

**EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN  
DE ALBÚMINA SÉRICA  
HUMANA RECOMBINANTE EN  
*PICHA PASTORIS***

**Rodrigo Lombide**

**Tutora: Dra. Lucía Turell**

**Co-tutora: Dra. Beatriz Álvarez**

**Laboratorio de Enzimología – Facultad de Ciencias**

**Universidad de la República**

**Octubre 2014**

# Índice

1	Resumen.....	6
2	Introducción .....	7
2.1	Albúmina sérica humana (HSA) .....	7
2.1.1	Generalidades y estructura .....	7
2.1.2	Metabolismo y distribución.....	8
2.1.3	Funciones.....	9
2.2	Tiol de la HSA .....	12
2.2.1	Tioles biológicos y su reactividad .....	12
2.2.2	Heterogeneidad del tiol de la HSA .....	14
2.2.3	Reactividad del tiol de la Cys34 .....	15
2.2.4	Ácido sulfénico en HSA .....	16
2.2.5	HSA y patologías .....	17
2.3	Producción de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i> .....	19
2.3.1	<i>Pichia pastoris</i> .....	19
2.3.2	Vectores de expresión .....	20
2.3.3	Integración, transformación y selección .....	22
2.4	HSA recombinante .....	25
2.4.1	Sistemas de expresión .....	25

2.4.2	Propiedades de la HSA recombinante .....	26
3	Objetivos .....	28
3.1	Objetivo general.....	28
3.2	Objetivos específicos .....	28
4	Materiales y métodos .....	29
4.1	Materiales y soluciones .....	29
4.2	Expresión de HSA recombinante .....	30
4.2.1	Trabajo previo.....	30
4.2.2	Puesta a punto de la expresión .....	30
4.3	Purificación .....	31
4.3.1	Precipitación con sulfato de amonio .....	31
4.3.2	Cromatografía de intercambio iónico .....	32
4.3.3	Cromatografía de afinidad.....	32
4.3.4	Cromatografía de exclusión molecular.....	33
4.4	Eliminación del propéptido y transformación de la cepa GS115 con el plásmido pPICZA-HSA $\Delta$ pp.....	33
5	Resultados y discusión .....	35
5.1	Expresión.....	35
5.2	Purificación .....	37
5.2.1	Precipitación con sulfato de amonio .....	37
5.2.2	Cromatografía de intercambio iónico .....	38

5.2.3	Cromatografía de afinidad.....	40
5.2.4	Cromatografía de exclusión molecular.....	47
5.3	Eliminación del propéptido.....	49
5.3.1	Eliminación de la secuencia que codifica al propéptido .....	49
5.3.2	Transformación de la cepa GS115.....	51
6	Conclusiones y perspectivas.....	56
7	Referencias.....	58
8	Agradecimientos .....	63

# Abreviaturas

- HSA – albúmina sérica humana
- rHSA – albúmina sérica humana recombinante
- HSA-SH – albúmina con el tiol reducido
- HSA-SOH – albúmina con el tiol oxidado a sulfénico
- HSA-SSR – albúmina con el tiol oxidado a disulfuro mixto
- HSA-SO<sub>2</sub>H – albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfínico
- HSA-SO<sub>3</sub>H- albúmina con el tiol oxidado a ácido sulfónico RSOH – ácido sulfénico
- RSO<sub>2</sub>H – ácido sulfínico
- RSO<sub>3</sub>H – ácido sulfónico
- RSNHR – sulfenamida
- RS(O)SR – tiosulfinato
- GSH – glutatión
- TNB – tionitrobenzoato
- HSA-STNB – disulfuro mixto entre HSA y TNB

# 1 Resumen

La albúmina sérica humana (HSA) es sintetizada por los hepatocitos en forma de prepro péptido. Constituye el 60 % de las proteínas plasmáticas. Entre sus 585 aminoácidos (65 kDa), cuenta con 35 residuos de cisteína, 34 de los cuales se encuentran conformando puentes disulfuro, quedando únicamente un tiol libre correspondiente a la cisteína 34 (Cys34). Este tiol en particular ha cobrado interés en los últimos años, dado que se lo ha considerado como un importante blanco de especies electrófilas. La Cys34, y el derivado sulfénico en particular, ha sido objeto de estudio por nuestro grupo en los últimos años. Es por eso que para poder continuar con dicha caracterización, en este trabajo nos planteamos expresar en forma recombinante la proteína, de manera de contar gracias a las distintas herramientas de la biología molecular, con la posibilidad de generar tanto mutantes en residuos que puedan considerarse claves para la reactividad y estabilidad del tiol de la Cys34, como de formas truncas de la HSA.

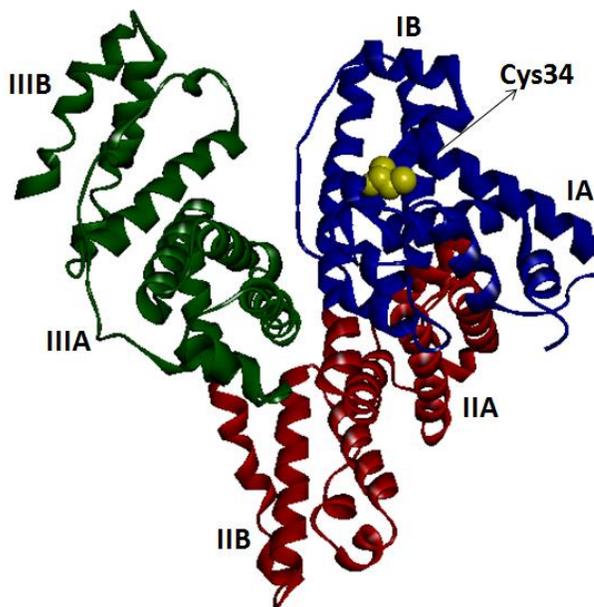
En el marco de este trabajo, partiendo de un plásmido previamente transformado con la secuencia codificante a la preproalbúmina, se logró expresar HSA recombinante (rHSA) como proteína de secreción mediante la utilización de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como vector de expresión con buenos rendimientos (~4 mg por cada 100 ml de medio de cultivo). Se evaluaron distintos métodos de purificación de la proteína lográndose obtener una purificación parcial de la misma. Asimismo, se evaluó el efecto del pre péptido, creyendo que el mismo pudiera estar interfiriendo con los métodos de purificación dado que no tenemos la certeza que el mismo fuese escindido por la levadura al momento de secretar la proteína al medio de cultivo. Para ello se eliminó directamente del vector pPICZA-HSAwt, la secuencia que codifica para el pre péptido mediante una PCR con cebadores específicamente diseñados. Se volvió a transformar la cepa GS115 de *Pichia pastoris*, y nuevamente se obtuvieron buenos niveles de expresión de la proteína.

Nos encontramos en este momento trabajando en la puesta a punto de una técnica que nos permita mejorar los niveles de pureza obtenidos hasta el momento.

## 2 Introducción

### 2.1 Albúmina sérica humana (HSA)

#### 2.1.1 Generalidades y estructura



**Figura 2.1 Estructura tridimensional de la HSA.** Se muestran, en azul el dominio I, en rojo el dominio II y en verde el dominio III. Se destaca la Cys34 en amarillo. Estructura extraída de Protein Data Bank, código de acceso 4EMX (60). La figura se generó utilizando Accelerlys Discovery Studio 4.0. (1)

La albúmina sérica humana (HSA) es la proteína más abundante en plasma constituyendo el 60% de las proteínas totales y alcanzando una concentración de ~42 g/l. Está compuesta por 585 aminoácidos (66.5 kDa) entre los que presenta un único residuo de triptofano en la posición 214 y 35 residuos de cisteína. Estos últimos forman 17 puentes disulfuro, quedando un único tiol libre presente en la cisteína 34 (Cys34). Presenta además en su estructura gran cantidad de aminoácidos cargados en su mayoría ácidos (62 glutamatos, 59 lisinas, 36 aspartatos y 24 argininas) lo que le confiere una gran solubilidad. A pH

fisiológico la proteína presenta ~19 cargas negativas (2).

Su estructura cristalográfica ya fue resuelta, y la muestra como una proteína monomérica globular compuesta en un 67 % por estructuras  $\alpha$ -hélice sin presentar estructuras de hoja  $\beta$ -plegada. Presenta tres dominios homólogos I, II y III, cada uno dividido en 2 subdominios A y B (Figura 2.1). A pesar de existir gran homología entre los tres dominios, su disposición es claramente asimétrica. Los dominios I y II se disponen en forma casi perpendicular entre sí,

mientras que el dominio III se desprende del II en un ángulo de 45°, dándole a la proteína forma de corazón (1). La gran homología que presentan los tres dominios entre sí, no solo en su estructura primaria sino también en la terciaria, puede explicarse por la teoría existente que sugiere que la estructura tal cual se conoce hoy en día deriva de un único dominio primordial que se triplicó en su secuencia (3).

### 2.1.2 Metabolismo y distribución

La HSA es sintetizada en el hígado por los hepatocitos, siguiendo la regla de “un gen – una proteína” y, por tratarse de una proteína monomérica, la misma no requiere de ensamblaje de cadenas. El plegamiento de la HSA se da en forma cotraduccional, esto es posible debido a que los enlaces disulfuro se forman de forma secuencial a partir del segundo residuo de cisteína. Aún no es claro porqué la Cys34 no participa de la formación de enlaces disulfuro. Esta HSA recién sintetizada posee en su extremo amino terminal un péptido señal de secreción (prepéptido) de 18 aminoácidos seguido de un propéptido de 6 aminoácidos sin función conocida. A esta secuencia recién sintetizada se la denomina preproHSA. Tanto el prepéptido como el propéptido son escindidos al momento de secretar la proteína por la enzima convertasa, siendo uno de los últimos pasos de maduración de la HSA antes de pasar del hepatocito al torrente sanguíneo (2).

Una vez sintetizada, la HSA es secretada inmediatamente al torrente sanguíneo sin almacenarse en las células. A su vez, se ha determinado que solamente el 40 % de la albúmina permanece en el compartimiento intravascular. El 60 % restante pasa al medio extravascular por intermedio de los vasos linfáticos y tiene una amplia distribución, encontrándose principalmente en piel, músculo y en menor medida en el intestino (2).

Con una vida media estimada de 27 días, la HSA tiene una tasa de degradación de 3.7% diaria. El proceso de degradación tiene lugar mayoritariamente en hígado, riñón, músculo y piel. Se ha visto que la degradación es más eficiente cuando la proteína se encuentra modificada de alguna forma. Existen dos receptores de membrana en las células endoteliales

denominados gp18 y gp30 que captan las moléculas de HSA modificadas. Una vez captadas, las mismas son internalizadas en vesículas por endocitosis las cuales se fusionan con los lisosomas dando lugar a la degradación de la proteína (2,4). Sin embargo, esto no ocurre con la HSA nativa. En este caso existe un receptor de membrana llamado albodina o gp60 que participa en el pasaje de la albúmina a través del endotelio pero no hay evidencia de que entre en el sistema de degradación lisosomal (1,5).

### 2.1.3 Funciones

La HSA cumple varias funciones en el compartimento intravascular. Lo primero que hay que destacar es que, por tratarse de una proteína plasmática, tiene una gran importancia en la estabilización del ambiente físico de sangre. Sin embargo, se le reconocen además algunas características como la de “esponja molecular” dada la capacidad que posee de transportar gran variedad de moléculas tanto endógenas como exógenas, su carácter de agente protector, y su participación en el metabolismo lipídico (2).

Funciones en la circulación. Siendo la proteína mayoritaria en plasma, la albúmina tiene un importante rol manteniendo la presión coloidosmótica en el torrente sanguíneo, contribuyendo con el 80% del total de la misma. Por otra parte, dada la gran cantidad de grupos ionizables y su bajo punto isoeléctrico, es el primer anión macromolecular en plasma a pH fisiológico (~19 cargas negativas). La cantidad de grupos ionizables a pH cercanos al fisiológico, hacen que la HSA posea la mayor capacidad amortiguadora en plasma (en sangre es ampliamente superado por la hemoglobina) (2).

Transporte de metabolitos. La HSA tiene una gran capacidad de unión frente una amplia gama de moléculas de bajo peso molecular endógenas y exógenas. Además, es capaz de unir péptidos y proteínas. Esta característica le ha otorgado a la HSA un importante interés en investigaciones de carácter farmacológico, clínico y nutricional. Entre las principales moléculas transportadas por la HSA se destacan los ácidos grasos de cadena media y larga (100–600 Da), bilirrubina, iones metálicos y otros compuestos de bajo peso molecular como hemina,

hormonas y vitaminas. Para varios de estos metabolitos, la HSA provee un depósito ampliamente mayor a la solubilidad que los mismos tendrían en plasma en forma libre, y protege de la eventual toxicidad de algunas moléculas transportándolas a los sitios específicos para su eliminación (1,5).

- **Ácidos grasos.** La HSA transporta los ácidos grasos desde el intestino hasta el hígado, desde el hígado hacia los músculos, y desde y hacia el tejido adiposo. Los ácidos grasos son moléculas altamente insolubles con una velocidad de recambio metabólica de aproximadamente 2 minutos (2). En condiciones fisiológicas la HSA transporta entre 0.3 y 1 molécula de ácidos grasos unidos (7), este número puede verse incrementado a causa de estimulaciones adrenérgicas o ejercicio intenso llegando a unir entre 4 y 6 moléculas (1,7). Estudios estructurales y biofísicos de la proteína dilucidaron 7 sitios de unión para ácidos grasos de cadena larga distribuidos asimétricamente entre los tres dominios. Los sitios de mayor afinidad son los sitios 2, 4 y 5, mientras que los sitios 1, 3, 6 y 7 son considerados sitios secundarios con una afinidad 5 a 10 veces menor. Si bien los sitios presentan afinidades distintas, en general todos presentan una estructura similar (8,9). Se trata de un bolsillo hidrofóbico que interacciona con la cadena alifática de los ácidos grasos y un residuo básico estabilizando la carga negativa del carboxilato (8,10). Existen además 2 sitios complementarios (sitios 8 y 9) que son ocupados por ácidos grasos de cadena media y corta, más solubles que los de cadena larga pero casi indetectables fuera de las células (11).
- **Bilirrubina.** La bilirrubina se forma predominantemente en el bazo como consecuencia de la degradación de los grupos hemo. Si bien en su estructura presenta dos grupos carboxilato y otros grupos hidrofílicos, la estructura que adopta en forma de cresta internaliza los grupos polares impidiendo así su solubilización. Es por eso que este compuesto requiere de un transportador para trasladarse desde el bazo hasta el hígado, donde será conjugado y volcado, junto al líquido biliar, al intestino para ser finalmente excretado. El sitio de unión de la bilirrubina a la HSA no está definido. Si bien durante muchos años se lo ha ubicado en el subdominio IIA en el denominado sitio de

“Sudlow I” (2), existen publicaciones recientes que sugieren que el mismo se ubica en el dominio IB (12).

- **Iones metálicos.** Hasta el momento, la HSA posee cuatro sitios principales de unión descritos para iones metálicos. Entre estos iones se destacan, Cu(I/II), Zn(II), Ca(II), Mg(II), Ni(II), Al(III) Mn(II), Cd(II), Co(II/III), Pt(II) y Au(I/II). La presencia de estos sitios de unión postulan a la HSA como una importante reguladora del transporte de iones fisiológicos como el Cu(II) y el Zn(II) así como también de la toxicidad mediada por Ni(II) y Cd(II) entre otros. Le otorga también un interés biomédico por su capacidad de unir fármacos acomplejados con metales de transición como Pt(II) y Au(I). Uno de los sitios de unión descritos se trata del tiol libre de la Cys34, capaz de unir Au(I), Hg(II) y Pt(II) (2,13).
- **Péptidos y proteínas.** Entre los derivados aminoacídicos y péptidos que se unen a la HSA se destacan hormonas como melatonina, gastrina y corticotropina entre otras. Se han detectado hasta el momento 35 proteínas que se unen a la HSA en plasma, entre ellas se encuentran las apolipoproteínas, angiotensinógeno, transferrina y protrombina. Además, se ha observado la unión de proteínas de patógenos que se unen a la HSA como estrategia evasiva ante el sistema inmune. Entre ellas se encuentran la proteína G de membrana de *Streptococcus* o un fragmento de la proteína gp41 del virus de inmunodeficiencia humana VIH (2,6). La diversidad de proteínas y péptidos que interaccionan con la HSA se revela por estudios de proteómica que han llevado a definir la fracción de proteínas y péptidos que se unen a la HSA como “albuminoma” (2,6).

Funciones de protección. Algunas de las propiedades antioxidantes de la HSA incluyen la capacidad de secuestrar moléculas prooxidantes como metales redox activos modulando de esta manera procesos como la química de Fenton (2). Por otro lado, une antioxidantes tales como la bilirrubina la cual es capaz de atrapar radicales peroxilo ( $LOO\cdot$ ) (14). Se ha determinado en los últimos años que el tiol de la Cys34 de la HSA es un importante blanco de especies reactivas de oxígeno en plasma provenientes del metabolismo aeróbico tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, peroxinitrito, radicales carbonatos y dióxido de nitrógeno. Siendo que es la proteína mayoritaria del plasma, y que el tiol libre de la

Cys34 constituye aproximadamente el 80% de los tioles totales de plasma, se le ha otorgado un rol antioxidante (15). No obstante para racionalizar este rol propuesta para el tiol como atrapador de especies oxidantes, es importante tener en cuenta no solo aspectos de reactividad sino también de difusión y compartimentalización. Así, si consideramos el compartimento intravascular en su totalidad, incluyendo los eritrocitos, el sistema se vuelve bastante más complejo. La distancia entre un eritrocito y otro es de  $\sim 3 \mu\text{m}$ , distancia significativamente menor a la recorrida por una molécula por ejemplo, de peróxido de hidrógeno durante su vida media ( $\sim 1200 \mu\text{m}$ ). Esto implica que mucho antes de poder reaccionar con una molécula de HSA, el peróxido de hidrógeno será internalizado por un eritrocito y consumido por la peroxirredoxina 2. A esto se le suma un análisis con los radicales libres, por ejemplo con el radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ). Este es producido mayoritariamente como producto de la reacción del peroxinitrito con dióxido de carbono. Esta especie es altamente reactiva y reaccionará inespecíficamente con moléculas de bajo peso molecular y residuos proteicos. Dada la alta concentración de HSA en plasma y que el carbonato radical reacciona más rápido con cisteínas que con la mayoría de los residuos aminoacídicos, es posible concluir que la HSA, y particularmente la Cys34 constituyen un blanco preferente para esta especie radicalar. Existen otras especies oxidantes que también podrían contribuir a los distintos niveles de oxidación del tiol de la Cys34 en plasma. Estas especies sería los hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ) y los radicales peroxilo ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ). Más allá de todas estas consideraciones el rol atrapador de especies reactivas por parte de la HSA parecería evidente dada la existencia de formas oxidadas *in vivo* observadas en plasma, y su incremento en diversas patologías (16,17).

## 2.2 Tiol de la HSA

### 2.2.1 Tioles biológicos y su reactividad

En condiciones normales, como consecuencia del metabolismo aeróbico se generan especies oxidantes dentro de las células, que en condiciones fisiopatológicas pueden verse incrementadas generando un desbalance entre éstas y las especies antioxidantes presentes a

favor de las primeras denominado “estrés oxidativo” (16,17). Sin embargo, de un tiempo a esta parte se ha propuesto que estas especies reactivas poseen un importante rol en la transmisión de señales, lo que ha llevado a una redefinición del “estrés oxidativo” en términos de una interrupción de la señalización redox (20). El exceso de especies oxidantes puede generar daño a nivel celular o tisular. Es por esto que un estricto control del ambiente redox intracelular resulta esencial para el correcto funcionamiento de las células. El estrés oxidativo es contrarrestado por la acción de antioxidantes que colaboran con el mantenimiento del ambiente redox intracelular. Estos antioxidantes son principalmente tioles, compuestos organosulfurados que contienen un grupo sulfhidrilo unido a un átomo de carbono (RSH). En los sistemas biológicos existen tioles proteicos presentes en los residuos de cisteína, y tioles de bajo peso molecular, como por ejemplo el glutatión (GSH) (21,22).

Los tioles son blancos preferenciales para una amplia gama de especies radicalares y no radicalares dando lugar a una gran diversidad de productos (Figura 2.2). Con potenciales de reducción de  $E'^{\circ} (\text{RS}^{\bullet}/\text{RSH}) = 0.92 \text{ V}$  y  $E'^{\circ} (\text{RSSR}/2\text{RSH}) = -0.24 \text{ V}$  para uno y dos electrones respectivamente, los tioles de los residuos de cisteína poseen una reactividad varios órdenes mayor que el resto de los aminoácidos. Entre los posibles productos de oxidación de los tioles, el ácido sulfénico (RSOH) ha atraído gran interés ya que se ha determinado en una larga lista de proteínas y se le han atribuido funciones catalíticas y regulatorias (15,20).



cromatografía y espectrometría de masas han demostrado que la fracción de no-mercaptoalbúmina se ve incrementada en la albúmina comercial alcanzando a comprender el 57% de la albúmina total (24,25).

### 2.2.3 Reactividad del tiol de la Cys34

Como es característico de tioles en general, en un tubo de ensayo el tiol de la Cys34 reacciona contra la mayoría de los oxidantes tanto radicalares como no radicalares. En plasma, la existencia de estas reacciones con oxidantes se evidencia al detectar isoformas de la HSA con distintos niveles de oxidación respecto a su tiol libre, y que además se ven incrementados en condiciones de estrés oxidativo. El tiol de la HSA reacciona contra peróxido de hidrógeno con constantes de reacción de  $2.2 - 2.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y con peroxinitrito con constantes de reacción de  $3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a pH 7.4 y 37°C, valores cercanos a los de la cisteína libre y glutatión (17). Sin embargo, la reactividad de la Cys34 es más compleja de analizar, ya que acorde al modelo de Christodoulou et. al. (1994) la Cys34, ubicada en una hendidura de 9.5 Å en el dominio I de la proteína, se encuentra en dos conformaciones distintas dependiendo del estado de oxidación del tiol. En su estado reducido se encuentra mayormente enterrado en la hendidura que la contiene, cercana a aminoácidos con grupos ionizables tales como la His39, la Tyr84 y el Asp38 y orientada de forma tal que un puente de hidrógeno puede formarse fácilmente con el átomo de oxígeno del grupo fenólico de la Tyr84 estabilizando esta conformación. Sin embargo, ante una eventual oxidación del tiol, esta conformación cambia, quedando más expuesto. De la misma forma, cabe la posibilidad que la isomerización cis-trans del residuo de prolina contiguo a la Cys34 (Pro35) también puede mediar un cambio conformacional en la región implicada exponiendo así al tiol. Diversos estudios han demostrado que los residuos de His39 y Tyr84 en menor y mayor medida respectivamente afectan tanto la accesibilidad como la reactividad del tiol de la Cys34 (27,28).

La constante de acidez ( $\text{pK}_a$ ) del tiol de la HSA es controversial. Si bien existen reportes que indican que la misma se ubica en valores menores a 7 e incluso menores a 5, distintos trabajos de nuestro grupo lo ubican en un valor de alrededor de 8, similar al de la cisteína libre en

solución (8). Dos factores contribuyen a la complejidad de dicha determinación. En primer lugar y como ya se mencionó, el tiol se presenta en dos conformaciones distintas que varían la reactividad del mismo. Por otra parte, la interacción con distintos ligandos afecta al  $pK_a$  de la Cys34 (7,26).

#### 2.2.4 Ácido sulfénico en HSA

El ácido sulfénico en proteínas tiene diversas funciones. Entre ellas pueden destacarse funciones catalíticas como en el caso de las enzimas capaces de reducir hidroperóxidos (peroxirredoxinas, glutatión peroxidasas entre otras) (23,31). Los derivados sulfénicos de las cisteínas se han visto involucrados también en transmisión de señales. Por citar algunos ejemplos, se ha determinado que el factor de transcripción de Ohr (OhrR), proteína peroxidática dependiente de cisteína de *Bacillus subtilis*, provoca una desrepresión en la expresión de Ohr cuando el residuo de cisteína es oxidado a ácido sulfénico, y posiblemente estados de oxidación superiores (32). Otro ejemplo es la regulación de las fosfatasa de tirosina que hidrolizan las fosfotirosinas de proteínas transductoras de señales (33). Finalmente, se ha demostrado que determinadas condiciones el ácido sulfénico es un precursor de enlaces disulfuro en el proceso de plegamiento protéico *in vitro*. La electrofilia del sulfénico, y el buen carácter nucleofílico del tiolato hacen que esto sea posible (34).

La formación de ácido sulfénico en HSA (HSA-SOH) fue observada por primera vez hace ya más de 60 años. Sin embargo, para una mayor comprensión de la reactividad y estabilidad del ácido sulfénico formado en la HSA nuestro grupo desarrolló una estrategia para cuantificar HSA-SOH formado al exponer la HSA a peróxido de hidrógeno. Una vez formado el HSA-SOH, se lo puso a reaccionar con tionitrobenzoato (TNB) formando un disulfuro (HSA-STNB), reacción que se puede seguir por un decaimiento en la absorbancia a 412 nm del reactivo TNB. Una vez formado el HSA-SOH puede seguir tres rutas. En primer lugar, ante un exceso de oxidante, el HSA-SOH esto puede continuar oxidándose a HSA-SO<sub>2</sub>H, producto que se confirmó mediante

espectrometría de masa tanto para la proteína tripsinizada como para la proteína entera. Por otra parte, HSA-SOH puede reaccionar con tioles de bajo peso molecular formando HSA-SSR. Mediante ensayos de competencia se determinaron las constantes de reacción del HSA-SOH con distintos tioles de bajo peso molecular presentes en plasma. El HSA-SOH reacciona con cisteína, cisteinilglicina, homocisteína y glutatión con constantes de  $21.6$ ,  $55$ ,  $9.3$  y  $2.9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  respectivamente a  $25 \text{ °C}$  y  $\text{pH } 7.4$ . Y en tercer lugar, se ha visto que el HSA-SOH decae espontáneamente en solución con una constante de primer orden a  $\text{pH } 7.4$  de  $1.7 \times 10^{-3}$  y  $5.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  a  $37$  y  $25 \text{ °C}$  respectivamente a un producto que aún no se ha determinado y al que denominamos HSA-SX. Considerando las concentraciones plasmáticas, es fácil concluir que la principal vía a seguir por el HSA-SOH formado *in vivo* es la formación de disulfuros mixtos. Cuando se compara al HSA-SOH con los ácidos sulfénicos formados en otras proteínas como por ejemplo las peroxirredoxinas, este resulta considerablemente más estable. Esta estabilidad característica del HSA-SOH es principalmente atribuida a la ausencia de un tiol cercano con el cual reaccionar, y la ubicación de la Cys34, en una hendidura que impide interacciones intermoleculares (17,35). La unión de ligandos a la HSA puede afectar la reactividad del ácido sulfénico formado. Por ejemplo, estudios realizados en nuestro grupo de trabajo han demostrado que la unión de ácidos grasos a la HSA incrementa la reactividad del ácido sulfénico. Esto puede atribuirse a que la unión de los ácidos grasos promueven un cambio conformacional que por un lado expone al ácido sulfénico para la reacción con otras moléculas, y además disminuye también las restricciones estéricas existentes en su conformación libre de ácidos grasos donde se encuentra enterrado en una hendidura (8).

### 2.2.5 HSA y patologías

Se han detectado hasta el momento 77 mutaciones en el gen que codifica para la HSA, algunas de las cuales producen enfermedades como la analbuminemia, definida como la condición en la que la concentración de HSA en sangre se encuentra en niveles por debajo de  $1 \text{ g/l}$ . Dicha condición da lugar a diversos síntomas tales como hipotensión, edema, fatiga, hipercolesterolemia e hiperlipidemia (2,36).

Existe gran cantidad de enfermedades crónicas que conducen a condiciones de estrés oxidativo. Como se mencionó antes, la HSA es susceptible a dichos estados de estrés oxidativo dado que su Cys34 es un importante blanco de especies reactivas en plasma. Por lo tanto, es de esperar que en pacientes que padezcan dichas condiciones, haya variaciones en el estado redox de la HSA circulante aumentando la fracción de no-mercaptoalbúmina. Más precisamente, la HSA cisteinilada (HSA-S-Cys) por ser la especie mayoritaria en la fracción de no-mercaptoalbúmina, y por ser una modificación postraduccional que no se encuentra en la HSA al momento de ser secretada por el hígado, se ha postulado como un marcador de estrés oxidativo (37).

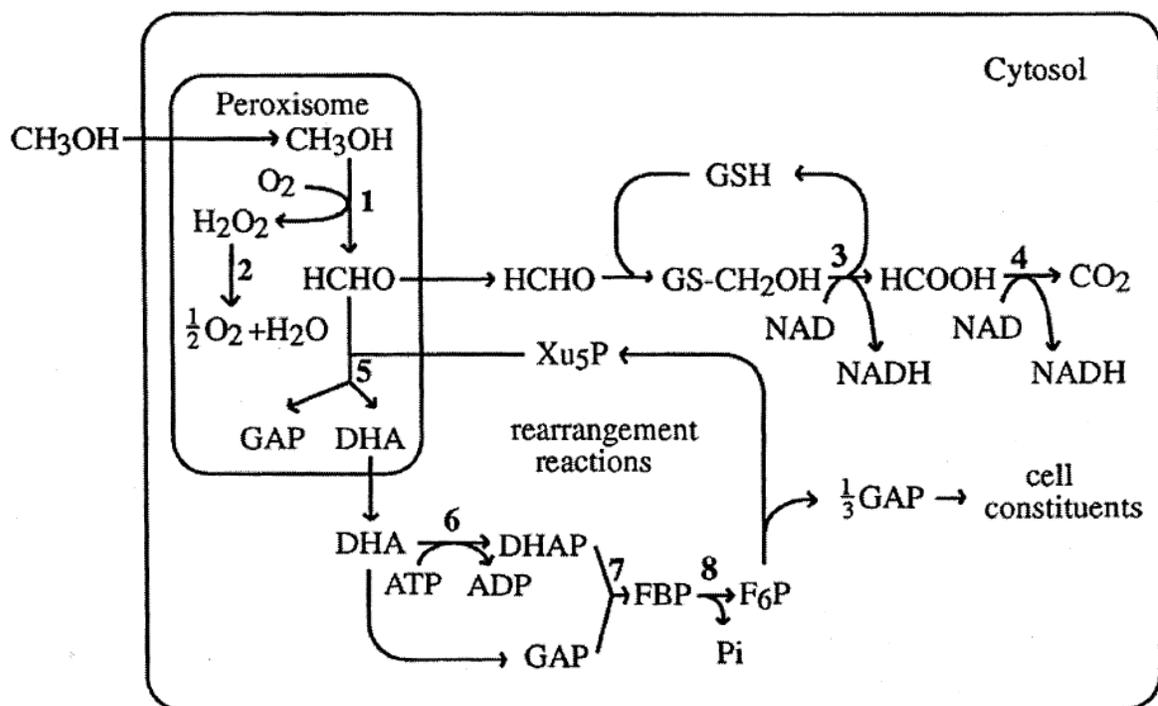
Desde el punto de vista del uso clínico de la albúmina, la administración a pacientes que sufren hipovolemia, shock, quemaduras, hipoproteinemia y hemodiálisis entre otras, ha sido considerada a lo largo de los últimos 50 años. No obstante, la terapia con albúmina, es relativamente costosa, controversial, y las ventajas de la albúmina sobre fluidos alternativos, menos costosos, es objeto de debate y de distintos estudios (38,39). Más allá de estos usos, la albúmina también presenta interés farmacológico como transportadora de drogas, a través de diferentes tecnologías que incluyen los conjugados y las nanopartículas. La albúmina para administrar a pacientes suele obtenerse a partir de plasma de donantes, con el consecuente riesgo biológico. Es posible obtener albúmina recombinante utilizando distintos sistemas de expresión, entre los que se destaca la levadura *Pichia pastoris* (40).

## 2.3 Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

### 2.3.1 *Pichia pastoris*

Durante las últimas décadas, la levadura *Pichia pastoris* ha adquirido popularidad como sistema de expresión para una gran variedad de proteínas. La creciente popularidad puede atribuirse a una serie de factores tales como: [1] simplicidad de las técnicas requeridas para la manipulación genética de la levadura y la similitud con las requeridas para trabajar con *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los sistemas mejor caracterizados de la biología moderna, [2] la capacidad de producir grandes cantidades de proteínas intra y extracelularmente, [3] la capacidad de introducir diversas modificaciones postraduccionales características de eucariotas tales como glicosilaciones, formación de enlaces disulfuro y procesamiento proteolítico y, [4] la disponibilidad comercial del sistema de expresión (37,38).

*P. pastoris* es una levadura capaz de crecer en un medio con metanol como única fuente de carbono. Las enzimas necesarias para metabolizar el metanol solo están presentes en presencia del mismo. La alcohol oxidasa (AOX) es la enzima encargada de llevar a cabo el primer paso en el metabolismo del metanol, oxidándolo a formaldehído y peróxido de hidrógeno. La AOX está compartimentalizada en el peroxisoma junto a la enzima catalasa que descompone al peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Dicha compartimentalización puede ser importante para evitar así la toxicidad mediada por el peróxido de hidrógeno. Parte del formaldehído escapa del peroxisoma y es oxidado a formiato y dióxido de carbono por dos deshidrogenasas citoplasmáticas, que serán fuentes de energía para el crecimiento en metanol de la célula. El formaldehído restante es asimilado para dar lugar a componentes celulares en una vía cíclica que comienza con la condensación del mismo con xilulosa 5-monofosfato (Figura 2.3)



**Figura 2.3. Metabolismo de metanol en *P. pastoris*.** 1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, formaldehído deshidrogenasa; 4, formiato deshidrogenasa; 5, dihidroxiacetona sintasa; 6, dihidroxiacetona quinasa; 7, fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa; 8, fructosa 1,6-bisfosfatasa. Figura tomada de (41).

Existen dos genes codificantes para la alcohol oxidasa en el genoma de la levadura, *AOX1* y *AOX2*. *AOX1* es el responsable de la mayor parte de la actividad alcohol oxidasa en la levadura, y su expresión es controlada a nivel de su transcripción. En presencia de metanol, ~5% del ARN poli(A)+ presente en la levadura corresponde a *AOX1* mientras que es casi indetectable en presencia de otras fuentes de carbono. Por su parte el 30 % de las proteínas solubles es alcohol oxidasa, lo que destaca aún más la potencia de este promotor (41).

### 2.3.2 Vectores de expresión

La expresión de proteínas exógenas en *P. pastoris* requiere de tres pasos básicos: [1] la inserción del gen en un vector de expresión, [2] la integración del vector de expresión con el

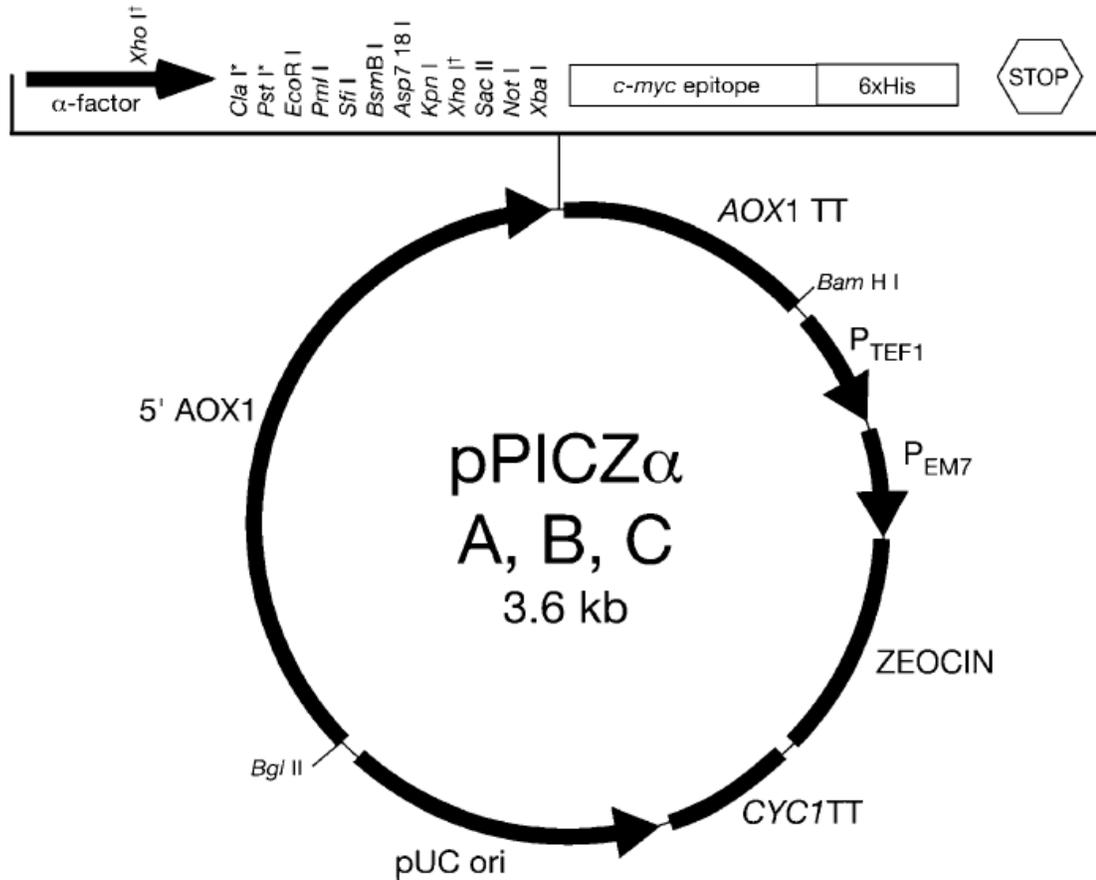
genoma de la levadura y [3] la correcta elección de la cepa a utilizar para expresar la proteína de interés (43).

El principal vector utilizado para *P. pastoris* es un cassette compuesto de una secuencia promotora (generalmente *AOX1*), seguido por el sitio de clonado del gen exógeno, y a continuación una secuencia de terminación transcripcional derivada de *AOX1* que asegure un correcto procesamiento del extremo 3' y la poliadenilación del ARN mensajero resultante. La inserción del gen foráneo, es llevada a cabo generalmente *in vitro* y propagado en *Escherichia coli*, es por eso que todos los vectores de expresión diseñados para *P. pastoris* sirven también para transformar *E. coli*. Para obtener las proteínas de interés como proteínas de secreción y obtenerlas del medio de cultivo, algunos vectores poseen una secuencia señal de secreción  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* al inicio del sitio de clonado que es reconocido por la levadura y escindido al momento de la secreción (43). Como alternativa, si se trata de una proteína que es de secreción, puede utilizarse su señal nativa. Este último es el caso de la HSA.

Si bien todo indica que los promotores implicados en el metabolismo del metanol *AOX1* (principalmente) y *AOX2* son los más indicados para inducir la expresión de proteínas recombinantes, no son los únicos. Existen publicaciones que indican que otros promotores, como el promotor *GAP* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), pueden ser utilizados para expresar proteínas obteniéndose buenos niveles de expresión. Otro ejemplo es el promotor *FLD1* (formaldehído deshidrogenasa) que si bien promueve la expresión de una enzima clave para el metabolismo del metanol, también está involucrada en la protección de la citotoxicidad causada por el formaldehído en el metabolismo de metilamina. Por lo tanto, en este caso la inducción puede realizarse por el agregado de metilamina en lugar de metanol, manteniendo la glucosa o el glicerol como fuentes de carbono. Se ha visto también que los promotores se pueden combinar. Por ejemplo, se ha observado que al combinar los promotores *AOX 1* y *GAP* para la expresión de un factor de estimulación de colonias de macrófagos-granulocitos humano (hGM-CSF) los niveles de expresión se duplicaron (39,40).

El vector más comúnmente utilizado para la expresión en *Pichia pastoris* es el vector pPICZ del cual existen distintas variantes (pPICZ  $\alpha$  A, B o C) dependiendo de la combinación de

enzimas de restricción que contengan, y de contener o no la secuencia  $\alpha$  de secreción de *Saccharomyces cerevisiae* como puede observarse en la figura 2.4.

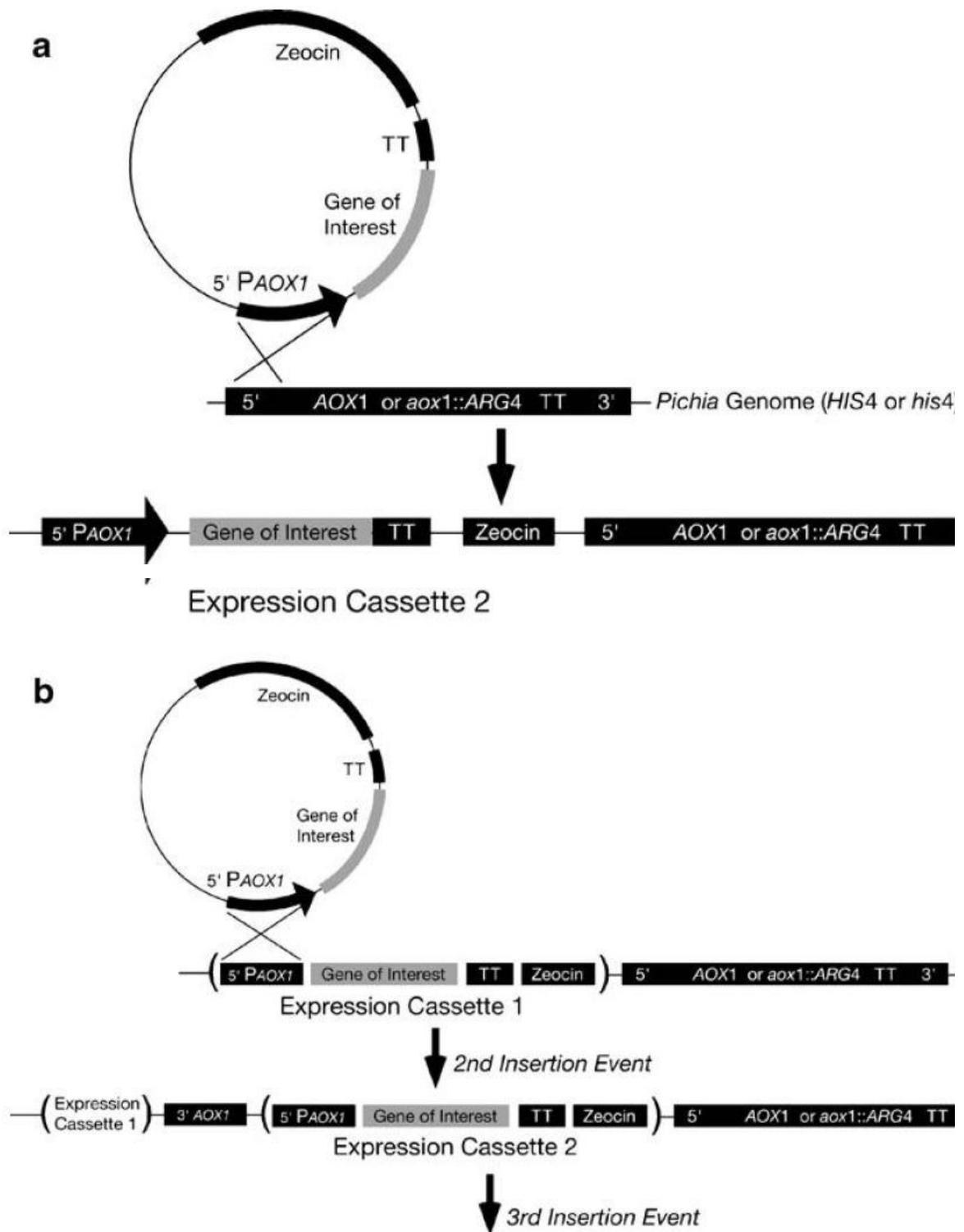


**Figura 2.4. Mapa del vector pPICZ $\alpha$  A, B y C.** Se destacan en el mapa: [1] promotor 5' AOX1, [2] sitio de policlonado, [3] secuencia señal de terminación de transcripción AOX1, [4] promotores TEF1 y EM7, [5] gen de resistencia a la Zeocina, [6] secuencia señal de terminación de transcripción CYC1TT y [7] Origen pUC. Figura tomada de (43).

### 2.3.3 Integración, transformación y selección

Existen tres cepas diferentes de *P. pastoris* que difieren en la capacidad de utilizar metanol como fuente de carbono. La cepa más utilizada es la GS115 (*his4*), que a diferencia de otras como KM71 (*his4 arg4 aox1 $\Delta$ : SARG4*) y MC100-3 (*his4 arg4 aox1 $\Delta$ : SARG4 aox2 $\Delta$ : Phis4*), es salvaje respecto de sus genes AOX1 y AOX2.

No se han diseñado hasta el momento vectores de expresión episomales para *P. pastoris*, es por eso que para expresar proteínas recombinantes el cassette de expresión debe insertarse en el genoma de la levadura. Existen distintos métodos para lograr la inserción del cassette en el genoma de la levadura. El más sencillo, que fue el que se utilizó en este trabajo, consiste en digerir el vector mediante una enzima de restricción a nivel del promotor 5'AOX1 cuidando que la enzima de restricción seleccionada no tenga además sitios de corte en la secuencia codificante para la proteína de interés. Una vez obtenido el vector en forma lineal, se transforma la cepa auxótrofa *his4* GS115 de *P. pastoris*. Luego de la transformación, el vector recombinará con la secuencia del promotor 5'AOX1 del genoma de la levadura. Dado que la secuencia 5'AOX1 del vector linealizado se encuentra en el extremo del cassette, la recombinación se lleva a cabo mediante un único evento de entrecruzamiento, lográndose una mayor eficiencia en el proceso (50–80 % de transformantes His<sup>+</sup>). Existen otros métodos más complejos de inserción del vector al genoma de la levadura, pero que implican, además de una menor eficiencia en el proceso de recombinación, (20%) una interrupción en el gen de la AOX1, recayendo así la transcripción al gen mucho menos eficiente AOX2 para crecer en metanol. Cualquiera sea el método seleccionado para insertar el cassette de expresión en el genoma de la levadura, este puede insertarse en más de una copia (Figura 2.5) generándose así los llamados transformantes multicopia, que serán más eficientes a la hora de expresar la proteína de interés (43).



**Figura 2.5. Mapa de inserción del cassette de expresión al genoma de *P. pastoris*.** [a] Inserción de una sola copia. [b] Inserción de múltiples copias. Figura tomada de (43).

La selección de transformantes suele realizarse por la resistencia al antibiótico Zeocina (Invitrogen). La Zeocina es un antibiótico de la familia de la bleomicina, que actúa generando complejos con iones metálicos tales como cobre o hierro para luego unirse al ADN intercalándose y catalizando la reducción de oxígeno molecular a radicales de oxígeno que generan la ruptura de ADN doble y simple hebra resultando en la muerte celular. Este método de acción la vuelve altamente tóxica para gran variedad de organismos, desde bacterias, pasando por los hongos y levaduras, hasta plantas y líneas celulares de mamíferos. Es por esto que la Zeocina puede utilizarse como marcador tanto para sistemas de expresión bacterianos como para levaduras (45). El vector pPICZA codifica para la expresión de una proteína denominada *Sh Ble*, que se une a la Zeocina impidiendo así que ésta corte la molécula de ADN (46,47).

Por último, una gran ventaja que posee la levadura *Pichia pastoris* sobre otros vectores de expresión, es que esta levadura reconoce la señal de secreción  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*, y en algunos casos incluso la señal de secreción nativa de la proteína que se quiera expresar. Por lo tanto, esto, sumado a que la levadura en sí misma tiene pocas proteínas de secreción, permitiría recoger luego la proteína recombinante del medio de cultivo con bajo nivel de contaminantes, en lugar de tener que realizar una lisis celular.

## 2.4 HSA recombinante

### 2.4.1 Sistemas de expresión

La HSA es actualmente utilizada con diversos fines terapéuticos. Por ejemplo, la HSA es utilizada en tratamientos contra la hipoproteïnemia, eritroblastosis fetal, pérdida de fluidos por quemaduras o shock hemorrágico, entre otros. En las últimas décadas el interés por la HSA en el mercado se ha incrementado en forma notable dada la gran variedad de aplicaciones que tiene la HSA en el ámbito clínico. La HSA comercial es mayoritariamente obtenida de fraccionamiento de plasma de pacientes lo cual se encuentra limitado por las donaciones de sangre de pacientes provenientes de países como India, China o Brasil. Por otra parte, la

manipulación de plasma de pacientes conlleva ciertos riesgos biológicos por la posible presencia de patógenos sanguíneos como el virus de hepatitis B, o de inmunodeficiencia adquirida. Estos factores sumados han impulsado al desarrollo de técnicas que permitan obtener HSA en forma recombinante (rHSA) (40).

Por tratarse de una proteína no glicosilada se han ensayado varios sistemas de expresión para la producción de rHSA. Por un lado se probaron sistemas de microorganismos procariontes y eucariotas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* y *Pichia pastoris*. Sin embargo, la presencia de 17 puentes disulfuro limita la elección a sistemas eucariotas que aseguren la correcta formación de los mismos, y por tanto un correcto plegamiento de la proteína (40,48). Por otra parte, se han realizado también ensayos con animales y plantas transgénicas, obteniéndose en el último caso buenos resultados en trabajos con semillas de arroz debido a su gran capacidad de almacenamiento de proteínas en vacuolas. En este caso, las líneas de plantas de arroz se transforman con un cassette previamente propagado en *Agrobacterium tumefaciens*, y utilizando como marcador de selección la resistencia a los glifosato haciendo a estas líneas de plantas resistentes a estos herbicidas (43,44). En suma, de todos los sistemas evaluados los que resultaron más adecuados fueron la levadura metilotrófica *P. pastoris* y las semillas de arroz.

#### 2.4.2 Propiedades de la HSA recombinante

Diversos estudios realizados en la caracterización de la rHSA han demostrado que no existen diferencias apreciables tanto a nivel estructural como funcional entre la rHSA producida en *P. pastoris* y la HSA obtenida de plasma. Análisis estructurales mostraron que tanto la estructura secundaria como la terciaria y la posición de los 17 puentes disulfuro existentes en la proteína se presentan de forma idéntica respecto de la proteína aislada de plasma. De igual forma, se llevaron a cabo estudios *in vivo* utilizando ratas como modelos biológicos para comprar otros parámetros tales como la vida media, distribución en los tejidos y excreción entre otros resultando todos comparables a los determinados para la proteína obtenida de plasma (45,46).

La utilización de la rHSA fue aprobada en el año 2007, y apenas un año después comenzó a utilizarse con fines terapéuticos en Japón, y ha sido utilizada con éxito en pacientes con cirrosis hepática, shock hemorrágico y síndrome nefrótico entre otras (46,47,48). Por otra parte, dada la gran capacidad de unión a diversas moléculas que presenta la HSA, ésta ha sido objeto de estudio para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas como productos de fusión con diversas proteínas bioactivas (citoquinas, interleuquina 2, factor estimulante de granulocitos entre otras), o drogas. La acumulación de HSA en los tumores sólidos indicaría que sería razonable la utilización de la rHSA para el desarrollo de un sistema de transporte de drogas antitumorales (54).

La producción de rHSA también ofrece varias ventajas en cuanto a los trabajos de investigación en el laboratorio. En primer lugar, estas ventajas se ven directamente reflejadas en los costos, ya que una vez puesta a punto la expresión y purificación de la rHSA esto significaría una fuente inagotable de proteína. Por otra parte, como ya mencionamos la HSA obtenida de plasma presenta una importante heterogeneidad en cuanto a las modificaciones postraduccionales dado que se obtiene de plasma de distintos pacientes. Y por último, pero no menos importante a la hora de caracterizar y analizar las distintas propiedades de la HSA, las técnicas de biología molecular dan lugar a la generación de mutantes, ya sean modificaciones puntuales en determinados aminoácidos que sean de interés, o por ejemplo, la expresión de un único dominio de la proteína por separado. Por todo esto, y sin perder el foco en nuestro interés en caracterizar las propiedades del tiol y sus derivados oxidados, fue que en el marco de este trabajo nos planteamos generar el sistema recombinante en la levadura *Pichia pastoris*.

# 3 Objetivos

## 3.1 Objetivo general

En el presente trabajo se plantea expresar y purificar albúmina humana recombinante (rHSA) utilizando como sistema de expresión la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

## 3.2 Objetivos específicos

1. Optimizar las condiciones de expresión de HSA recombinante en el sistema de expresión *Pichia pastoris*.
2. Poner a punto un método que permita purificar la HSA recombinante.

# 4 Materiales y métodos

## 4.1 Materiales y soluciones

**Materiales.** Inicialmente en los ensayos de expresión se comenzó utilizando la cepa de *Pichia pastoris* GS115-HSAwt previamente transformada por Lucía Turell. Como HSA control se utilizó HSA Sigma (fracción V obtenida de plasma). Para los distintos ensayos de purificación se utilizaron una columna de intercambio iónico Hi Prep DEAE 26/10 (GE-Healthcare), una columna de HiTrap blue (GE-Healthcare) y una columna de exclusión molecular Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 HR (GE-Healthcare).

**Medios de cultivo.** **BMGY** 1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM fosfato de potasio pH 6.0, 1.34% base de nitrógeno de levadura,  $4 \times 10^{-5}$ % biotina, 1% glicerol. **BMMY** 1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM fosfato de potasio pH 6.0, 1.34% base de nitrógeno de levadura,  $4 \times 10^{-5}$ % biotina, 0.5% metanol. **YPD** 1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa (glucosa). **YPD agar** idéntica composición al YPD con 20 g/l de agar. **YPDS agar** 1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % dextrosa, 1 M sorbitol, 2 % agar.

**Equipos utilizados.** Las medidas espectrofotométricas fueron realizadas en un espectrofotómetro Varian Cary 50 UV-visible. Para los distintos ensayos cromatográficos, se utilizó el FPLC AKTA – prime plus GE Healthcare. Por último, para transformar las levaduras se utilizó un electroporador Gene Pulser XCell de Biorad.

## 4.2 Expresión de HSA recombinante

### 4.2.1 Trabajo previo

Previo a comenzar el trabajo presentado en esta tesis, la secuencia codificante para la HSA fue obtenida de un cultivo de hepatocarcinoma humano (HepG2). Se realizó la extracción de ARN total y mediante retrotranscripción con cebadores específicos se obtuvo el ADNcopia (ADNc) para la HSA. El ADNc fue en primera instancia introducido al vector pGEM-T y propagado en *Escherichia coli*, para luego ser escindido e insertado en el vector de expresión pPICZA con el que finalmente por electroporación se transformó la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. De esta transformación se seleccionaron los clones 9 y 16 por presentar mayor resistencia a Zeocina (16).

### 4.2.2 Puesta a punto de la expresión

En este trabajo se comenzó inoculando 25 ml de medio BMGY con los crioinóculos previamente obtenidos el cual se incubó en agitación a 30 °C hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 2-6. Una vez alcanzada, se centrifugó el medio y las levaduras se resuspendieron en 100 ml de medio BMMY que contiene 0.5 % de metanol en lugar de glicerol dando lugar al comienzo de la inducción que luego se mantuvo durante 96 h agregando metanol 0.5 % cada 24 h. Los niveles de expresión fueron evaluados en el sobrenadante del medio de cultivo por SDS-PAGE.

En ensayos posteriores nos propusimos tener un control más estricto del crecimiento celular en las distintas etapas de la expresión, disminuyendo así la lisis celular y por consiguiente disminuyendo también los niveles de contaminación del sobrenadante. Con este fin se agregaron dos pasos previos. En primera instancia partiendo de los crioinóculos se sembraron placas de YPD agar con 100 µg/µl de Zeocina y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Luego con las colonias obtenidas se inocularon 5 ml de medio líquido de YPD y se incubaron

durante 6-7 h a 30 °C. Posteriormente se inocularon los medios BMGY con el volumen necesario para obtener una absorbancia inicial a 600 nm de 0.031. Este valor se desprende de cálculos realizados con el tiempo de duplicación observado de 2.5 h en las condiciones de incubación establecidas, de forma que al incubar el medio toda la noche, a primera hora del día siguiente (aproximadamente 17 h de incubación – 7 tiempos de duplicación) los mismos tengan una absorbancia aproximada a 600 nm de 4 UA, valor recomendado por la bibliografía (46). Por otra parte, de esta manera nos aseguramos también que todos los medios BMGY partieran con la misma cantidad de células, y que se encontraran en fase de crecimiento exponencial. Una vez alcanzada dicha absorbancia, se procedió a cambiar el medio a BMMY como se realizó anteriormente.

## **4.3 Purificación**

En todos los casos, cumplidas las 96 h de expresión los medios de cultivos fueron centrifugados por 5 minutos a 3.000 g precipitando las células y obteniendo entonces el medio de cultivo donde se esperaba encontrar la rHSA expresada. A excepción del ensayo de purificación por sulfato de amonio, en el resto de los casos al sobrenadante obtenido se lo llevó a 60% de saturación de sulfato de amonio para luego centrifugarlo durante 30 minutos a 12.000 g y 4 °C para eliminar así algunos componentes del medio.

### **4.3.1 Precipitación con sulfato de amonio**

Una vez centrifugado el medio de cultivo (~300 ml), el sobrenadante se llevo a 40 % de saturación de sulfato de amonio y se centrifugó por 30 minutos a 9.300 g y 4 °C. Al precipitado se lo resuspendió en agua destilada y se conservó para luego correr un SDS-PAGE. Al sobrenadante se lo llevó a 60 % de saturación de sulfato de amonio, se colocó en baño de hielo y se ajustó el pH a 4.4 minimizando así las cargas de la proteína para luego centrifugarlo durante 30 minutos a 12.000 g y 4 °C (50). Finalmente el precipitado se resuspendió en la menor cantidad posible de agua destilada (aproximadamente 30 ml) y se realizó una

electroforesis SDS-PAGE con las distintas fracciones obtenidas en los distintos pasos. Las alícuotas correspondientes a los sobrenadantes de ambas precipitaciones se pasaron dos veces previo a la electroforesis por micro columnas de gel filtración (Sephadex G-25, GE Healthcare) previamente equilibradas con agua destilada para eliminar el sulfato de amonio.

#### 4.3.2 Cromatografía de intercambio iónico

Al precipitado obtenido anteriormente en la precipitación a 60 % de saturación de sulfato de amonio se agregaron 75 ml de amortiguador Tris 20 mM, pH 7.2, llegando a un volumen final de aproximadamente 100 ml. La muestra se aplicó en una columna Hi Prep DEAE (GE-Healthcare) previamente equilibrada con el mismo amortiguador utilizando una bomba peristáltica. Luego la columna fue conectada al AKTA y se lavó con 200 ml de amortiguador a un flujo de 5 ml/min. Luego se realizó un gradiente de 0 a 100 % de amortiguador Tris 20 mM, pH 7.2, 1 M NaCl en 40 min recogiendo el eluido en fracciones de 1 ml que se analizaron luego por SDS-PAGE.

#### 4.3.3 Cromatografía de afinidad

El precipitado obtenido en la precipitación a 60 % de saturación de sulfato de amonio se resuspendió en la menor cantidad de agua destilada posible (aproximadamente 30 ml) y se dializó 48 h contra agua y 24 h contra amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.2. La muestra luego se concentró mediante la utilización de centricones con un paso límite de 10kDa hasta obtener un volumen menor o igual a 5 ml para facilitar el sembrado en la columna. Una vez concentrada, se aplicó en una columna HiTrap blue (GE-Healthcare) previamente equilibrada con el mismo amortiguador y se lavó durante 40 minutos con el mismo amortiguador a un flujo de 1 ml/min. La elución se llevó a cabo mediante un salto a 66 % de amortiguador fosfato 20 mM, pH 7.2, 3 M NaCl recogiendo el eluido en fracciones de 1 ml que se analizaron luego por SDS-PAGE.

#### 4.3.4 Cromatografía de exclusión molecular

En este caso en particular se analizó la fracción no unida (FNU) de la cromatografía de afinidad. La muestra se concentró previamente hasta reducirla a un volumen de 1 ml y se aplicó en una columna Hi Prep 16/60 Sephacryl S-200 HR previamente equilibrada con amortiguador fosfato 50 mM, pH 7.2, 0.15 M NaCl. La corrida continuó luego con el mismo amortiguador a un flujo de 1 ml/min durante 2 h recogiendo el eluido en fracciones de 1 ml que se analizaron luego por SDS-PAGE.

### **4.4 Eliminación del propéptido y transformación de la cepa GS115 con el plásmido pPICZA-HSA $\Delta$ pp**

Para la eliminación de la secuencia aminoacídica que codifica para el propéptido se diseñaron los cebadores, (Tabla 5.13) uno complementario a la primera porción de la secuencia codificante para la HSA madura (DelF – cebador directo) y el otro complementario e inverso a la secuencia codificante para el propéptido de secreción (DelR – cebador reverso) de manera de flanquear la secuencia que codifica al propéptido y amplificar así la totalidad del vector excluyendo únicamente esa región.

La eliminación del propéptido se realizó mediante un ensayo de reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando 42.5 ng de ADN (pPICZA-HSAwt), 1  $\mu$ l de la enzima polimerasa Pfu y los cebadores DelF y DelR. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial 30 segundos a 95°C, seguido por 20 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 1 minuto a 55 °C y 5 minutos y medio a 68°C. Finalmente una etapa de extensión final de 7 minutos a 68 °C. La presencia del producto amplificado fue evaluado mediante geles de agarosa 0.8 % utilizando el intercalante GelRed como revelador.

Luego de confirmar la presencia de un fragmento de tamaño esperado en el gel de agarosa, se ligó el producto de amplificación mediante la utilización de la enzima T4 ligasa y su secuencia se confirmó en el Servicio de Secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo.

El vector obtenido se propagó transformando la cepa quimiocompetente XL-1 blue de *E.coli* y la realización de minipreparaciones de ADN. Una vez propagado, el plásmido fue linealizado con la enzima Pmel.

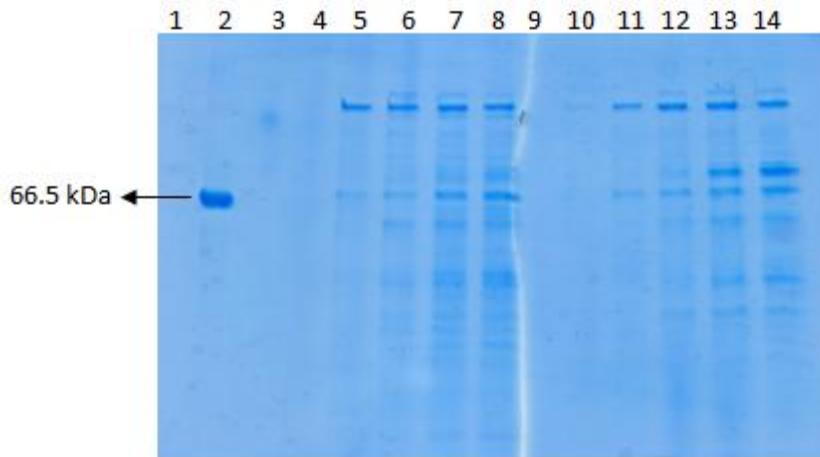
Se utilizó nuevamente la cepa de *Pichia pastoris* GS115, His<sup>-</sup>, Mut<sup>+</sup> (Invitrogen). La transformación se realizó por electroporación siguiendo las indicaciones del kit EasySelect *Pichia* Expression kit de Invitrogen (46) y utilizando el programa para *Pichia* del electroporador Gene Pulser XCell de Biorad. Los transformantes se seleccionaron sembrando distintos volúmenes (10, 25, 50, 100 y 200 µl) en placas de YPDS agar utilizando Zeocina (100 µg/ml) como marcador y se incubaron durante 6 días a 30 °C. Las colonias de transformantes obtenidas fueron luego sembradas en una nueva placa de YPD agar, esta vez con una mayor concentración de Zeocina (1 mg/ml) y se incubaron durante 72 h a 30 °C para seleccionar así los transformantes multicopia (cuanto mayor sea el número de copias del vector introducidas por la levadura, mayor será la resistencia al antibiótico).

# 5 Resultados y discusión

## 5.1 Expresión

Partiendo de los clones 9 y 16 de *Pichia pastoris* que habían sido transformadas previamente con un vector de expresión que contiene la secuencia codificante de HSA (ver 4.2.1) se realizó un primer ensayo de expresión. Al evaluar el sobrenadante del medio de cultivo por SDS-PAGE se observó una proteína de 66 kDa cuya expresión aumentó con el tiempo de inducción alcanzando los valores máximos a las 72-96 h. Mediante tripsinización y espectrometría de masas en el Servicio de espectrometría de masa del Institut Pasteur de Montevideo, se comprobó que se trataba de rHSA (16).

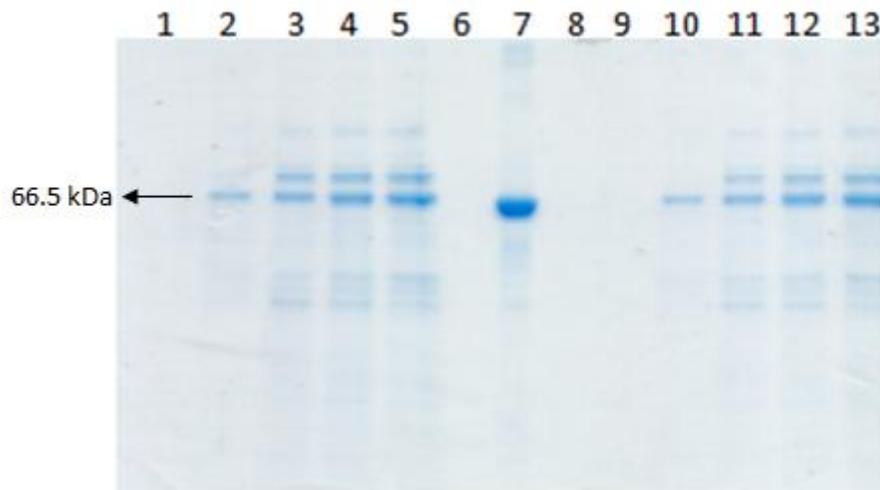
Desde ese momento se continuó trabajando en la puesta a punto de la expresión utilizando los clones 9 y 16. Las expresiones se llevaron a cabo durante 96 h de inducción agregando metanol 0.5 % y guardando una alícuota del medio de cultivo cada 24 h. Cumplidas las 96 h de inducción, los niveles de expresión se controlaron por SDS-PAGE (Figura 5.1).



**Figura 5.1. SDS-PAGE de los distintos tiempos de inducción para los 2 clones seleccionados. Carril 2: HSA control; 4: t = 0 h clon 9; 5: t = 24 h clon 9; 6: t = 48 h clon 9; 7: t = 72 h clon 9; 8: t = 96 h clon 9; 9: vacío; ; 10: t = 0 h clon 16; 11: t = 24 h clon 16; 12: t = 48 h clon 16; 13: t = 72 h clon 16; 14: t = 96 h clon 16.**

En los sucesivos ensayos de expresión se pudo evidenciar que el patrón de bandas de las proteínas contaminantes en el sobrenadante del medio de cultivo era comparable al observado al sembrar una muestra de lisis celular (dato no mostrado). Se observó también una correlación entre la  $Abs_{600}$  alcanzada en cada caso el medio BMGY (previo a la inducción con metanol) y la cantidad de contaminación que se observaba en los geles, lo que nos llevó a atribuir el alto nivel de contaminación observado en algunos casos a la lisis celular y liberación de proteínas al medio. Fue entonces que decidimos agregar un paso adicional a los ensayos de expresión buscando poner a punto el proceso y minimizar de esta forma la contaminación final por lisis celular. Buscando optimizar las condiciones de crecimiento de las células en el medio BMGY, partimos entonces de allí en más de colonias aisladas en placas de YPD, inoculando con ellas 5 ml de medio YPD líquido durante 6 - 8 h a 30°C con agitación a 185 rpm. Previamente se calculó el tiempo de duplicación de la levadura en las condiciones establecidas de incubación resultando el mismo en 2.5 h. Por lo tanto, buscando obtener una  $Abs_{600}$  entre 2 – 6 luego de incubar el medio BMGY durante toda la noche (~ 17 h) se inoculó con la cantidad suficiente del

cultivo YPD para lograr una  $Abs_{600}$  inicial de 0.031 UA. Como se puede observar en la Figura 5.2, se logró disminuir considerablemente el nivel de contaminación al cabo de las 96 h de expresión. En este caso se realizó el ensayo de expresión por duplicado con el clon 9.



**Figura 5.2. Optimización de las condiciones de expresión. Carril 1-5:** t = 0 a 96 h clon 9, matraz a; **7:** HSA control; **9-14:** t = 0 a 96 h clon 9, matraz b.

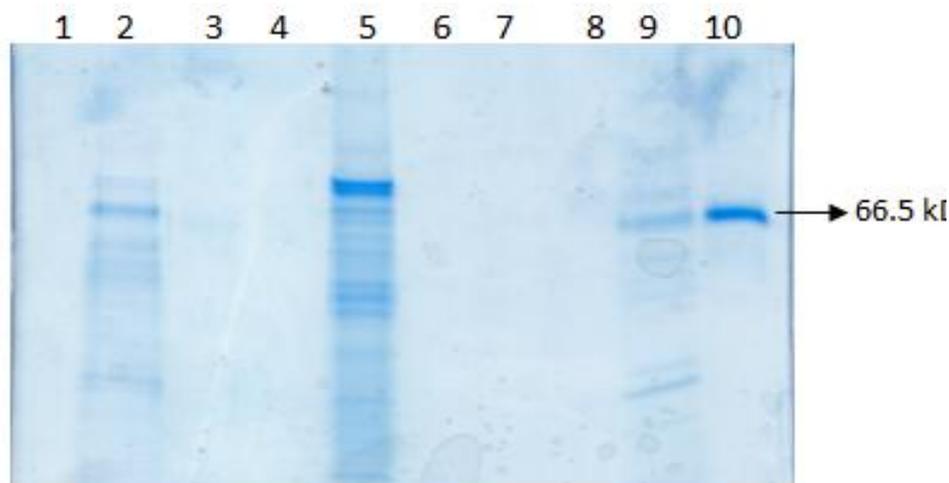
## 5.2 Purificación

En esta instancia, considerando ciertas características particulares de la HSA y los datos publicados en trabajos previos sobre expresión y purificación de rHSA en *P. pastoris* (50), nos propusimos ensayar diversas técnicas con el fin de poner a punto alguna que nos permita purificar la rHSA obtenida.

### 5.2.1 Precipitación con sulfato de amonio

En una primera instancia, nos propusimos purificarla mediante dos precipitaciones a 40 y 60 % de saturación de sulfato de amonio. En este ensayo se esperaba que las proteínas

contaminantes precipitaran a un porcentaje de saturación inferior a la HSA, obteniendo entonces la rHSA pura en la segunda precipitación (60 % de saturación con sulfato de amonio). Como se puede observar en la Figura 5.3, en la segunda precipitación donde se esperaba obtener la rHSA pura, se logró eliminar solo parcialmente parte de las proteínas contaminantes y se perdió algo de rHSA en la primera precipitación, otras precipitaron conjuntamente con la rHSA (carril 9). Al no obtener los resultados esperados, decidimos continuar y probar otros métodos de purificación, de todas formas, se mantuvo el paso de precipitación a 60 % de saturación con sulfato de amonio como una etapa previa de preparación de la muestra para separar las proteínas del resto de los componentes del medio de cultivo.

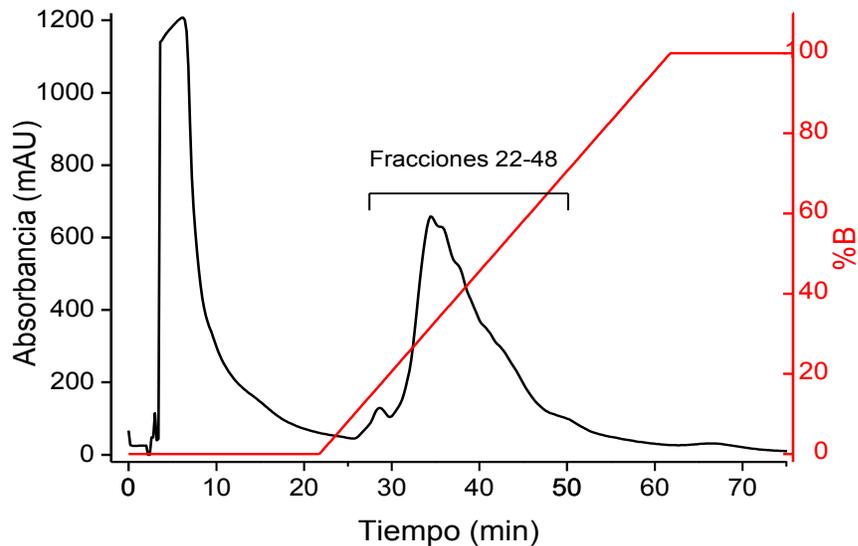


**Figura 5.3. SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas luego de la precipitación con distintos porcentajes de saturación de sulfato de amonio. Carril 2:** sobrenadante del medio de cultivo luego de 96 h de inducción; **3:** sobrenadante 40% de saturación con sulfato de amonio; **5:** precipitado 40% de saturación con sulfato de amonio, resuspendido; **7:** sobrenadante 60% de saturación con sulfato de amonio; **9:** precipitado 60% de saturación con sulfato de amonio, resuspendido; **10:** HSA control.

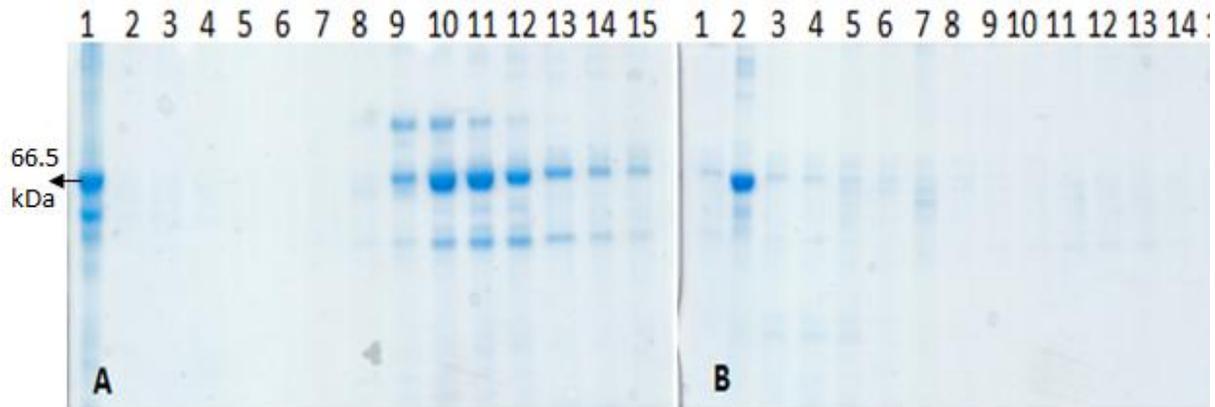
### 5.2.2 Cromatografía de intercambio iónico

En esta oportunidad, considerando el bajo punto isoeléctrico ( $pI = 4.7 - 5.8$ ) y que a pH neutro la proteína presenta ~19 cargas negativas intentamos purificar la rHSA mediante una

cromatografía de intercambio aniónico. Con este objetivo se utilizó una resina Hi Prep DEAE (GE-Healthcare) previamente equilibrada con amortiguador Tris 20 mM, pH 7.2. La elución se llevó a cabo realizando un gradiente en 200 ml a un flujo de 5 ml/min, hasta 100 % con amortiguador Tris 20 mM, pH 7.2, 1 M NaCl. Como se puede observar en la Figura 5.4, en la cromatografía no se obtuvieron picos definidos correspondientes a la elución de distintas proteínas a medida que las interacciones se fueran debilitando a causa del aumento de la fuerza iónica. Se obtuvo un pico inicial antes de comenzar, y luego al realizar el gradiente se obtuvo un pequeño pico que se continúa con un único pico de gran amplitud donde eluirían todas las proteínas que hayan quedado retenidas en la resina. Al realizar la electroforesis SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas (Figura 5.5), se observó que la fracción donde se encontró la rHSA también contenía otras proteínas contaminantes por lo que tampoco resultó efectivo este método de purificación.



**Figura 5.4. Cromatograma de intercambio aniónico** Se sembraron 80 ml de muestra en una columna DEAE-Sephadex previamente equilibrada con amortiguador de inicio (Tris 20 mM, pH 7.2). La elución se llevó a cabo con un gradiente al 100% de amortiguador de elución (Tris 20 mM, pH 7.2, 1 M NaCl) con un flujo de 5 ml/min. Se registró la absorbancia a 280 nm (trazo negro) y el % de amortiguador de elución (trazo rojo).



**Figura 5.5. SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas en la cromatografía de intercambio aniónico. Gel A. Carril 1: HSA control; 2: fracción no unida; 3 – 15: fracciones 22 a 34; Gel B. 1: fracción 35; 2: HSA control; 3 – 15: fracciones 36 a 48.**

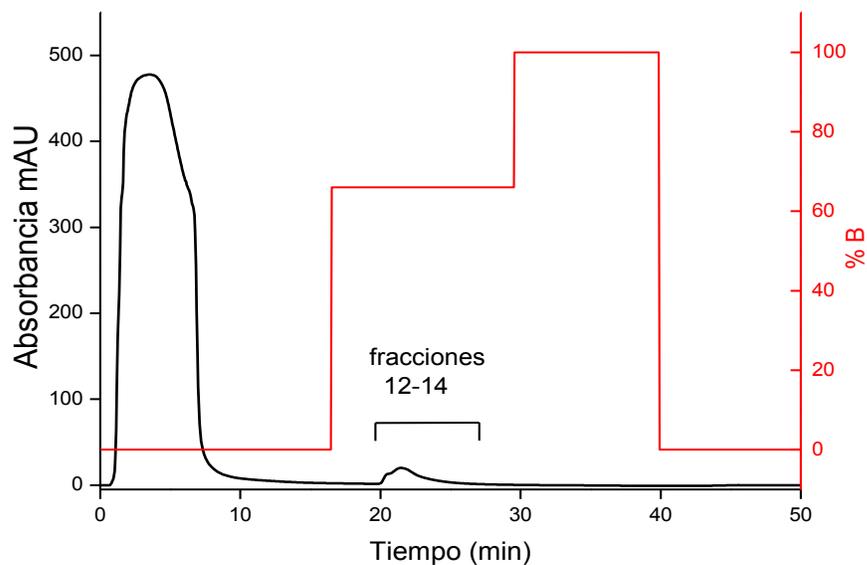
Como puede observarse en la Figura 5.5, pese a lo ancho del pico de la fracción no unida, en el gel de SDS-PAGE no se observa ninguna proteína en el carril correspondiente. Como veremos luego, esa absorbancia se la atribuimos a un componente de bajo peso molecular de color amarillo, no proteico y de menor peso molecular que no se registra en los geles ya que escapa de los mismos junto con el frente de corrida.

Si bien esta técnica da lugar a evaluar modificaciones que permiten ajustar las condiciones de corrida para poner a punto el sistema, decidimos seguir adelante y probar un tercer método de purificación mediante una técnica de cromatografía de afinidad comúnmente utilizada para la purificación de HSA.

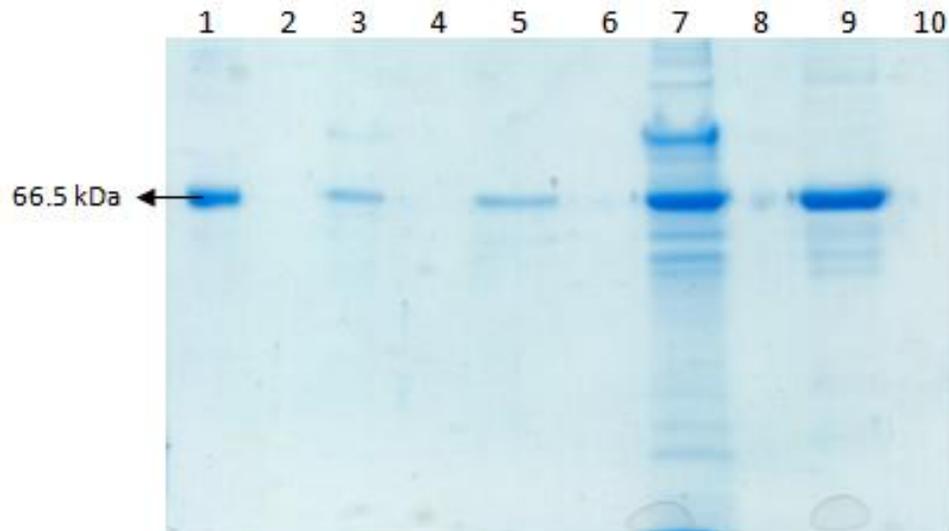
### 5.2.3 Cromatografía de afinidad

En este ensayo se utilizó una resina de sefarosa derivatizada con grupos Cibacrón blue F3GA que se sabe interaccionan con el sitio Sudlow I ubicado en el subdominio IIA al igual que la bilirrubina (2). Por lo tanto esperábamos que la rHSA (previamente dializada en primera instancia contra agua dializada, y posteriormente contra el amortiguador de inicio) quedara retenida en la columna al interaccionar con los grupos de Cibacrón separándose así de las

proteínas contaminantes que eluirían en la fracción no unida. Varios trabajos publicados utilizan esta técnica como método de purificación tanto de rHSA completa como de la expresión de sus tres dominios por separado (el principal sitio de unión al cibacrón es el Sudlow I, pero no es el único) (40,55). En nuestro caso, como se observa en la Figura 5.6, solo una pequeña fracción (fracciones 12-14) de la rHSA expresada interacciona con la resina eluyendo al realizar un salto a 2 M NaCl, coeluyendo la mayor parte en la fracción no unida junto a las proteínas contaminantes como se puede observar en la Figura 5.7.

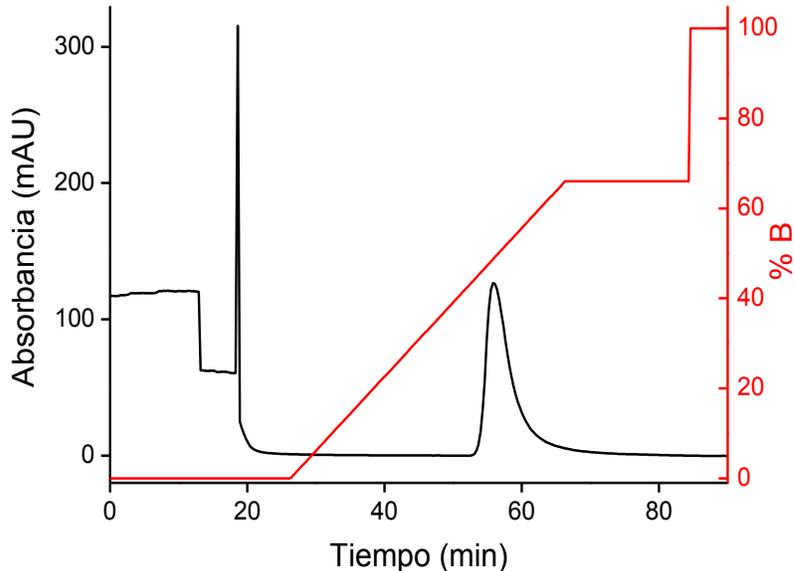


**Figura 5.6. Cromatografía de afinidad.** Se sembraron 5ml en una columna **HiTrap blue** previamente equilibrada con amortiguador de inicio (fosfato 20 mM, pH 7). La elución se llevó a cabo mediante un salto a 66% de amortiguador de elución (fosfato 20 mM, pH 7, 3 M NaCl) a un flujo de 1 ml/min. Se registró la absorbancia de las distintas fracciones a 280 nm (trazo negro) y el % de amortiguador de elución (trazo rojo). La llave indica la fracción de rHSA que interaccionó con la resina.



**Figura 5.7. SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas. Carril 1:** HSA control; **3:** fracción no unida; **5:** fracciones 12-14; **7:** fracción no unida concentrada; **9:** fracciones 12-14 concentradas.

Para comprobar que la columna funcionara correctamente, el primer paso a seguir luego del resultado no esperado fue realizar una nueva cromatografía pero esta vez sembrando en la columna una solución con HSA Sigma para descartar de esta forma algún inconveniente propio del sistema. En este caso la HSA interaccionó de la forma esperada con la resina eluyendo al realizar, en este caso, un gradiente a 2M NaCl como se puede observar en la Figura 5.8.



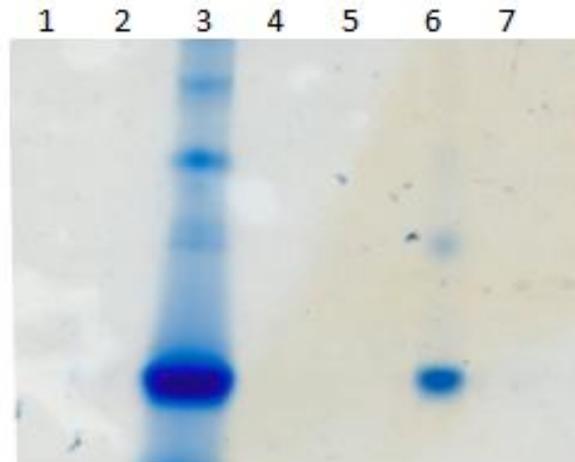
**Figura 5.8. Cromatografía de afinidad con HSA Sigma.** Se sembraron 20 mg de en una columna HiTrap blue previamente equilibrada con amortiguador de inicio (fosfato 20 mM, pH 7). La elución se llevó a cabo con un gradiente a 66 % de amortiguador de elución (fosfato 20 mM, pH 7, 3 M NaCl) en un flujo de 1 ml/min. Se registro la absorbancia de las distintas fracciones a 280 nm (trazo negro) y el % de amortiguador de elución (B) (trazo rojo). Flujo 1 ml/min.

Ante la controversia que nos marcaron los resultados obtenidos al no lograr que la rHSA interaccione con la resina de cibacrón blue, nos planteamos algunas posibles hipótesis que pudieran explicar los resultados obtenidos.

1. **La rHSA expresada tiene moléculas de bajo peso molecular unidas que impiden que la misma interaccione debidamente con la resina.** Si bien esta hipótesis parecería ser poco probable dado que la muestra se dializa durante 72 h en los pasos de preparación previos a la cromatografía, realizamos 3 controles antes de descartarla. En primer lugar se llevó a cabo el proceso de deslipidación utilizando carbón activado (56) que se realiza en los trabajos con HSA comercial obtenida de plasma y volvimos a realizar la cromatografía de afinidad. Nuevamente la mayor

parte de la rHSA eluyó en la fracción no unida (datos no mostrados), Posteriormente, se realizó un cultivo bajo las mismas condiciones que se hizo con la cepa GS115-HSAwt, pero en esta oportunidad se utilizó la cepa GS115 sin transformar. Mediante observaciones de las intensidades de las bandas del gel de expresión, estimamos que la cantidad final obtenida de rHSA es de aproximadamente 4 mg. Por lo tanto, para mantener las condiciones en las que se obtiene la rHSA, se agregó diariamente 1 mg HSA comercial al medio de cultivo hasta alcanzar a las 96 h aproximadamente la misma cantidad que se obtuvo de los ensayos de expresión anteriores. Nuevamente, y manteniendo todos los pasos de preparación previa antes mencionados, se realizó una cromatografía de afinidad y en esa oportunidad la HSA comercial interaccionó correctamente con la resina. En suma, ambos controles descartan la hipótesis planteada de que la rHSA pueda tener algún componente del medio de cultivo fuertemente unido impidiendo la interacción del sitio I con las moléculas de Cibacrón (datos no mostrados).

2. **Plegamiento incorrecto de la rHSA.** Nuevamente esta hipótesis parecería poco probable dada la gran estabilidad en solución que presenta la rHSA, siendo soluble a altos porcentajes de saturación de sulfato de amonio, e incluso en las condiciones extremas como el bajo pH al que se la sometió durante el proceso de deslipidación. De todas formas, realizamos una electroforesis nativa (no desnaturizante, no reductora con un 8% de acrilamida) esperando ver alguna diferencia en la migración de la fracción no unida respecto de la HSA comercial considerando que en esta técnica las proteínas migran según su relación  $z/r$  (carga sobre radio). Como se observa en la Figura 5.9, no se observaron diferencias, no habiéndose obtenido entonces evidencia de que la rHSA pudiera estar mal plegada. Otras técnicas podrían emplearse para analizar la hipótesis planteada como dicróismo circular y procedimientos de desnaturización y replegado. No obstante, se destaca el excelente comportamiento de la HSA en electroforesis nativa que hace que ésta sea una alternativa para el análisis de muestras de HSA.



**Figura 5.9. Electroforesis nativa (8% acrilamida, no desnaturalizante y no reductora). Carril 3: HSA control; 6: fracción no unida.**

- 3. Introducción de modificaciones postraduccionales por parte de la levadura.** Una tercera hipótesis sobre posibles modificaciones postraduccionales que pudiera estar introduciendo la levadura fue evaluada mediante el análisis de los péptidos obtenidos mediante tripsinización y espectrometría de masas. El análisis se basó en comparar el patrón de péptidos registrados para cada muestra, la HSA Sigma, la rHSA obtenida en la fracción no unida y la rHSA obtenida en la fracción unida de la cromatografía de afinidad. De esta forma esperábamos ver si existía o no alguna diferencia tanto entre las distintas muestras de rHSA como de cada una de estas respecto de la HSA Sigma. Al no encontrarse diferencias mayores tanto en el patrón de los péptidos obtenidos de cada muestra como en posibles modificaciones postraduccionales sufridas tanto entre las muestras de rHSA como de estas respecto la HSA control, descartamos esta hipótesis. De todas maneras, debe tenerse en cuenta que la cobertura de péptidos en el análisis por espectrometría de masa no fue completa sino que la misma rondó en el 25-30 % de la secuencia primaria. Se analizó también la proteína contaminante de aproximadamente 45 kDa que coeluye junto a la rHSA en todos los métodos de purificación ensayados (la banda puede observarse en todos los geles realizados luego de los distintos ensayos d

purificación. El tamaño fue confirmado en la figura 5.11), y resultó ser una forma trunca en el extremo amino terminal de HSA.

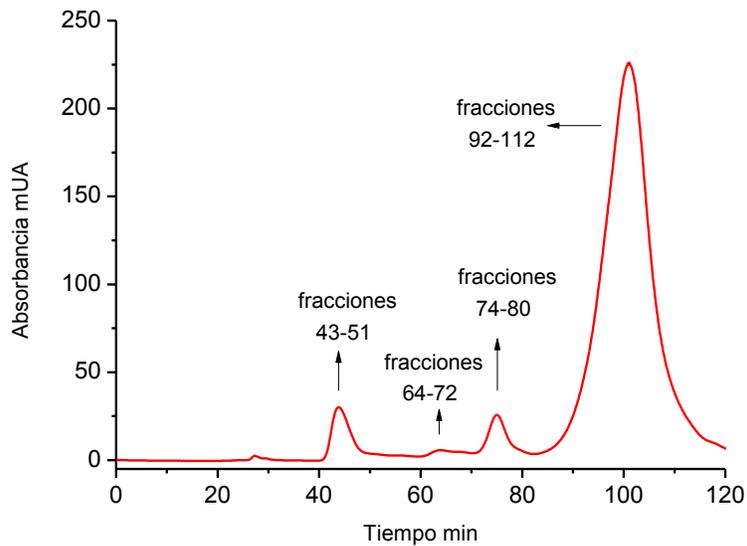
4. **Procesamiento incorrecto del propéptido por parte de la levadura.** La HSA sintetizada en el hígado *in vivo* posee en su secuencia aminoacídica un prepéptido señal de secreción y un propéptido de apenas 6 aminoácidos, ambos escindidos al momento de secretarse al torrente sanguíneo. Es sabido que la levadura procesa correctamente el prepéptido de secreción, pero no hay certeza de que lo mismo ocurra con el propéptido (41). Nuestra secuencia codificante al haber sido obtenida por retrotranscripción de una extracción de ARN total de un cultivo de hepatocarcinoma humano, posee tanto la secuencia que codifica para el prepéptido como para el propéptido. Dado su pequeño tamaño y la presencia de una arginina en la sexta posición (Figura 5.10), no fue posible detectar la presencia del mismo por tripsinización y espectrometría de masas. Por lo tanto nos propusimos eliminar el propéptido de la secuencia codificante ya que existen trabajos publicados que sugieren que esta secuencia no se encuentra presente en la elaboración de los vectores utilizados para transformar las levaduras con HSA (50). Este proceso se detalla paso a paso en la sección 5.3.

```
3' MKWVTFISLLFLSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQY
LQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETY
GEMADCCAKQEPERNECFHQKDDNPNLPRPVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK
KYLIEIARRHPYFYAPPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAAACLLPKLDELDEGKAS
SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPAEFAEVSKLVTDLTKVHTECC
HGDLLCADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPAD
LPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLLRLAKTYETT
LEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRY
TKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHE
KTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKER
QIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKKL
VAASQAALGL 5'
```

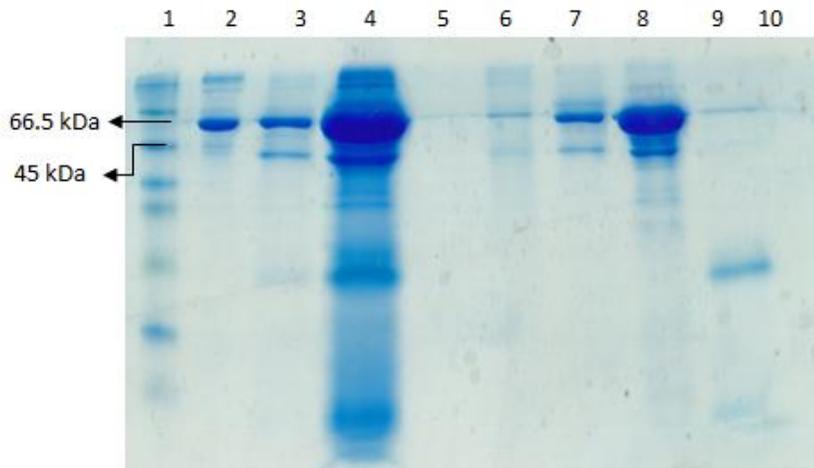
**Figura 5.10. Secuencia aminoacídica de la preproalbúmina.** Se observa en color rojo, la secuencia del péptido señal de secreción. En verde, la secuencia del propéptido y en color negro, la secuencia de la HSA madura circulante.

#### 5.2.4 Cromatografía de exclusión molecular

En los sucesivos ensayos de expresión y purificación que realizamos observamos que la muestra posee un color amarillo que persiste durante todos los pasos de preparación de la muestra previos a las cromatografías de afinidad. Pudimos observar también que dicho componente de color amarillo posee un peso molecular de aproximadamente 10 kDa, dado que tanto durante la diálisis como en las instancias de concentración de la muestra donde se utilizan membranas con un paso límite de 10 kDa algo de éste atraviesa las membranas observándose un color amarillo tanto en la solución de la diálisis como el filtrado resultante de la concentración. Observamos también que en las corridas de electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras, dicho componente de color amarillo corre separado de la rHSA. Por último, comprobamos mediante espectrometría de masas que no se trata de un componente proteico. Por otra parte, la fracción de rHSA que sí interactúa con la resina de cibacron es incolora al eluir. Por lo tanto nos propusimos realizar una cromatografía de exclusión molecular para comprobar que este componente de color amarillo no se encuentre unido a la rHSA impidiendo entonces la interacción de esta con la resina. Como se observa en la Figura 5.11, se obtuvieron 4 picos separados en la cromatografía. Como se puede observar en la Figura 5.12, la rHSA que eluyó en las fracciones 74-80, mientras que el componente de color amarillo eluyó en el volumen total de la columna (las fracciones 92 – 112 tenían color amarillo).



**Figura 5.11. Cromatografía de exclusión molecular.** Se sembró 1 ml de muestra en una columna HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR previamente equilibrada con amortiguador fosfato (50 mM, pH 7.2, 0.15 M NaCl) La corrida se llevó a cabo con un flujo de 1 ml/min. Se registró la absorbancia de las distintas fracciones a 280 nm.



**Figura 5.12. SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular.** Carril 1: MPM; 2: HSA control; 3: resuspendido del precipitado a 60 % de saturación de sulfato de amonio dializada; 4: resuspendido del precipitado a 60 % de saturación de sulfato de amonio dializada concentrada; 6: fracciones 43-51; 7: fracciones 64-72 concentradas; 8: fracciones 74-80 concentradas; 9: fracciones 92-112 concentradas.

Por otra parte, obtuvimos mediante esta técnica una única proteína contaminante, que a su vez, un análisis de la misma mediante tripsinización y espectrometría de masas mostró que la misma se trata de un fragmento de rHSA trunca en el extremo amino terminal de aproximadamente 45 kDa expresada por la levadura. Por lo tanto, obtuvimos finalmente mediante esta técnica, el mayor grado de pureza hasta el momento.

## 5.3 Eliminación del propéptido

Como se mencionó en la sección 5.2.3, una de las posibles hipótesis que nos planteamos de porque la rHSA no interacciona correctamente con la resina de cibacrón, es que el propéptido de 6 aminoácidos que se encuentra entre el propéptido de secreción (escindido por la levadura al momento de secretar la rHSA al medio de cultivo) y la secuencia madura de la HSA no sea correctamente procesado por la levadura, y entonces su presencia impida de alguna forma la interacción de las moléculas de cibacrón con el sitio Sudlow I. Como no fue posible detectarlo por tripsinización y espectrometría de masas, nos propusimos eliminar directamente la secuencia que codifica para el propéptido en vector clonado pPICZA-HSAwt y transformar nuevamente la cepa GS115 con un nuevo vector pPICZA-HSA $\Delta$ pp, idéntico al vector anterior, pero sin las 18 bases que codifican para los 6 aminoácidos que comprenden el propéptido.

En esta etapa se contó con la colaboración del Magister Ignacio López y la Dra. Mónica Marin, de la Sección Bioquímica y Biología Molecular Facultad de Ciencias.

### 5.3.1 Eliminación de la secuencia que codifica al propéptido

En esta instancia, se eliminó la secuencia codificante para el propéptido de 6 aminoácidos, mediante la utilización de cebadores específicos y utilizando como molde el vector pPICZA-HSAwt. Para esto hubo que diseñar dos cebadores, un complementario a la secuencia del propéptido de secreción (DelR) , y otro complementario a la primera porción de la secuencia que codifica para la HSA madura (DelF). De esta forma se amplificó todo el

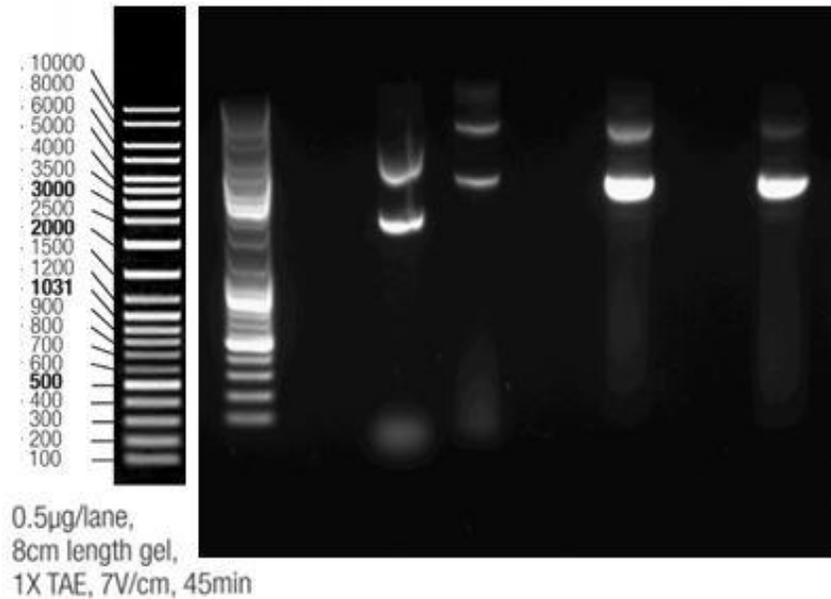
vector sin la secuencia codificante al propéptido. Los cebadores diseñados para este paso, así como los cebadores utilizados para la secuenciación se muestran en la Tabla 5.13.

**Tabla 5.13. Cebadores utilizados en los distintos ensayos.** \*adquiridos en SBS Genetech, Beijing, China. \*\* adquiridos con el kit invitrogen EasySelect™ *Pichia* Expression Kit(46).

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Ensayo
*DeIR	GGAATAAGCCGAGCTAAAGAGAAAAAGAA GGG	Delección propéptido
*DeIF:	GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGG	Delección propéptido
*HSAEcoRI F	CGCGAATTCATGAAGTGGGTAACC	secuenciación
*HSASqR1	AGTAAGGATGTCTTCTGGC	Secuenciación
**AOX1 5'	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Secuenciación
**AOX1 3'	TACTATTGCCAGCATTGCTGC	Secuenciación

Con estos cebadores se realizó una PCR utilizando como molde el plásmido GS115-HSAwt y la enzima polimerasa Pfu. Posteriormente, al producto obtenido de PCR, se lo ligó mediante la utilización de la enzima T4 ligasa y se confirmó mediante secuenciación, que efectivamente se hubiera obtenido el producto de interés.

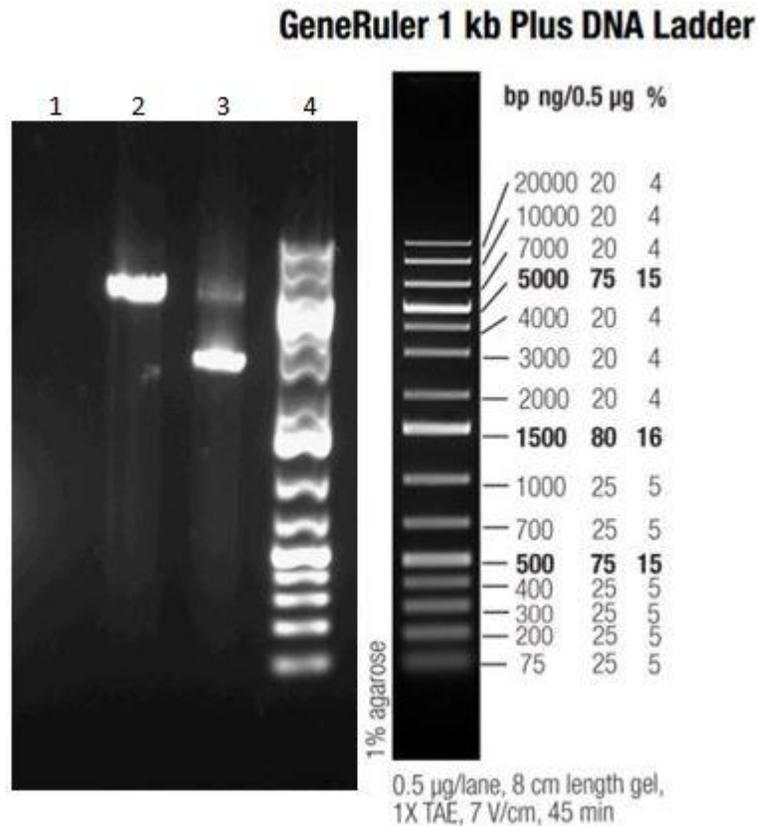
Una vez que se confirmó mediante secuenciación la obtención del nuevo vector pPICZA-HSAΔpp, el siguiente paso fue propagar el vector obtenido en una cepa de bacterias XL-1 blue quimiocompetentes (Figura 5.14) para luego continuar con la transformación de la cepa GS115.



**Figura 5.14. Minipreparación de ADN plasmídico.** Con el nuevo plásmido obtenido pPICZA-HSA $\Delta$ pp se transformó la cepa quimiocompetente XL-1 blue y se realizó la minipreparación según las indicaciones del kit Axygen. **Carril 1;** MPM GeneRuler sm0331 de Thermo Scientific **3;** Plásmido pPICZA control. **4;** Plásmido pPICZA-HSAwt. **6;** minipreparación 1 plásmido pPICZA-HSA $\Delta$ pp. **8;** minipreparación 2 plásmido pPICZA-HSA $\Delta$ pp

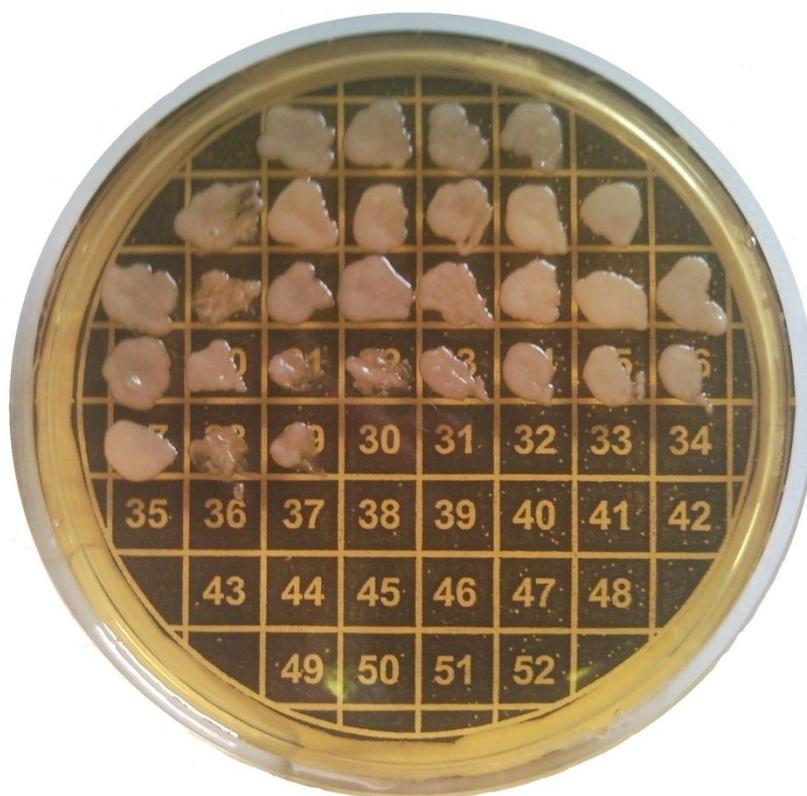
### 5.3.2 Transformación de la cepa GS115

. Como se indicó antes, previo a la transformación el péptido debió ser linealizado mediante digestión con una enzima de restricción. Una vez más se eligió la enzima PmeI, la cual tiene un único sitio de corte en la región AOX) y no afecta la secuencia codificante para la HSA Se incubó el plásmido con la enzima durante 1 h a 37 °C y se verificó el éxito de la digestión mediante gel de agarosa (Figura 5.15).



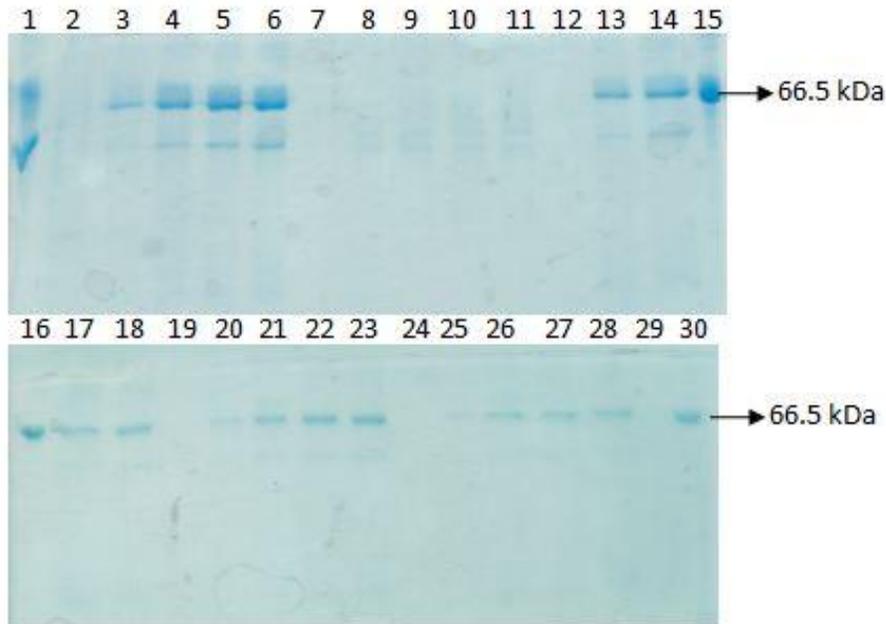
**Figura 5.15.** Gel de agarosa 0.8% del producto de digestión con PmeI. Carril 2: Producto de digestión; 3: vector pPICZA-HSAΔpp sin digerir; 4: MPM GeneRuler SM1331 de Thermo Scientific.

Paralelamente a los ensayos de linealización del plásmido se prepararon las células para la posterior transformación según se detalla en el punto 4.3.6. Una vez preparadas las células y obtenido el plásmido en su forma lineal, se transformaron las células mediante electroporación y se plaquearon distintos volúmenes de la mezcla de transformantes obtenidas en placas de YPDS con Zeocina (100 µg/ml) para seleccionar las transformantes. En cuatro de las cinco placas sembradas se obtuvieron colonias, dando un total de 51 colonias. De las 51 colonias obtenidas se seleccionaron 29 para sembrar en una placa con mayor concentración de Zeocina para seleccionar las transformantes multicopia (Figura 5.16).



**Figura 5.16. Aislamiento de recombinantes multicopia.** 29 de las 51 colonias obtenidas en las placas con 100  $\mu\text{g/ml}$  de Zeocina se volvieron a plaquear en una placa con 1 mg/ml de Zeocina para seleccionar las transformantes multicopia.

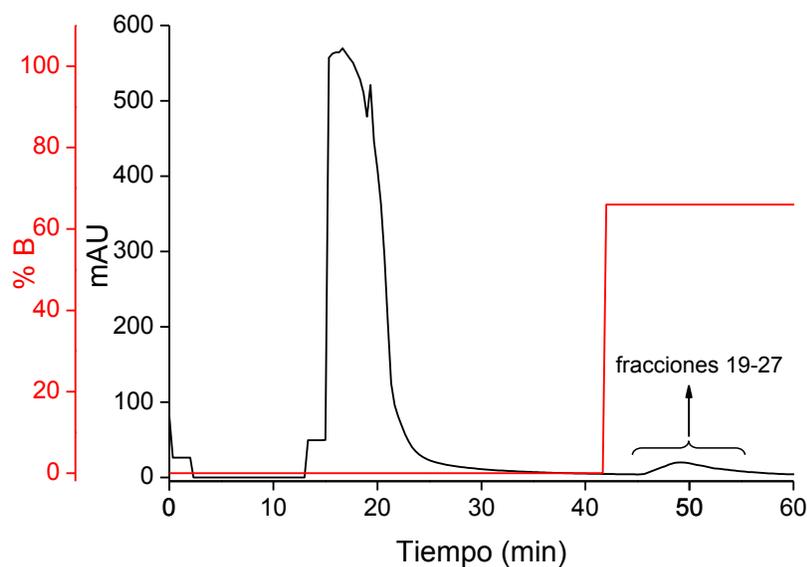
Una vez obtenidos los transformantes multicopia, se seleccionaron cinco de ellos (clones 1, 6, 11, 14 y 19) para realizar un ensayo de expresión. El mismo se realizó de igual manera que los ensayos anteriores, lo que implica una primera instancia de crecimiento en medio YPD, para luego inocular los medios BMGY y finalmente cambiar el medio a BMMY e inducir durante 96 h con el agregado de metano 0.5 % final. Como se observa en la Figura 5.17, se obtuvo para cuatro de los cinco clones seleccionados una banda de tamaño esperado que luego se confirmó mediante tripsinización y espectrometría de masas que efectivamente se trataba de rHSA.



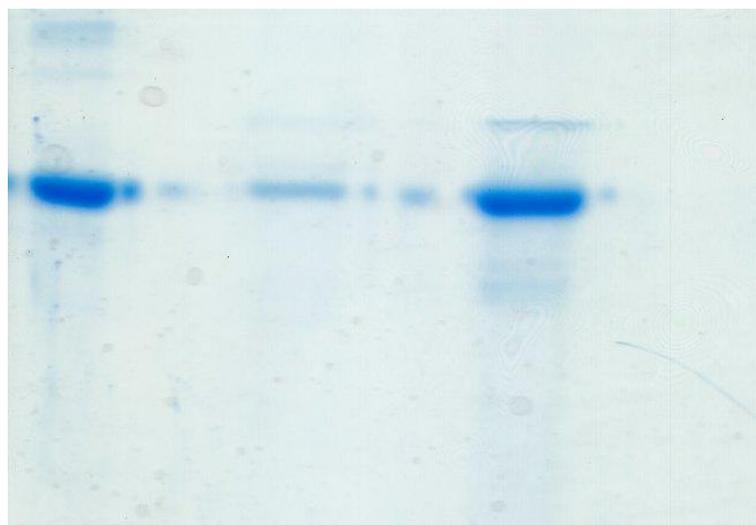
**Figura 5.17 SDS-PAGE de los distintos tiempos de inducción para los 5 clones seleccionados. A. Carril 1:** HSA control; **2-6:** t = 0 a 96 h clon 1; **7-11:** t = 0 a 96 h clon 6; **12-14:** t = 0 a 48 h clon 11; **15-16:** HSA control; **17-18:** t = 72 a 96 h clon 11; **19-23:** t = 0 a 96 h clon 14; **24-28:** t = 0 a 96 h clon 19; **29:** vacío; **30:** HSA control.

Luego de confirmar que el producto de expresión obtenido se trataba efectivamente de rHSA, el siguiente paso fue ensayar nuevamente el método de purificación mediante cromatografía de afinidad con la resina de Cibacrón blue. Manteniendo siempre las mismas condiciones en los pasos previos de preparación de la muestra, realizamos una cromatografía de afinidad con el sobrenadante de los medios de cultivo de los clones 1 y 14.

Como se puede observar en el cromatograma de la Figura 5.18, nuevamente se obtuvo un pequeño pico al realizar el salto a 2 M NaCl con el amortiguador de elución. Al correr un gel de SDS-PAGE (Figura 5.19) vimos que nuevamente la mayor parte de nuestra proteína eluye sin interactuar con la resina junto a las proteínas contaminantes en la fracción no unida.



**Figura 5.18. Cromatografía de afinidad.** Se sembraron 5 ml en una columna HiTrap blue previamente equilibrada con amortiguador de inicio (fosfato 20 mM, pH 7). La elución se llevó a cabo con un salto a 66 % de amortiguador de elución (fosfato 20 mM, pH 7, 3 M NaCl). Se registró la absorbancia de las distintas fracciones a 280 nm (trazo negro) y el % de amortiguador de elución (B) (trazo rojo). La flecha indica la fracción de rHSA que interaccionó con la resina. Flujo 1 ml/min



**Figura 5.19. SDS-PAGE de las distintas fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad.** Carril 1: HSA control; 3: fracciones 19 a 27 concentradas; 5: fracción no unida.

## 6 Conclusiones y perspectivas

Este trabajo se centró en la puesta a punto de la expresión y purificación de albúmina sérica humana en forma recombinante utilizando como vector a la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. En primer lugar se perfeccionaron las condiciones de expresión logrando disminuir considerablemente las proteínas contaminantes en el sobrenadante del medio de cultivo producto de la lisis celular. Observamos que cuanto más crecidos se encontraban los medios, mayor era la contaminación al final de las 96 h de inducción, y que el patrón de bandas era comparable al observado al sembrar una muestra de lisis celular. Logramos mediante el agregado de un paso adicional controlar el crecimiento disminuyendo y controlando la carga inicial con la que se inoculan los medios BMGY. Logramos así entonces buenos niveles de expresión de rHSA con bajo contenido de contaminantes.

Se logró eliminar correctamente del plásmido original pPICZA-HSAwt la secuencia que codifica para el propéptido de 6 aminoácidos interpuesto entre el prepéptido señal de secreción y la secuencia de la HSA madura generando un nuevo plásmido pPICZA-HSA $\Delta$ pp, con el que posteriormente se volvió a transformar correctamente la cepa GS115 His<sup>-</sup>, Mut<sup>+</sup> de *Pichia pastoris* de invitrogen.

En cuanto a la purificación de la rHSA obtenida, si bien aún no hemos logrado poner a punto una técnica que nos permita obtenerla en forma pura, hemos realizado diversos estudios que nos permitieron evaluar posibles problemas como podría ser un plegamiento incorrecto de la proteína, modificaciones postraduccionales producidos por la levadura o interacciones fuertes con algún componente proveniente del medio que impida la interacción de la rHSA con la resina de Cibacrón. Logramos de todas formas un alto nivel de pureza mediante la cromatografía de exclusión molecular, siendo que la única contaminante que coeluye con la rHSA se trata de una forma trunca en el extremo amino terminal de rHSA.

Hemos obtenido un buen comportamiento de la HSA en electroforesis nativa, algo de lo que no se encontraron reportes previos, lo que podría significar una nueva alternativa para el análisis de muestras de HSA

Por lo tanto, podemos decir que si bien seguimos trabajando en la puesta a punto de la purificación, hemos perfeccionado las condiciones de expresión que nos permite obtener la proteína recombinante. Esto nos permitirá en un futuro, poder generar variantes mutadas de rHSA en algunos aminoácidos importantes para la reactividad del tiol de la Cys34, y de formas truncas de la rHSA. Esto nos permitirá continuar profundizando en la caracterización de este tiol, que ha sido objeto de estudio por nuestro grupo de laboratorio desde hace ya unos cuantos años. De hecho, recientemente hemos logrado clonar únicamente la secuencia codificante para el dominio I (Dom I) de la HSA, dominio en el que se encuentra la Cys34 y hemos transformado correctamente la cepa GS115 His<sup>-</sup>, Mut<sup>+</sup> de *Pichia pastoris* obteniendo buenos niveles de expresión del mismo. La obtención del Dom I en forma pura, por tratarse de una molécula bastante menor que la proteína entera (22 kDa), abriría las puertas a estudios estructurales tanto cristalográficos como de resonancia magnética nuclear.

En este momento continuamos trabajando en la puesta a punto de algún método que nos permita purificar tanto la rHSA como el Dom I y hemos comenzado a caracterizar las propiedades del tiol.

## 7 Referencias

1. Botti H, Bonilla L, Trajtenberg F, Radi R, A. B. New insights on B factors in crystal structure analysis and crystallographic model refinement. *Be Publ.* 2012 Apr 12;null–null.
2. Peters T. All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications. San Diego: Academic Press; 1996.
3. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* 1999;12(6):439–46.
4. Predescu D, Predescu S, Malik AB. Transport of nitrated albumin across continuous vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U A.* 2002;99(21):13932–7.
5. Schnitzer JE. gp60 is an albumin-binding glycoprotein expressed by continuous endothelium involved in albumin transcytosis. *Am J Physiol.* 1992;262(1 Pt 2):H246–54.
6. Gundry RL, Fu Q, Jelinek CA, Van Eyk JE, Cotter RJ. Investigation of an albumin-enriched fraction of human serum and its albuminome. *Proteomics Clin Appl.* 2007;1(1):73–88.
7. Spector AA. Structure and lipid binding properties of serum albumin. *Methods Enzym.* 1986;128:320–39.
8. Torres MJ, Turell L, Botti H, Antmann L, Carballal S, Ferrer-Sueta G, et al. Modulation of the reactivity of the thiol of human serum albumin and its sulfenic derivative by fatty acids. *Arch Biochem Biophys.* 2012;En prensa.
9. Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA, Curry S. Location of High and Low Affinity Fatty Acid Binding Sites on Human Serum Albumin Revealed by NMR Drug-competition Analysis. *J Mol Biol.* 2006 Aug 11;361(2):336–51.
10. Van der Vusse GJ. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24(4):300–7.
11. Fanali G, di Massi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. Human serum albumin: From bench to bedside. *Mol Aspects Med.* 2012 Jun;33(3):209–90.
12. Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Curry S. Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. *J Mol Biol.* 2008;381(2):394–406.
13. Bal W, Sokołowska M, Kurowska E, Faller P. Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Jun 26;

14. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987;235(4792):1043–6.
15. Turell L, Carballal S, Botti H, Radi R, Alvarez B. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(4):305–11.
16. Turell L. Ácido sulfénico en albúmina sérica humana. Tesis de doctorado en química, Facultad de Ciencias, Universidad de la República; 2012.
17. Turell L, Radi R, Alvarez B. The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med*. 2013 Jun 7;65C:244–53.
18. Sies H. *Oxidative Stress*. London: Academic Press; 1985.
19. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*. 2008;4(5):278–86.
20. Carballal S, Alvarez B, Turell L, Botti H, Freeman BA, Radi R. Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids*. 2007;32(4):543–51.
21. Heinemann J, Hamerly T, Maaty WS, Movahed N, Steffens JD, Reeves BD, et al. Expanding the paradigm of thiol redox in the thermophilic root of life. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* [Internet]. [cited 2013 Sep 24]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030441651300353X>
22. Banerjee R. *Redox biochemistry*. Wiley-Interscience; 2008.
23. Poole LB. The catalytic mechanism of peroxiredoxins. *Subcell Biochem*. 2007;44:61–81.
24. Wood ZA. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(1):32–40.
25. Turell L, Botti H, Carballal S, Radi R, Alvarez B. Sulfenic acid—a key intermediate in albumin thiol oxidation. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2009;877(28):3384–92.
26. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Gardner DK, Slone DS, Craun ML. Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use. *Crit Care Med*. 2005;33(7):1638–41.
27. Turell L, Botti H, Bonilla L, Torres MJ, Schopfer F, Freeman BA, et al. HPLC separation of human serum albumin isoforms based on their isoelectric points. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014 Jan 1;944:144–51.

28. Christodoulou J, Sadler PJ, Tucker A. A new structural transition of serum albumin dependent on the state of Cys34. Detection by 1H-NMR spectroscopy. *Eur J Biochem.* 1994;225(1):363–8.
29. Stewart AJ, Blindauer CA, Berezenko S, Sleep D, Tooth D, Sadler PJ. Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *Febs J.* 2005;272(2):353–62.
30. Claiborne A, Miller H, Parsonage D, Ross RP. Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *Faseb J.* 1993;7(15):1483–90.
31. Toppo S, Flohe L, Ursini F, Vanin S, Maiorino M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: variations of a basic scheme. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1790(11):1486–500.
32. Fuangthong M, Helmann JD. The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc Natl Acad Sci U A.* 2002;99(10):6690–5.
33. Denu JM, Tanner KG. Specific and Reversible Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases by Hydrogen Peroxide: Evidence for a Sulfenic Acid Intermediate and Implications for Redox Regulation†. *Biochemistry (Mosc).* 1998 Apr 1;37(16):5633–42.
34. Rehder DS, Borges CR. Cysteine sulfenic acid as an intermediate in disulfide bond formation and nonenzymatic protein folding. *Biochemistry (Mosc).* 2010;49(35):7748–55.
35. Turell L, Botti H, Carballal S, Ferrer-Sueta G, Souza JM, Duran R, et al. Reactivity of sulfenic acid in human serum albumin. *Biochemistry (Mosc).* 2008;47(1):358–67.
36. Minchiotti L, Galliano M, Kragh-Hansen U, Peters T. Mutations and polymorphisms of the gene of the major human blood protein, serum albumin. *Hum Mutat.* 2008;29(8):1007–16.
37. Nagumo K, Tanaka M, Chuang VTG, Setoyama H, Watanabe H, Yamada N, et al. Cys34-cysteinylated human serum albumin is a sensitive plasma marker in oxidative stress-related chronic diseases. *PLoS One.* 2014;9(1):e85216.
38. SAFE Study Investigators, Finfer S, McEvoy S, Bellomo R, McArthur C, Myburgh J, et al. Impact of albumin compared to saline on organ function and mortality of patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2011 Jan;37(1):86–96.
39. Albumin Reviewers (Alderson P, Bunn F, Li Wan Po A, Li L, Blackhall K, Roberts I, Schierhout G). Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;(10):CD001208.
40. Chen Z, He Y, Shi B, Yang D. Human serum albumin from recombinant DNA technology: Challenges and strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Dec;1830(12):5515–25.

41. Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24(1):45–66.
42. Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol.* 2002 Aug;13(4):329–32.
43. Li P, Anumanthan A, Gao X-G, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N, et al. Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2007 Aug 1;142(2):105–24.
44. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 2005;22(4):249–70.
45. Tsukuda M, Miyazaki K. DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin. *J Biosci Bioeng.* 2013 Nov;116(5):644–6.
46. Life technology corporation. invitrogen EasySelect™ *Pichia* Expression Kit. 2010.
47. Calmels T, Parriche M, Durand H, Tiraby G. High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Curr Genet.* 1991 Sep;20(4):309–14.
48. He Y, Ning T, Xie T, Qiu Q, Zhang L, Sun Y, et al. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Nov 22;108(47):19078–83.
49. Zhang Q, Yu H, Zhang F, Shen Z. Expression and purification of recombinant human serum albumin from selectively terminable transgenic rice. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2013 Oct;14(10):867–74.
50. Watanabe H, Yamasaki K, Kragh-Hansen U, Tanase S, Harada K, Suenaga A, et al. In vitro and in vivo properties of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* purified by a method of short processing time. *Pharm Res.* 2001;18(12):1775–81.
51. Kobayashi K. Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals.* 2006;34(1):55–9.
52. Kasahara A, Kita K, Tomita E, Toyota J, Imai Y, Kumada H. Repeated administration of recombinant human serum albumin caused no serious allergic reactions in patients with liver cirrhosis: a multicenter clinical study. *J Gastroenterol.* 2008;43(6):464–72.
53. Ohnishi K, Kawaguchi A, Nakajima S, Mori H, Ueshima T. A comparative pharmacokinetic study of recombinant human serum albumin with plasma-derived human serum albumin in patients with liver cirrhosis. *J Clin Pharmacol.* 2008;48(2):203–8.

54. Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J Control Release*. 2008;132(3):171–83.
55. Dockal M, Carter DC, Rüker F. The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *J Biol Chem*. 1999 Oct 8;274(41):29303–10.
56. Chen RF. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J Biol Chem*. 1967;242(2):173–81.

## 8 Agradecimientos

En primer lugar agradezco a Lucía Turell por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su proyecto a cargo Fondo Clemente Estable en el marco de tesis de grado. Por eso, y por su constante disposición y dedicación a la hora de discutir resultados, planificar nuevos experimentos, transformando cada una de esas instancias en una instancia enriquecedora y de gran aprendizaje. Sinceramente, por todo eso y más, muchas gracias!

Agradezco también a Beatriz Álvarez, que en su rol de co-tutora también participó de las instancias de discusión aportando todo su conocimiento y su pasión por la ciencia.

A Mónica Marín y a Ignacio López, por su colaboración en las instancias “moleculares” del trabajo.

A todo el grupo de laboratorio de Fisicoquímica Biológica y Enzimología, Leonor, Ana, Gefe, Laura, Matías M., Lía, Leo, Bocha, Flor A., Mara, Ceci, Nico, Stephanie. A los más nuevos, Joaquín, Martina, Matías D., Silvina, Lourdes. A los que ya no están, Floto, Flopa, Gaby, Claudio, Flor B, Majo. A todos ellos, por hacer del laboratorio un excelente ambiente de trabajo y aprendizaje, muchas gracias!

A mi familia y amigos de toda la vida (La barra de las flores), quienes siempre me han apoyado y a quienes les he tocado aguantarme cuando las cosas no marchaban como uno esperaba!

A los nuevos amigos que he conocido a los largo de la carrera (“los del fondo” y “los rejas”) con quienes compartí tantas horas de estudio, mates y salidas.

Finalmente, a la ANII por la beca de iniciación a la investigación otorgada en el marco del presente trabajo.