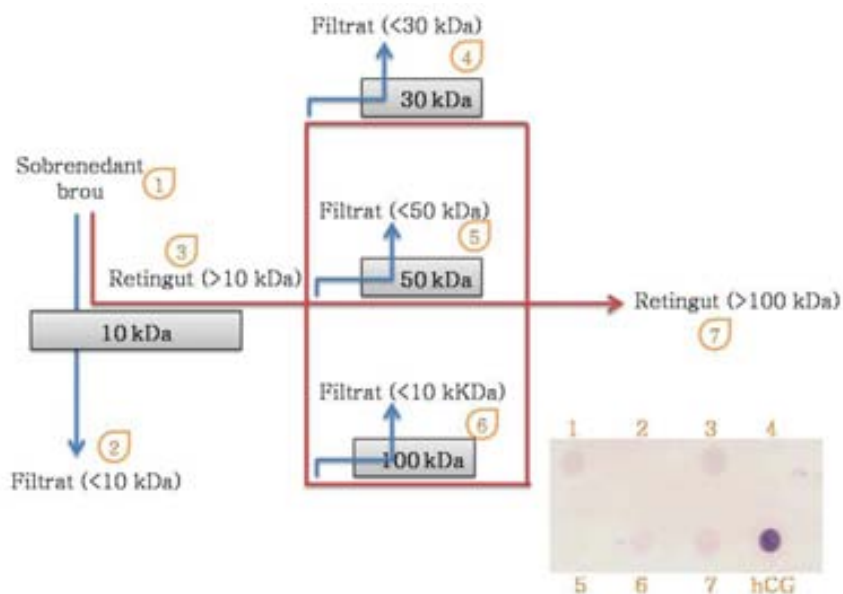


Fig. 5.2.5 Esquema del muntatge. En taronja es marca el nombre de la fracció per identificar-les en la transferència de punts també mostrat. hCG és el control positiu a una concentració de 100 µg/ml.

Tot i aquests resultats i tal com s'ha explicat al principi d'aquest apartat, es segueix utilitzant la membrana de 10 kDa, per evitar perdre possibles formes de eCG amb menys glicosilació i de pes molecular més petit de 50 kDa.

5.3.1.2 Anàlisi de la conductivitat

S'ha fet un segon anàlisi per determinar quants volums de tampó s'han de fer passar per tenir la conductivitat desitjada del tampó que es necessita pels passos posteriors: Tris·HCl 20 mM, pH=7,5. S'entén com a un volum de diafiltració el volum de brou inicial que es vol diafiltrar. Durant aquest procés es mantén el volum, no es concentra ni dilueix.

Tal com mostren els resultats recollits en la taula 5.2.2, es mesura la conductivitat del tampó final i es pren una mostra del brou en procés de diafiltració cada vegada que ha passat un volum del nou tampó. Com que el brou té un alt contingut en salts s'ha de veure una disminució de la conductivitat.

Taula 5.2.2 Dades de conductivitat. També es mostra la conductivitat del tampó utilitzat.

Nº de volums	Conductivitat (mS/cm)
0	52,0
1	26,1
2	14,4
4	4,04
5	3,01
6	2,35
7	1,946
8	1,759
9	1,733
10	1,687
12	1,709
Tampó	1,718

En l'última mostra també s'ha mesurat el pH per comprovar que és de 7,5, com el tampó.

En la figura 5.2.6 es mostra el gràfic de l'evolució de la conductivitat durant el procés. Com es veu, als 8 volums ja s'ha obtingut una conductivitat com la del tampó, però s'allargarà a 10 per assegurar el bon resultat del procés.

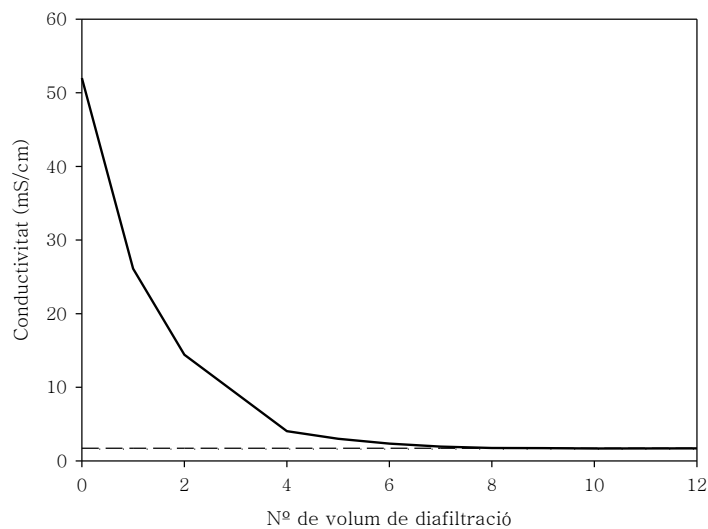


Fig. 5.2.6 Evolució de la conductivitat a mida que avança la diafiltració. La línia discontinua mostra el valor de conductivitat del tampó Tris·HCl 20 mM pH=7,5, utilitzat en el procés.

5.3.2 Purificació per cromatografia d'afinitat

Com ja s'ha explicat en el primer capítol (pàgina 57), la proteïna recombinat porta una cua de 6 histidines a la cadena α . Això hauria de permetre fer una purificació en un sol pas: cromatografia d'afinitat. La proteïna que té la cua d'histidines es queda retinguda a la columna i la resta són rentades. Com s'explica, seguidament, es fan dues variants d'aquest tipus de cromatografia i una d'elles amb dos aparells diferents.

5.3.2.1 Sartobind®; purificació per gravetat a petita escala

Aquesta columna cromatogràfica en forma de filtre permet una manipulació molt senzilla; Es carrega la mostra recollint el que en surt que serà la fracció de proteïnes que no s'uneix, es renta i s'elueix, obtenint les quatre fraccions que es mostren en la transferència de punts de la figura 5.2.7 que permet veure en quines fraccions hi ha proteïna. S'utilitza el brou d'un cultiu fet en erlenmeyer que ja se li ha eliminat la biomassa.

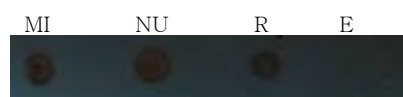


Fig. 5.2.7 Membrana de transferència de punts amb detecció fotogràfica de les fraccions obtingudes en la purificació amb el *Sartobind*. MI: Mostra inicial, NU: fracció que no s'uneix a la columna, R: fracció del rentat i E: fracció eluïda.

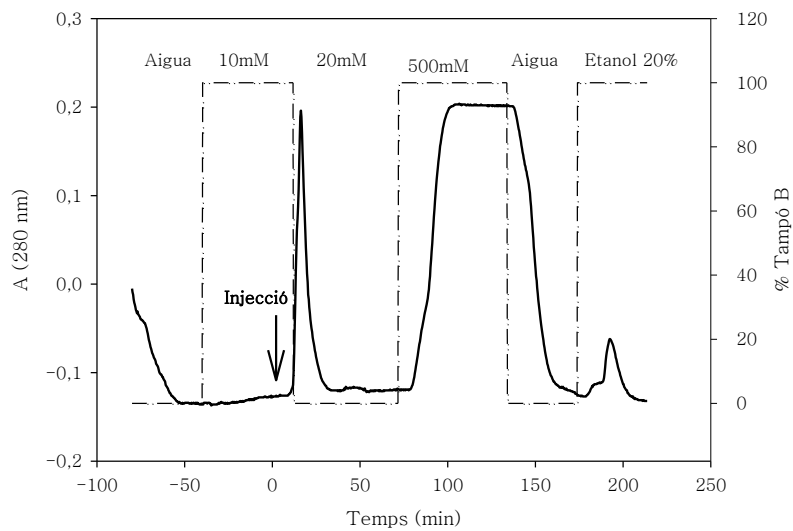
186

Com mostra la figura, no s'obté gens de proteïna en la fracció d'elució (E), tota la proteïna present en la mostra inicial (MI) es troba en la fracció de proteïnes que no s'uneixen a la membrana (NU) i les que surten amb el rentat (R). Els resultats semblen indicar que la eCGr present en el brou no s'uneix correctament a la resina. Una possible explicació podria ser que la cua d'histidines de la cadena α no es troba accessible a la superfície de l'heterodímer. L'altra possible raó podria ser que els components del brou de cultiu interfereixin en la unió de la eCGr a la resina.

5.3.2.2 Purificació amb el sistema FPLC

Per descartar que el brou de cultiu pugui interferir en la purificació, s'ha fet un cultiu en bioreactor operat en discontinu i s'ha concentrat i diafiltrat el brou. Com que s'ha obtingut un volum més gran es prova de fer la mateixa tècnica però amb una columna convencional. D'aquesta manera també s'evita treballar

amb quantitats de producte massa petites per a ser monitoritzades al llarg del procés de purificació.



7

Fig. 5.2.8 Purificació per afinitat. La línia gruixuda mostra l'evolució de l'absorbància a 280 nm, que permet visualitzar la quantitat de proteïna que surt de la columna. La línia discontinua indica el canvi de tampó, a la part superior s'indica la concentració d'imidazole que conté cada un.

En la figura 5.2.8 es mostra el cromatograma resultant; no comença a temps zero perquè inclou la fase de rentat amb aigua i la fase d'equilibrat de la columna amb el tampó que conté imidazole a una concentració de 10 mM. Al temps zero hi ha la injecció de la mostra i el segueix el rentat amb el tampó amb imidazole a 20 mM. L'elució es fa a una concentració d'imidazole de 500 mM, aquí acaba la cromatografia, ja que el segueix el rentat (aigua) i el tampó de guardat de la columna (etanol 20 %).

En el perfil sembla que hi ha separació de dues proteïnes o grups de proteïnes. S'ha fet un gel i una transferència Western amb una fracció del rentat (15 min) i una d'elució (95 min). En la figura 5.2.9 es mostra el gel d'acrilamida la transferència Western amb aquestes dues fraccions. La transferència Western mostra com només hi ha proteïna, al voltant de 70 kDa, reconeguda en la fracció de rentat (15 min) i no en la d'elució (95 min), per tan s'observa la mateixa problemàtica que amb el Sartobind®.

Com que en la transferència Western no es poden veure les bandes suposadament associades a l'heterodímer i que ronden els 70 kDa en la fracció d'elució, s'intentarà obtenir mostres de la cromatografia més concentrades per poder corroborar que realment non hi ha gens de eCGr en la fracció d'elució; durant aquesta cromatografia s'ha diluït la proteïna, ja que s'han carregat 10 ml de brou en una columna de 80 ml. Per aquest motiu s'utilitzarà una columna més petita per repetir la cromatografia i poder visualitzar millor tota la proteïna.

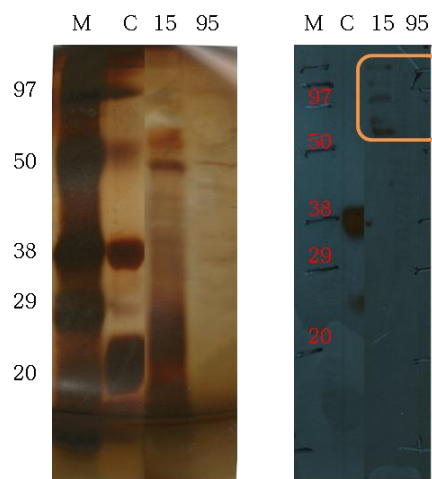


Fig. 5.2.9 Gel d'acrilamida al 12 % tenyit amb plata i la transferència Western amb dues de les fraccions de la cromatografia d'afinitat en un gel d'acrilamida tenyit amb plata (esquerra) i la transferència Western (dreta). En la primera columna s'hi mostra el marcador de pes molecular, amb la mida indicada en kDa, en la segona el control positiu hCG (C) i en les darreres columnes s'hi mostren les dues fraccions de la cromatografia corresponents als minuts 15 i 95.

5.3.2.3 Purificació amb el sistema AKTA

Com que l'aparell de la primera cromatografia té limitacions operacionals degut a la seva antiguitat (per exemple, no permetre refrigerar la columna), es prova l'anàlisi amb la columna de 1 ml amb un aparell més modern i automatitzat.

El procés és equivalent. Es carreguen, igualment, 10 ml de mostra concentrada i diafiltrada, així, enlloc de diluir la proteïna es concentra, sempre i quan s'uneixi a la resina d'afinitat de la columna.

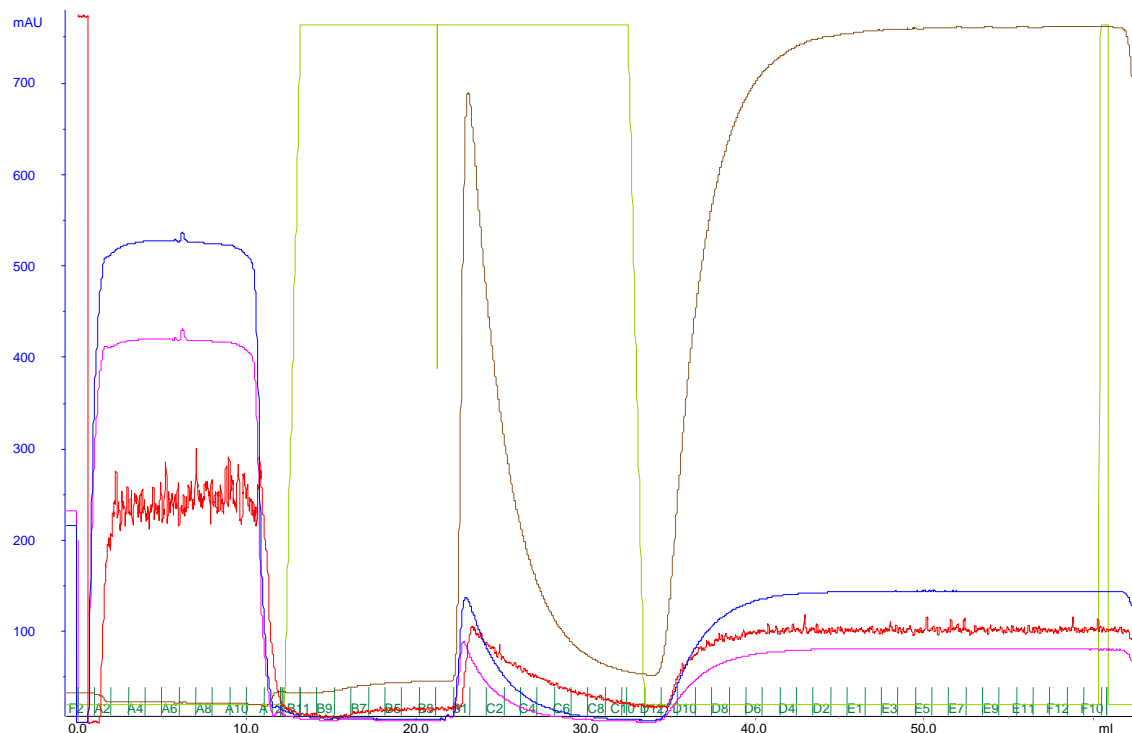


Fig. 5.2.10 Cromatograma de la segona cromatografia d'afinitat. En blau vermell i rosa s'indica l'absorbància a tres longituds d'ona diferents, 280, 214 i 254 nm, respectivament. En marró s'indica la conductivitat i en verd clar els canvis de tampó.

S'han fet dues cromatografies, una repetint les condicions de la inicial, els gels mostren que no s'uneix gens de proteïna a la columna, per això se n'ha fet una segona afegint una incubació de la mostra amb urea 1 M durant 1 h i a temperatura ambient. A la figura 5.2.10 es mostra el cromatograma d'aquesta cromatografia i a la figura 5.2.11 es mostra el gel d'acrilamida i la transferència Western de les fraccions d'aquesta segona cromatografia, dividides en les tres fases de la cromatografia: càrrega de la mostra, rentat de la columna i elució. Amb un cercle vermell s'assenyala una banda positiva d'uns 29 kDa que apareix en el rentat, tan en el gel com en la transferència Western.

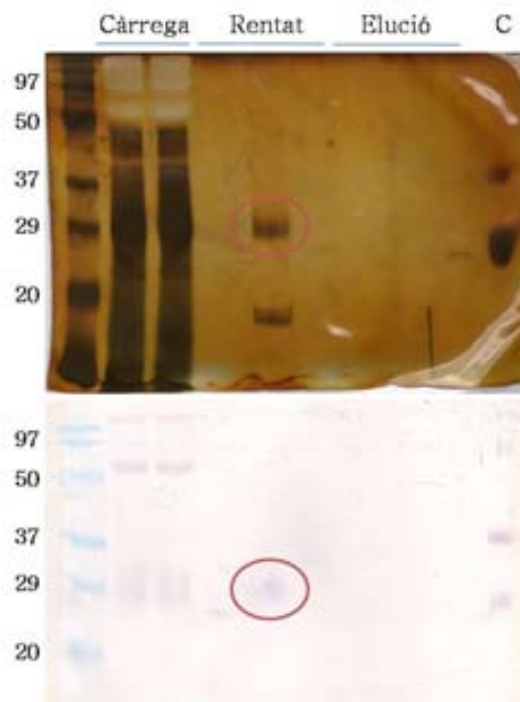


Fig. 5.3.1 Gel d'acrilamida al 12 % tenyit amb plata i transferència Western de les fraccions de la cromatografia d'afinitat amb incubació amb Urea. En el primer carril es mostra el marcador, en l'últim es mostra el control hCG nativa a una concentració de 100 µg/ml. Es mostren dues fraccions corresponents a càrrega de la mostra a la columna, tres del rentat i tres de l'elució.

Com es veu en el gel, la major part de la proteïna no s'ha unit a la resina, ja que en el moment en què es carrega la columna no queda retinguda i s'elueix quasi tota. Això podria ser degut a que es carrega molta més proteïna de la que permet la columna, no obstant s'ha calculat la proteïna total carregada com es mostra a continuació i està al voltant del 20 % de la capacitat màxima de la columna (8 mg). Tot i que el fabricant de la resina recomana no superar el 10 % (4 mg), cal tenir en compte que el que s'ha mesurat és proteïna total, no proteïna recombinant.

Concentració brou final 20X: 1,12 g/l
 Volum de mostra carregat: 10 ml
 Proteïna carregada a la columna: 11,2 mg

En les fraccions de rentat es veuen dues bandes (de 29 i 20 kDa aproximadament) que són reconegudes per l'anticòs anti-hCG, com es veu amb el positiu lleu de la transferència Western (la de menys de 20 kDa no es veu en la transferència Western perquè ha sortit del gel abans de fer la transferència). Això indica que hi ha grau d'afinitat molt baix entre la proteïna recombinat i la columna i per això la majoria de proteïna surt durant la càrrega i una petita part durant el rentat; la interacció no és suficientment forta ja que la concentració de 20 mM d'imidazole que conté el tampó de rentat fa que s'elueixi.

Pel contrari, en les fraccions de l'etapa d'elució, no es detecta cap banda en el Western, tot i que com mostra el cromatograma de la figura 5.2.11 hi ha un augment de l'absorbància en les tres longituds d'ona: 214 nm (en vermell), 254 nm (en rosa) i 280 nm (en blau). Aquest augment és degut a la presència d'imidazole a una concentració de 500 mM, ja que l'absorbància comença a pujar quan es posa aquest tampó i disminueix quan es comença el rentat. En la figura 5.2.12 es mostra un espectre d'absorbància de l'imidazole, que corrobora que la variació d'absorbància pot ser deguda a la presència d'aquest compost en el tampó.

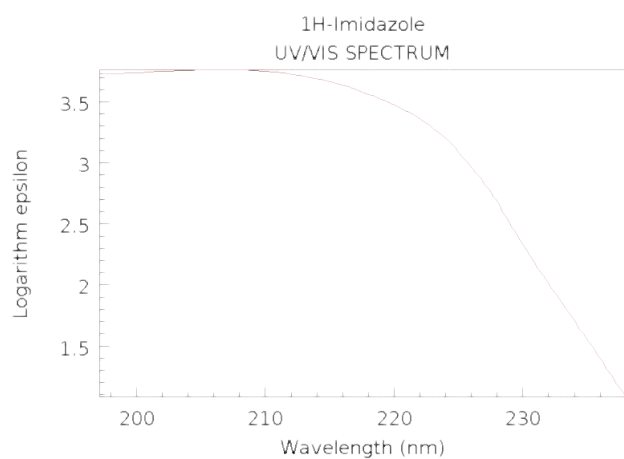


Fig. 5.2.11 Espectre UV-visible de l'imidazole.

Veient els resultats, s'ha decidit deixar estar la purificació amb la cromatografia d'afinitat, per això en l'esquema mostrat a la figura 5.2.2 aquesta línia queda tallada. Amb els resultats de la cromatografia es veu clarament que la cua de 6 histidines que té la cadena α no permet fer la purificació per afinitat, segurament perquè no està a una part accessible de la proteïna i no permet que la proteïna recombinant s'uneixi a la columna. Per aquest motiu es segueix per un cromatografia de bescanvi iònic.

5.3.3 Purificació per bescanvi iònic

Com que l'estratègia de purificació en un sol pas per cromatografia d'afinitat no ha funcionat es planteja una altra estratègia. La primera etapa que es proposa fer és una cromatografia de bescanvi iònic.

Es coneixen les propietats físico-químiques de la eCG nativa, però no de la recombinant. Per això i per a poder definir les condicions d'operació de la cromatografia s'utilitza un programa bioinformàtic de *Swiss-Prot* per predir el punt isoelèctric de la eCG recombinant. La predicció del punt isoelèctric de les cadenes α i β per separat dóna 8,97 i 8,76, respectivament. Per poder fer la predicció per l'hormona sencera s'han considerat les seqüències de les dues cadenes seguides com si fossin una sola proteïna. La predicció ha donat un punt isoelèctric $pI=5,81$, en els dos possibles ordres de les cadenes. Aquest punt isoelèctric teòric és una hipòtesi que serveix de punt de partida.

5.3.3.1 Columnes Vivapure

Per fer una primera aproximació experimental per la selecció de les condicions de la cromatografia de bescanvi iònic, s'han utilitzat aquestes columnes que són de manipulació senzilla i permeten provar diferents condicions fàcilment i utilitzant poca mostra. Aquestes columnes es posen a una microcentrífuga per fer passar la mostra i els tampons a través de la membrana. Seguint el protocol explicat en l'apartat de materials i mètodes s'obtenen les mostres obtingudes per fer-ne una transferència de punts i comprovar en quines fraccions hi ha eCGr.

En la figura 5.2.12 es mostra un esquema de la càrrega de la proteïna segons el seu punt isoelèctric teòric (pI) i el pH del medi i en la figura 5.2.13 la membrana de la transferència de punts.

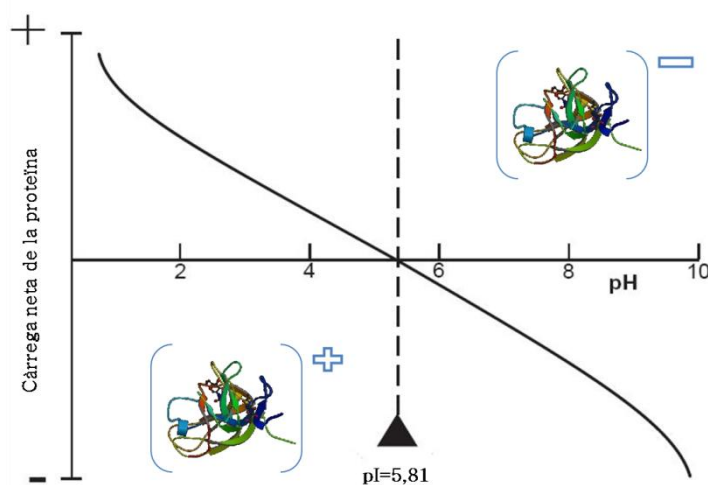


Fig. 5.2.12 Gràfica que relaciona el pH del medi i la càrrega neta de la proteïna.

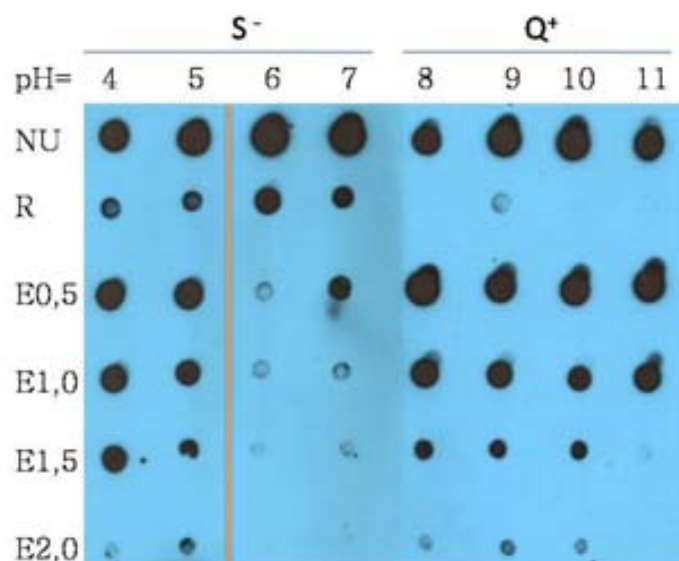


Fig. 5.2.13 Membrana de la transferència de punts amb detecció fotogràfica de les diferents fraccions de les cromatografies fetes. A la part esquerra s'indica cada fracció: mostra no unida (NU), rentat amb el mateix tampó de càrrega (R) i les quatre fraccions d'elució amb concentració creixent de NaCl. La línia taronja intenta marcar el pH on la proteïna tindria càrrega neta zero.

En la figura 5.2.13 es mostren els resultats de l'anàlisi de transferència de punts de les diferents fraccions de les cromatografies que s'han fet amb els dos tipus de columna; Q⁺ i S⁻ i el pH dels tampons que s'han utilitzat.

Segons el punt isoelèctric teòric, la eCG té càrrega neta positiva per sota de 5,81, per tant s'hauria d'haver unit en columnes S⁻ quan el tampó té pH=4 o pH=5. En canvi a pH=6 i pH=7, la proteïna té càrrega neta negativa, per tant no s'hauria d'haver unit a aquest tipus de columnes. En la membrana de la figura 5.2.13 es veu com a pH=4-5 s'ha aconseguit eluir proteïna, mentre que a pH=6-7 se n'ha eluït molt poca i en el rentat en n'ha sortit més. Tot i així, en els quatre casos s'ha perdut proteïna en el rentat. En les columnes Q⁺ i en tres dels quatre pH estudiats no hi ha presència de proteïna en el rentat, per tant hi ha hagut una millor interacció entre la proteïna i la membrana. Es descarta el pH=9, on s'observa proteïna en el rentat. De la resta s'ha escollit fer les purificacions a pH=8, ja que és un pH més pròxim a la neutralitat i fent un gradient de força iònica s'aconsegueix eluir tota la proteïna. A pH=11 s'ha aconseguit eluir tota la proteïna, però és un pH molt bàsic. A més, quan s'ha preparat la mostra per carregar a la columna i s'ha ajustat al pH=10-11 s'ha format un precipitat que ha costat de resuspendre. En la introducció ja s'ha mencionat (pàgina 41) que per tenir les dues cadenes unides cal mantenir el pH entre 5,3 i 9,5.

Amb aquestes resultats es pot acotar que el punt isoelèctric de l'heterodímer està entre 5 i 6, tal com s'ha predit amb el programari.

Un fet que s'ha observat en totes les condicions és que la mostra no unida té proteïna que és reconeguda per l'anticòs ant-hCG. La capacitat de la columna és de 0,02 mg, si es calcula la quantitat de proteïna que s'ha carregat a cada

columna, és de 0,15 mg. Per tant, s'ha carregat més proteïna de la que es pot unir a la columna i és normal que en la fracció de proteïnes no unides a la columna hi hagi eCGr.

Per verificar el pH de treball de la cromatografia s'ha fet una segona prova carregant menys proteïna (en el primer experiment s'ha utilitzat brou concentrat mentre que en aquest s'ha utilitzat brou sense concentrar) i només amb les columnes Q⁺ equilibrades a pH=7, 8, 9 i 10. En la figura 5.2.14 es mostra la membrana de la transferència de punts amb les fraccions de les diferents purificacions.

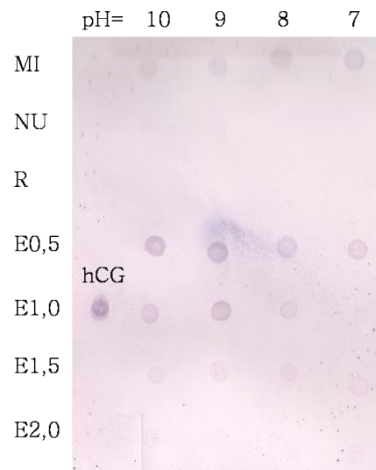


Fig. 5.2.14 Transferència de punts amb detecció colorimètrica feta amb les fraccions de les diferents condicions fetes amb les columnes Q⁺:mostra inicial (MI), no unida (NU), rentat (R) i les quatre fraccions d'elució amb concentració creixent de NaCl als diferents pH. També s'hi mostra el control positiu de la transferència de punts, hCG a una concentració de 100 µg/ml.

Cal comentar que la sensibilitat del revelat d'aquesta transferència de punts és inferior, però tot i així s'ha observat que tota la proteïna s'ha unit a la columna ja que en la fracció NU i R no hi ha presència de proteïna.

A mida que s'ha augmentat el pH del medi ha costat més eluir la proteïna de la columna; ha calgut arribar a una força iònica més elevada. Tot i que a pH=7 la intensitat de proteïna a partir de la fracció d'elució a 1 M ha estat menor que en la resta de condicions, s'ha escollit el pH=8 per fer la cromatografia amb la columna convencional, ja que el pH=7 està més pròxim al punt isoelèctric i això podria portar problemes de precipitació de la proteïna quan estigui a una concentració més elevada.

Així doncs, per la purificació s'utilitzarà una resina de bescanvi aniònic (Q⁺), el tampó a pH=8 i s'eluirà amb una força iònica màxima 1 M de NaCl.

5.3.3.2 Purificació amb el sistema AKTA i columna de 1 ml de volum

Aquesta primera aproximació amb una columna cromatogràfica convencional ha permès determinar alguns paràmetres que no s'han determinat amb les columnetes Vivapure. Amb aquesta columna més petita no es gasta tanta mostra ni tant tampó. Una vegada s'hagin optimitzat les condicions d'operació de la cromatografia es farà l'escalat a 50 ml. S'ha mantingut el tampó Tris·HCl 20 mM a pH=8,0. L'elució s'ha fet amb un gradient continu de força iònica de 0 a 1 M de NaCl. Una de les variables que s'ha provat ha estat el nombre de volums de columna en què cal fer el gradient; s'han provat 20 i 50 volums. En la figura 5.2.15 es mostra el cromatograma de la primera cromatografia que s'ha fet amb 20 volums l'elució.

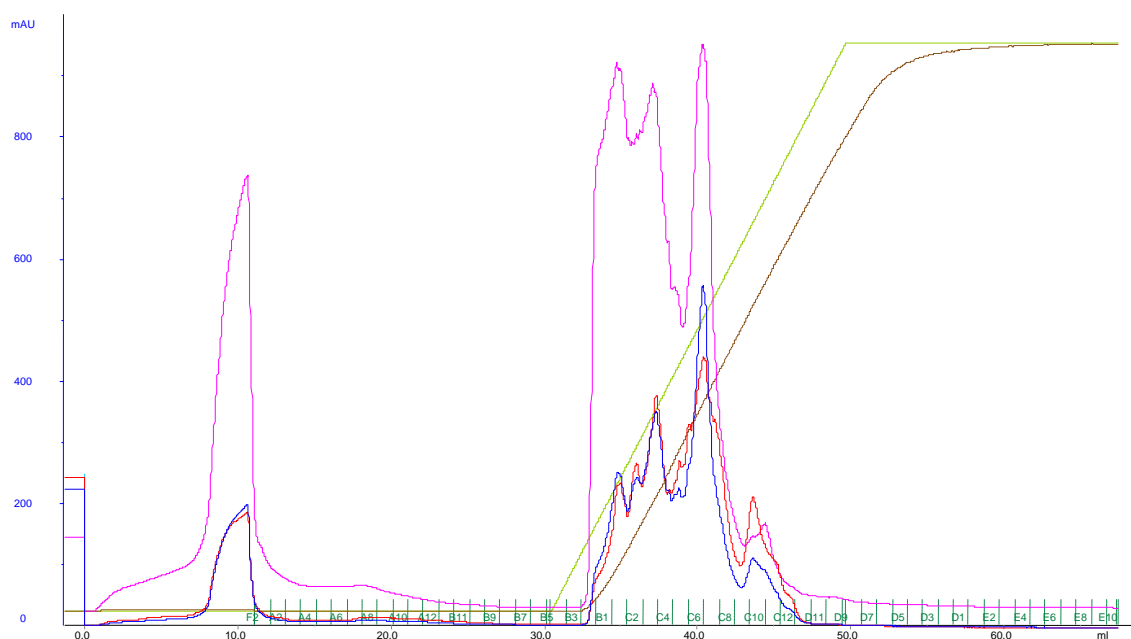


Fig. 5.2.15 Cromatograma de la primera cromatografia de bescanvi iònic. En blau, vermell i rosa s'indica l'absorbància a tres longituds d'ona diferents, 280, 254 i 214 nm, respectivament. En verd clar es mostra com creix la proporció del tampó de força iònica 1 M, que va en paral·lel amb la conductivitat, indicada en marró.

El que es vol destacar del perfil cromatogràfic obtingut és el volum de fraccions en què s'han obtingut el conjunt de pics; 14 fraccions de 1 ml. En la cromatografia on s'ha eluït amb 50 ml aquest volum ha augmentat a 28 ml (28 fraccions). En la figura 5.2.16 es mostra l'ampliació del la zona de la cromatografia que conté els pics d'elució, el perfil de les dues cromatografies és el mateix, però més ample en la segona.

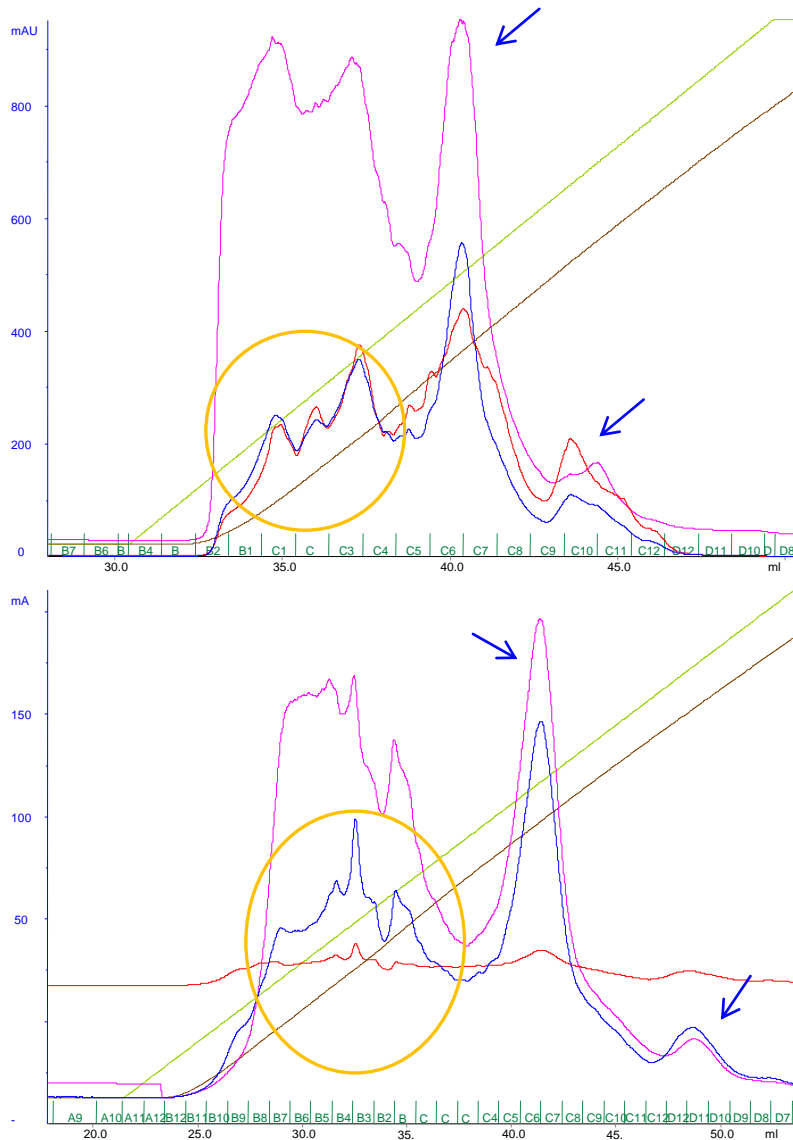


Fig. 5.2.16 Ampliació de la zona d'elució de les dues cromatografies, a dalt el de la cromatografia amb 20 volums d'elució i a baix el de la cromatografia amb 50 volums. Les fletxes indiquen els pics que no contenen eGr purificada. A la part inferior i en verd es mostra el nom de cada una de les fraccions.

En la segona cromatografia (elució en 50 volums) s'han separat més els pics, sobretot el primer grup de pics (de la fracció B8 a la C2) de la resta, però això ha fet que la concentració de proteïnes sigui més diluïda. Per tal d'analitzar el contingut proteic de cada fracció s'han analitzat en un gel d'acrilamida i transferència Western (fig. 5.2.17) les fraccions que contenen els principals pics.

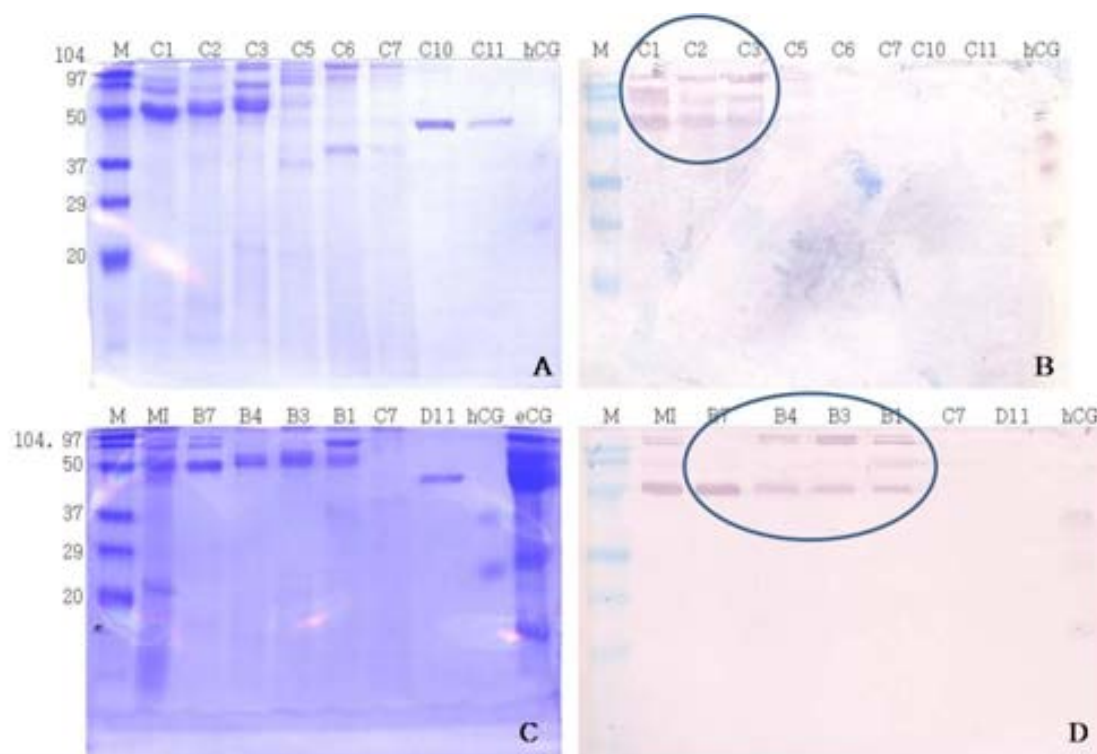


Fig. 5.2.17 Gels d'acrilamida al 15 % i tenyits amb *Comassie* col·loïdal (A i C) i transferència Western amb detecció colorimètrica (B i D) de les fraccions corresponents als màxims d'absorbància de les dues cromatografies de bescanvi iònic. A i B: primera cromatografia, 20 volums d'elució. C i D: segona cromatografia, 50 volums d'elució. El cercle blau s'indiquen les bandes de eCGr.

Com mostren els gels i la transferència Western, no tots els pics contenen eCG recombinant. En la PRIMERA CROMATOGRAFIA, només el primer grup de tres pics, encerclats amb taronja a la figura 5.2.16, corresponents a les fraccions C1, C2 i C3 i assenyalats amb un cercle blau en la transferència Western de la figura 5.2.17, contenen proteïnes reconegudes per l'anticòs anti-hCG. Aquestes bandes corresponen a pesos moleculars entre 50 i 97 kDa, del mateix ordre que les bandes que es veuen en el preparat de eCGn, tal i com s'ha comentat anteriorment, podria correspondre a l'heterodímer. La fracció C5 també conté aquestes proteïnes, però també hi ha una banda d'uns 37 kDa que no sembla ser reconeguda per l'anticòs, per tant s'ha descartat.

En la SEGONA CROMATOGRAFIA hi ha més fraccions que contenen eCG, totes elles corresponen al primer grup de pics (de la fracció B8 a la C3) també encerclats amb taronja en la figura 5.2.16 i també assenyalats amb un cercle blau en la transferència Western. Els dos pics que apareixen a partir dels 40 ml d'elució i que s'assenyalen amb una fletxa blava en el cromatograma ja no contenen eCG, per tant s'han descartat.

Així doncs, de tot el bloc de pics d'elució s'ha de distingir el primer grup de pics (encerclats en taronja a la figura 5.2.16) dels dos que apareixen després (assenyalats amb una fletxa blava a la mateixa figura), tot i que en la segona

cromatografia queden més separats, en la primera ja es poden distingir i no es dilueix tant la proteïna, per aquest motiu s'han escollit les característiques de la primera cromatografia; 20 volums d'elució.

El fet que apareguin diferents pics que contenen eCG pot ser degut a diverses isoformes de l'hormona recombinant, ja sigui degut al patró de glicosilació o agregacions de diferents cadenes de l'hormona. També podrien ser proteïnes endògenes de *P. pastoris* de punt isoelèctric i pes molecular semblant a l'heterodímer de eCG

5.3.3.3 Purificació amb el sistema AKTA i columna de 50 ml de volum

D'acord amb les condicions d'elució seleccionades per la cromatografia de bescanvi iònic a escala 1 ml, s'ha avaluat el seu escalat a una columna de 50 ml de volum.

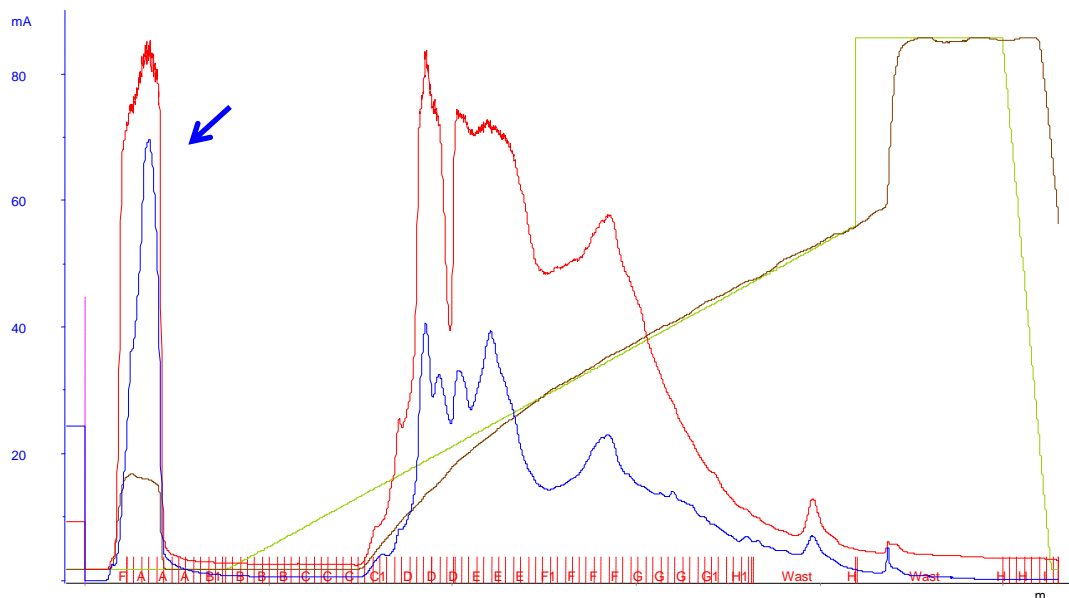


Fig. 5.2.18 Cromatograma de la primera cromatografia de bescanvi iònic feta amb la columna de 50 ml. En blau i vermell s'indica l'absorbència a dues longituds d'ona diferents, 280 i 214 nm, respectivament. En verd clar es mostra com creix la proporció del tampó de força iònica 1 M, que va en paral·lel amb la conductivitat, indicada en marró.

El volum de càrrega de la columna es calcula segons la quantitat de brou concentrat i diafiltrat obtingut i la seva concentració de proteïna total per tal de no sobrepassar la capacitat màxima de la columna.

En la figura 5.2.18 es mostra el cromatograma d'una de les cromatografies fetes en aquestes condicions on també s'hi veuen cinc pics principals (mirant el perfil d'absorbència a 280 nm, en blau), tal i com s'havia observat en les cromatografies realitzades amb la columna de 1 ml. També surten dos pics petits al final de l'elució que s'han descartat per la poca absorbència que presenten. No obstant, aquests cinc pics principals estan distribuïts de forma

diferent, pel que fa al seu volum d'elució, ja que han sortit els quatre primers molt pròxims i l'últim més separat. En la figura 5.2.19 se'n mostra una ampliació.

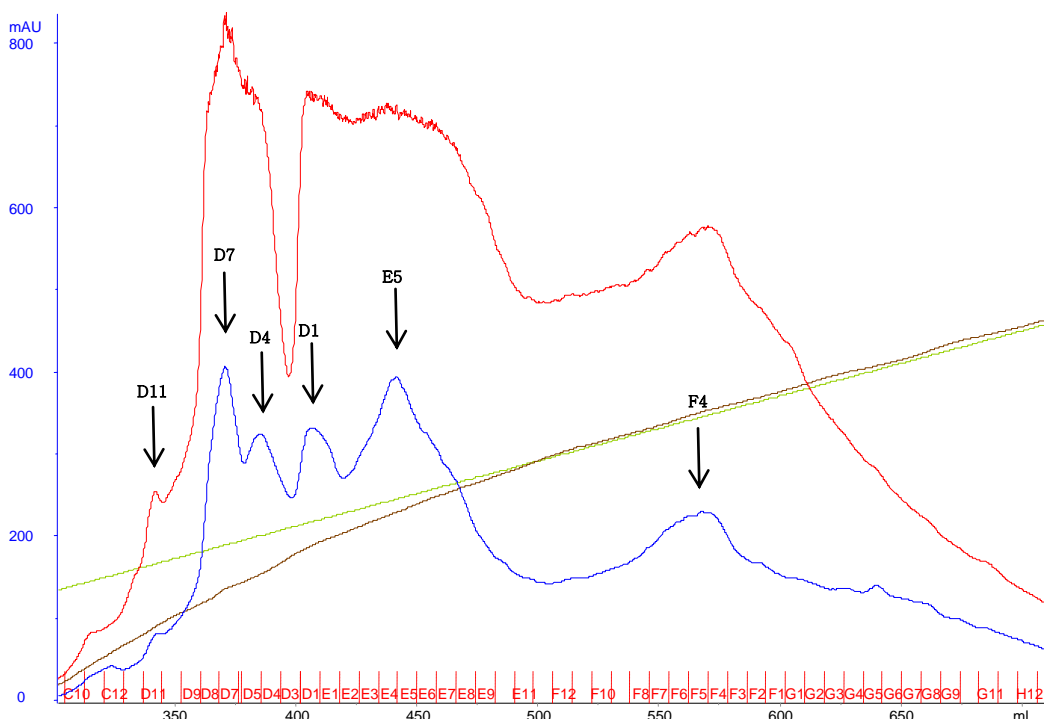


Fig. 5.2.19 Ampliació del cromatograma.

Per poder identificar les fraccions que contenen eCGr i el seu grau de puresa s'ha fet un gel d'acrilamida i una transferència Western (que es mostra en la figura 5.2.20) amb les fraccions que contenen el màxim dels pics assenyalats amb una fletxa de color blau, incloent el petit pic que mostra el perfil d'absorbància a 214 nm (color vermell).

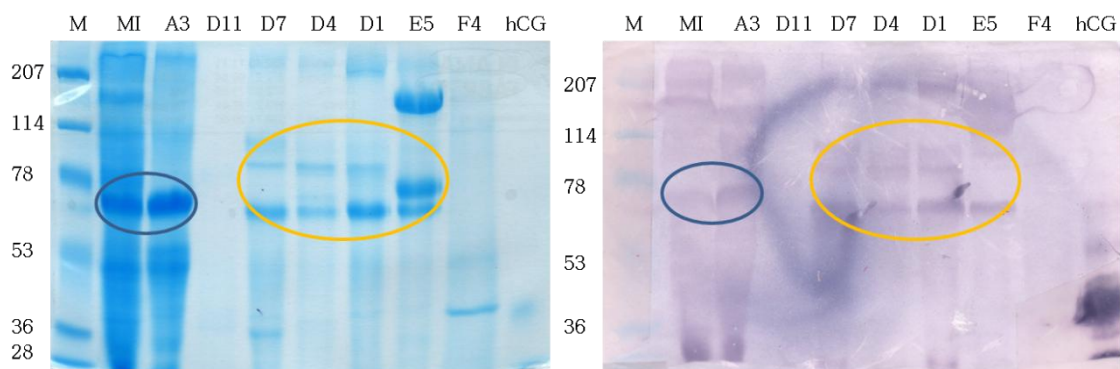


Fig. 5.2.20 Gel d'acrilamida al 7,5 % tenyit amb *Comassie* i la transferència Western amb detecció colorimètrica dels màxims d'absorbància de la cromatografia. En blau s'assenyalen les bandes majoritàries de la fracció inicial i del rentat. En taronja s'assenyalen les bandes de les fraccions que donen positiu a la transferència Western.

Cal esmentar que les bandes que donen positiu en la transferència Western semblen tenir un patró de pes molecular diferent que el de la figura 5.2.17. No obstant, el gel que es mostra en aquesta pàgina és al 7,5 % d'acrilamida, permetent una millor separació de les bandes de pes molecular més elevat. Per contra, el gel de la figura 5.2.17 és al 15 %, gel que permet distingir millor les bandes de pes molecular baix i, per tant, les bandes d'alt pes queden més juntes i més difícil de determinar-ne un pes molecular aproximat.

En La figura 5.2.20 es veuen quines fraccions semblen contenir majoritàriament eCG recombinant, com ho són D7, D4, D1 i E5; aquestes fraccions contenen diverses bandes que surten totes elles la transferència Western, s'han marcat amb un cercle de color taronja. En la fracció D11 no es veu proteïna, en la figura 5.2.19 ja es veu que el pic és molt petit. En la fracció F4 es veuen dues bandes, però aquestes no es veuen en la transferència Western, per tant aquesta fracció i totes les que componen aquest pic seran descartades. Aquest darrer pic està més separat dels altres quatre, fet que facilitarà separar-lo.

Altre cop es presenten possibles diferents isoformes de la eCG, corresponents als quatre diferents pics; per això es guarden les fraccions agrupades segons de quin dels quatre pics prové i el patró de les bandes que mostra el gel d'acrilamida. En la figura 5.2.21 es mostra una ampliació dels quatre pics que es recullen i les fraccions corresponents (A, B i C), que seguiran el procés de purificació per separat.

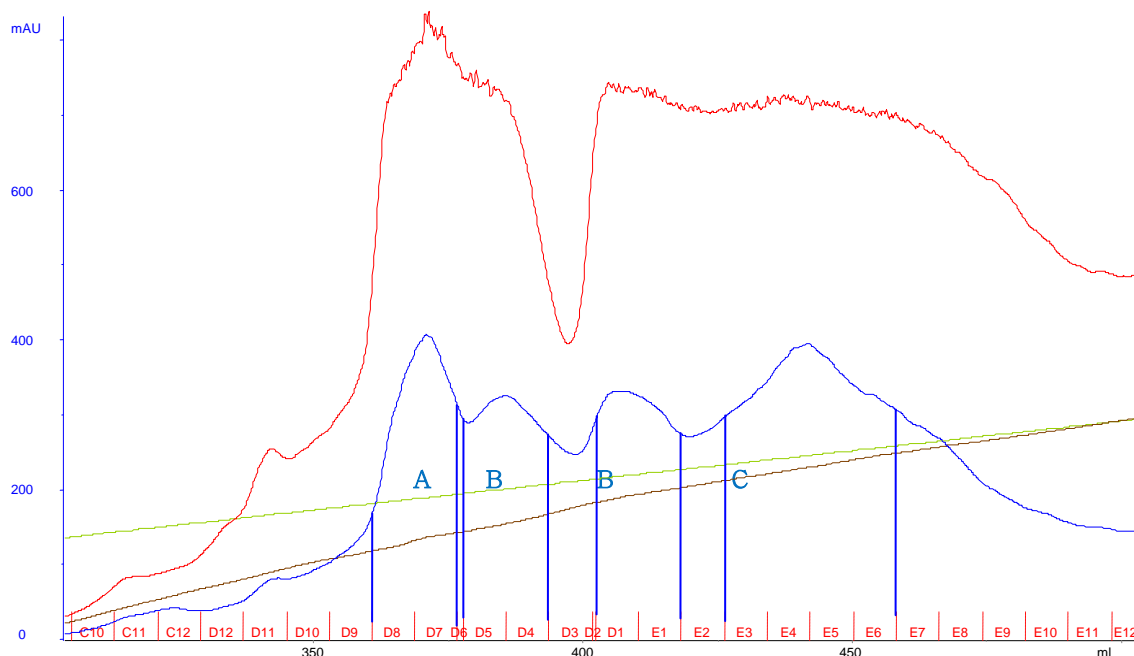


Fig. 5.2.21 Ampliació dels pics que contenen eCG.

Cal esmentar, que cromatografies de les mateixes característiques realitzades amb el brou provinent d'un altre cultiu han donat com a resultat un

cromatograma amb el mateix perfil de pics, mostrant que el procés és reproducible.

Així doncs, una cromatografia de bescanvi iònic amb un gradient de 20 volums permet fer una primera purificació, eliminant la majoria de proteïnes contaminants.

Per acabar de refinar i homogeneïtzar el producte final es planteja un segon pas de purificació, una cromatografia de sedàs molecular o gel filtració.

5.3.4 Purificació per sedàs molecular (gel filtració)

Aquest pas permet canviar el tampó, ja que per anàlisis posteriors, com l'anàlisi d'activitat *in vivo*, el tampó Tris·HCl 20 mM pH=8,0 podria ser inadequat i cal canviar-lo per solució salina fisiològica. A més, tot i que els anàlisis electroforètics de purificació anterior no mostren que quedin contaminants en quantitats importants, permet fer un últim pas de refinat.

Tal i com ja s'ha esmentat, es carreguen per separat les tres fraccions (A, B i C) provinents de cada pic en la columna amb la resina *Superdex 75*, de 350 ml. En la figura 5.2.22 es mostra el cromatograma de la cromatografia de la fracció C.

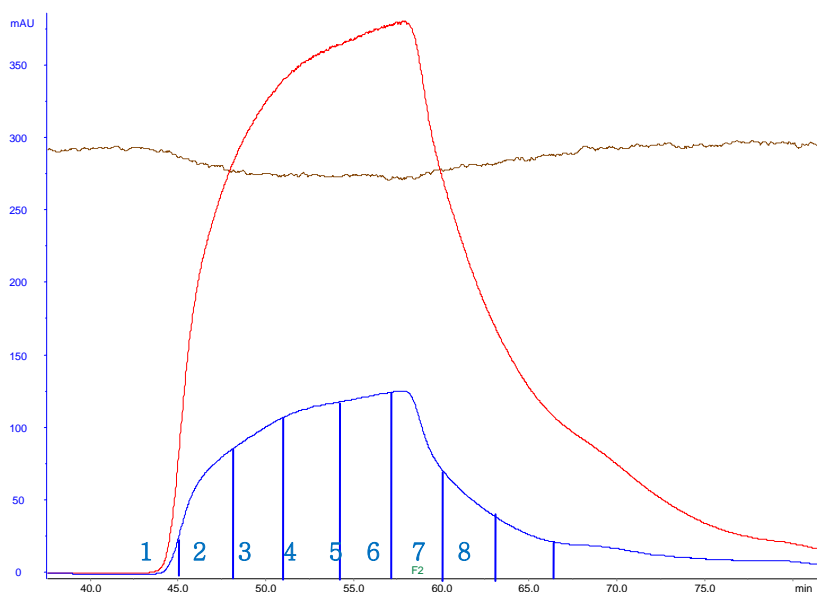


Fig. 5.2.22 Ampliació del pic que conté eCG de la fracció C.

Aquest pic s'ha recollit en 8 fraccions indicades en línies verticals, aquestes s'han analitzat amb un gel d'acrilamida que es mostra en la figura 5.2.23. No s'ha fet una transferència Western perquè el patró de les bandes és el mateix que el mostrat en la figura 5.2.20 i on s'han comprovat les bandes reconegudes per l'anticòs.

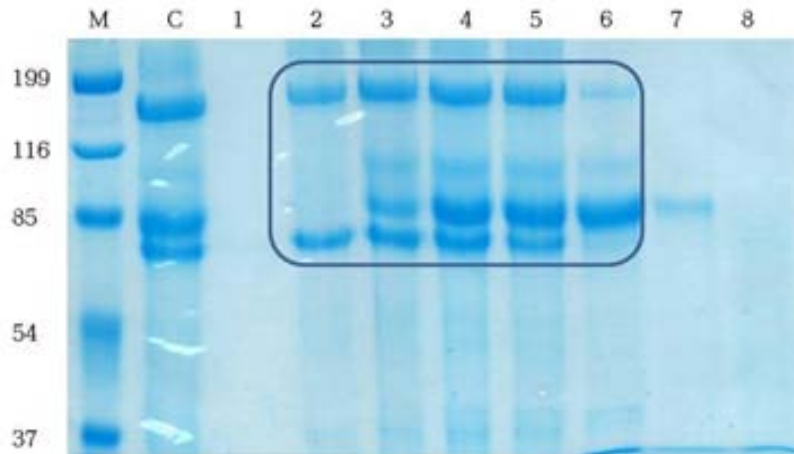


Fig. 5.2.23 Gel d'acrilamida al 7,5 % i tenyit amb *Comassie* de les fraccions de la cromatografia de sedàs molecular. Al primer carril s'hi mostra el marcador amb els pesos de cada una de les bandes en kDa. Al segon carril s'hi mostra la fracció C que es carrega a la columna, els carrils 1 al 8 corresponen a les fraccions mostrades en el perfil cromatogràfic de la figura 5.2.22.

Com mostra la figura, no totes les fraccions recollides contenen proteïna, fins i tot n'hi ha algunes que en tenen poca, per això només es guarden les fraccions de la 2 a la 6, assenyalades amb un cercle blau; les fraccions 1 i 8 no tenen proteïna, almenys a la concentració que es detecta amb la tinció de *Comassie* col·loïdal, la fracció 7 en conté, però poca i es prefereix eliminar aquesta fracció per no diluir el lot generat.

Aquesta cromatografia s'ha fet per les tres fraccions (A, B i C) generades en la cromatografia de bescanvi iònic. En totes elles només apareix un sol pic, tot i que la forma del pic pot variar, un gel d'acrilamida és suficient per distingir les noves fraccions que s'aprofiten i les que es descarten.

La columna utilitzada permet separar bé proteïnes que tenen un pes entre 3 i 70 kDa, les que tenen un pes per sobre d'aquest surten ràpidament de la columna i en un sol pic. S'havia escollit aquesta columna perquè el pes molecular teòric de l'heterodímer era de 61 kDa (Ferguson KA, 1964) i tot i que els anàlisis electroforètics realitzats anteriorment mostraven bandes de pes molecular superior. Veient els resultats caldria haver utilitzat una columna *Superdex 200* per poder separar les diferents proteïnes. No obstant, aquesta etapa cromatogràfica ha permès eliminar contaminants minoritaris de més baix pes molecular, així com obtenir la nostra proteïna en el tampó adequat.

5.3.5 Determinació del contingut en sucres del preparat comercial de eCG (Foligon d'Intervet)

Per poder plantejar una possible liofilització del producte final, s'analitzen els sucres que conté el producte comercial com a excipients.

Es fa un anàlisi per cromatografia líquida HPLC (High Performance Liquid Chromatography) per analitzar els sucres que acompanyen l'hormona nativa d'aquest producte comercial.

El primer anàlisi que es fa és del producte Foligon a una concentració de 1000 U/ml. En la figura 5.2.24 es mostra el cromatograma resultant, on es poden destacar tres pics. El primer correspon a les sals presents, els altres dos corresponen a sucres. En base al temps de retenció aquests pics semblen correspondre a sacarosa i fructosa (als 7,7 i 9,8 minuts de retenció, respectivament).

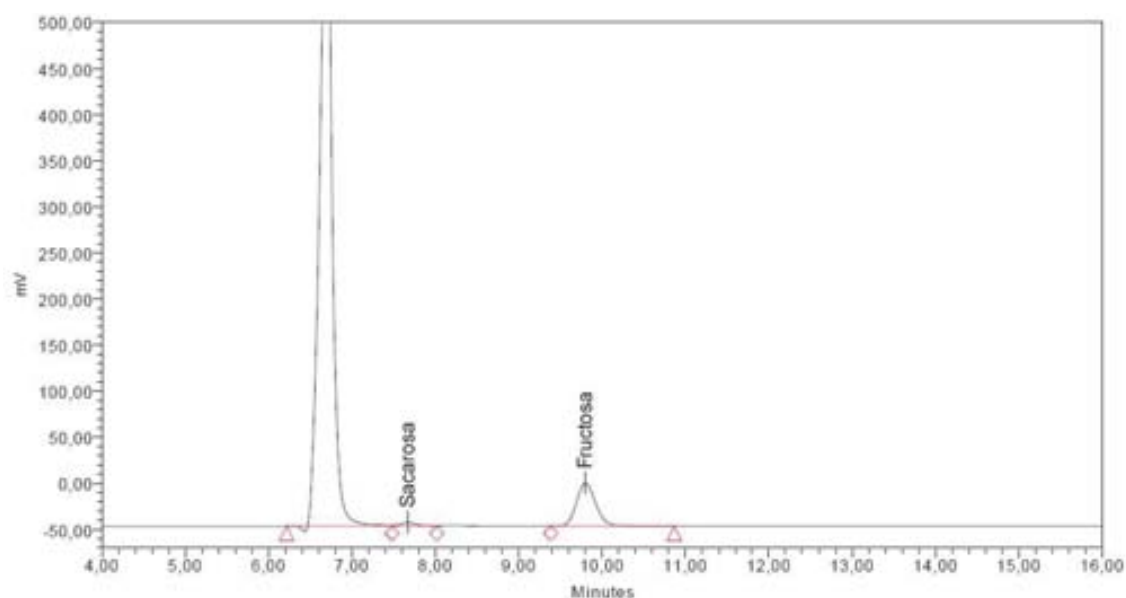


Fig. 5.2.24 Cromatograma corresponent al Foligon.

Per confirmar la identitat dels sucres presents, es fan diferents anàlisis combinant el Foligon amb una solució patró dels dos sucres que s'han identificat a partir del seu temps de retenció: fructosa i sacarosa. En la figura 5.2.25 es mostra el cromatograma del Foligon sol (perfil de color negre) i del Foligon amb la fructosa a 0,5 g/l (perfil de color verd).

En la figura es veu com el temps de retenció del pic de la sacarosa és el mateix, mentre que el de la fructosa ha augmentat, mantenint el mateix temps de retenció, per tant es verifica que un dels sucres és la fructosa.

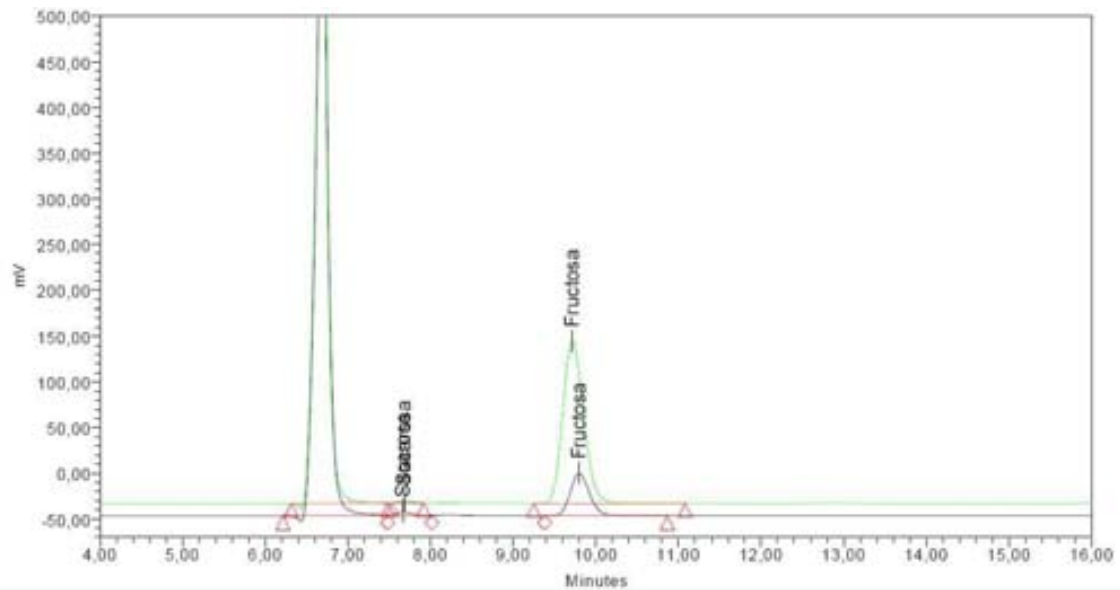


Fig. 5.2.25 Cromatogrames del Foligon, en negre, i del Foligon amb fructosa, en verd.

En el cas de la sacarosa s’observa el mateix: en la figura 5.2.26 es mostren els dos cromatogrames solapats; en negre el que correspon a una mostra de Foligon i en verd a la mostra de Foligon amb sacarosa adicionada a 1 g/l. El pic de la fructosa és equivalent en els dos cromatogrames, mentre que el de la sacarosa s’ha incrementat.

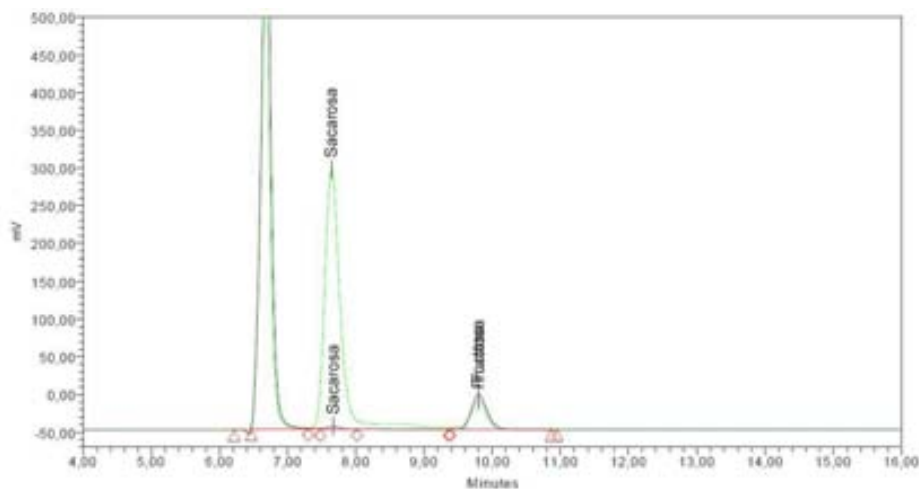


Fig. 5.2.26 Cromatogrames del Foligon, en negre, i del Foligon amb sacarosa, en verd.

Un cop verificats que els sucres que conté com excipients són la sacarosa i la fructosa, l’anàlisi del Foligon per HPLC permet quantificar-los. En la taula 5.2.3 es mostren els resultats obtinguts.

Taula 5.2.3 Resultats de la quantificació del Foligon.

Compost	Temps retenció (min)	Àrea	Alçada	Concentració (mg/ml)
Sacarosa	7,670	61123	4382	0,07
Fructosa	9,800	748235	45531	0,91

5.4 Conclusions

Segons els resultats obtinguts, cal descartar la cromatografia d'afinitat per fer la purificació en un sol pas, ja que la proteïna recombinant no s'uneix a la columna, possiblement perquè la cua d'histidines no està accessible a la superfície de la proteïna. El fet que la proteïna es troba altament glicosilada podria interferir en la unió entre la cua d'histidines i la resina d'afinitat; a la figura A.2.1 de la introducció es mostra un esquema de la proteïna madura i els punts de glicosilació, a l'aminoàcid 82 n'hi ha un i és molt pròxim al l'extrem C-terminal on hi ha la cua d'histidines, aquesta cadena de sucres podria ser inaccessible la cua i evitar-ne la unió amb la resina.

No obstant, la combinació de la diafiltració, cromatografia de bescanvi iònic i sedàs molecular permeten obtenir una preparació d'hormona suficientment pura per poder fer els anàlisis posteriors d'activitat i caracterització físico-química. A més, s'han identificat els components de l'excipient de la preparació comercial d'hormona, essencialment sacarosa i fructosa.

Capítol 6. Caracterització i comparació

6.1 Introducció

Un cop s'aconsegueix tenir la proteïna recombinant purificada cal esbrinar si té les mateixes propietats que la proteïna nativa, tan a nivell bioquímic com a nivell funcional.

En aquest capítol es presenten els resultats comparatius entre l'hormona nativa i la recombinant: seqüència N-terminal, pes molecular, grau i tipus de glicosilació, punt isoelèctric, activitat *in vitro* i activitat *in vivo*.

6.2 Materials i mètodes

6.2.1 Desnaturalització ens gels SDS-PAGE

Per poder distingir les dues cadenes de eCG en els gels d'acrilamida en condicions desnaturalitzants cal modificar el protocol estàndard de preparació de les mostres explicat en el capítol 3 (apartat 3.2.5).

El primer que s'ha modificat ha estat el temps d'incubació a 95 °C, s'ha passat dels 5 min utilitzats de forma estàndard a 10 min. En alguns experiments també s'han modificat aquests 10 min d'incubació, variant des de 5 fins a 20 min.

6.2.1.1 Urea com a agent desnaturalitzant

S'afegeix a la mostra abans de preparar la mescla per carregar al gel.

1. Afegiu 0,15 o 0,30 g d'urea (PRS, Cat. No. 141754) a 2,5 ml de mostra de eCGr purificada per obtenir una concentració final d'urea de 1 i 2 M, respectivament.
2. Incubeu a 20 °C i agitació suau durant 1, 2, 3 i 4 h.
3. Prepareu la mescla per carregar el gel d'acrilamida amb el tampó de càrrega estàndard i incubeu a 95 °C durant 10 min.

6.2.1.2 β -mercaptoetanol com a agent reductor

S'ha augmentat la concentració de β -mercaptoetanol present en el tampó de càrrega; el tractament de la mostra i la resta de components es mantenen igual.

1. Partiu del tampó de càrrega estàndard que en té un 5 % (v/v).

TAMPÓ DE CÀRREGA (8 ml)

- 3,8 ml Aigua destil·lada
 - 1,0 ml Tris·HCl 0,5 M pH 6,8 (Panreac, Cat. No. 141940)
 - 0,8 ml Glicerol (Panreac, Cat. No. 141339)
 - 1,6 ml SDS 10 % (p/v) (Sigma, Cat. No. L-5750)
 - 0,4 ml β -mercaptoetanol (Sigma, Cat. No. M-6250)
 - 0,4 ml Blau de bromofenol 1 % (p/v) (Merck, Cat. No. 8122.0005)
2. Afegiu β -mercaptoetanol per augmentar-ne la concentració final, seguint les indicacions de la taula 6.1.1.

Taula 6.1.1 Resum de les diferents concentracions de β -mercaptoetanol utilitzades. TC indica tampó de càrrega.

Concentració final β -mercaptoetanol (% (v/v))	TC (μ l)	Mostra (μ l)	β -mercaptoetanol (μ l)
5,0	25	75	0
10,4	25	75	6
15,2	25	75	12
20,2	25	75	19

3. Incubeu a 95 °C durant 5, 10, 15 i 20 min.
4. Carregueu el gel i correu-lo a les condicions estàndards.

6.2.1.3 DTT com a agent reductor

Es substitueix el β -mercaptoetanol per ditiotreitòl (DTT) (Sigma, Cat. No. D9163) del tampó de càrrega, la resta de la tècnica es fa exactament igual.

1. Prepareu el tampó de càrrega sense β -mercaptoetanol:
 - TAMPÓ DE CÀRREGA (7,6 ml)
 - o 3,8 ml Aigua destil·lada
 - o 1,0 ml Tris·HCl 0,5 M pH 6,8 (Panreac, Cat. No. 141940)
 - o 0,8 ml Glicerol (Panreac, Cat. No. 141339)
 - o 1,6 ml SDS 10 % (p/v) (Sigma, Cat. No. L-5750)
 - o 0,4 ml Blau de bromofenol 1 % (p/v) (Merck, Cat. No. 8122.0005)
2. Prepareu una solució de DTT 100 mM. Cal que sigui fresca o congeleu-la a -20 °C per evitar el deteriorament del DTT.
3. Barregeu la quantitat de cada component indicada en la taula 6.1.2 per tenir diferents concentracions finals de DTT i una relació proteïna/DTT diferent.

Taula 6.1.2 Composició de les diferents proves amb DTT.

	TC (μ l)	DTT 100mM (μ l)	Proteïna (μ l)	Concentració final DTT (mM)
1	6	2	16	8
2	6	3	15	12
3	6	4	14	16
4	6	5	13	20
5	6	6	12	24
6	6	7	11	28
7	6	8	10	32

La proteïna que es posa és una mostra de eCGr i el patró de eCGn.

4. Incubeu a 95 °C durant 5, 10, 15 i 20 min i carregueu el gel.

6.2.2 Seqüenciació de l'extrem N-terminal de proteïnes

Aquests experiments s'han dut a terme en els laboratoris del Servei de Proteòmica i Bioinformàtica de l'Institut de Biotecnologia i de Biomedicina de la UAB.

S'ha utilitzat el seqüenciador de proteïnes Procise 492 de la casa Applied Biosystems.

Les mostres es sotmeten prèviament a una SDS-PAGE, seguida d'una transferència a una membrana de PVDF Sequi-Blot (Bio-Rad, Cat. No. 162-0180) seguint les instruccions del fabricant. Finalment es tenyeix segons el protocol facilitat pel servei de seqüenciació.

Gel d'acrilamida

1. Prepareu un gel al 7,5 o 15 % d'acrilamida.
2. Prepareu la mostra per la desnaturalització:
 - o 24 µl de tampó de càrrega sense β -mercaptoetanol.
 - o 20 µl de DTT 500 mM (Sigma, cat. No. D9163)
 - o 52 µl mostra
3. Desnaturalitzeu a 95 °C durant 10 min i carregueu la mostra al gel.
4. Correu els gels a 20 mA (constants) durant 1 h aproximadament.

Transferència

5. Activeu la membrana de PVDF submergint-la en metanol pur durant uns segons.
6. Transferiu-la al tampó de transferència durant 2-3 min, quan estigui equilibrada la membrana sura. No deixeu que s'assequi, sinó caldrà tornar a començar el procés d'equilibrat.
7. Prepareu el sandvitx com indica la figura 3.1.4, tenint molt en compte no tocar la membrana en cap moment.
8. Feu la transferència a 150 mA (constant) durant 1,5 h. Poseu la cubeta en gel per mantenir la temperatura a uns 4 °C.

Tinció de la membrana

9. Renteu la membrana amb aigua tres vegades (5 min cada un).
10. Tenyiu amb la solució de tinció durant 5 min.
11. Destenyiu amb la solució de destinció durant 10-15 min.
12. Renteu amb aigua MilliQ 2 vegades.
13. Deixeu assecar.
14. Retalleu les bandes i guardeu-les en un tub *ependorf* fins l'anàlisi.

SOLUCIÓ DE TINCIÓ

- o 0,025 % (p/v) *Comassie*[®] Blue R-250 (Bio-Rad, Cat. No. 161-0400)
- o 40 % (v/v) Metanol (Panreac, Cat. No. 131091)

Mescleu 400 ml de metanol i 600 ml d'aigua MilliQ. Afegiu-hi 0,25 g de *Comassie*.

SOLUCIÓ DE DESTINCIÓ (1L)

- o 50 % (v/v) Metanol.

Mescleu 500 ml de metanol i 500 ml d'aigua MilliQ.

Un cop es té la seqüència de fins a 10 aminoàcids es fa un cerca a bases de dades de seqüències de proteïnes per saber a quina proteïna pot correspondre aquesta seqüència. Per les proteïnes de les mostres de proteïna nativa i les possibles bandes de la eCGr es fa la cerca amb l'eina BLAST obtinguda a la pàgina web de Swiss-Prot: <http://expasy.org/tools/blast/> que conté un banc de seqüències de proteïnes de molts organismes. Per les proteïnes de les mostres obtingudes dels cultius de *Pichia* que no són eCGr també s'utilitza el blast de la pàgina web ERGO, <http://ergo.integratedgenomics.com>, que té un banc de seqüències de proteïnes traduïdes de la seqüència del genoma de *P. pastoris*.

6.2.3 Estimació del pes molecular de la eCGr

6.2.3.1 SDS-PAGE i anàlisi de transferència Western

Es fa servir la mateixa metodologia ja descrita en el capítol 3 (apartat 3.2.5). Però en aquest cas només es fan servir gels al 7,5 % i 15 %.

Es fa una transferència Western per identificar les bandes corresponents a eCG. La metodologia també és la detallada en el capítol 3 (apartat 3.2.6), però només s'ha utilitzat el revelat colorimètric i els anticossos anti-conill amb fosfatasa alcalina.

6.2.3.2 MALDI-TOF

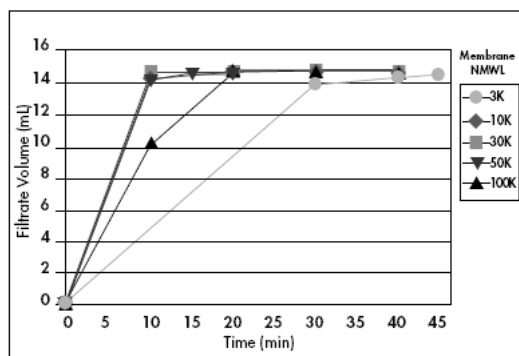
Aquests experiments s'han dut a terme en els laboratoris del Servei Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

S'ha utilitzat un aparell d'espectrometria de Masses MALDI-TOF, Q-Tof, Q-Star AP1189Y07C d'Applied Biosystems.

Les mostres que s'han d'analitzar han d'estar a un rang de concentració de 0,1–0,5 µg/µl. Si no es té aquesta concentració es concentra la mostra les vegades que faci falta per aconseguir-la.

La concentració es fa amb un Amicon[®] Ultra-15 de la casa Millipore (Cat. No. UFC901008) amb una membrana de tall de 10 kDa.

1. Poseu la mostra dins la part interna del *Falcon* on hi ha el filtre.
2. Tapeu i poseu el *Falcon* dins la centrifuga de manera que la membrana del filtre quedi perpendicular a l'eix del rotor.
3. Centrifugueu a 5000 xg durant, aproximadament 20 min. Segons el volum inicial i final cal deixar més o menys estona. En la figura 6.2.1 es mostra un gràfic per saber el temps orientatiu.



Spin Condition: Swinging bucket 4000 x g at 25 °C
 0.25 mg/mL Cytochrome c for 3K and 10K, 1 mg/mL of BSA for 30K and 50K, and 1 mg/mL of IgG for 100K; 15 mL starting volume

Fig. 6.1.1 Condicions de centrifugat a 4000 xg .

Si la mostra conté moltes sals es pot fer una diafiltració amb el mateix Amicon® Ultra-15, afegint aigua destil·lada per eliminar les sals i considerant el volum inicial per la concentració el volum de mostra abans d'afegir l'aigua.

6.2.4 Desglicosilació enzimàtica de proteïnes

S'han utilitzat un enzim per eliminar els sucres de la proteïna; Endoglicosidasa H (Roche Molecular Biochemicals. Cat. No. 11 088 726 001) que elimina les cadenes de sucres N-unides.

En la taula 6.1.3 es mostra la composició de la barreja per dur a terme la reacció amb l'endoglicosidasa H, a la columna del mig hi ha la pròpia reacció i a la de la dreta el control negatiu.

Taula 6.1.3 Composició de les mescles de reacció per la desglicosilació.

Component	Reacció	Control negatiu
Proteïna	25 µl	25 µl
SDS 1% (p/v)	2 µl	2 µl
β-mercaptoetanol	0,8 µl	0,8 µl
Endoglicosidasa H	10 µl	-
Tampó acetat 5X	10 µl	10 µl
H ₂ O	52,2 µl	62,2 µl
Total	100 µl	100 µl

Un cop preparades les dues reaccions es deixen a 37 °C o/n.

Segons la concentració de la mostra de proteïna que s'utilitza cal preparar una dilució mare perquè la quantitat de proteïna present en la reacció no superi els 20 µg.

SDS 1 % (P/V)

- 1 % (p/v) SDS (Sigma, Cat. No. L-5750)

Dissoleu 1 g de SDS en 100 ml d'aigua MilliQ.

β-MERCAPTOETANOL (Sigma, Cat. No. M-6250)

TAMPÓ ACETAT 5X

- 0,5 M NaAc·3H₂O (PRS, Cat. No. 131632)

Dissoleu 4,1 g d'acetat sòdic en 50 ml d'aigua MilliQ. Ajusteu el pH a 5,5 i enraseu a 100 ml.

6.2.5 Estimació del punt isoelectric de proteïnes

6.2.5.1 Predicció del pI *in silico*

Es determina el punt isoelectric de polipèptids de qualsevol proteïna amb el programari *on-line* que facilita *Swiss-prot*; <http://expasy.org>; ProtParam tool.

6.2.5.2 Determinació del pI en gels bidimensionals

Aquests experiments s'han dut a terme en els laboratoris de la Unitat Casanovas de la Plataforma Mixta de Proteòmica de la Universitat de Barcelona. S'han portat mostres purificades de eCGr i de eCGn de la casa Intervet a 6000 U/ml.

Per la primera dimensió s'ha utilitzat una tira de 24 cm de rang de pH entre 3 i 5,6 (GE Healthcare, Cat. No. 17-6003-57). S'han carregat 2 µg de cada mostra i el patró de voltatge ha estat el següent (taula 6.1.4):

Taula 6.1.4 Etapes per fer la separació de les proteïnes en la primera dimensió.

Etapa	Voltatge (V)	Tipus	Durada (h)
1	30	Constant	8
2	100	Constant	1
3	250	Constant	1
4	500	Constant	1
5	1.000	Constant	1
6	1000-8000	Gradient	1,5
7	8000	Fins arribar a 42.000 Vh	
8	8000-1000	Gradient	2

Un cop feta la separació de la primera dimensió (pH), s'utilitza un gel d'acrilamida al 12,5 % i es córrer a 1 W o/n i seguidament a 15 W fins que el front surt del gel.

6.2.6 Activitat *in vivo* de eCG

Aquests experiments s'han dut a terme en els laboratoris del Servei d'Endocrinologia i de Radioimmunoanàlisi de la UAB.

S'han utilitzat 18 rates de la classe Sprague-Dawley immadures que a l'iniciar de l'experiment tenen 28 dies d'edat. Es reparteixen en tres grups de 6 animals; al grup 1 se'ls subministra tampó, al segon eCGn d'Intervet i al tercer una preparació de eCG recombinant, tenint en compte que la distribució de pesos sigui semblant entre els grups.

Dosi que s'administra a cada rata de cada grup:

Tampó: 200 µl de NaCl 0,9 % estèril.

eCGn (Control positiu): 50 UI en 200 µl de tampó.

eCGr: 6,8 µg en 200 µl de tampó.

L'administració és per via subcutània als temps 0, 18, 21, 24, 42 i 48 h. Es sacrifiquen els animals a les 96 h, s'extreuen els ovaris i es pesen. El resultat final és el pes relatiu de l'ovari referit al pes total de l'animal a les 96 h.

6.3 Resultats i discussió

6.3.1 Anàlisi de la eCG en gels SDS-PAGE

Per poder identificar les diferents formes de l'hormona que contenen els brous de cultiu o les mostres durant la purificació, ja siguin les dues cadenes o diferents estats de glicosilació, cal poder separar-les en un gel SDS-PAGE. Un altre motiu per separar les dues cadenes és per poder fer una anàlisi de la seqüència de l'extrem N-terminal de cada una de les cadenes, com es mostra en l'apartat 6.3.2. En la figura 6.2.1 es mostra un gel amb els resultats aconseguits un cop separades les cadenes.

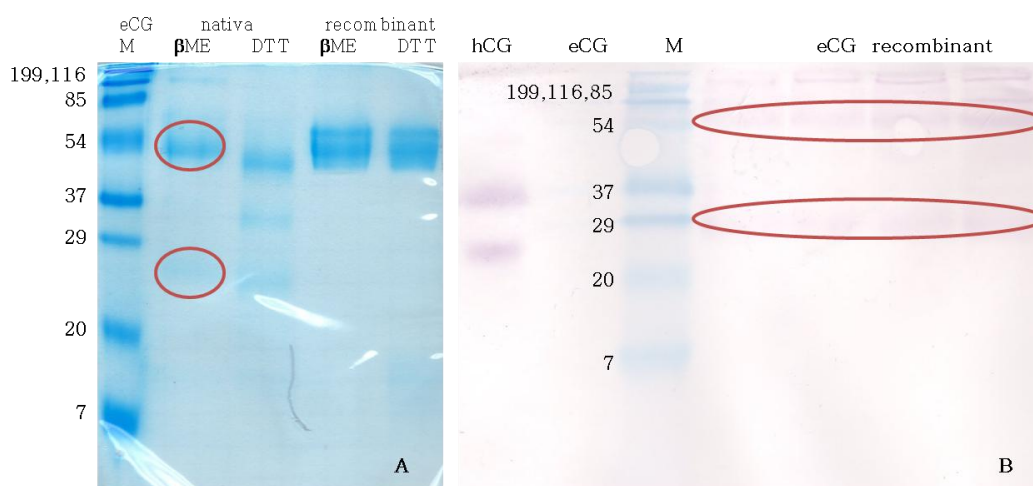


Fig. 6.2.1 A. Gel d'acrilamida al 15 %: al primer carril s'hi mostra el marcador de pes molecular i la mida en kDa, β ME indica que s'ha desnaturalitzat la mostra amb β -mercaptoetanol i DTT que s'ha fet amb DTT. B. Transferència Western: al primer carril s'hi mostra l'hormona humana, al segon l'equina nativa que no és reconeguda per l'anticòs policlonal, després es mostra el marcador de pes molecular (M) i la mida de les bandes en kDa. Finalment mostres de eCG purificada. Els cercles vermells indiquen les bandes del gel que surten positives a la transferència Western.

Per l'hormona nativa, el patró de bandes es veu clarament modificat segons l'agent reductor. No obstant, en cap dels casos el pes molecular de les bandes principals sembla concordar amb la bibliografia. En canvi la hCG sí que sembla presentar un patró de bandes esperat.

Aquests resultats podrien reflectir la presència de proteïnes contaminants en quantitats relatives en la eCG nativa o que la mobilitat electroforètica queda alterada degut a l'elevat contingut de sucres de les cadenes α i β .

A més, l'efecte diferenciat del DTT respecte el β -mercaptoetanol fa pensar que cal optimitzar el procés de desnaturalització.

En el cas de la eCGr, el patró de bandes no sembla que s'alteri segons l'agent desnaturalitzant utilitzat, igualment es veuen múltiples bandes.

La transferència Western confirma que la banda per sota dels 29 kDa i la de 54 kDa en les preparacions de eCGr són reconegudes per l'anticòs. També hi ha altres bandes per sobre d'aquests valors que donen positiu a la transferència, però no se'n pot determinar el pes molecular.

Per aquests dos motius es canvien les condicions de desnaturalització de les mostres abans de carregar-les en un gel d'acrilamida (SDS-PAGE). Les proves que es fan són amb urea, DTT i augmentant la quantitat de β -mercaptoetanol.

6.3.1.1 Urea com a agent desnaturalitzant

Inicialment s'han fet proves per veure si l'urea és capaç de desnaturalitzar la proteïna i permetre la distinció de les dues bandes de l'hormona. En els estudis de purificació mitjançant cromatografia d'afinitat ja s'ha provat de desnaturalitzar l'hormona amb urea 1 M (apartat 5.3.2.3). Ara s'utilitzen mostres de brou de cultiu en discontinu alimentat que s'han diafiltrat contra el tampó Tris·HCl.

Es proven incubacions amb urea a una concentració final de 1 M i 2 M i durant 1, 2, 3 i 4 h. A continuació es corren les mostres tractades en gels d'acrilamida al 15 %, que es mostren en la figura 6.2.2.

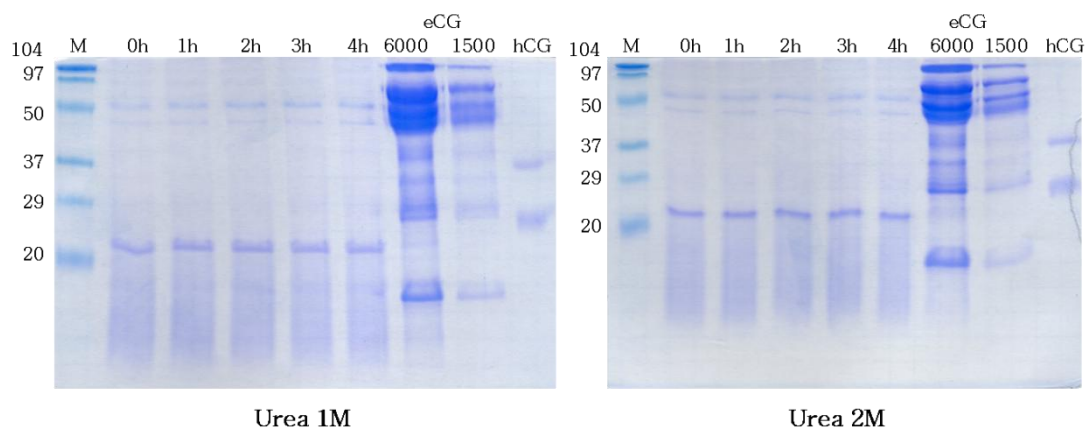


Fig. 6.2.2 Gels d'acrilamida al 15 % tenyits amb *Comassie* col·loïdal que mostren les incubacions de eCGr diafiltrada amb urea durant 0, 1, 2, 3 i 4 hores. M indica el marcador amb el pes molecular de cada banda en kDa, eCG nativa a 6000 i 1500 U/ml i hCG a 100 μ g/ml. En aquests tres darrers carrils no hi ha hagut tractament a part del convencional abans de carregar la mostra al gel.

En la figura no s'observa cap canvi entre les mostres incubades a diferents temps i la mostra inicial (temps 0 h). Tampoc s'observen diferències entre les incubacions amb urea 1 o 2 M.

Així doncs s'intentarà modificar la composició del tampó de càrrega, pel que fa agents reductors.

6.3.1.2 β -mercaptoetanol com a agent reductor

S'intenta millorar la separació de les bandes que semblen correspondre a agregats de la eCGr, augmentat la concentració d'aquest agent reductor, a veure si es millora la separació.

Com a mostra s'ha utilitzat brou concentrat i diafiltrat sense purificar.

Es fan proves a 4 concentracions diferents de β -mercaptoetanol: 5, 10, 15 i 20 % (v/v), aproximadament. Aquestes quatre concentracions finals de β -mercaptoetanol en el tampó de càrrega s'incuben 5, 10, 15 i 20 min a 95 °C i es carreguen en una gel d'acrilamida al 15 %. En la figura 6.2.3 es mostren els dos gels d'acrilamida amb les mostres incubades a diferents temps i amb diferent concentració de β -mercaptoetanol en la preparació i desnaturalització de les mostres.

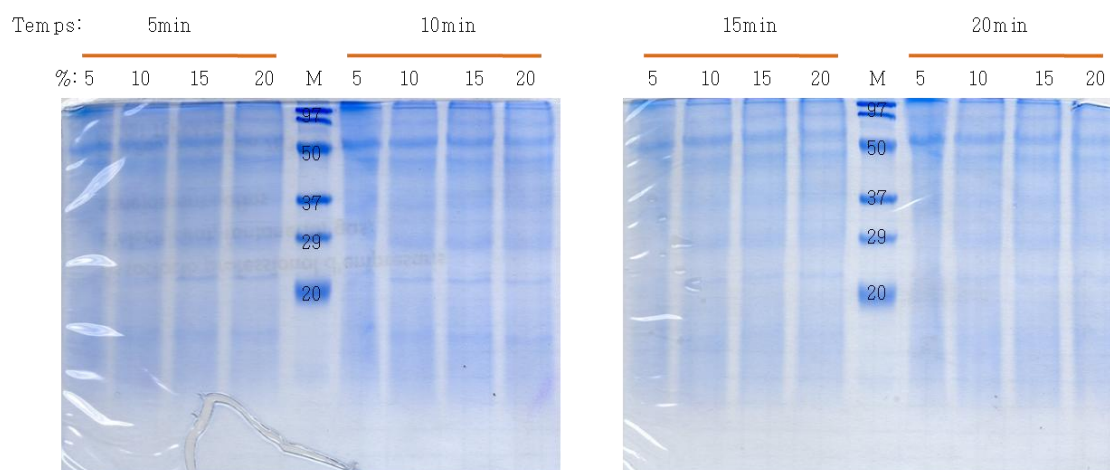


Fig. 6.2.3 Gels d'acrilamida tenyits amb *Comassie* col·loïdal de les mostres de eCGr purificada incubada amb diferents concentracions de β -mercaptoetanol indicades a la part superior i durant diversos temps. M indica el marcador de pes molecular.

En els gels no s'aprecien grans diferències entre les diferents condicions de concentració i temps d'incubació. Per tant es provaran altres modificacions de les condicions desnaturalitzants, utilitzant DTT com a agent reductor.

6.3.1.3 DTT com a agent reductor

El DTT (ditiotreitòl), com el β -mercaptoetanol, és capaç de reduir els ponts disulfur que es formen entre els sofres dels aminoàcids d'una mateixa proteïna o entre proteïnes diferents. Per tant, és un bon agent que hauria de facilitar la separació de les dues cadenes de la eCGr i visualitzar-les per separat en els gels d'acrilamida.

S'ha preparat un tampó de càrrega sense cap agent reductor, així es poden provar diferents concentracions de DTT, de 8 mM a 32 mM. Després de la incubació es carrega en un gel d'acrilamida al 15 % i es tenyeix amb *comassie* col·loïdal. En la figura 6.2.4 es mostra el gel.

En el grup de bandes a l'alçada de 54 kDa es veu una lleugera disminució d'intensitat a mida que s'augmenta la concentració de DTT, tot i que també es veuen més difoses. Només quan es posa DTT com agent reductor es pot observar la banda (assenyalada amb un cercle taronja) entre els 7 i 20 kDa; a mida que augmenta la concentració de DTT, aquesta banda disminueix d'intensitat.

Així doncs, el DTT permet distingir més bandes, però un excés fa que es vegin menys definides.

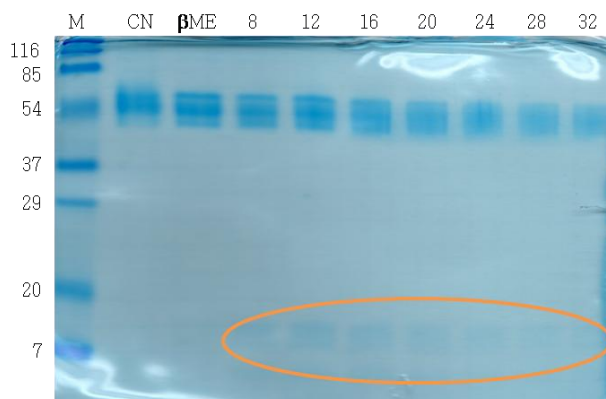


Fig. 6.2.4 Gel d'acrilamida al 15 % i tenyit amb Comassie col·loïdal de les mostres purificades de eCGr i desnaturalitzades en diferents concentració de DTT, indicada a la part superior del gel amb mM. M és el marcador de pes molecular, CN és la incubació en condicions no reductores i βME amb les condicions estàndard amb β-mercaptoetanol.

Tot i que en cap de les concentracions es veuen canvis importants en la mobilitat electroforètica de les bandes, s'escull la concentració de DTT 12 mM com la òptima, ja que és la menor en què es veu una banda de pes molecular petit.

S'augmenta el temps d'incubació a 15, 30, 45 i 60 min, però no milloren els resultats, per tant es segueix el protocol inicial.

Per poder visualitzar millor les bandes en el gel, es concentra 5 vegades la mostra de eCG purificada amb un Amicon® 10K amb un tall de pes molecular de 10 kDa. En la figura 6.2.5 es mostra el gel resultant, on s'hi mostren dos lots de eCGr i l'hormona nativa, totes tres han estat desnaturalitzades amb unes condicions de DTT (12 mM) i temps (15 min a 95 °C) iguals.

Així doncs, aquestes condicions són les que permeten veure bandes que potencialment es poden assignar a cada una de les cadenes per separat de la eCGn: 17 i 44 kDa per la cadena α i β, respectivament i 61 kDa per l'heterodímer.

L'anàlisi de la seqüència N-terminal de cada una de les bandes, explicat en l'apartat 6.2.2 d'aquest mateix capítol, ho confirmarà.

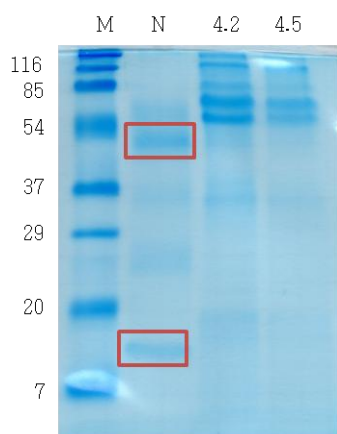


Fig. 6.2.5 Gels amb mostres de eCG nativa i recombinant desnaturalitzada amb DTT. M indica el marcador de pes molecular, N és eCG nativa i 4.2 i 4.5 indica eCG recombinant de dos lots diferents. Els quadrats assenyalen les bandes de la cadena α de 17 kDa i la β de 44 kDa.

No obstant, les bandes que reaccionen amb l'anticòs anti-hCG en les mostres de eCGr continuen mostrant un pes molecular aparent superior a 54 kDa (bada del marcador). Això podria indicar que no tots els ponts disulfur s'han trencat, és més, podria indicar presència de ponts disulfur erròniament formats entre les dues cadenes. No obstant, aquesta causa es podria descartar per la concentració de DTT superior no afecta el seu pes molecular. També es podria especular que les cadenes α i β recombinants tenen un contingut de sucres superior a la eCGn. D'altra banda, diversos estudis (Müller R *et al.*, 2007) mostren que proteïnes fortament glicosilades mostren una menor mobilitat electroforètica relativa, donant un pes molecular aparent més gran.

6.3.2 Identificació de les cadenes α i β i determinació del pes molecular a partir del gel SDS-PAGE

Com que el patró de bandes obtingut per a mostres de eCGr en els gels SDS-PAGE és poc clar, s'utilitza la seqüenciació de l'extrem N-terminal de les proteïnes que conformen les bandes d'abundància relativa més elevada i de pes molecular dins el rang que mostren les cadenes α i β de l'hormona nativa.

6.3.2.1 Determinació de la seqüència N-terminal

El problema en la limitació de proteïna transferida a la membrana de PVDF ha estat resolt augmentant la concentració de proteïna i DTT en la mescla que es carrega al gel. D'aquesta manera s'ha obtingut una membrana com que la que es mostra a la figura 6.2.6 on s'assenyalen les bandes més rellevants de les que se n'ha analitzat la seqüència d'aminoàcids de l'extrem N-terminal.

La seqüència obtinguda, d'un màxim de 10 aminoàcids, serveix per esbrinar de quina proteïna es tracta, ja que és suficient per trobar només una sola proteïna

en els bancs de seqüències que coincideixi amb el N-terminal que s'ha trobat. A continuació es detalla les seqüències trobades i a quina proteïna correspon. En la figura 6.2.6 es mostren els dos gels al 7,5 i 15 % d'acrilamida que han servit per poder fer la transferència a la membrana de PVDF i d'aquí la seqüenciació.

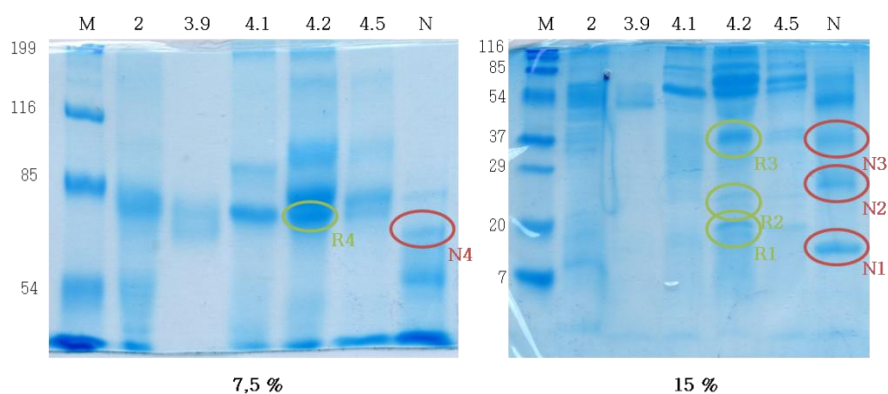


Fig. 6.2.6 Gels d'acrilamida tenyits amb *Comassie* col·loidal. M indica el marcador de pes molecular, a l'esquerra s'indiquen els pesos moleculars de cada banda en kDa. 2, 3.9, 4.1, 4.2 i 4.5 indiquen diferents lots de eCGr purificada. N indica l'hormona eCG nativa. Amb cercles verds i vermells s'assenyalen les bandes seqüenciades.

Amb cercles es marquen les bandes que s'han analitzat, es prioritzen les bandes al voltant de 17 i 44 kDa, ja que segons KA Ferguson (1964) (full de característiques subministrat amb la eCG nativa de la casa Sigma) corresponen a la cadena α i β , respectivament. En una segona etapa s'han intentat seqüenciar les bandes de major pes molecular, ja que se sap que proteïnes molt glicosilades poden tenir un comportament diferent en SDS-PAGE, retardant la seva mobilitat i donant un pes molecular aparent més gran (Müller R *et al.*, 2007).

A continuació es mostra la seqüència obtinguda i una breu descripció de la proteïna que correspon:

HORMONA NATIVA

N1. GPAGAGESKG (**11,42 kDa**). De l'aminoàcid 21 al 29 de la prealbúmina de diverses espècies, entre elles el porc i ratolí. També correspon a una posició diferent de la mateixa proteïna d'altres espècies com l'orangutan i l'ovella. La prealbúmina és una proteïna plasmàtica.

N2. FPDGEFTTQ (**24,25 kDa**). eCG- α .

N3. RSLG?ACFTA (**37,83 kDa**). Té un 77% d'homologia amb una proteïna de membrana de *Arabidopsis thaliana*. No coincideix amb cap fragment de la cadena β ni l'extrem N-terminal.

N4. TD?TNGE (**65,13 kDa**). Inhibidor de la carboxipeptidasa A de *Ascaris lumbricoides* amb un 85 % de similitud, amb un 71 % es troba una proteïna associada a l'esperma del ximpanzé, goril·la i humà, però en cap cas de cavall.

HORMONA RECOMBINANT

R1. FDNSAKNNVA (15,46 kDa). Endoquitinasa de *P. pastoris*. Present després de la mitosi per separar les cèl·lules.

R2. (21,06 kDa). No s'ha pogut obtenir cap seqüència clara (barreja de proteïnes).

R3. (37,83 kDa). No s'ha pogut obtenir cap seqüència clara (barreja de proteïnes).

R4. AYYCDTTK (74,98 kDa). Proteïna de *Pichia* amb domini SCP. De funció desconeguda.

D'una banda, les anàlisis de la seqüència aminoacídica corresponents a les bandes de proteïnes presents en la preparació de la EKG NATIVA mostren que l'hormona comercial no és pura, presenta, almenys, dues impureses; prealbúmina (11,4 kDa) i una altra de 65 kDa, aproximadament en quantitats importants. S'ha identificat una proteïna de pes molecular aparent de 24,25 kDa com a cadena α , és a dir, amb un pes molecular superior al referenciat de 17 kDa. No obstant, les anàlisis realitzades no han permès identificar la banda corresponent a la cadena β . Es va intentar analitzar la proteïna amb un pes molecular aparent de 54 kDa, però la qualitat de la seqüència obtinguda va ser molt pobre.

D'altra banda, les anàlisis de les seqüències de les proteïnes de la preparació de EKG RECOMBINANT no han permès identificar cap de les cadenes de l'hormona. Així, l'anàlisi de les proteïnes amb pes molecular aparent de 21 kDa i d'uns 37,8 kDa, properes a la banda d'uns 29 kDa identificada en les anàlisis de transferència Western suggereixen que corresponen a una mescla de 4 o 5 proteïnes, mentre que la banda de 15 kDa és una endoquitinasa de *P. pastoris* (identificada també en el secretoma (Mattanovich D *et al.*, 2009). En el rang superior de pes molecular (50–80 kDa), només ha estat possible identificar una altra proteïna del secretoma de *P. pastoris* d'uns 75 kDa (domini SCP). Les altres bandes analitzades en aquest rang de pes molecular, també suggereixen la presència de múltiples proteïnes de pes molecular molt semblant (no discriminades en un gel SDS-PAGE).

Globalment, es pot concloure que cap de les dues preparacions de eCG és pura. D'altra banda, aquestes anàlisis confirmen que el component eCG en la preparació recombinant és minoritari, és a dir, tot i que es detecten proteïnes que reaccionen amb l'anticòs anti-hCG, aquestes són components minoritaris no identificables de manera òbvia en un gel SDS-PAGE tenyit amb *Comassie*.

6.3.2.2 Determinació del pes molecular

S'han utilitzat els gels de la figura 6.2.6 per calcular el pes molecular. A partir del gel s'ha mesurat la distància de migració de cada una de les bandes del marcador de pes molecular i s'ha fet el calibrat a partir del logaritme d'aquest

valor i el pes molecular real de cada una de les bandes i que dóna el subministrador del marcador. S'ha fet un calibrat per cada un dels gels. En l'annex 6.1 es mostra la recta de calibrat del gel al 15 % i del gel al 7,5 %.

El següent pas ha estat mesurar la distància de migració de les bandes del gel i, a partir de la recta de calibrat, determinar el pes molecular. En el mateix l'annex 6.1 es recull la distància de migració, el seu logaritme i el pes molecular. En el gel de la figura 6.2.6 es numeren les bandes per ser fàcilment identificades en la taula de l'annex.

A través de la web de *Swiss-Prot* s'ha determinat el pes molecular de les cadenes α i β sense glicosilar: 10,2 i 15,0 kDa, respectivament. El 1964, KA Ferguson (full de característiques subministrat amb la eCG nativa de la casa Sigma) va determinar que els pesos moleculars de les dues cadenes α i β , incloent-hi la glicosilació, és de 17 i 44 kDa, respectivament.

Pel que fa a la banda de menor pes molecular de L'HORMONA NATIVA (N1, color vermell), sembla que no és la cadena α , ja que és de, tan sols, 10 kDa, pes de la seqüència proteica i prou, de fet l'anàlisi del N-terminal ho confirma, ja que com s'ha explicat en l'apartat 6.3.2.1, aquesta banda correspon a la prealbúmina.

Pel que fa a la següent banda (N2), el N-terminal confirma que és la cadena α , per tant es pot dir que el pes molecular és, segons aquesta tècnica, de 24,25 kDa.

Segons el pes molecular teòric i el que s'ha obtingut en la cadena α i sense les dades de N-terminal que ho confirmen, la cadena β hauria de ser la banda N3, ja que el pes és de 37,83 kDa, també per sobre del pes teòric sense sucres i per sota del pes establert per Ferguson.

Analitzant els resultats obtinguts per L'HORMONA RECOMBINANT (color verd) i assumint que donaran un pes molecular lleugerament per sobre del teòric, s'associa la banda R2 a la cadena α i la R3 a la cadena β , de 21,06 i 37,83 kDa, respectivament. Les anàlisis de N-terminal confirmen que la banda N1 no és la cadena α , ja que és una quitinasa de *P. pastoris*.

Si es comparen els pesos obtinguts per cada cadena, es veu com la cadena β surt a la mateixa alçada, per tant té un pes molecular idèntic en l'hormona nativa i la recombinant. A la cadena α hi ha una lleugera diferència; la cadena nativa té un pes molecular més gran que la recombinant, com que en principi la cadena d'aminoàcids és la mateixa, aquesta diferència es deu a que conté menys sucres.

Cal deixar clar que l'única banda en què l'anàlisi del N-terminal ha confirmat la seva naturalesa és la de la cadena α de l'hormona nativa. Les altres s'han deduït.

6.3.3 Estimació del pes molecular de la eCGr

S'ha volgut comparar el pes molecular de la proteïna nativa i de la recombinant, ja que el patró de glicosilació de *P. pastoris* és diferent al dels eucariotes superiors. Així el que s'espera és que les cadenes per separat i l'heterodímer recombinants tinguin un pes molecular superior al de l'hormona nativa.

S'han comparat amb dues tècniques diferents, tot i que s'espera obtenir un resultat semblant, però no amb la mateixa precisió.

6.3.3.1 SDS-PAGE

Està detallat a l'apartat 6.3.2.2, en aquest mateix capítol.

6.3.3.2 MALDI-TOF

Per poder determinar el pes molecular amb aquesta tècnica cal tenir les mostres, en aquest cas purificades, a una concentració entre 0,1 i 0,5 µg/µl. Per això ha calgut concentrar les mostres de l'hormona recombinant amb un Falcon de diafiltració Amicon. Aquesta procés de concentrat ha anat seguit d'una diafiltració, així es poden eliminar part de les sals que hi ha amb la proteïna i millorar els resultats.

En la figura 6.2.7 es mostra l'espectre obtingut de L'HORMONA RECOMBINANT. S'hi poden veure dos pics, un de uns 22 kDa, que correspondria a la cadena α i un de 43,7 kDa, que podria ser la β . La diferent àrea dels dos pics no indica que hi hagi diferent concentració de cada una de les cadenes ja que l'àrea varia en funció del grau de ionització de la molècula i cada molècula el té diferent, per tant no es pot fer una correlació de quantitat o concentració a partir d'aquest paràmetre.

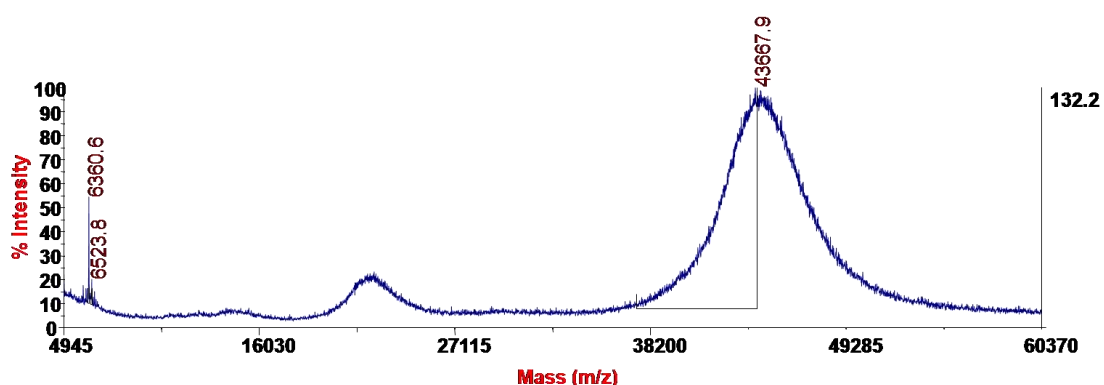


Fig. 6.2.7 Espectre resultant de l'anàlisi de l'hormona eCG recombinant.

La diferència de pes molecular de la cadena α respecte el que dona Sigma pot ser deguda a la font de l'hormona; aquesta proteïna té diferents formes de glicosilació (del 13 al 50 %) segons el seu teixit d'origen i això fa variar el seu pes molecular (Murphy BD and Martinuk SD, 1991).

Aquesta tècnica trenca totes les unions làbils, com els pont d'hidrogen, que com s'ha explicat en la introducció, uneixen les dues cadenes i per tant no es pot detectar l'heterodímer.

En la taula 6.2.1 es mostren els resultats obtinguts en aquest apartat.

Taula 6.2.1 Pes molecular de eCG recombinant determinat a partir de diferents tècniques.

Tècnica	Cadena α	Cadena β	$\alpha + \beta$
Swiss-Prot (desglicosilada)	10,2	15,0	27,2
Ferguson (nativa)	16,96	43,72	64,03
Gels	21,06	37,83	58,89
MALDI-TOF	22	43,7	65,6

En les diferents mides determinades, tan per la cadena α com per la β no hi ha massa diferència. Les mesures obtingudes amb el Software de Swiss-prot són només de la part proteica de l'hormona, per això és d'esperar que els valors obtinguts siguin més petits i diferenciats de la resta, que són de l'hormona glicosilada. De la resta de mesures, les més fiables, tenint en compte les característiques i propietats de la tècnica utilitzada, són les del MALDI-TOF. Així, amb la transferència Western de la figura 6.2.1 que ho apunta, s'assumeix que la cadena α té uns 22 kDa i la β uns 44 kDa. L'heterodímer uns 66 kDa.

En els gels d'acrilamida es pot calcular un pes aparent, ja que la migració de la proteïna depèn de la relació massa/càrrega de cada proteïna que no té perquè ser igual la de l'hormona com la de les proteïnes utilitzades al calibrat.

Cal esmentar, però, que els resultats obtinguts de l'anàlisi de N-terminal permeten associar la banda d'uns 75 kDa que es veu en els gels de purificació a l'heterodímer (figura 5.2.17 del capítol 5).

6.3.4 Desglicosilació enzimàtica de proteïnes

Tot i que les anàlisis anteriors han demostrat que la preparació de ECGr no és pura, s'ha provat d'esbrinar l'efecte de la N-desglicosidasa sobre el patró de bandes d'aquest preparat.

No s'ha fet cap reacció per eliminar els sucres O-units, ja que no s'ha trobat cap enzim comercial que sigui capaç de trencar els enllaços entre manoses que solen posar els eucariotes inferiors en el cor dels sucres, el que s'ha trobat són enzims que trenquen els enllaços dels cors dels sucres típics dels eucariotes superiors.

En la figura 6.2.8 es mostra el gel d'acrilamida al 15 % tenyit amb plata del resultat de la reacció amb la glicosidasa i el corresponent control negatiu, així com l'anàlisi de transferència Western.

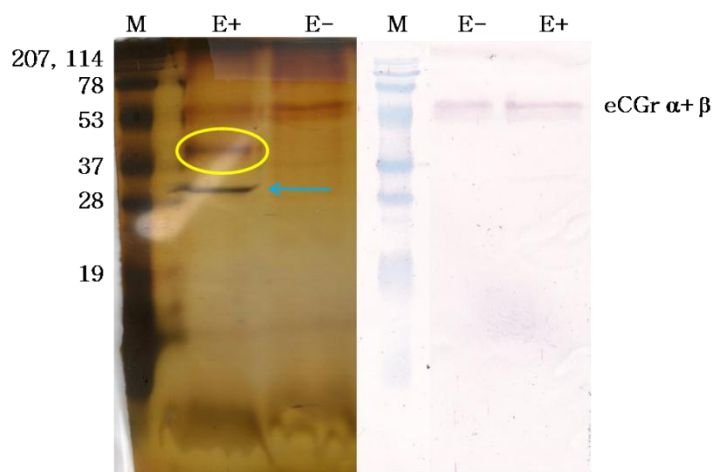


Fig. 6.2.8 Gel d'acrilamida en condicions reductores i tenyit amb plata de les reaccions de desglicosilació i membrana de la transferència Western. M indica el marcador de pes molecular, la mida de les bandes està indicada amb kDa. E+ la pròpia reacció i E- el control sense enzim. El cercle groc indica la possible banda associada a la eCGr desglicosilada i la fletxa blava l'enzim endoglicosidasa.

Tal com es pot observar en el gel, l'acció de la endoglicosidasa H resulta en una aparició d'una banda addicional propera als 37 kDa. Tot i així, aquesta banda no és reconeguda per l'anticòs en la transferència Western, només ho són les bandes d'elevat pes molecular per damunt dels 53 kDa. Però aquesta falta de detecció no pot excloure totalment la possibilitat que correspongui a eCGr ja que es podria donar el cas que l'anticòs estigués reconeixent les cadenes llargues dels N-glicans, eliminats per l'endoglicosidasa H en aquesta reacció. També podria ser degut a la baixa sensibilitat del mètode, esmentat en diverses ocasions.

De totes maneres, el fet que el pes molecular de les principals bandes no variï fa dubtar sobre l'eficiència de la reacció de desglicosilació. Tot i que s'han provat diferents condicions de desnaturalització i/o desglicosilació no s'han aconseguit millorar els resultats.

Fent un calibrat de pes molecular, que es mostra en l'annex 6.2, es pot saber la mida de les bandes. Així doncs, la banda que està per sobre dels 53 kDa té un pes de 64,09 kDa i s'associa a l'heterodímer glicosilat per la similitud de pes molecular als 64,03 que esmenta KA Ferguson (taula 6.2.1). La banda corresponent a la proteïna N-desglicosilada té un pes molecular de 42,25 kDa. Assumint que aquesta banda podria correspondre a l'heterodímer desglicosilat i que l'enzim ha estat capaç d'eliminar tots els sucres N-units de l'hormona es pot saber el pes molecular de l'hormona quan només conté O-glicans.

A partir de les seqüències d'aminoàcids de les dues cadenes i amb l'aplicació ProtParam tool de *Swiss-prot* es pot saber el pes molecular de l'hormona sense glicosilar; 11,03 kDa per la cadena α i 15,67 kDa de la β . Així l'hormona sencera té un pes molecular de 26,70 kDa.

Per saber el pes molecular de l'hormona quan només conté N-glicans i prou s'ha calculat el pes molecular dels O-glicans (15,55 kDa) i s'ha restat del pes molecular de l'hormona amb tots els sucres, donant un pes de 48,54 kDa.

En la taula 6.2.2 es recullen els pesos moleculars dels diferents estats de glicosilació de l'hormona que s'han calculat.

Taula 6.2.2 Pes molecular de la eCGr en diferents estat de glicosilació.

Estat de glicosilació	PM (kDa)
Tots els sucres	64,09
Amb O-glicans	42,25
Amb N-glicans	48,54
Sense glicans	26,70

A partir de les dades d'aquesta taula es pot saber el pes de cada un dels dos tipus de sucre i, a partir d'aquests dos valors, el % que representen de l'hormona total. Aquests resultats es recullen en la taula 6.2.3.

Taula 6.2.3 % de glicosilació de eCGr.

Tipus de sucres	Pes molecular	% del pes de eCGr
O-glicans	15,55	24,25
N-glicans	21,84	30,08
glicans	37,39	54,33

L'hormona nativa té un 41,7 % de sucres, segons KA Ferguson (1964). Per tant *P. pastoris* ha afegit més sucres però no s'ha obtingut una hormona recombinant amb un gran excés de sucres. (Moore WT and Ward DN, 1980).

Aquest % de sucres tan elevat dona suport a que la proteïna en qüestió sigui la eCGr, ja que en el secretoma de *P. pastoris* (Mattanovich D *et al.*, 2009) la proteïna d'aquest pes molecular més similar a la eCGr (una endoquitinasa de 72 kDa) només conté un punt de glicosilació que en cap cas podria arribar a representar un 54% del pes molecular total de la proteïna.

En la patent P1259ES00 (Ubach A. *et al.*, 2009) es presenten els resultats d'una desglicosilació química completa, obtenint l'hormona nativa i la recombinant sense sucres. El pes molecular de les dues bandes obtingudes en els dos casos és molt semblant. Se'n mostren els resultats en la taula 6.2.4.

Taula 6.2.4 Pes molecular, en kDa, de les dues cadenes totalment desglicosilades, tan per l'hormona nativa com per la recombinant.

	Cadena α	Cadena β
Hormona nativa	21,85	24,03
Hormona recombinant	21,85	23,68

6.3.5 Estimació del punt isoelèctric de proteïnes

6.3.5.1 Predicció del pI *in silico*

Per fer una predicció del punt isoelèctric de la proteïna sencera cal introduir la seqüència de les dues cadenes seguides, com si fossin una sola proteïna. S'han introduït les seqüències de cada una de les cadenes per separat i totes dues, ja sigui en ordre $\alpha+\beta$ com $\beta+\alpha$, per comprovar si es prediu el mateix punt isoelèctric. Cal tenir present que en la predicció no es té en compte les influències dels sucres.

En la taula 6.2.5 es mostren els resultats de la predicció.

Taula 6.2.5 Punt isoelèctric predit de l'hormona i les seves cadenes sense glicosilar.

Cadena	Punt Isoelèctric
α	5,83
β	5,73
$\alpha+\beta / \beta+\alpha$	5,81
$\alpha+\beta+\text{C-myc}+6\text{His}$	8,82

Com mostren els resultats de la taula el punt isoelèctric teòric de l'hormona és de 5,81. Si s'afegeix la seqüència de l'epítot c-myc i la cua de 6 histidines el punt isoelèctric puja fins a 8,82.

6.3.5.2 Determinació del pI en gels bidimensionals

Es fa una primera aproximació amb una tira de rang ampli de pH en la primera dimensió. El resultat es mostra en la figura 6.2.9.

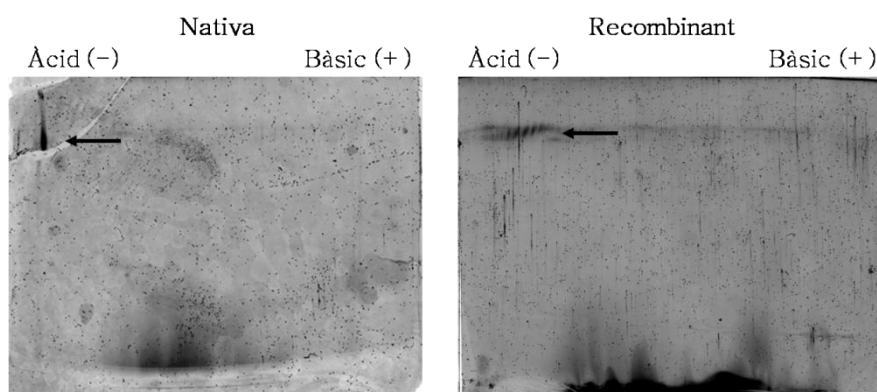


Fig. 6.2.9 Gels de dues dimensions de la proteïna nativa i recombinant.

Els gels mostren que el punt isoelèctric és més àcid del que s'ha predit, entre 3 i 4. Per concretar el resultat es fa una segona anàlisi amb una tira de rang de pH més àcida; entre 3 i 5,6. En la figura 6.2.10 es mostren els dos gels resultants.

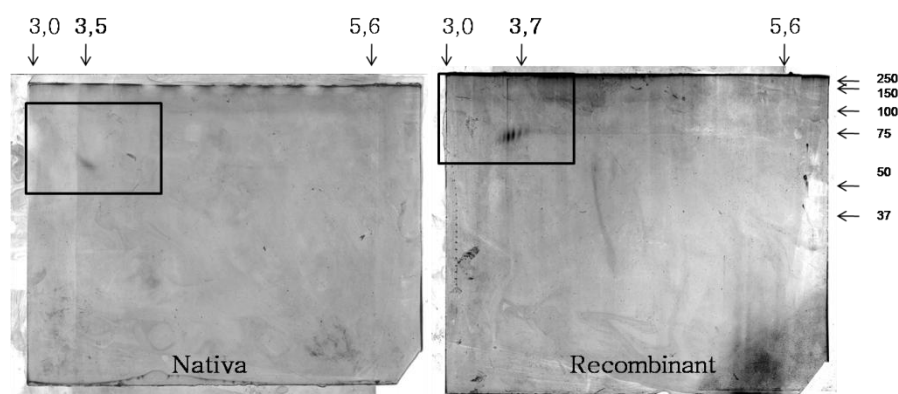


Fig. 6.2.10 Gels bidimensionals de la proteïna nativa i recombinant, amb un rang de pH més petit i àcid. A la dreta es mostra la mida, en kDa, que correspon a cada punt.

A la part dreta de la figura es mostra la mida a kDa que correspon en cada punt de migració, així doncs es té una sola proteïna, pel que fa a la nativa, d'uns 75 kDa. Pel que fa a la proteïna recombinant es té un grup de 5 proteïnes del mateix pes molecular, 75 kDa. Si es compara amb el gel del secretoma de *P. pastoris* obtingut per D Mattanovich i col·laboradors (2009) mostrat en l'annex 7, aquest és un gel amb moltes menys proteïnes, com s'espera d'una mostra d'una proteïna purificada, però en el secretoma es mostren diverses proteïnes en la regió on apareix la eCG, per tan no seria d'estranyar que una de les cinc variants de eCG fos, en realitat, una proteïna de endògena de *P. pastoris*, ja que té un pes molecular i un punt isoelèctric molt semblant a eCG i aquestes han estat les propietats en què s'ha basat la purificació.

Com que el gradient de pH és lineal es pot calcular el pH en un punt concret del gel fent les divisions necessàries entre el punt inicial (pH=3,0) i el final (pH=5,6). D'aquesta manera s'obté que la proteïna nativa té un punt isoelèctric aproximat de 3,5, mentre el grup de 5 taques de la proteïna recombinant el tenen entre 3,4 i 3,6.

Així doncs no es pot dir que tinguin un punt isoelèctric massa diferent.

El que sí que varia és respecte el valor predir amb el software, cal dir que aquesta predicció no té en compte com els sucres poden afectar en el comportament de la proteïna i per tant modificar el punt isoelèctric.

6.3.6 Activitat *in vitro*

Un cop s'ha caracteritzat mínimament l'hormona cal determinar si és activa. El principi de la tècnica utilitzada ha estat l'anàlisi de l'activitat FSH associada a la eCG recombinant, comparant-la amb la mateixa activitat associada a l'hormona nativa i a la pròpia FSH. La metodologia es descriu a la patent P1259ES00 (Ubach A *et al.*, 2009).

Com a cèl·lules diana s'utilitza un cultiu de cèl·lules de Sertoli murines. Aquestes cèl·lules, d'origen testicular, tenen a la seva superfície el receptor de

la FSH i en presència de l'hormona són capaces de sintetitzar l'enzim aromatasas que transforma la testosterona a estrògens. En l'experiment s'utilitza androstenediona com a substrat de l'enzim, que és convertida a estradiol, mesurat per ELISA.

Cada experiment s'ha fet per duplicat i la quantificació d'estradiol de cada un també. En la taula 6.2.6 es mostren els resultats.

Taula 6.2.6 Resultats de l'anàlisi d'activitat *in vitro*.

	eCGn	eCGr	Control negatiu
Estradiol	14,5±0,43	15,3±1,23	10,0±1,40

Segons els resultats de la taula es pot concloure que l'hormona recombinant és activa *in vitro*, fins i tot és capaç d'induir una mica més de producció d'estradiol que la nativa.

6.3.7 Activitat *in vivo*

Un cop s'ha obtingut un resultat positiu en l'activitat *in vitro* es planteja una anàlisi amb rates per veure el comportament de l'hormona dins un organisme. Veure si l'activitat es manté. Es planteja un experiment equivalent al que demana la farmacopea per poder quantificar l'activitat d'un lot de eCGn. S'utilitzen rates femella i es mesura l'augment de pes dels ovaris de les rates que han estat tractades amb eCG respecte un grup de rates control. Aquesta tècnica es pot fer gràcies a l'activitat FSH, que indueix l'ovulació i per tant un augment de pes dels ovaris que actuen com a diana.

Els resultats que es presenten són el pes relatiu de l'ovari referit al pes total de l'animal abans del sacrifici. En la taula 6.2.7 es mostren els resultats pels tres grups.

Taula 6.2.7 Resultats de l'anàlisi *in vivo*.

	Control negatiu	eCGr	eCGn
mg ovari/g rata	0,423±0,005	0,418±0,040	2,994±0,138

Com mostren els resultats de la taula, es pot concloure que l'hormona recombinant no produeix cap efecte en els ovaris tractats, donant un pes similar al del grup control i 7 vegades inferior al pes induït per l'hormona nativa.

El fet que no hi hagi activitat *in vivo*, però si *in vitro* fa pensar que el problema es troba en la vida mitja que té l'hormona en sang. Està descrit que quan una proteïna és administrada parenteralment i no conté àcid siàlic en els seus sucres és degradada ràpidament, té un temps de vida mitja en sang molt curt (Jacobs PP *et al.*, 2009).

6.3 Conclusions

El preparat d'eCGr obtingut a partir del procés anteriorment descrit presenta un patró de bandes de pes molecular més elevat al que s'espera al ser analitzat per SDS-PAGE. Es canvien les condicions de desnaturalització a l'hora de preparar les mostres per eliminar un problema associat a la tècnica. El tractament amb DTT a una concentració final de 12 mM permet, almenys parcialment, visualitzar polipèptids de menor pes molecular. Aquest fet s'observa en l'hormona nativa.

El pes molecular s'ha establert d'una manera aproximada i ha donat al voltant dels 22 kDa per la cadena α i 44 kDa per la β . L'heterodímer el podem associar a una proteïna de 66 kDa.

Així mateix, s'ha pogut determinar el % de sucres N-units, un 34%. Mentre que els O-units s'han establert en un 24%.

El punt isoelèctric de la proteïna majoritària de la preparació de eCGr és bastant àcid, entre 3,4 i 3,6. S'assembla molt al determinat per l'hormona nativa que és 3,5. Els gels bidimensionals han permès veure que hi ha 5 isoformes d'aquesta proteïna, que podrien correspondre a diferents glicofomes de pes molecular equivalent.

S'ha determinar que l'hormona recombinant és activa *in vitro*, però els experiments amb rates han mostrat una falta d'activitat *in vivo*. Caldrà buscar una manera d'augmentar la seva biodisponibilitat en sang per poder tenir activitat *in vivo*.

Conclusions

Com a conclusió general s'ha aconseguit produir gonadotrofina coriònica equina en *Pichia pastoris* que mostra activitat *in vitro*.

Per aconseguir aquest objectiu general s'han assolit les següents fites específiques:

- S'ha dut a terme la síntesi *in vitro* dels gens codificadors de la cadena α i β de la eCG. Aquesta síntesi s'ha basat en la tècnica de PCR, els paràmetres clau que han calgut optimitzar han estat el disseny dels oligonucleòtids i les condicions de PCR. I, globalment, aquesta tècnica ha permès la síntesi dels gens de la eCG amb un ús de codons optimitzat per *P. pastoris*.
- S'ha construït 4 tipus de soques; productores de α , de β i de α i β (amb les dues possibles construccions $\alpha+\beta$ i $\beta+\alpha$).
- Malauradament, no s'ha disposta d'un mètode analític robust per la quantificació del producte, fet que ha limitat el desenvolupament i optimització del procés de producció. No obstant, ha permès avaluar-lo de manera qualitativa.
S'han seleccionat transformants productors en experiments a petita escala i s'ha escollit la construcció $\alpha+\beta$ com a millor productora.
- S'ha aconseguit produir eCG en cultius d'alta densitat cel·lular utilitzant un medi mínim, detectant-se problemes operacionals associats a la temperatura i el subministra d'oxigen i al manteniment de la concentració de metanol, que, majoritàriament, s'han solucionat treballant amb un bioreactor ED enriquint amb oxigen pur i optimitzant els paràmetres de control de la concentració de metanol. Els nivells de producció obtinguts són de l'ordre de 100 mg/l.
- Aquest nivell de producció ha estat suficient per posar a punt un procés de purificació basat en tècniques convencionals, que consisteix en la següent seqüència: centrifugació per eliminar biomassa, concentració i diafiltració, cromatografia de bescanvi iònic i sedàs molecular.
No ha estat possible implementar la cromatografia d'afinitat de metalls quelants, possiblement per la falta d'inaccessibilitat de la cua d'histidines.
- Tot i que el preparat de eCG final no és del tot pur, ha permès fer una breu caracterització i comparació amb el producte natiu. El producte recombinat no està hiperglicosilat, el pI es troba en el mateix rang que la nativa.
- S'ha obtingut activitat *in vitro* del mateix ordre que la nativa, tot i que no s'ha pogut comparar en termes d'activitat específica.
No s'ha detectat activitat *in vivo* de l'hormona recombinant, fet que mostra que la seva biodisponibilitat en sang és limitada.

Bibliografia

- Allen WR. (1980) *Hormonal control of early pregnancy in the mare*. Vet Clin north Am 2: 291
- Ascheim S & Zondek B. (1928) *Die Schwangerschaftsdiagnose aus dem Harn durch Nachweis des Hypophysenvorderlappenhormons*. Klin Wochenschr 7: 1404
- Bellisario R, Carlsen RB, Bahl OP. (1973) *Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the alpha subunit*. J Biol Chem. 10;248(19):6796
- Brierley RA, Bussineau C, Kosson R, Melton A, Siegel RS. (1990) *Fermentation development of recombinant Pichia pastoris expressing the heterologous gene: bovine lysozyme*. Ann N Y Acad Sci. 1990;589:350–62.
- Brierley RA. (1998) *Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-1)*. Meth Mol Biol 103: 149
- Brown AJP. (1989) *Messenger RNA stability in yeast*. Yeast 5: 239
- Carlsen RB, Bahl OP, Swaminathan N. (1973) *Human chorionic gonadotropin. Linear amino acid sequence of the beta subunit*. J Biol Chem. 10;248(19):6810
- Catchpole HR, Lyons WR. (1934) *The gonad-stimulating hormone of pregnant mares*. Am J Physiol 93:57
- Catt KJ & Pierce JG. (1978) *Reproduction endocrinology*. Ed. S.S.C. Yen, Re.B. Jaffe, pp. 34–62. Philadelphia: Saunders
- Cereghino JL & Cregg JM. (2000) *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews 24: 45
- Chiruvolu V, Cregg JM, Meagher MM. (1997) *Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of Pichia pastoris in fed-batch fermentations*. Enzyme Microb Technol 21: 277
- Christakos S & Bahl OP. (1979) *Pregnant mare serum gonadotropin: purification and physicochemical, biological and immunological characterization*. J Biol Chem 254: 4253
- Cid VJ, Sánchez M, Nombela C. (1994) *Characterization of thermosensitive autolytic mutants from diploid Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 140: 559–568.
- Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA. (1991) *High-level expression of tetanus toxin fragment C in Pichia pastoris strains containing multiple tandem integrations of the gene*. Bio/Technology 9:455
- Clegg M, Boda JM, Cole HH. (1954) *The endometrial cups and allantochorionic pouches in the mare with emphasis on the source of equine gonadotrophin*. Endocrinology 54: 448

- Cole HH & Hart GH. (1930) *The potency of blood serum of mares in progressive stages of pregnancy in effecting the sexual maturity of the immature rat.* Am J Physiol 93: 57
- Cole HH, Goss H. (1943) *The source of equine gonadotrophin.* In: Essays in honour of Herbert M. Evans. University of California Press, Berkley, pp. 107
- Cole HH, Penchars RL, Goss H. (1946) *On the biological properties of highly purified gonadotrophin from pregnant mare serum.* Endocrinology 27:548
- Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. (2006) *A simple model-based control for Pichia pastoris allows a more efficient heterologous protein production bioprocess.* Biotechnolgy and Bioprocess 95(1):145
- Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F. (2006) *Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast Pichia pastoris under different promoters: a review.* Microb Cell Fact. 6;5:17.
- Cos O, Resina D, Ferrer P, Montesinos JL, Valero F. (2005) *Heterologous production of Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures.* Biochemical Engineering Journal 26:86–94
- Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F. (2005) *Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in Pichia pastoris fed-batch cultures.* J Biotechnol. 6;116(4):321–35
- Cos O. (2005) *Estudi i millora de la producció de la lipasa de Rhizopus oryzae amb el mmevat metilotròfic Pichia pastoris.* Tesi doctoral, Universitat de Barcelona 2005.
- Cregg JM & Madden KR. (1989b) *Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers.* Mol Gen Genet 219: 320
- Cregg JM & Russell KA. (1998) *Pichia Protocols.* Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Cregg JM & Russell KA. (1998) *Transformation methods.* Mol Biol 103: 27
- Cregg JM, Barringer KR, Hessler AY, Madden KR. (1985) *Pichia pastoris as a host system for transformations.* Mol Cell Biol 5: 3376
- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. (1989a) *Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast Pichia pastoris.* Mol. Cell. Biol. 9(3):1316
- Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden KR, Kellaris PA, Davis GR, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi

- G, Thill GP. (1987) *High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, Pichia pastoris*. Bio/Technology 5: 479
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. (1993) *Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris*. Biotechnology (N Y). 11(8):905
- Curvers S, Brixius P, Klauser T, Thommes J, Weuster-Botz D, Takors R, Wandrey C. (2001) *Human chymotrypsinogen B production with Pichia pastoris by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation*. Biotechnology Progress, 17, 495–502.
- Curvers S, Linnemann J, Klauser T, Wandrey C, Takors R. (2002) *Recombinant protein production with Pichia pastoris in continuous fermentation – kinetic analysis of growth and product formation*. Eng Life Sci 2, 8:229–235.
- Daly, R & Hearn, MTW. (2005) *Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris; a useful experimental tool in protein engineering and production*. J. Mol. Recognit. 18:119
- Dan S, Marton I, Dekel M, Bravdo BA, He S, Withers SG, Shoseyov O. (2000) *Cloning, expression, characterization, and nucleophile identification of family 3, Aspergillus niger beta-glucosidase*. J Biol Chem. 18;275(7):4973
- Davis JS, Weakland LL, West LA, Farese RV. (1986) *Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol triphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells*. Biochem J 238: 597
- De Schutter K, Lin YC, Tiels P, Van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, Van de Peer Y, Callewaert N. (2009) *Genome sequence of the recombinant protein production host Pichia pastoris*. Nat Biotechnol. 27(6):561
- Demolder J, De Backer M, Fiers W, Contreras R. (1993) *Phenotypic effects in Saccharomyces cerevisiae after regulated expression of β -(1,3)-glucanase from Nicotiana plumbaginifolia*. J. Biotechnol. 27:295–305.
- Egli T, van Dijken JP, Veenhuis M, Harder W, Fiechter A. (1980) *Methanol metabolism in yeasts: regulation of the synthesis of catabolic enzymes*. Arch Microbiol 124: 115
- Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM, Gingeras TR. (1985) *Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast Pichia pastoris*. Mol. Cell. Biol. 5, 1111
- Farmer, SW. & Papkoff, H. (1979) *Hormones and evolution*. Ed. EJ. Barrington, 2: 325–59. London: Academic.
- Ferguson KA. (1964) *Metabolism* 13 pàg 985–1002.
- Ferrer P, Diers I, Asenjo JA, Andrews BA. (1998) *Yeast Cell Permeabilizing β -1,3-Glucanases: A Tool for the Integration of Downstream Processes and*

Metabolic Engineering Applications to Yeast. Biotechnol Bioeng. 5;58(2-3):321-4.

Fidler AE, Lun S, Young W, McNatty KP. (1998) *Expression and secretion of a biologically active glycoprotein hormone, ovine follicle stimulating hormone, by Pichia pastoris*. J Mol Endocrinol. 21(3):327-36.

Field, JB. (1978) *The Thyroid*. Ed. S.C. Werner, S.H. Ingbar pp. 185-95. Hagerstown, Md: Harper & Row. 4th edition.

Gadkari R, Deshpande R, Dighe RR. (2003) *Hyperexpression and purification of biologically active human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin using the methylotropic yeast, Pichia pastoris*. Protein Expr Purif. 32(2):175-84

Galet C, Le Bourhis CM, Chopineau M, Le Griec G, Perrin A, Magallon T, Attal J, Viglietta C, Houdebine LM, Guillou F. (2001) *Expression of a single $\beta\alpha$ chain protein of equine LH/CG in milk of transgenic rabbits and its biological activity*. Mol Cell Endocrinol. 28;174(1-2):31-40.

Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, Giuliani M, Parrilli E, Branduardi P, Lang C, Porro D, Ferrer P, Tutino ML, Mattanovich D, Villaverde A. (2008) *Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview*. Microb Cell Fact. 4;7:11

Goochee CF, Gramer MJ, Andersen DC, Bahr JB, Rasmussen JR. (1991) *The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties*. Biotechnology (N Y). 9(12):1347

Gupta CS, Dighe RR. (1999) *Hyperexpression of biologically active human chorionic gonadotropin using the methylotropic yeast, Pichia pastoris*. J Mol Endocrinol. 22(3):273-83.

Hartner F & Glieder A. (2006) *Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts*. Microb Cell Fact. 14;5:39.

Higgins DR, Busser K, Comiskey J, Whittier PS, Purcell TJ, Hoeffler JP. (1998) *Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection*. Methods Mol Biol 103: 41

<http://webbook.nist.gov/chemistry/> per l'espectre d'absorbància de l'imidazole

Hunzicker-Dunn MH & Birnbaumer L. (1985) *The involvement of adenylyl cyclase and AMP-dependent protein kinase in luteinizing hormone actions*. In: Ascoli, M. (ed) *Luteinizing hormone action and receptors*. CRC Press, Boca Raton, p. 57

Jablonka-Shariff A, Roser JF, Bousfield GR, Wolfe MW, Sibley LE, Colgin M, Boime I. (2006) *Expression and bioactivity of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH)*. Theriogenology 15;67(2):311-20.

- Jacobs PP, Geysens S, Vervecken W, Contreras R, Callewaert N. (2009) *Engineering complex-type N-glycosylation in Pichia pastoris using GlycoSwitch technology*. Nat Protoc. 4(1):58
- Jahic M, Veide A, Charoenrat T, Teeri T, Enfors S-O. (2006) *Process Technology for production and recovery of heterologous proteins with Pichia pastoris*. Biotechnol. 22,1465-1473
- Koutz P, Davis GR, Stillman C, Barringer K, Cregg J, Thill G. (1989) *Structural comparison of the Pichia pastoris alcohols oxidase genes*. Yeast 5: 167
- Kumagai MH, Donson J, della-Cioppa G, Grill LK. (2000) *Rapid, high-level expression of glycosylated rice alpha-amylase in transfected plants by an RNA viral vector*. Gene. 7;245(1):169-74.
- Kurjan J & Herskowitz I. (1982) *Structure of a yeast pheromone gene (MF alpha): a putative alpha-factor*. Cell 30:933
- Legardinier S, Duonor-Cérutti M, Devauchelle G, Combarous Y, Cahoreau C. (2005b) *Biological activities of recombinant equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (eLH/CG) expressed in Sf9 and Mimic insect cell lines*. J Mol Endocrinol. 34(1):47-60.
- Legardinier S, Klett D, Poirier JC, Combarous Y, Cahoreau C. (2005a) *Mammalian-like nonsialyl complex-type N-glycosylation of equine gonadotropins in Mimic insect cells*. Glycobiology. 15(8):776-90.
- Licht P, Farmer SW, Papkoff H. (1977) Recent Prog. Horm. Res. 33:169-248.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. (2005) *Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system*. Yeast. 22(4):249-70
- Martinuk SD, Rajlumar K, Murphy BD. (1990) *Comparison of circulating and placental forms of quine chorionic gonadotropin*. Domest. Anim Endocrinol. In press
- Mattanovich D, Graf A, Stadlmann J, Dragosits M, Redl A, Maurer M, Kleinheinz M, Sauer M, Altmann F, Gasser B. (2009) *Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host Pichia pastoris*. Microb Cell Fact. 2;8:29
- Mattos AP, Sarno ML, Romero CR, Sbrogio-Almeida ME, Raw I, Ho PL. (2002) *Synthesis of cholera toxin B subunit gene: cloning and expression of a functional 6XHis-tagged protein in Escherichia coli*. Protein Expr & Purif 25:481-487
- Menendez J, Valdes I, Cabrera N. (2003) *The ICL1 gene of Pichia pastoris, transcriptional regulation and use of its promoter*. Yeast. 15;20(13):1097

- Miele RG, Castellino FJ, Bretthauer RK. (1997) *Characterization of the acidic oligosaccharides assembled on the Pichia pastoris-expressed recombinant kringle 2 domain of human tissue-type plasminogen activator*. Biotechnol Appl Biochem 26:79
- Minning S, Schmidt-Dannert C, Schmid RD. (1998) *Functional expression of Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris: high-level production and some properties*. J Biotechnol. 11:66(2-3):147
- Minning S, Serrano A, Ferrer P, Solà C, Schmid RD, Valero F. (2001) *Optimization of the high-level production of Rizopus oryzae lipase in Pichia pastoris*. J Biotechnol 2001, 86:59-70.
- Montesino R, Cremata J, Rodríguez M, Besada V, Falcon V, de la Fuente J. (1996) *Biochemical Characterization of the recombinant Boophilus microplus Bm86 antigen expressed by transformed Pichia pastoris cells*. Biotechnol Appl Biochem 23:23
- Montesino R, Garcia R, Quintero O, Cremata JA. (1998) *Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Protein Expr Purif 14: 197
- Moore WT & Ward DN. (1980) *Pregnant mare serum gonadotropin: an in vitro characterization of the lutropin-follitropin dual activity*. J Biol Chem 250: 6930
- Moore, WT & Ward, DN. (1980) *Pregnant mare serum gonadotropin. Rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits*. J. Biol. Chem. 256(14); 6923
- Mrša V, Klebl F, Tanner W. (1993) *Purification and Characterization of the Saccharomyces cerevisiae BGL2 gene product, a cell wall endob-1,3-glucanase*. J. Bacteriol. 175: 2102
- Müller R, Marchetti M, Kratzmeier M, Elgass H, Kuschel M, Zenker A, Allmaier G. (2007) *Comparison of planar SDS-PAGE, CGE-on-a-chip, and MALDI-TOF mass spectrometry for analysis of the enzymatic de-N-glycosylation of antithrombin III and coagulation factor IX with PNGase F*. Anal Bioanal Chem 389:1859
- Murphy BD, Martinuk SD. (1991) *Equine Chorionic Gonadotropin*. Endocrine Reviews 12: 27
- Ogata K, Nishikawa H, Ohsugi M. (1969) *A yeast capable of utilizing methanol*. Agric. Biol. Chem. 33, 1519
- Palladino MJ, Keegan LP, O'Connell MA, Reenan RA. (2000) *dADAR, a Drosophila double-stranded RNA-specific adenosine deaminase is highly developmentally regulated and is itself a target for RNA editing*. RNA. 6(7):1004-18

- Papkoff H, Bewley TA, Ramachandran J. (1978) *Physicochemical and biological characterization of pregnant mare serum gonadotropin and its subunits*. Biochim Biophys Acta 532: 185
- Papkoff H. (1974) *Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin*. Biochem Biophys Res Commun 58: 397
- Pierce JG & Parsons TF (1985) *Glycoprotein hormones: Structure and function*. Annu Rev Biochem 50: 465
- Potgieter TI, Cukan M, Drummond JE, Houston-Cummings NR, Jiang Y, Li F, Lynaugh H, Mallem M, McKelvey TW, Mitchell T, Nylen A, Rittenhour A, Stadheim TA, Zha D, d'Anjou M. (2009) *Production of monoclonal antibodies by glycoengineered Pichia pastoris*. J Biotechnol. 23;139(4):318-25
- Ramon, R. (2007) *Estratègies d'operació en el procés de producció de proteïnes heteròlogues en Pichia pastoris: aplicació de tècniques de monitorització i control*. Tesi doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona 2007.
- Resina D, Bollók M, Khatri NK, Valero F, Neubauer P, Ferrer P. (2007) *Transcriptional response of P. pastoris in fed-batch cultivations to Rhizopus oryzae lipase production reveals UPR induction*. Microb Cell Fact. 16;6:21.
- Resina D. (2006) *Expression of the Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris under the control of the FLD1 promoter*. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona 2006.
- Richard F, Robert P, Remy JJ, Martinat N, Bidart JM, Salesse R, Combarous Y. (1998) *High-level secretion of biologically active recombinant porcine follicle-stimulating hormone by the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Biochem Biophys Res Commun. 28;245(3):847-52.
- Roche PC & Ryan RJ. (1985) *Lh/hCG receptor*. In: Ascoli, M. (ed) *Lutenizing hormone action and receptors*. CRC Press, Boca Raton, pp. 17
- Rodesch FR, Fontaine YA. (1968) *Estimation of comparative activities of various thyrotropic preparations on isolated sheep thyroid cells*. Gen Comp Endocrinol. 11(1):64-8
- Romanos MA, Scorer CA, Clare JJ. (1992) *Foreign gene expression in yeast: a review*. Yeast 8: 423
- Roser JF, Papkoff H, Murthy HMS, Chang Y-S, Chloupek RC, Potes JAC. (1984) *Chemical, biological and immunological properties of pituitary gonadotropins from donkey (Equis asinus): comparison with the horse (Equis caballus)*. Biol Reprod 30: 1253
- Roser JF. (1999) *Equine Chorionic Gonadotropin*. Encyclopedia of Reproduction (Vol.2) Academic Press, San Diego

- Ryan RJ, Charlesworth MC, McCormick DJ, Milius RP, Keutmann HT. (1988) *The glycoproteins hormones: recent studies of structure-function relationships*. FASEB J. 2: 2661
- Sairam MR. (1983) *Gonadotropic hormones: relationship between structure and function with emphasis on antagonists*. In: Li, C.H. (ed) *Hormonal proteins and peptides*. Academic Press, New York, pp. 1
- Samaddar M, Catterall JF, Dighe RR. (1997) *Expression of biologically active beta subunit of bovine follicle-stimulating hormone in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Protein Expr Purif. 10(3):345-55.
- Sherman GB, Wolfe M, Farmerie TA, Clay CM, Threadgill DS, Sharp DC, Nilson JH. (1992) *A single gene encodes the β -subunits of equine LH and CG*. Mol Endocrinol 6(6): 951-9
- Sherman, GB, Heilman, DF, Hoss, AJ, Bunick, D, Lund, LA. (2001) *Messenger RNAs encoding the β subunits of guinea pig LH and putative CG autotranscribed from a single copy gpLH/CG β gene*. J. Mol. Endocrinol 26(3): 267
- Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, Cruze J, Mazzaferro P, Fish W, Fuke M, Holden K, Phelps D, Wood P, Parker K. (1989) *High-level expression, purification and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Biochemistry 28:4117
- Stewart M, Stewart F. (1977) *Constant and variable regions in glycoprotein hormone beta subunit sequences: implications for receptor binding specificity*. J. mol. Biol. 116: 175-179
- Strickland TW, Parsons TF, Pierce JG. (1981) *Structure of LH and hCG*. In: Ascoli, M. (ed) *Lutenizing hormone action and receptors*. CRC Press, Boca Raton, pp. 1
- Surribas A. (2009) *Millora en el procés de producció d'una lipasa de Rhizopus oryzae en Pichia pastoris mitjançant tècniques de monitoratge i estratègies de cultiu alternatives*. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona 2009.
- Trimble RB, Atkinson PH, Tschopp JF, Townsend RR, Maley F. (1991) *Structure of oligosaccharides on Saccharomyces SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. J Biol Chem 266: 22807
- Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig W, Grinna L. (1987) *High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, Pichia pastoris*. Bio/Technology 5: 1305
- Tullner WW, Hertz R. (1966) *Chorionic gonadotropin levels in the rhesus monkey during early pregnancy*. Endocrinology 78: 204

- Ubach A, Ferrer P, Valero F, Font A, Ramon R, Resina D. (2009) *Hormona gonadotropina coriònica equina recombinante, procedimiento de obtención y usos*. P1259ES00
- Valenzuela JFF (2008) *Estudio de la transferencia de oxígeno en biorreactores utilizados para la producción de proteínas heterólogas en Pichia pastoris*. Màster, Universitat Autònoma de Barcelona 2008.
- Veenhuis M, van Dijken JP, Harder W. (1983) *The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast*. Adv Microb Physiol 24: 1
- Ventura S, Villegas V, Sterner J, Larson J, Vendrell J, Hershberger CL, Avilés FX. (1999) *Mapping the pro-region of carboxypeptidase B by protein engineering. Cloning, overexpression, and mutagenesis of the porcine proenzyme*. J Biol Chem. 9;274(28):19925
- Verostek MF, Trimble RB. (1995) *Mannosyltransferase activity in membranes from various yeast strains*. Glycobiology 5: 671
- Vuorela A, Myllyharju J, Nissi R, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. (1997) *Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type III collagen in the yeast Pichia pastoris: formation of a stable enzyme tetramer requires co expression with collagen and assembly of a stable collagen requires co expression with prolyl 4-hydroxylase*. EMBO J. 16: 6702
- White CE, Hunter MJ, Meininger DP, White LR, Komives EA. (1995) *Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of thrombomodulin: the roles of the sixth domain and of methionine 388*. Protein Eng. 8(11):1177
- Wu S & Letchworth GJ (2004) *High efficiency transformation by electroporation of Pichia pastoris pretreated with lithium acetate and dithiothreitol*. BioTechniques 36(1): 152
- Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM. (2000) *Modeling Pichia pastoris growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A*. Biotechnology and Bioengineering, 70, 1-8.
- Zhang W, Sinha J, Smith LA, Inan M, Meagher MM. (2005) *Maximization of production of secreted recombinant proteins in Pichia pastoris fed-batch fermentation*. Biotechnology Progress, 21, 386-393.

Abreviatures

Abreviatures

% gC	Contingut en guanines i citosines
μ max	Velocitat específica de creixement màxima
AOX, <i>AOX</i>	Alcohol oxidasa
BMG	Medi mínim tamponat, amb glicerol
BMGY	Medi complex tamponat, amb glicerol
BMM	Medi mínim tamponat amb, metanol
BMMY	Medi complex tamponat, amb metanol
BSA	Albúmina sèrica bovina
dNTPs	Desoxiribonucleòtids
eCG	Equine chorionic gonadotropin
eCGn	Equine chorionic gonadotropin nativa
eCGr	Equine chorionic gonadotropin recombinant
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
hCG	<i>Human chorionic gonadotropin</i>
HPLC	Cromatografia líquida d'alta pressió
LB	Medi de cultiu Luria-Bertrani
LH	<i>Lutropin Hormone</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i>
o/n	Over night; tota la nit
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PM	Pes molecular
pO ₂	Pressió d'oxigen
ROL	Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>
SCP	<i>Single Cell Production</i>
t/a	Temperatura ambient
T _m	Temperatura de fusió o <i>melting</i>
T _a	Temperatura d'hibridacio o <i>annealing</i>
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
UPR	<i>Unfolding protein response</i>
YPD	Medi complex amb extracte de llevat, peptona i dextrosa

Annex

Annex 1 Seqüències nucleotídica i aminoacídica de les cadenes de eCG

1.1 Seqüència aminoacídica de eCG

eCG- α

1 FPDGEFTTQDCPECKLRENK
21 YFFKLGVPPIYQCKGCCFSRA
41 YPTPARSRKTMLVPKNITSE
61 STCCVAKAFIRVTVMGNIKL
81 ENHTQCYCSTCYHHKI **96**

eCG- β

1 SRGPLRPLCRPINATLAAEK
21 EACPICITFTTSICAGYCPS
41 MVRVMPAALPAIPQPVCTYR
61 ELRFASIRLPGCPPGVDPMV
81 SFPVALSCHGPCQIKTTDC
101 GVFRDQPLACAPQASSSSKD
121 PPSQPLTSTSTPTPGASRRS
141 SHPLPIKTS **149**

1.2 Seqüència nucleotídica dels gens codificadors de la eCG (GenBank)

En Blau es marca el pèptid senyal, en blau i negreta el codó d'inici. Els introns o seqüències no codificants es marquen en gris i la seqüència que es tradueix a la proteïna madura en morat.

eCG- α

AB000200: *Equus caballus* mRNA for equine chorionic gonadotropin alpha-subunit, complete cds. (Min,K. et al. 1994)

```

1  aggagagcta atggattacta cagaaaacat gcagctgtca tcttggccac attgtccgtg
61  tttctgcata ttctccattc ctttctctgat ggagagttha caacgcagga ttgccagaa
121  tgcaagctaa gggaaaacaa gtacttcttc aaactgggcg tcccgattta ccagtgtgag
181  ggctgctgct tctccagagc gtaccccact ccagcaaggt ccaggaagac aatgttggtc
241  ccaaagaaca tcacctcaga atccacatgc tgtgtggcca aagcattat cagggtcaca
301  gtgatgggaa acatcaagtt ggagaaccac acccagtgct attgcagcac ttgctatcac
361  cacaagattt aaaggtttca ccaagtg

```

eCG- β

S41704: *Equidae* luteinizing hormone and chorionic gonadotropin beta-subunits gene, complete cds. (Sherman,G.B. et al. 1992)

```

1  ctaaggaagg actttggcac aggaatggct ttcagttcac ggctggtgga gcgtgaacct
61  gaagcttcag cccatctcca ttgaggggtc gtcggagggg cgagcatacc ttacttcatg
121  tgtccccagc acgacctttc tagccccctg ggactgagtc tgccaagttg gtctcacctg
181  ggtgtctcct gcttaaggcg cctagcactc agcagagtggt gggagggggt gctccagga
241  gccactcctg cacctccctg accttgtccg cctctcgccc gggggcactt agtgtccagg
301  ttaccctgcc atgcggcacg cccagtggtc ttgcctcccc cacagcctgc ctgctgggtat
361  aagaccagta gtataagacc agggtaagca ccagcaaaga tcagtagtgt aagaccagag

```

421 taaacacggc agaggaggca ccgaggatgg agacgctcca ggtaaggctg tagggccctg
481 ggccttgcaa ctccatccag ggtccagttg gcgcgaagag ggagcgtctt atgacctggc
541 aaaggtgtgg acagccagca gcgttcctgc caggagggcc gcgggtaggg cagggcctga
601 gtgggtatct gaggtgttgg ggtccctggg gtattgggat gggggatcaa agtggagggg
661 ccctgaatgg aagatgtcag gcagaggagc tgggtccctc aatgtgtatc tgggacggga
721 ggggtgagggc ccaaggctga ggtctcaggc tggccctgag gcaactggcct tgtcccaggg
781 gctgctgctg tggatgctgc tgagtgttgg cggggtctgg gcatccaggg ggccactgcg
841 gccactgtgc cggcccatca acgccactct ggctgctgag aaggaggcct gccccatctg
901 catcaccttc accaccagca tctgtgcccg ctaactgcccc agcatggtga gctgcccagg
961 gggggcccac agaggacggg agggggcagc gggggtgcaa ggggcctacc cctgggtaga
1021 ggccggggaa ctggagtctg agctgggtgt gtgggagggg gagcaagggt cccctggaca
1081 cctgagttgg ggggatctgt gaggggcagt gggggggctc aggggagggc ccaaccagg
1141 cagatgctca tgctgcaccc cctctctcca ggtgcggggtg atgccagctg ccctgccggc
1201 cattccccag ccagtgtgca cctaccgtga gctgcgcttt gcttccatcc ggctccccgg
1261 ctgcccgcct ggtgtggacc ccatggtctc cttccccgtg gcctcagtt gtcactgcg
1321 gccctgccag atcaagacca ctgactgctg ggttttcaga gaccagcct tggcctgtgc
1381 cccccaggcc tcctcttct ctaaggatcc ccatcccaa cctctacat ccacatccac
1441 cccaactcct ggggcccagca gacgttctc tcatcccctc ccaataaaga cttcttgac
1501 tacacactgt ggggttgttt ttgggctcag ggtgcgtgtg cacgtgtata cacacacaca
1561 gtgggtccag tttcagaacc atttatata aagtacagt gtcagaactc tag

1.3 Seqüència nucleotídica dissenyada per eCG

eCG- α

XhoI
~~~~~  
AvaI  
~~~~~

1 CGTTCACTCG AGTTTCCTGA TGGAGAGTTT ACAACTCAAG ATTGTCCAGA
GCAAGTGAGC TCAAAGGACT ACCTCTCAA TGTGAGTTC TAACAGGTCT

51 ATGTAAGTTG AGAGAAAACA AGTACTTCTT CAAATTGGGT GTTCCAATTT
TACATTCAAC TCTCTTTTGT TCATGAAGAA GTTTAACCCA CAAGGTAAAA

101 ACCAATGTAA GGGTTGTTGT TTCTCCAGAG CTTACCCAAC TCCAGCAAGA
TGGTTACATT CCCAACAAACA AAGAGGTCTC GAATGGGTTG AGGTCGTTCT

151 TCCAGGAAGA CAATGTTGGT TCCAAAGAAC ATCACCTCAG AATCCACATG
AGGTCCTTCT GTTACAACCA AGGTTTCTTG TAGTGGAGTC TTAGGTGTAC

201 TTGTGTTGCC AAAGCATTTA TCAGAGTTAC AGTTATGGGA AACATCAAGT
AACACAACGG TTTCGTAAAT AGTCTCAATG TCAATACCCT TTGTAGTTCA

251 TGGAGAACCA CACCCAATGT TATTGTTCTG CTTGTTATCA CCACAAGATT
ACCTCTTGGT GTGGGTACATA ATAACAAGCT GAACAATAGT GGTGTTCTAA

NotI
~~~~~  
EagI  
~~~~~

301 GCGGCCGCAT CCAG
CGCCGGCGTA GGTC

eCG-β

		XhoI			
		~~~~~			
		AvaI		AccI	
		~~~~~		~~~~~	
1	CCTATTCTCG	AGTCCAGAGG	TCCATTGAGA	CCATTGTGTA	GACCAATCAA
	GGATAAGAGC	TCAGGTCTCC	AGGTAACCTCT	GGTAACACAT	CTGGTTAGTT
51	CGCCACTTTG	GCTGCTGAGA	AGGAGGCCTG	TCCAATCTGT	ATCACCTTCA
	GCGGTGAAAC	CGACGACTCT	TCCTCCGGAC	AGGTTAGACA	TAGTGGAAGT
101	CCACCTCTAT	CTGTGCCGGT	TACTGTCCAT	CTATGGTTAG	AGTTATGCCA
	GGTGGAGATA	GACACGGCCA	ATGACAGGTA	GATACCAATC	TCAATACGGT
151	GCTGCCCTGC	CAGCCATTCC	ACAACCAGTT	TGTACCTACA	GAGAGCTGAG
	CGACGGGACG	GTCGGTAAGG	TGTTGGTCAA	ACATGGATGT	CTCTCGACTC
				HincII	
				~~~~~	
201	ATTTGCTTCC	ATCAGATTGC	CAGGTTGTCC	ACCTGGTGTT	GACCCAATGG
	TAAACGAAAG	TAGTCTAACG	GTCCAACAGG	TGGACCACAA	CTGGGTTACC
251	TTTCCTTCCC	AGTTGCCTTG	AGTTGTCACT	GTGGTCCATG	TCAGATCAAG
	AAAGGAAGGG	TCAACGGAAC	TCAACAGTGA	CACCAGGTAC	AGTCTAGTTC
301	ACCACTGACT	GTGGTGTTTT	CAGAGACCAA	CCATTGGCCT	GTGCCCCACA
	TGGTGACTGA	CACCACAAA	GTCTCTGGTT	GGTAACCGGA	CACGGGGTGT
351	AGCCTCCTCT	TCCTCTAAAG	ATCCACCATC	CCAACCTTTG	ACATCCACAT
	TCGGAGGAGA	AGGAGATTTT	TAGGTGGTAG	GGTTGGAAC	TGTAGGTGTA
401	CCACCCCAAC	TCCTGGTGCC	TCCAGAAGAT	CCTCTCATCC	ATTGCCAATT
	GGTGGGGTTG	AGGACCACGG	AGGTCTTCTA	GGAGAGTAGG	TAACGGTTAA
		NotI			
		~~~~~			
		EagI			
		~~~~~			
451	AAGACTTCTT	AAGCGGCCGC	TTAGGC		
	TTCTGAAGAA	TTCGCCGGCG	AATCCG		

## Annex 2 Classificació de la família Equidae

### FAMÍLIA EQUIDAE

#### Gènere *Equus*

- Espècie *Equus asinus* (burro)
- Espècie *Equus burchellii* (Zebra de Burchell)
- Espècie *Equus caballus* (Cavall domèstic)
- Espècie *Equus grevyi* (zebra de Grevy)
- Espècie *Equus hemionus* (kulan o ase asiàtic)
- Espècie *Equus kiang* (kiang)
- Espècie *Equus onager* (onager)
- Espècie *Equus quagga* (quagga)
- Espècie *Equus zebra* (zebra)

## Annex 3

Exemple d'alineament de dos clons després de la seqüenciació, un amb un alineament correcte (clon  $\alpha$ ) i l'altre amb errors (clon  $\beta$ ).

eCG $\alpha$  (clon 13)

```

5'  $\alpha$ 13      -----CCAAAGCTTGC-TGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGT 42
3'  $\alpha$ 13      TAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCCGT 180
eCG $\alpha$         -----CGT 3
                                     ***

5'  $\alpha$ 13      TCACTCGAGTTTCCTGATGGAGAGTTTACAACCTCAAGATTGTCCAGAATGTAAGTTGAGA 102
3'  $\alpha$ 13      TCACTCGAGTTTCCTGATGGAGAGTTTACAACCTCAAGATTGTCCAGAATGTAAGTTGAGA 240
eCG $\alpha$         TCACTCGAGTTTCCTGATGGAGAGTTTACAACCTCAAGATTGTCCAGAATGTAAGTTGAGA 63
                *****

5'  $\alpha$ 13      GAAAACAAGTACTTCTTCAAATTGGGTGTTCCAATTTACCAATGTAAGGGTTGTTGTTTC 162
3'  $\alpha$ 13      GAAAACAAGTACTTCTTCAAATTGGGTGTTCCAATTTACCAATGTAAGGGTTGTTGTTTC 300
eCG $\alpha$         GAAAACAAGTACTTCTTCAAATTGGGTGTTCCAATTTACCAATGTAAGGGTTGTTGTTTC 123
                *****

5'  $\alpha$ 13      TCCAGAGCTTACCCAACCTCCAGCAAGATCCAGGAAGACAATGTTGGTTCCAAAGAACATC 222
3'  $\alpha$ 13      TCCAGAGCTTACCCAACCTCCAGCAAGATCCAGGAAGACAATGTTGGTTCCAAAGAACATC 360
eCG $\alpha$         TCCAGAGCTTACCCAACCTCCAGCAAGATCCAGGAAGACAATGTTGGTTCCAAAGAACATC 183
                *****

5'  $\alpha$ 13      ACCTCAGAATCCACATGTTGTGTTGCCAAAGCATTATCAGAGTTACAGTTATGGGAAAC 282
3'  $\alpha$ 13      ACCTCAGAATCCACATGTTGTGTTGCCAAAGCATTATCAGAGTTACAGTTATGGGAAAC 420
eCG $\alpha$         ACCTCAGAATCCACATGTTGTGTTGCCAAAGCATTATCAGAGTTACAGTTATGGGAAAC 243
                *****

5'  $\alpha$ 13      ATCAAGTTGGAGAACCACACCCAATGTTATGTTTCGACTTGTATCACCACAAGATTGCG 342
3'  $\alpha$ 13      ATCAAGTTGGAGAACCACACCCAATGTTATGTTTCGACTTGTATCACCACAAGATTGCG 480
eCG $\alpha$         ATCAAGTTGGAGAACCACACCCAATGTTATGTTTCGACTTGTATCACCACAAGATTGCG 303
                *****

5'  $\alpha$ 13      GCCGCATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCTGTGTGA 402
3'  $\alpha$ 13      GCCGCATCCAGGGGTACCGAGCTCGAATTCGGAA----- 514
eCG $\alpha$         GCCGCATCCAG----- 314
                *****

```

eCG $\beta$  (clon 67)

```

eCG- $\beta$         -----CCTATCTCGAGTCCAGAGGTCCATTGAGACCATTGTG 38
5'  $\beta$ 67      ATTCGAATTCGAGCTCGGTACCCCTATCTCGAGTCCAGAGGTCCATTGAGACCATTGTG 60
3'  $\beta$ 67      -----GAGCTCGGTACCCCTATCTCGAGTCCAGAGGTCCATTGAGACCATTGTG 50
                * * * * *

eCG- $\beta$         TAGACCAATCAACGCCACTTTGGCTGCTGAGAAGGAGGCCTGTCCAATCTGTATCACCTT 98
5'  $\beta$ 67      TAGACCAATCAACGCCACTTTGGCTGCTGAGAAGGAGGCCTGTCCAATCTGTATCACCTT 120
3'  $\beta$ 67      TAGACCAATCAACGCCACTTTGGCTGCTGAGAAGGAGGCCTGTCCAATCTGTATCACCTT 110
                *****

eCG- $\beta$         CACCACCTCTATCTGTGCCGGTTACTGTCCATCTATGGTTAGAGTTATGCCAGCTGCCCT 158
5'  $\beta$ 67      CACCACCTCTATCTGTGCCGGTTACTGTCCATCTATGGTTAGAGTTATGCCAGCTGCCCT 180
3'  $\beta$ 67      CACCACCTCTATCTGTGCCGGTTACTGTCCATCTATGGTAAGAGTTATGCCAGCTGCCCT 170
                *****

eCG- $\beta$         GCCAGCCATTCCACAACCAGTTTGTACCTACAGAGAGCTGAGATTTGCTTCCATCAGATT 218
5'  $\beta$ 67      GCCAGCCATTCCACAACCAGTTTGTACCTACAGAGAGCTGAGATTTGCTTCCATCAGATT 240
3'  $\beta$ 67      GCCAGCCATTCCACAACCAGTTTGTACCTACAGAGAGCTGAGATTTGCTTCCATCAGATT 230
                *****

eCG- $\beta$         GCCAGGTTGTCCACCTGGTGTGACCCAATGGTTTCCTTCCCAGTTGCCTTGAGTTGTCA 278
5'  $\beta$ 67      GCCAGGTTGTCCACCTGGTGTGACCCAATGGTTTCCTTCCCAGTTGCCTTGAGTTGTCA 300
3'  $\beta$ 67      GCCAGGTTGTCCACCTGGTGTGACCCAATGGTTTCCTTCCCAGTTGCCTTGAGTTGTCA 290
                *****

```



```

eCG-β      CTGTGGTCCATGTCAGATCAAGACCACTGACTGTGGTGTTCAGAGACCAACCATGGC 338
5'β67     CTGTGGTCCATGTCAGATCAAGACCACTGACTGTGGTGTTCAGAGACCAACCATGGC 360
3'β67     CTGTGGTCCATGTCAGATCAAGACCACTGACTGTGGTGTTCAGAGACCAACCATGGC 350
*****

eCG-β      CTGTGCCCCACAAGCCTCCTCTTCTCTAAAGATCCACCATCCCAACCTTTGACATCCAC 398
5'β67     CTGTGCCCCACAAGCCTCCTCTTCTCTAAAGATCCACCATCCCAACCTTTGACATCCAC 420
3'β67     CTGTGCCCCACAAGCCTCCTCTTCTCTAAAGATCCACCATCCCAACCTTTGACATCCAC 410
*****

eCG-β      ATCCACCCCAACTCCTGGTGCCTCCAGAAGATCCTCTCATCCATTGCCAATTAAGACTTC 458
5'β67     ATCCACCCCAACTCCTGGTGCCTCCAGAAGATCCTCTCATCCATTGCCAATTAAGACTTC 480
3'β67     ATCCACCCCAACTCCTGGTGCCTCCAGAAGATCCTCTCATCCATTGCCAATTAAGACTTC 470
*****

eCG-β      TTAAGCGGCGCTTAGGC----- 476
5'β67     TTAAGCGGCGCTTAGGCGGGGATCCTCTAGAG----- 513
3'β67     TTAAGCGGCGCTTAGGCGGGGATCCTCTAGAGTCGACGTGCAGGCATGCAAGGTTGG 528
*****

```

## Annex 4

Determinació de la relació entre pes sec i densitat òptica. S'ha fet amb la soca utilitzada en els bioprocessos:  $\alpha + \beta 1$ .

Dades obtingudes a partir del cultiu:

**Taula 1.** Valors d'absorbància a 600nm i pes sec obtinguts a partir de les mostres del cultiu.

Densitat òptica (600nm)	Pes sec (g/l)
0,04	0,01
3,6	0,76
6,2	1,32
8,8	1,86
16,2	3,43
19,1	4,05
23,2	4,94
42,5	9,01
43,5	9,23
44,1	9,36
46,3	9,82

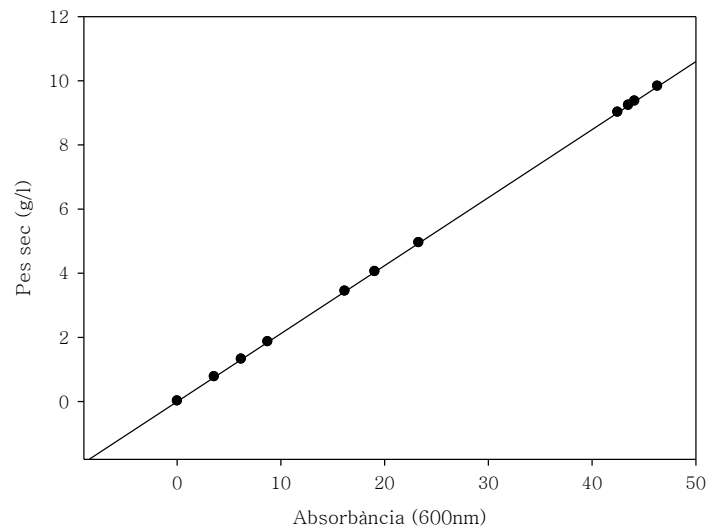


Figura 1. Gràfica que relaciona l'absorbància del cultiu i el seu pes sec.

Per tant;

$$PS=0,212 \cdot Abs \cdot 4E^{-15}$$

$$R^2= 1$$

## Annex 5

Calibrat de la sonda de metanol. S'ha preparat un cultiu en el bioreactor Biostat B amb el medi sense biomassa. S'afegeix la quantitat de metanol necessària per tenir una concentració determinada i es pren el valor de voltatge un cop estabilitzat. En la figura 2 es mostra el gràfic corresponent.

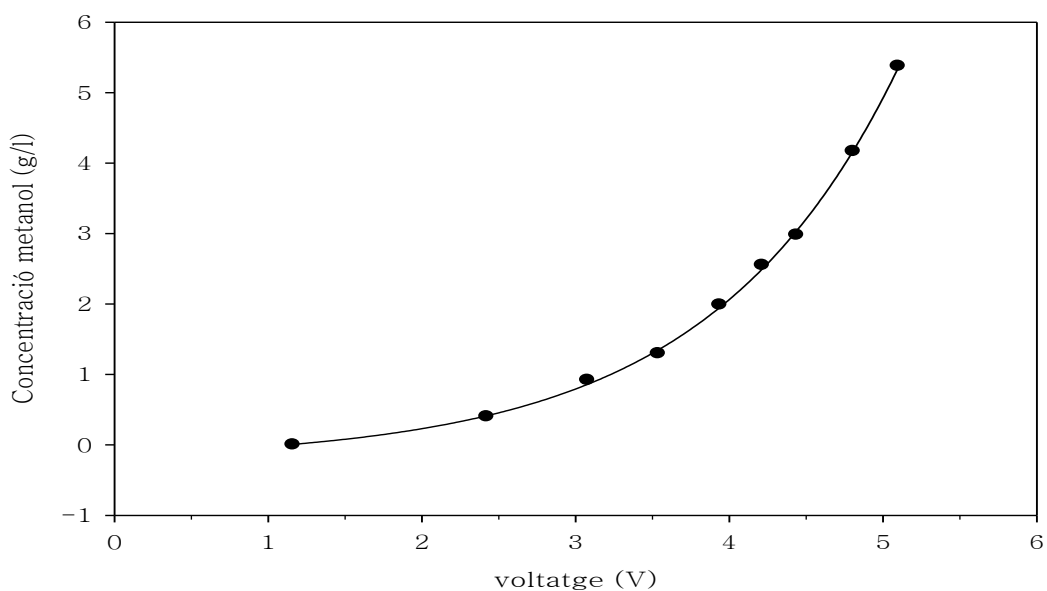


Figura 2. Gràfica que relaciona la concentració de metanol en el medi i el voltatge que en detecta la sonda.

En la taula 2 es mostren els paràmetres del calibrat, seguint l'equació:

$$M = y_0 + a \cdot \exp(b \cdot V)$$

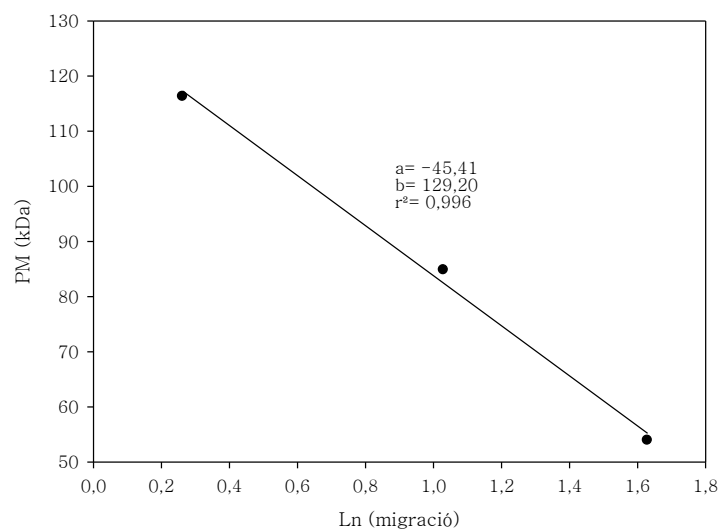
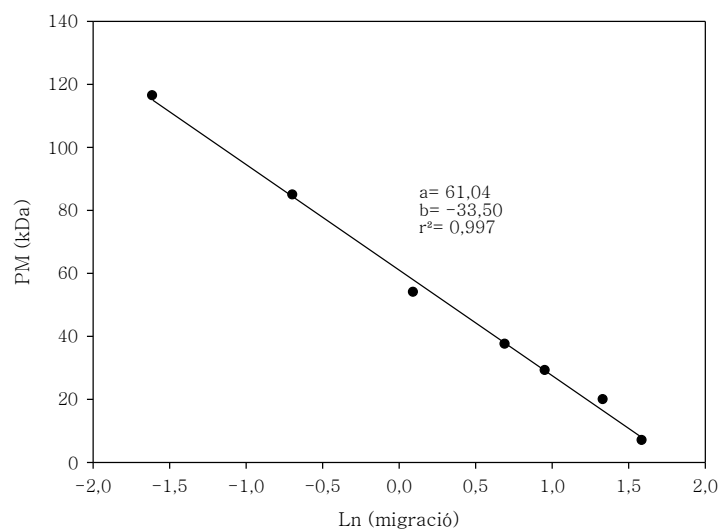
Taula 2. Paràmetres de calibrat

$Y_0$	-0,21903
$a$	0.08849
$b$	0,81258
$R$	0,9997

## Annex 6 Calibrat pes molecular-migració SDS-PAG

### 6.1 Estimació del pes molecular de la eCGr

Recta de calibrat per determinar el pes molecular de les bandes d'un gel d'acrilamida. A la part superior per un gel al 15% i a la part inferior per un gel al 7,5% d'acrilamida.



Per fer el calibrat del gel al 7,5% no s'ha tingut en compte la banda de 199 kDa, aproximadament, ja que la banda no ha migrat. En la taula 3 es mostren els resultats.

Taula 3. Determinació del pes molecular de les bandes del gel d'acrilamida.

Banda	Migració (cm)	Ln (migració)	PM (kDa)
N 1	4,4	1,48	11,42
N 2	3,0	1,10	24,25
N 3	2,0	0,69	37,83
N 4	4,1	1,41	65,13
R 1	3,9	1,36	15,46
R 2	3,3	1,19	21,06
R 3	2,0	0,69	37,83
R 4	3,3	1,19	74,98

## 6.2 Desglicosilació enzimàtica de proteïnes

Recta de calibrat per determinar el pes molecular de les bandes d'un gel d'acrilamida,

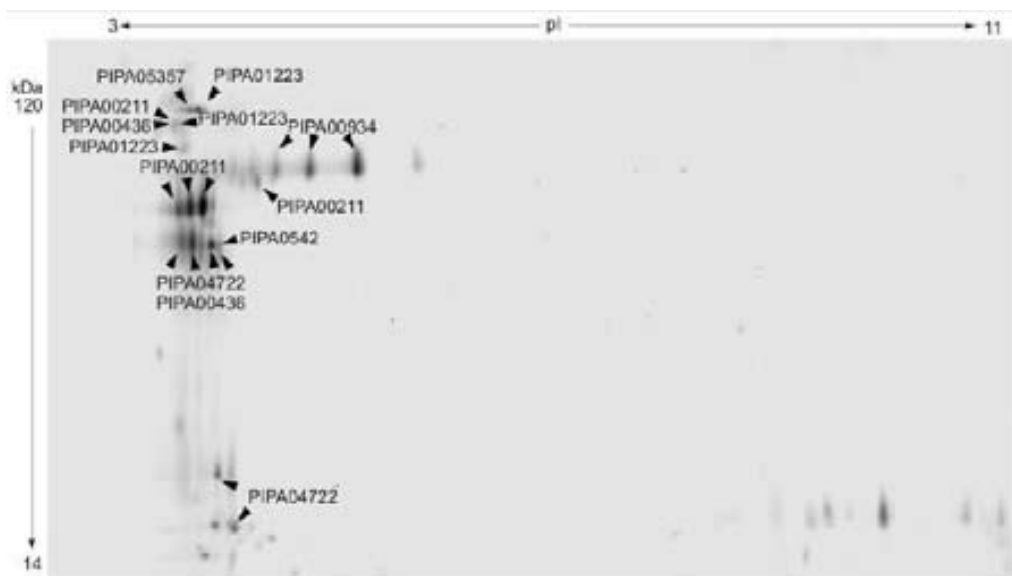
$$PM = 51,50 - 35,27 \cdot \ln(\text{migració})$$

Taula 4 Determinació del pes molecular de les bandes del gel d'acrilamida.

Banda	Migració (cm)	Ln (migració)	PM (kDa)
Prot+ sucres	1,3	0,26	42,25
Prot-sucres	1,4	0,36	64,09

## Annex 7 Secretoma de *P. pastoris*

Gel bidimensional del secretoma de *Pichia pastoris* obtingut per D Mattanovich i col·laboradors (2009).



PIPA ID	Predicted function	theoretical pI / MW [kDa]	Predicted N-glycosylation sites	Predicted localization
PIPA00211	Covalently-bound cell wall protein of unknown function	5.01 / 45.73	1	secreted
PIPA00246	hypothetical fungal hexokinase	5.98 / 24.92	1	no SP
PIPA00436	Cell wall protein related to glucanases	4.83 / 36.07	0	secreted
PIPA00545	Cell wall protein related to glucanases	4.33 / 45.02	2	secreted
PIPA00748	O-glycosylated protein required for cell wall stability	4.22 / 31.86	1	secreted
PIPA00934	SCP-domain family protein, unknown function, extracellular	5.55 / 31.72	0	secreted
PIPA00956	60S ribosomal protein L18A	9.92 / 21.82	1	no SP
PIPA01008	GAS1; Beta-1,3-glucanosyltransferase	3.98 / 57.20	4	secreted
PIPA01010	GAS1; Beta-1,3-glucanosyltransferase	3.99 / 58.37	5	secreted
PIPA01223	potential cell wall glucanase	4.34 / 49.39	0	secreted
PIPA01958	Endo-beta-1,3-glucanase	4.03 / 33.76	1	secreted
PIPA02332	no similarity found	6.01 / 23.64	2	no SP
PIPA02510	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6.24 / 35.74	1	no clear SP
PIPA02524	glucan 1,3-beta-glucosidase similar to <i>S. cerevisiae</i> EXG1 (YLR300W)	4.51 / 46.22	1	secreted
PIPA02544	aldehyde dehydrogenase, Adh2p [ <i>S. cerevisiae</i> ]	6.00 / 36.86	0	no SP
PIPA03955	endo-1,3-beta-glucanase [ <i>P. stipitis</i> CBS 6054], Dse4p [ <i>S. cerevisiae</i> ]	4.70 / 109.45	5	secreted
PIPA04722	Cell wall protein with similarity to glucanases	5.18 / 32.95	0	secreted
PIPA05357	no similarity found	4.25 / 66.46	1	no SP, 2 TM
PIPA05673	YLR286Cp-like protein [ <i>S. cerevisiae</i> ], endochitinase	4.05 / 71.87	1	no clear SP
PIPA05771	Chitin deacetylase, Cda2p [ <i>S. cerevisiae</i> ]	5.25 / 34.66	2	secreted, lower probability

List of identified secreted proteins, with theoretical pI and theoretical MW, and information on the predicted localization (SP = signal peptide, TM = transmembrane domain).