



**Producción del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano recombinante en  
*Komagataella pastoris (Pichia pastoris)*.**

María Camila López Carvajal y Juan José Moreno Pino

UNIVERSIDAD ICESI

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA Y BIOLOGÍA CON  
CONCENTRACIONES EN CONSERVACIÓN Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR/BIOTECNOLOGÍA

Santiago de Cali  
2024

**Producción del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano recombinante en  
*Komagataella pastoris* (*Pichia pastoris*).**

María Camila López Carvajal y Juan José Moreno Pino  
Trabajo de grado para optar por el título de pregrado en Química Farmacéutica y Biología  
Concentraciones en Conservación y Biología Molecular/Biotecnología.

Tutor: Steven Alexander David Jiménez, MSc.

Tutora: Paola Andrea Caicedo Burbano, Ph.D.

FACULTAD DE INGENIERÍA, DISEÑO Y CIENCIAS APLICADAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA Y BIOLOGÍA CON  
CONCENTRACIONES EN CONSERVACIÓN Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR/BIOTECNOLOGÍA

Santiago de Cali  
2024

**Aprobado por:**

Steven A David

Nombre del Tutor: Steven Alexander David Jiménez, MSc.

**Aprobado por:**

Paola Andrea

Nombre del Tutor: Paola Andrea Caicedo Burbano, Ph.D.

**Firma del Estudiante 1:**

Camila

Nombre del Estudiante: María Camila López Carvajal.

**Firma del Estudiante 2:**

Juan Jose Moreno

Nombre del Estudiante: Juan José Moreno Pino.

## TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen .....	5
2. Introducción.....	5
3. Metodología.....	7
3.1. Establecimiento de las condiciones de crecimiento de <i>Komagataella pastoris</i> . .....	7
3.2. Establecimiento de las condiciones de crecimiento de <i>Komagataella pastoris</i> .....	8
3.3. Determinación de las condiciones para la expresión del rhEGF .....	9
3.3.1. Determinación del tiempo de inducción .....	9
3.3.2. Determinación de la concentración de metanol.....	9
3.4. Verificación de expresión mediante SDS-PAGE y Western Blot .....	10
3.4.1. Tinción con plata.....	11
3.5. Cuantificación de proteína por método de Bradford .....	11
3.6. Concentración de la proteína rhEGF.....	12
4. Resultados y discusión.....	12
4.1. Análisis por PCR del transgén de hEGF. ....	12
4.2. Determinación de las condiciones de expresión .....	13
4.3. Verificación de la expresión de la proteína modificando la concentración del inductor.....	17
5. Conclusiones.....	22
6. Agradecimientos .....	22
7. Referencias .....	22

## 1. Resumen

La producción de proteínas recombinantes en levaduras se ha vuelto cada vez más frecuente debido a los beneficios que representan, tales como su fácil manipulación, la capacidad para generar modificaciones postraduccionales y la alta viabilidad para el escalado del proceso. Dentro de las proteínas producidas en dicho microorganismo se encuentran algunas con potencial terapéutico, y otras con aplicaciones cosméticas. Una de estas es el factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), el cual es un polipéptido que se encuentra de forma natural en orina, plaquetas leche y plasma, se conoce que es fundamental en las vías de señalización celular que regulan la división y la supervivencia celular. Además, se ha demostrado una buena capacidad en la reparación tisular, por lo que, es empleado en estudios para la regeneración de la piel en diversos campos que van desde curación de heridas hasta el tratamiento contra arrugas. Es importante destacar que hoy en día su producción no es lo suficientemente eficiente para la demanda que se tiene y que se espera. A partir de lo anterior, se ha planteado este proyecto, en búsqueda de desarrollar e implementar una metodología para la producción de este factor de manera recombinante mediante el uso de la levadura *Komagatella pastoris*, generando así conocimiento para diferentes sectores de la economía como lo son el educativo y el industrial.<sup>1</sup>

**Palabras clave:** rhEGF, Proteínas recombinantes, ADN recombinante, *K. pastoris*.

## 2. Introducción

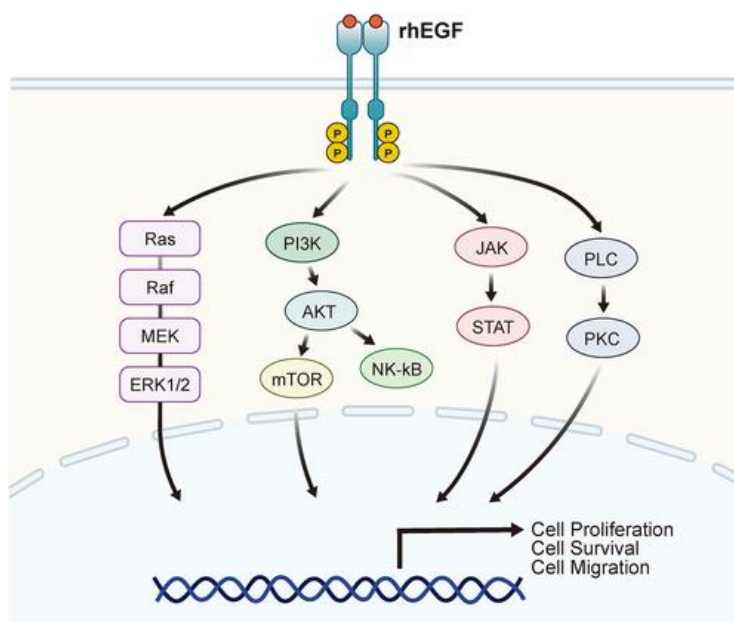
El Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (hEGF) es un polipéptido de 6kD que se produce naturalmente a nivel fisiológico por diversas células como plaquetas, macrófagos, fibroblastos y células epiteliales. De igual forma, se encuentra presente en diferentes fluidos corporales como orina, saliva, leche y plasma. Este juega un papel fundamental en la regulación de las vías de señalización celular relacionadas con el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, mediante la unión a su receptor de membrana específico, es decir, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Así pues, se ha encontrado que esta molécula presenta un rol importante en procesos relacionados con la regeneración tisular. En este sentido, la versatilidad funcional de esta proteína de señalización ha llevado a su aplicación en múltiples campos, principalmente en la industria cosmética, farmacéutica y biotecnológica. Lo anterior se debe a que, tiene un gran impacto en el desarrollo de tratamientos eficaces para lesiones dermatológicas como quemaduras, úlceras cutáneas, alopecia y arrugas<sup>1,2,3,4</sup>.

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas del hEGF.

Número de aminoácidos	53
Secuencia de aminoácidos <sup>5</sup>	NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKNWELR

<b>Punto isoelectrico</b>	4.6
<b>Formula molecular</b>	C257H381N73O83S7

El polipéptido hEGF, ha sido protagonista de múltiples investigaciones clínicas por su impacto en procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas, reparación de tejidos y la regeneración de la piel, un ejemplo de esto es la investigación de Young-Bae Kwon y colaboradores donde se emplea hEGF obtenido de forma recombinante para acelerar la cicatrización en ratas, obteniendo resultados positivos al acelerar el proceso de cicatrización. Esta actividad biológica ocurre al estimular la angiogénesis y la reepitelización, así como promover la activación de miofibroblastos por medio de las vías de señalización PI3K/AKT y ERK/MAPK generando así la proliferación celular<sup>1,2,6</sup>.



**Figura 1.** Esquema de las vías de señalización implicadas en la función del rhEGF<sup>7</sup>.

Hoy en día existen diferentes metodologías para la producción del hEGF; sin embargo, las más importantes se basan en extracción de fuentes naturales (sangre) y estrategias biotecnológicas que incluyen el uso de diversos organismos. Entre estos últimos, se encuentran plantas como *Nicotiana tabacum*, células de mamífero y la expresión en bacterias como en *Escherichia coli*. Por un lado, *E. coli*, es uno de los sistemas más utilizados debido a su simplicidad a nivel de crecimiento y proceso de transformación, así como una producción económica; sin embargo, suele producir el hEGF en formas insolubles y mal plegadas. Además, no posee la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, que son necesarias para la actividad biológica adecuada del hEGF. Ahora bien, las células de mamífero han demostrado ser un sistema que permite realizar esta clase de modificaciones y generar un producto estructural y funcionalmente idéntico al hEGF autólogo. No obstante, estos sistemas son más complejos e

implican un proceso altamente costoso. Por otro lado, en cuanto al uso de plantas transgénicas, se conoce que ofrecen bajos rendimientos y enfrentan problemas de aceptación pública y regulación <sup>8, 9, 10, 11</sup>.

De esta manera, la tecnología del ADN recombinante basada en sistemas de expresión eucarióticos resulta ser una solución prometedora para la obtención del hEFG. Estos, poseen la maquinaria necesaria para realizar modificaciones postraduccionales complejas, facilidad de producción a gran escala y está en un rango intermedio de costos en comparación con los métodos tradicionales. Actualmente, la Universidad Icesi se ha destacado por la aplicación de esta tecnología para la producción de proteínas heterólogas; sin embargo, esta ha utilizado únicamente organismos procariotas como las bacterias y eucariotas como las plantas. Por lo tanto, es crucial expandir el espectro de herramientas disponibles en los laboratorios de investigación y avanzar hacia una metodología más completa y versátil, mediante la integración de organismos eucariotas como vehículos de expresión, como la levadura *Komagataella pastoris*. <sup>12</sup>.

En este contexto, el presente proyecto se propuso sentar las bases para la producción de proteínas recombinantes en *K. pastoris*, empleando el plásmido pPinkalfa-HC en la cepa PichiaPink Strain 1. Hasta ahora, los estudios de producción de proteínas recombinantes en la Universidad Icesi se han concentrado mayormente en bacterias como sistemas de expresión y, en menor medida, en plantas. La introducción de levaduras, como *K. pastoris*, representa un avance significativo que ampliará las capacidades de los laboratorios de investigación, abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de proteínas de alto valor en contextos biomédicos y biotecnológicos. Así, este proyecto no solo buscó expandir las técnicas de producción de proteínas recombinantes en sistemas eucariotas, sino también posicionar a la universidad como un referente en investigación y establecer una base sólida para futuras aplicaciones en la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico.

### **3. Metodología**

#### **3.1. Establecimiento de las condiciones de crecimiento de *Komagataella pastoris*.**

Como primer paso, se verificó que si hubiera presencia del plásmido dentro de las levaduras a emplear, para esto se realizó PCR a las colonias con las que contábamos, estas colonias se diferenciaban en 2 grupos, con marcador His-Tag y sin marcador His-Tag. Inicialmente se realizó el proceso de lisado de las células, el cual consistió en tomar una colonia y diluirla en 70uL de agua DPC, posteriormente la muestra se calentó durante 2 minutos en microondas y se agito, este proceso se repitió 3 veces para luego poner la muestra a -80°C durante mínimo 10 minutos, luego se volvió a calentar a 95°C para finalmente centrifugar a temperatura ambiente por 10 minutos a 2500 rpm, del sobrenadante se tomaron 5uL que fueron empleados como muestra para preparar el mix de PCR y finalmente llevando a cabo la reacción de PCR en el termociclador. Las condiciones de la reacción se encuentran en la *Tabla 3*.

Para la visualización de los resultados se empleó un gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio por 20 minutos.

**Tabla 2.** Mix para la confirmación del plásmido mediante PCR.

Componente	Cantidad (µL)
Agua DEPC	10,3
DNTP's 10 mM	0,4
Buffer de Taq	2
Primer pPink_nuevo Forward 10uM	1
Primer pPink_nuevo Reverse 10uM	1
Template*	5
Taq Polimerasa (Dream taq Thermo)	0,3
<b>Volumen Total</b>	<b>20</b>

**Tabla 3.** Termoperfil para la confirmación del transgén mediante reacción de PCR.

Etapa	Condiciones	
Desnaturalización Inicial	95°C 1,5 minutos	
Desnaturalización	95 °C 30 segundos	X 34
Annealing	58.9 °C 1 minuto	
Extensión	72 °C 1 minuto	
Extensión final	72°C 10 minutos	

### 3.2. Establecimiento de las condiciones de crecimiento de *Komagataella pastoris*.

En un principio, para el proceso de expresión, es crucial determinar las condiciones óptimas para el crecimiento de la levadura *Komagataella pastoris* modificada. Para ello, inicialmente, se inoculó 25 mL de medio BMGY en erlenmeyers con baffle de 250 mL. Posteriormente, se incubaron a 30°C con agitación continua a una velocidad de 250 rpm. La progresión del crecimiento se evaluó continuamente mediante la medición de la densidad óptica (OD) hasta que alcanzará un valor de  $OD_{600} = 2,0$ . Seguido a esto, el cultivo se centrifugó a una velocidad de 2000 rpm a temperatura ambiente controlada. Todo lo anterior, con el fin de obtener las células de *K. pastoris* como preparación para las fases posteriores del proceso de expresión.

### **3.3. Determinación de las condiciones para la expresión del rhEGF**

Una vez realizada la fase de crecimiento de la levadura, se determinaron los parámetros adecuados para la inducción de la expresión del rhEGF. En este caso, se evaluó el efecto de la variación de dos variables: Tiempo de incubación post-inducción (48 a 96 horas) y concentración de metanol (0.25% a 1%). Las variaciones mencionadas previamente, se determinaron de acuerdo a lo reportado en la literatura. Para cada experimento, en un inicio, se partió de un stock en glicerol de las levaduras transformadas para inocular 25 mL de medio BMGY. Posteriormente, se siguió el procedimiento descrito en la *Figura 2*, se descartó el sobrenadante, y, el pellet resultante se resuspendió con 30 mL de medio BMMY.

#### **3.3.1. Determinación del tiempo de inducción**

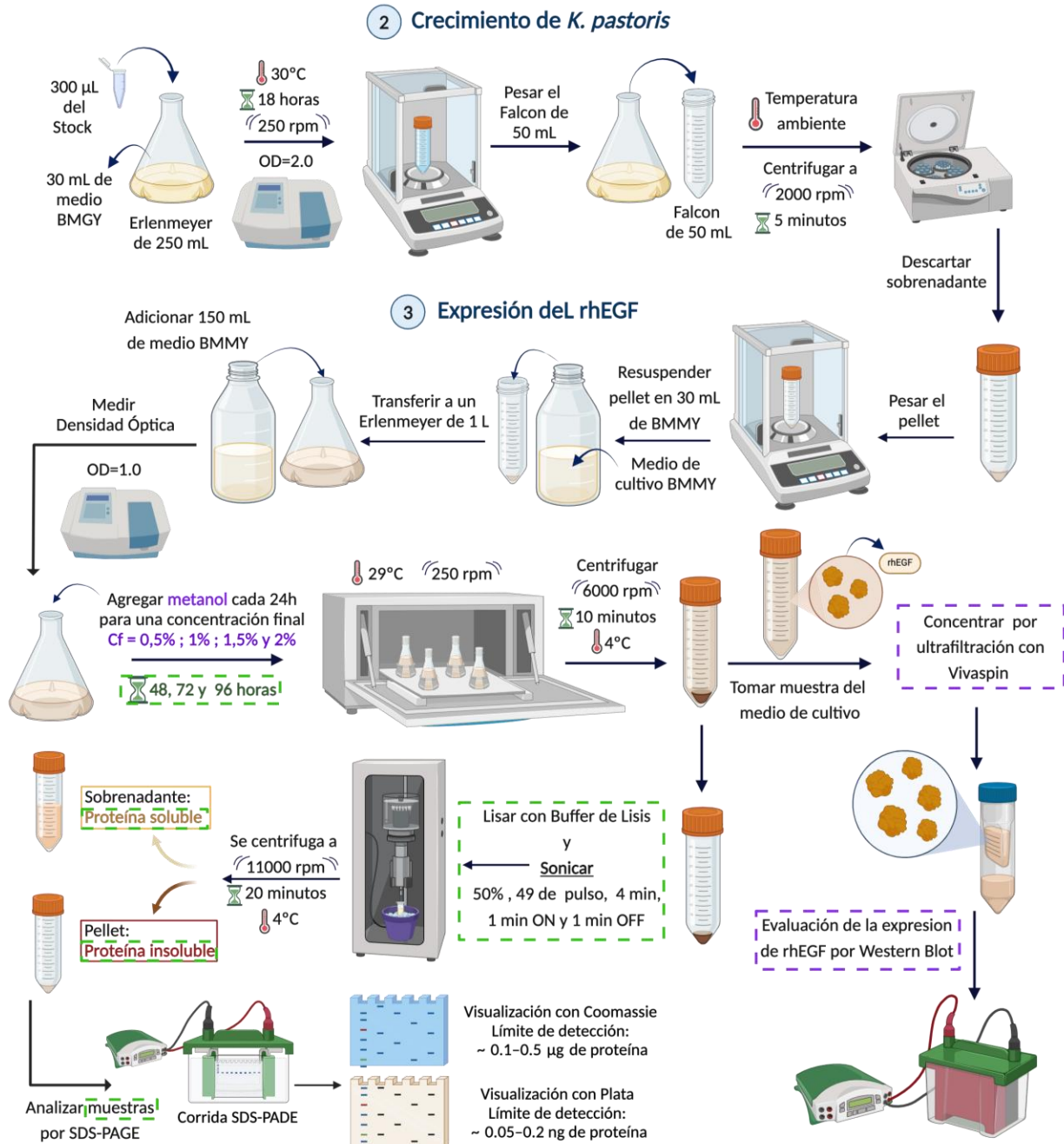
Para esta primera condición de la expresión, se trabajó con tiempos de post-inducción de 48 a 96 horas, manteniendo una concentración de inductor (metanol) fija igual a 0,5%. En este sentido, se llevó a cabo el proceso descrito anteriormente y se siguió con la transferencia a un erlenmeyer con baffle de 1 L y en este se agregaron 120 mL de medio BMMY suplementado con metanol, para así iniciar la expresión del rhEGF. El cultivo se incubó a 29°C con agitación a 270 rpm durante 48 a 96 horas para permitir la producción del hEGF recombinante. Para mantener la inducción de la producción de hEGF, se agregó metanol al cultivo cada 24 horas, de manera que se obtuviera una concentración final de 0,5%. Es importante señalar que, se tomó una muestra del medio de cultivo después del tiempo de inducción de la proteína, pues, según lo reportado en la literatura, es en este dónde se da la producción del rhEGF.

Partiendo del proceso anterior, se centrifugó el cultivo a una velocidad de 6000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, para obtener el sobrenadante y el sedimento celular (proteína total). mediante su resuspensión en un tampón de lisis, seguida de una sonicación en frío con una amplitud del 50% y ciclos de 49% de pulso durante 4 minutos, alternando 1 minuto de sonicación activa (ON) y 1 minuto de pausa (OFF). En un segundo paso de centrifugación a 11000 rpm por 20 minutos y una temperatura de 4°C, se obtuvieron las proteínas solubles (sobrenadante) e insolubles (pellet). Todo lo anterior se analizó por SDS-PAGE con el proceso descrito en la *sección 3.4*.

#### **3.3.2. Determinación de la concentración de metanol**

Teniendo en cuenta los resultados previos, se procedió a evaluar diferentes concentraciones de metanol como inductor, específicamente en un rango de 0,5% a 2%, bajo el proceso descrito en la *sección 3.3* y *3.3.1*. Dado que en los experimentos iniciales para determinar el tiempo óptimo de post-inducción se observaron bajas concentraciones de proteína, se decidió concentrar directamente las muestras obtenidas tras el periodo de incubación mediante el uso de un Vivaspín.

Posteriormente, se realizó un análisis por Western Blot para evaluar la expresión de la proteína recombinante. Es importante destacar que en esta etapa no se analizaron las fases soluble e insoluble, ya que dichas fracciones habían sido evaluadas en experimentos anteriores, como se detalla en la *Figura 2*.



**Figura 2.** Protocolo para el crecimiento de *K. pastoris* y expresión del rhEGF.

### 3.4. Verificación de expresión mediante SDS-PAGE y Western Blot

Las muestras obtenidas en la *sección 3.3.1* se analizaron mediante SDS-PAGE. Para ello, se tomaron alícuotas de 1 mL de la proteína total obtenida tras la sonicación, así como de las fracciones solubles e insolubles. Cada alícuota se mezcló con un volumen igual de tampón de tricina, incubándose a 95 °C durante 5 minutos y centrifugándose a 12000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, se cargaron 20 µL de cada preparación en un gel de poliacrilamida al 14 %, utilizando tampones de ánodo y tricina para la electroforesis. El gel se tiñó con soluciones de azul de Coomassie y ácido acético en diferentes concentraciones, siguiendo un protocolo del grupo de investigación que emplea cuatro soluciones denominadas A, B, C y D, con distintas proporciones de azul de Coomassie, ácido acético e isopropanol, permitiendo la visualización de bandas con una concentración mínima de proteína de 5 ng. Por último, se determinó la concentración de proteína de interés en las muestras mediante el método de Bradford.

En lo que respecta a la técnica de Western blot, para las muestras de la *sección 3.3.2*, se transfirió la proteína rhEGF desde el gel de SDS-PAGE a una membrana de PVDF, utilizando una corriente de 0,3 A durante 70 minutos. Posteriormente, la membrana se sometió a un proceso de bloqueo con una solución de leche desnatada al 5% en TBS al 0,2% de Tween durante un período de una hora. Seguido a esto, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario (6x-His Tag Monoclonal Antibody, ThermoFisher Catalog#MA1-135) a una dilución de 1:5000 en la solución de bloqueo, se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras completar cuatro lavados con TBS al 0,2% de Tween, la detección de la señal inmunorreactiva se llevó a cabo utilizando un kit de quimioluminiscencia Femto (sustrato de máxima sensibilidad Thermo Scientific™ SuperSignal™ West Femto Catalog #34095). La señal quimio luminiscente se capturó mediante un analizador Amersham Imager 600 equipado con exposición automática.

### **3.4.1. Tinción con plata**

Teniendo en cuenta las diferentes sensibilidades entre los métodos de tinción, en algunos casos, se hizo uso del método de tinción con plata para la visualización de los resultados en los geles de electroforesis SDS-PAGE. Este, permitió la visualización de bandas con concentraciones de proteína inferiores a los 5 ng, para este método se hizo uso del kit “Pierce Silver Stain Kit, catálogo No. 24612, de Thermo Scientific” y se siguieron todos los pasos descritos por el protocolo de este kit.

### **3.5. Cuantificación de proteína por método de Bradford**

Para determinar la concentración de proteína se empleó el método de Bradford. Para ello, se construyó una curva de calibración utilizando BSA (albúmina sérica bovina) como estándar. En específico, se prepararon seis concentraciones de BSA para la curva: 0.1, 0.2, 0.3, 0.6, 0.7, 0.9 y 1.2 mg/mL. Luego, se tomaron 5 µL de cada punto de la curva y se mezclaron con 250 µL del reactivo de Bradford. Para las muestras de proteína, se realizaron diluciones 1:10 y se siguió el mismo procedimiento que con la curva de BSA. Las muestras y la curva de calibración se

adicionaron en una microplaca y se dejaron en incubación durante 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron analizadas en un lector de placas a una longitud de onda de 595 nm.

Finalmente, se empleó la ecuación (1) para calcular la concentración total de proteína, considerando que la pendiente y el intercepto corresponden a la ecuación de la recta de la curva de calibración, y el factor de dilución es de 10.

$$[\text{proteína total en fase soluble}] = \frac{\text{Abs muestra} - \text{intercepto}}{\text{Pendiente}} \times 10. \quad [1]$$

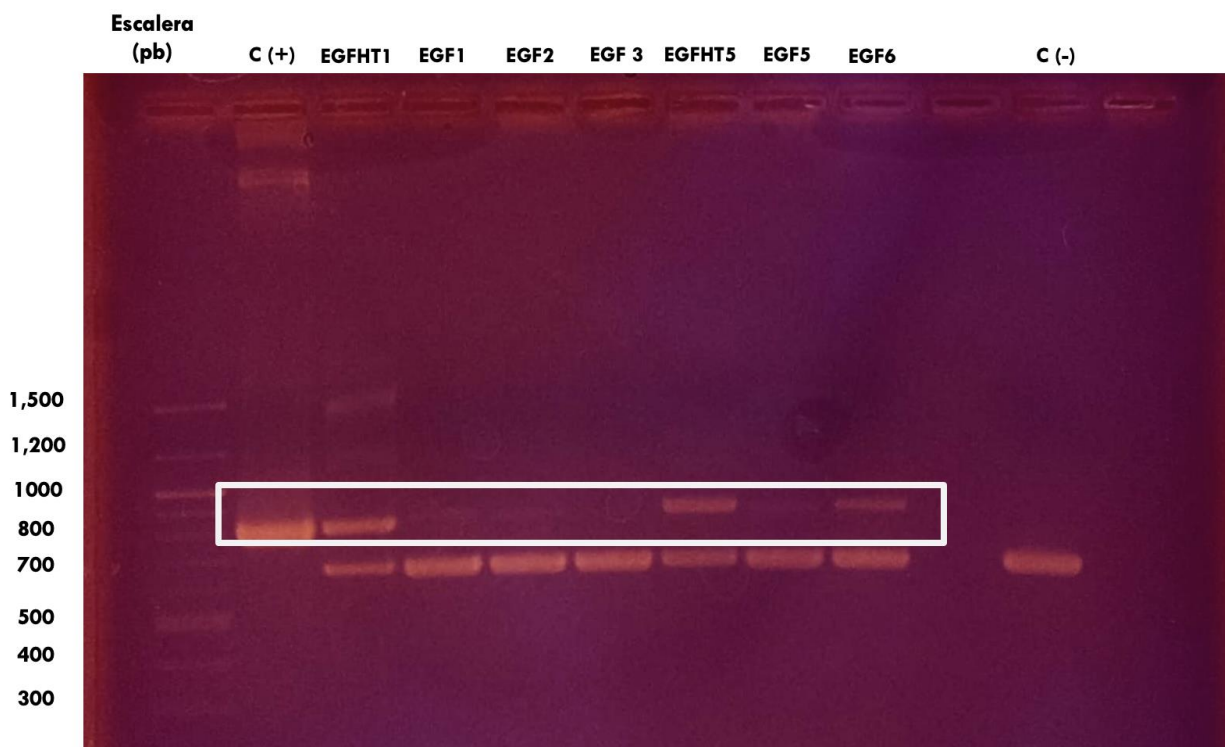
### 3.6. Concentración de la proteína rhEGF

Finalmente, teniendo en cuenta que la proteína estaba presente en el medio de cultivo, lo cual implicaba una alta dilución, se procedió a concentrar las muestras de los diferentes tratamientos utilizando dos dispositivos VivaSpin de 15 mL, equipados con una membrana de 3 kDa. Antes de cada uso, los dispositivos fueron limpiados con una solución de etanol al 20% y agua tipo II, centrifugando cada solución a 7000 x G durante 30 minutos para asegurar la eliminación de posibles contaminantes. Posteriormente, se añadieron 14 mL del medio de cultivo a cada VivaSpin y se sometieron a centrifugación a 7000 x G durante un mínimo de 90 minutos a 10 °C. Tras la centrifugación, se recolectó únicamente el retenido ubicado en la parte superior del VivaSpin,. Este proceso de concentración se realizó con casi 50 mL del medio de cultivo hasta obtener un volumen de 10 mL. Por último, se realizaron los lavados correspondientes de la membrana siguiendo el mismo procedimiento de limpieza inicial, y los dispositivos VivaSpin fueron almacenados con etanol al 20% junto con las muestras concentradas a 4°C para su conservación.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Análisis por PCR del transgén de hEGF.

En primera instancia se verificó la transformación de la cepa de *Komagataella pastoris*, proveniente de un proyecto previo en los laboratorios de investigación. Se disponía de dos transformaciones distintas: la primera contenía un constructo con la secuencia codificante para hEGF fusionada a una etiqueta de histidina, designadas como EGFHT1 y EGFHT5; la segunda carecía de dicha etiqueta y se identificó como EGF1, EGF2, EGF3, EGF5 y EGF6. Cada colonia se evaluó mediante PCR de colonia (ver *Figura 3*) para confirmar la presencia del constructo genético necesario para la producción de la proteína. Se esperaba un producto de amplificación de aproximadamente 800 pares de bases (pb), utilizando como control positivo una muestra del plásmido empleado para la transformación.



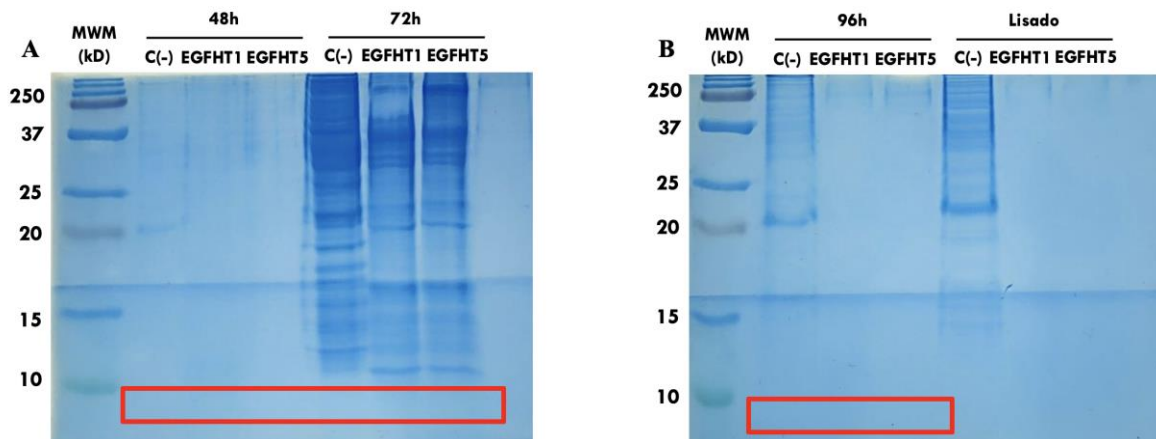
**Figura 3.** Análisis por PCR de colonia de *K. pastoris* transformadas con el plásmido pPink-HC (~800 pb) y visualización en gel de agarosa al 1%. Escalera (bp): Escalera de peso molecular; control positivo (C+), colonias EGFHT1, EGF1, EGF2, EGF3, EGFHT5, EGF5, EGF6; control negativo (C-); HT: Inserto del gen de hEGF unido a His-tag.

Al analizar el gel de agarosa, se observó que únicamente cuatro muestras presentaban bandas correspondientes al tamaño esperado del plásmido (~800 pb), de las cuales dos provenían de transformaciones con la etiqueta His-tag. Confirmada la presencia de levaduras transformadas, se decidió trabajar exclusivamente con las colonias EGFHT1 y EGFHT5 para facilitar los experimentos posteriores en los que se quisiera realizar una purificación más sencilla de la proteína. Con estos resultados, se procedió a la etapa de expresión de la proteína recombinante.

#### 4.2. Determinación de las condiciones de expresión

En primer lugar, se partió de una cepa de levadura transformada previamente e identificada como EGFHT-5, en la cual se había confirmado la inserción del plásmido pPinkalfa-HC. A partir de esta, se procedió a determinar las condiciones óptimas para la expresión del rhEGF. Para ello, se siguió como referencia el protocolo descrito por Samira Eissazadeh y colaboradores, el cual establece múltiples condiciones para la expresión de proteínas recombinantes en *Komagataella pastoris*. En este contexto, se seleccionaron dos variables a evaluar: el tiempo de incubación post-inducción y la concentración de metanol, con base en las condiciones propuestas por el estudio mencionado previamente y se utilizaron equipos similares para facilitar la replicabilidad de resultados.<sup>13</sup>

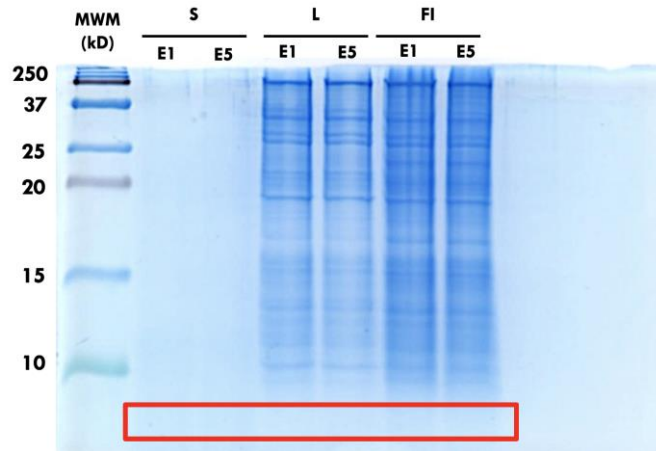
De esta manera, se evaluó el sobrenadante, es decir el medio de cultivo post-inducción, variando el tiempo de incubación post-inducción, donde el gel de electroforesis de SDS-PAGE (ver *Figura 4*), evidenció que el mejor tiempo de inducción es de 72 horas con la colonia EGFHT5 de la cepa de *K.pastoris* modificada. No obstante, estos resultados no concuerdan con estudios previos, que indican que el tiempo ideal para la expresión de proteínas recombinantes en esta levadura suele ser de 96 horas para maximizar la acumulación de proteínas y la estabilidad en condiciones de inducción prolongada. Esta discrepancia podría sugerir un posible error en la manipulación experimental, especialmente en el montaje de muestras en el gel de SDS-PAGE, lo cual pudo haber afectado la visibilidad y resolución de las bandas de proteínas en el análisis. Por esta razón, y con el objetivo de garantizar condiciones óptimas que se alineen con las prácticas reportadas en la literatura, se decidió ajustar los experimentos posteriores a un tiempo de inducción de 96 horas. Esta decisión no solo sigue las recomendaciones de investigaciones anteriores, sino que también minimiza la posibilidad de errores técnicos, permitiendo una mayor consistencia y confiabilidad en los resultados obtenidos.<sup>14,15,16,17.</sup>



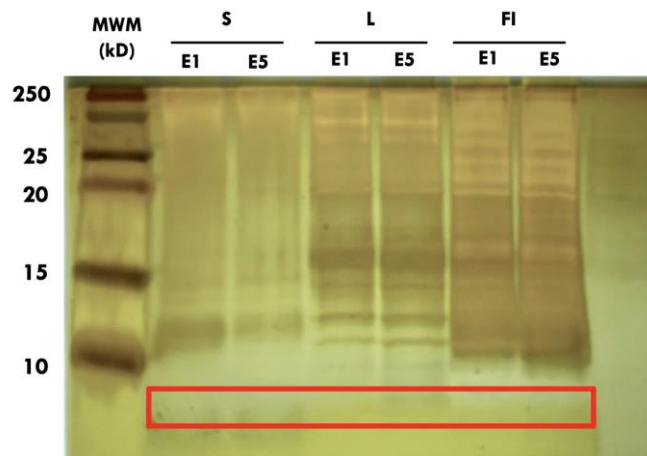
**Figura 4.** Determinación de tiempo de post-inducción para la expresión de la proteína rhEGF. Geles de electroforesis SDS-PAGE resultantes del ensayo de para determinación de tiempo de post-inducción a **A.** 48 y 72 horas y **B.** 96 horas. De izquierda a derecha está el marcador de peso molecular (MWM), control negativo (C(-)), muestra de la colonia EGFHT1, muestra de la colonia EGFHT5.

Posteriormente, se siguió con la verificación de la producción heteróloga de la proteína de interés, el rhEGF. Para ello, se realizó el proceso descrito en la *sección 3.2* y mediante un gel de SDS-PAGE al 14% se evaluaron las 3 fases obtenidas: medio de cultivo post-inducción, fase soluble (sobrenadante obtenido después de la centrifugación de la lisis celular) y fase insoluble (pellet obtenido después de la centrifugación de la lisis celular). Como se puede observar en la *Figura 5*, en la fase de medio de cultivo no se presentó ninguna banda que fuera correspondiente a la proteína de 6 kDa en ninguna de las fases, lo cual indicó una baja concentración de proteína. Por tanto, se repitió el proceso utilizando la tinción con plata, un método con mayor sensibilidad, en el rango de nanogramos, que permite detectar concentraciones muy pequeñas de proteína (Ver *Figura 6*). No

obstante, se observó el mismo comportamiento, no había ninguna banda a la altura de 6 kDa que indicará la presencia de la proteína de interés.



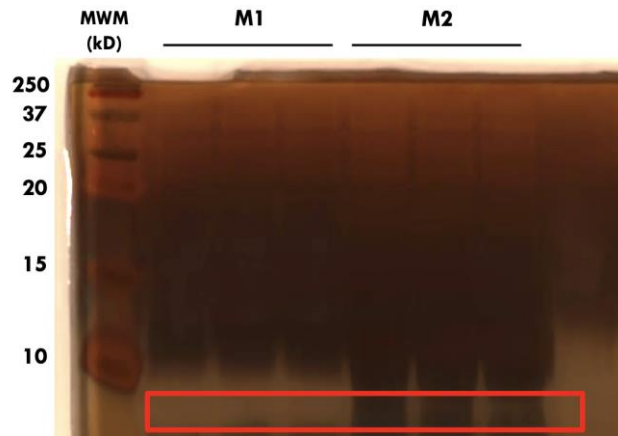
**Figura 5.** Gel de electroforesis SDS-PAGE para evaluar la concentración de proteína en el medio de cultivo post-inducción, fase soluble y fase insoluble. El orden de los pozos de izquierda a derecha es marcador de peso molecular (MWM), medio de cultivo post-inducción (S), fase soluble (L) y fase insoluble (FI). Cabe acotar, que se trabajó con las muestras obtenidas de la expresión a partir de dos colonias distintas de la levadura, EGFHT1 y EGFHT5.



**Figura 6.** Tinción con plata de Geles de electroforesis SDS-PAGE para evaluar la concentración de proteína en el medio de cultivo post-inducción, fase soluble y fase insoluble. El orden de los pozos de izquierda a derecha es marcador de peso molecular (MWM), medio de cultivo post-inducción (S), fase soluble (L) y fase insoluble (FI). Cabe acotar, que se trabajó con las muestras obtenidas de la expresión a partir de dos colonias distintas de la levadura, EGFHT1 y EGFHT5.

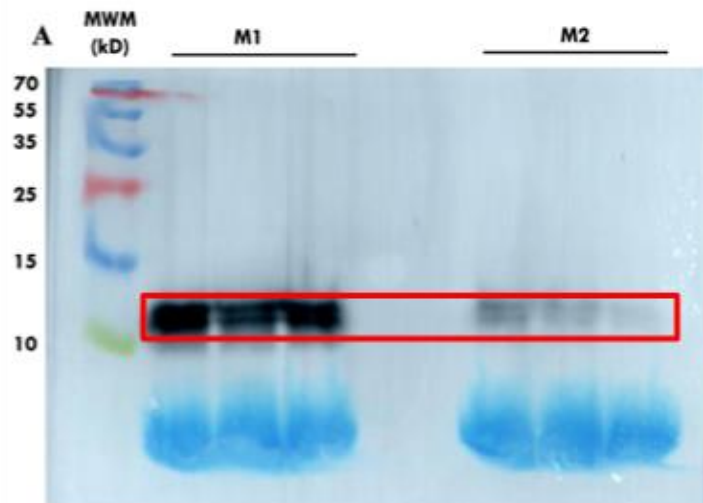
Teniendo en cuenta lo anterior, y con el fin de descartar que la ausencia de bandas se debiera a una baja concentración de proteína en lugar de su inexistencia, se decidió concentrar las muestras del medio de cultivo post-inducción utilizando un VivaSpin de 3 kDa y el procedimiento de la *sección 3.4.1*. En este sentido, en la *Figura 7*, se logra observar una resolución muy baja, posiblemente

debido a que el método de tinción con plata utilizado, a pesar de ser a partir de un kit, podría decirse que no está completamente estandarizado en los laboratorios de biotecnología de la Universidad Icesi, pues no es un método de uso frecuente. Esto dificulta la identificación clara de las bandas en los geles; sin embargo, en la *Figura 7*, se observa una banda tenue debajo de la última línea del marcador de peso molecular (MWM), lo cual sugiere la posible presencia de rhEGF.



**Figura 7.** Tinción con plata de Geles de electroforesis SDS-PAGE para evaluar la cantidad de proteína reconcentrada (M1) y concentrada (M2) de las muestras de medio de cultivo de post-inducción con la colonia EGFHT5. El orden de las muestras está ubicadas de la siguiente manera de izquierda a derecha: marcador de peso molecular (MWM), 3 réplicas de muestra 1 (M1) y 3 réplicas de muestra 2 (M2).

A partir de lo anterior, se realizó un análisis mediante Western blot para confirmar la presencia de la proteína recombinante. Este método destaca por su alta sensibilidad y especificidad, ya que utiliza anticuerpos capaces de reconocer regiones específicas de las proteínas denominadas epítomos. En nuestro caso, se empleó un anticuerpo dirigido contra las colas de histidina (His-tag), que fueron incorporadas a la proteína de interés, el rhEGF, durante su diseño para facilitar su detección. Así, el anticuerpo utilizado en el Western blot se unió específicamente a estas colas de histidina, permitiendo una identificación precisa del rhEGF incluso en bajas concentraciones. Para garantizar la consistencia en los resultados, se analizaron las mismas muestras previamente evaluadas mediante SDS-PAGE (Ver *Figura 7*).



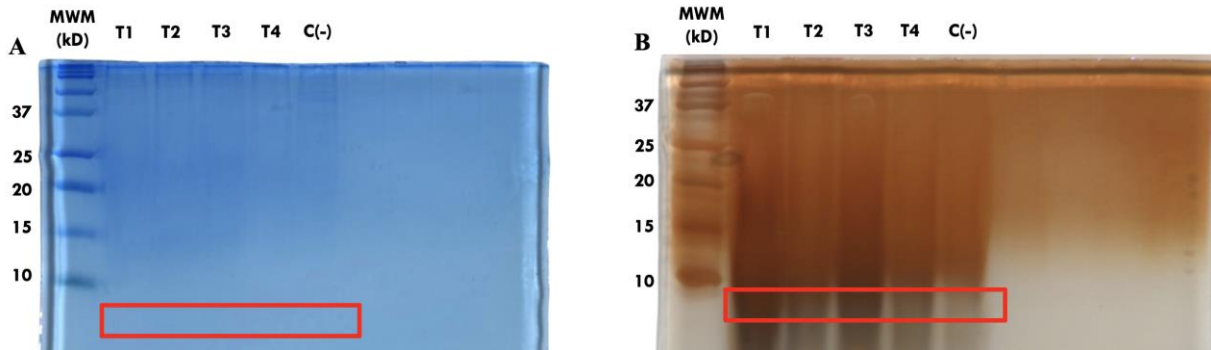
**Figura 8.** Evaluación de la expresión de rhEGF mediante Western blot en las muestras de cantidad proteína reconcentrada (M1) y concentrada (M2) del medio de cultivo de post-inducción con la colonia EGFHT5. Las muestras están ubicadas de la siguiente manera: marcador de peso molecular (MWM), muestra reconcentrada (M1) y muestra concentrada (M2).

De acuerdo con la *Figura 8*, se verificó la presencia de la proteína mediante la observación de una banda a la altura correspondiente a un peso molecular superior a 10 kDa. No obstante, este peso no coincide con el valor esperado para el rhEGF con His-tag, el cual, según la literatura, debería estar en torno a los 7 kDa como máximo. Esto se basa en que la adición de una etiqueta de histidina de seis residuos generalmente incrementa el peso molecular de la proteína en aproximadamente 0.7 a 1 kDa. La diferencia sugiere la posibilidad de modificaciones postraduccionales o de interacciones no específicas que alteran el peso molecular aparente en la membrana. En concreto, *K. pastoris* tiene la capacidad de glicosilar proteínas, lo que podría haber llevado a la adición de un glicano grande a la cadena principal de la proteína, por lo que el peso molecular pudiera verse afectado, afectando su peso molecular. Además, hEGF cuenta con regiones propensas a interacciones no covalentes que pueden influir en la formación de dímeros, la cual no es desconocida e incluso se sabe que aminoácidos como Leu15 y His16 contribuyen en las interacciones necesarias para la formación de estos, abriendo la puerta a hipótesis, como la formación de uniones intermoleculares debido a las regiones no polares como Leu15, sin embargo, se sabe muy poco sobre el mecanismo molecular de la dimerización del hEGF, y son varias las hipótesis que existen.<sup>18,19,20,21.</sup>

#### 4.3. Verificación de la expresión de la proteína modificando la concentración del inductor

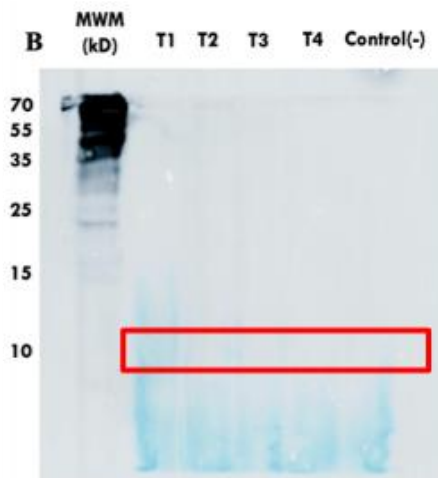
Basándonos en los resultados de Adi Santoso y colaboradores, quienes evaluaron la cantidad de proteína producida en función de la cantidad de inductor agregado, decidimos replicar el experimento utilizando cuatro tratamientos diferentes. Para ello, se varió la concentración de metanol, incrementándola en un 0,5% en cada tratamiento. De este modo, se comenzó con una concentración de 0,5%, la cual es ampliamente empleada según la literatura, y se alcanzó una concentración final de 2%. Es importante señalar que, para este experimento, se repitió el proceso

de expresión y el medio de cultivo post-inducción se concentró de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 3.5. Una vez finalizado el proceso anterior, se realizaron geles de SDS-PAGE y se aplicaron técnicas de tinción con Coomassie y plata para analizar los resultados (ver *Figura 9*).<sup>22</sup>



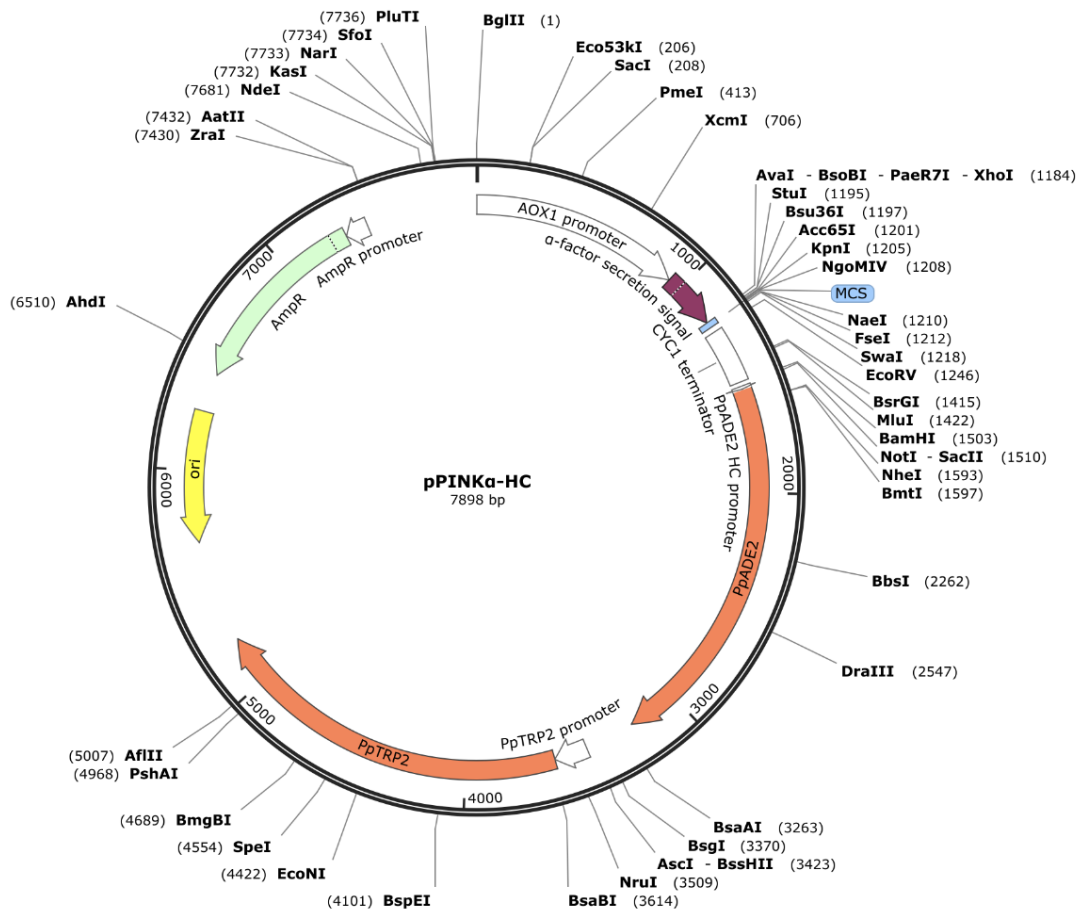
**Figura 9.** Geles de electroforesis SDS-PAGE al 14% para la evaluación de muestras de proteína concentrada bajo diferentes condiciones de inducción. Se utilizaron cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de metanol durante el proceso de inducción de la proteína, además de un control negativo sin metanol. La tinción de proteínas se realizó con Coomassie (A) y con plata (B). El orden de los pozos de izquierda a derecha es el siguiente: marcador de peso molecular (MWM), tratamiento 1 (0,5%), tratamiento 2 (1%), tratamiento 3 (1,5%), tratamiento 4 (2%) y control negativo (C(-)).

Como se puede observar en la *Figura 7*, no se identificaron bandas visibles a la altura de 6 kDa o 10 kDa, en caso de que se hubieran formados dímeros, por lo tanto, no se puede establecer que la proteína se produjo a partir del sistema de expresión empleado. Por esta razón, se realizó un Western blot adicional con el objetivo de verificar la producción de rhEGF. Sin embargo, de acuerdo con los resultados mostrados en la *Figura 10*, se determinó que la proteína no fue producida. Esto sugiere que la cepa de *K. pastoris* utilizada podría no ser un sistema estable o eficiente para la producción de rhEGF en estas condiciones.



**Figura 10.** Membrana de Western Blot evaluando proteína concentrada. El orden de los pozos de izquierda a derecha es: marcador de peso molecular (MWM), tratamiento 1 (T1), tratamiento 2 (T2), tratamiento 3 (T3), tratamiento 4 (T4) y control negativo (C(-)).

La ausencia de expresión de la proteína de interés según los resultados mostrados previamente puede estar influenciada por múltiples factores. En primer lugar, al diseño del casete de expresión en el plásmido pPinkalfa-HC (Ver *Figura 11*), ya que según la literatura, la estabilidad y eficiencia de expresión de proteínas recombinante en sistemas, como las levaduras, pueden verse comprometidas si este casete no está bien diseñado o si la integración del plásmido en el genoma de *K. pastoris* es inestable, lo cual podría llevar a la pérdida del gen insertado o a niveles de expresión insuficientes.<sup>23</sup>



**Figura 11.** Yeast plasmid pPINK(Alpha)-HC

En segundo lugar, se debe acotar que la cepa de la levadura modificada, se encontraba almacenada a manera de subcultivos de colonias que se conservaban en cajas Petri a 4°C. Este tipo de almacenamiento, aunque es adecuado para periodos cortos de tiempo, no es el ideal para conservación prolongada de cepas transformadas. Diversos factores, podrían haber afectado la

capacidad de la misma para la producción del rhEGF de manera eficiente. Principalmente, la viabilidad de las células puede disminuir si no se criopreservan correctamente usando agentes crioprotectores como el glicerol. Esto, en vista de que las bajas temperaturas (-80 °C) ralentizan el metabolismo, pero no lo detienen completamente, lo que puede causar un desgaste gradual de las células y así sean menos susceptibles a la inestabilidad genética. En cambio, si se son almacenadas bajo métodos que no son de congelación profunda, puede ocurrir una pérdida parcial o total del plásmido, así como mutaciones no deseadas. Por esta razón, la mejor forma para almacenar cepas, sin que haya cambios a nivel genómico, es empleando la criopreservación, ya que esta permite un almacenamiento a largo plazo y es más económica que otras técnicas como por ejemplo la liofilización.<sup>24</sup>

Asimismo, al desconocer con precisión el tipo de cepa utilizada para el proceso de transformación, puede que se hayan cometido errores al momento de plantear los experimentos y la cantidad de inductor empleado. Lo anterior, ya que existen fenotipos que cuentan con diferentes genes codificantes como lo son AOX1 y AOX2, y según el fenotipo que se tengan, varían las tasas de crecimiento. Esto, partiendo de que si se cuenta únicamente con AOX1 no hay problema con la tasa de crecimiento, pero si no se cuenta con AOX1 el crecimiento se ve drásticamente afectado. Otro factor es la producción de proteína, en levaduras este depende del consumo de metanol, la mayoría de autores recomiendan un uso de 0,5% de metanol y un máximo de 2,5% debido a que mayores porcentajes son nocivos para la biomasa, pero en contraste se ha visto que pocas cantidades de inductor generan una degradación proteolítica por lo que se obtienen bajos rendimientos.<sup>25</sup>

Ahora bien, es relevante destacar que en el proceso de expresión (Ver *Figura 2*), se consideró constantemente la disponibilidad de oxígeno, ya que una baja oxigenación afecta negativamente la biosíntesis de ergosterol, un componente crucial para la formación de la membrana celular en levaduras. Además, la falta de oxígeno impacta el metabolismo central del carbono y la respuesta al estrés, elementos fundamentales para el crecimiento y productividad de las levaduras. Por esta razón, se utilizaron Erlenmeyers con deflectores, ya que estos incrementan la transferencia de oxígeno y aseguran un suministro más adecuado para los microorganismos. De igual forma, estos ayudan a prevenir zonas de baja oxigenación, lo que permite una distribución de oxígeno casi uniforme. Sin embargo, también presentan ciertas limitaciones como la ubicación de los deflectores, pues esta puede generar variaciones en la tasa de transferencia de oxígeno entre diferentes tratamientos. Esto, dificulta mantener condiciones uniformes en todos los ensayos. Además, el aumento de la transferencia de oxígeno puede causar una mayor formación de espuma, lo cual es perjudicial para el incremento de la biomasa y puede afectar la eficiencia del proceso.<sup>26</sup>  
<sup>27</sup>.

Lo anterior, también se ve influenciado por la composición de los medios de cultivo empleados, se emplearon medios ya conocidos por sus buenos rendimientos en *K. pastoris* que permitieran alta

formación de biomasa y producción de proteína. Para el crecimiento de levaduras se empleó medio BMGY, las cuales sus siglas en inglés significan “Buffered Glycerol- complex Medium”, esta solución nutritiva es ideal para el crecimiento de biomasa ya que contiene glicerol como principal fuente de carbono permitiendo un rápido crecimiento sin inducir la expresión de los genes controlados por AOX1; además, no es un compuesto tóxico, por lo que, permite la acumulación de biomasa, cuenta también con sales que son vitales para las funciones de la levadura así como para el control del pH, el cual puede disminuir debido a desechos o células muertas.

Una vez alcanzada una densidad celular óptima, se realizó el cambio al medio de cultivo que permitiera la inducción de la proteína recombinante. Para ello, se utilizó el medio BMMY (Buffered Methanol- complex Medium), cuyos componentes son los mismos que el de crecimiento con la única diferencia de la fuente de carbono, que en este caso es metanol y no glicerol. Este compuesto es indispensable, ya que activa el promotor AOX1 del constructo genético y así desencadenar la producción de la proteína.

Otro factor crítico es la temperatura, ya que influye tanto en el desarrollo de biomasa como en la eficiencia de expresión. La temperatura afecta aspectos como la cantidad de proteína secretada y el correcto plegamiento. En este proyecto, se utilizó la temperatura recomendada por diversos autores, que oscila entre 25°C y 30°C. Estas temperaturas, inferiores a 30°C, son favorables para el metabolismo energético, promueven un buen plegamiento y una eficiencia alta de expresión, además de disminuir la muerte celular y la degradación de proteína y aseguran una alta eficiencia, específicamente para el factor de crecimiento epidérmico se determinó que la temperatura más indicada era a 29°C y que temperaturas superiores disminuían drásticamente la cantidad expresada<sup>13,28</sup>.

Después de revisar y analizar las posibles causas por las que la producción de rhEGF en *K. pastoris* no fue la esperada, se presentan a continuación algunas recomendaciones y perspectivas para optimizar resultados en investigaciones futuras. En primer lugar, se sugiere utilizar una cepa comercial bien establecida para la expresión de proteínas recombinantes, que haya demostrado estabilidad y eficacia frente al inductor, y que no presente posibles mutaciones que comprometan su rendimiento. Entre las cepas más utilizadas y recomendadas en la literatura se encuentra GS115, la cual ha sido empleada exitosamente en la producción de diversas proteínas, incluido el factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF). Asimismo, es fundamental seleccionar un vector de expresión confiable y ampliamente validado. En este sentido, se recomienda continuar utilizando el plásmido pPIC9K, conocido por su eficacia en la expresión de proteínas recombinantes. Este vector incluye el promotor AOX1 y el factor alfa, los cuales facilitan tanto la inducción como la secreción de la proteína de interés. La combinación del vector pPIC9K con la cepa GS115 ha demostrado ser una plataforma eficiente y confiable, incluso para la producción de hEGF.<sup>13</sup>

Finalmente, es crucial garantizar la correcta integración del transgén en el cromosoma de la levadura. Esto comienza desde el diseño de un casete de expresión adecuado, asegurando que la información genética se integre correctamente en el genoma de la cepa transformada. Antes de continuar con experimentos de expresión, se debe verificar mediante análisis moleculares, como PCR o Southern blot, que el transgén esté presente y correctamente integrado. Este paso es esencial, ya que errores en la clonación o la integración pueden ser determinantes en el éxito o fracaso de la producción de la proteína recombinante.

## **5. Conclusiones**

Dando cumplimiento al objetivo general del proyecto, se comprobó que la metodología aplicada resultó efectiva para la expresión de una proteína recombinante con colas de histidina. Las condiciones evaluadas (29 °C, 0,5% de inductor y 96 horas de expresión) demostraron ser favorables para la expresión de rhEGF en *Komagataella pastoris*, consolidando un protocolo viable para la producción inicial de esta proteína recombinante.

No obstante, la variabilidad observada en la expresión del rhEGF sugiere posibles deficiencias en el diseño del constructo genético y su integración cromosómica en el genoma de *K. pastoris*. Por lo tanto, la cepa y el constructo genético empleados no mostraron ser un sistema de expresión completamente consistente para la producción recombinante del factor de crecimiento epidérmico humano.

En conclusión, si bien se logró cumplir el objetivo general de este proyecto, persisten incógnitas relacionadas con la optimización del diseño y la integración del constructo genético para maximizar la producción de rhEGF. Por ello, este estudio constituye un punto de partida significativo y una oportunidad para futuras investigaciones destinadas a desarrollar un sistema de expresión más eficiente y reproducible.

## **6. Agradecimientos**

Queremos expresar nuestra más profunda gratitud a nuestras familias, pilares fundamentales en cada etapa de nuestra formación profesional y personal. Su constante apoyo y ejemplo han sido fuentes inagotables de inspiración, impulsándonos a alcanzar nuestras metas.

Extendemos nuestro sincero agradecimiento a nuestros tutores, Steven David Jiménez y Paola Andrea Caicedo, por su invaluable acompañamiento y respaldo a lo largo de este proceso. Su orientación y la oportunidad de adentrarnos en el fascinante mundo de la investigación científica han sido esenciales para nuestro crecimiento académico y personal.

Finalmente, agradecemos a nuestros compañeros del semillero de biotecnología, cuyo compromiso y trabajo conjunto han enriquecido nuestra experiencia e inspirado nuestro desarrollo en este campo de estudio.

## **7. Referencias**

1. Esquirol Caussa, J. & Herrero Vila, E. Un enfoque para el tratamiento de las úlceras de origen vascular: revisión y papel del factor de crecimiento epidérmico. *Angiologia* 68, 322–330 (2016).
2. Zeng, F. & Harris, R. C. Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol* 0, 2 (2014).
3. Esquirol Caussa, J. & Herrero Vila, E. Epidermal growth factor, innovation and safety. *Medicina Clínica (English Edition)* 145, 305–312 (2015).
4. Verified Market Reports. Global Epidermal Growth Factor EGF Market By Type (Liquid EGF, Powder EGF), By Application (EGF Cream, EGF Lotion), By Geographic Scope And Forecast. <https://www.verifiedmarketreports.com/product/epidermal-growth-factor-egf-market/> (2024).
5. Stefonek-Puccinelli, T. J. & Masters, K. S. Co-immobilization of gradient-patterned growth factors for directed cell migration. *Ann Biomed Eng* 36, 2121–2133 (2008).
6. Tamama, K., Kawasaki, H. & Wells, A. Epidermal Growth Factor (EGF) Treatment on Multipotential Stromal Cells (MSCs). Possible Enhancement of Therapeutic Potential of MSC. *J Biomed Biotechnol* 2010, (2010).
7. Shin, S. H., Koh, Y. G., Lee, W. G., Seok, J. & Park, K. Y. The use of epidermal growth factor in dermatological practice. *Int Wound J* 20, 2414–2423 (2023).
8. Parsons, J. et al. Production of Human Epidermal Growth Factor (hEGF) by in Vitro Cultures of *Nicotiana tabacum*: Effect of Tissue Differentiation and Sodium Nitroprusside Addition. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6, 131–138 (2010).
9. Negahdari, B., Shahosseini, Z. & Baniasadi, V. Production of human epidermal growth factor using adenoviral based system. *Res Pharm Sci* 11, 43 (2016).
10. Ma, Y. et al. High Efficient Expression, Purification, and Functional Characterization of Native Human Epidermal Growth Factor in *Escherichia coli*. *Biomed Res Int* 2016, (2016).
11. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol* 5, 79503 (2014).
12. Gao, M. & Shi, Z. Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylophilic *Pichia pastoris*. *Chin J Chem Eng* 21, 216–226 (2013).
13. Eissazadeh, S. et al. Production of recombinant human epidermal growth factor in *Pichia pastoris*. *Brazilian Journal of Microbiology* 48, 286 (2017).
14. Cinza, A. M. et al. Cultivo discontinuo para produccion de hEGF en levaduras. Establecimiento de un cultivo discontinuo para la producción del factor de crecimiento epidérmico humano en levaduras. *Caracterización del producto vol. 8* Preprint at (1991).
15. Pina, A. S., Lowe, C. R. & Roque, A. C. A. Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. *Biotechnology Advances vol. 32* 366–381 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.001> (2014).
16. Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B. & Harvey, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast vol. 22* 249–270 Preprint at <https://doi.org/10.1002/yea.1208> (2005).

17. Eissazadeh, S. et al. Production of recombinant human epidermal growth factor in *Pichia pastoris*. *Brazilian Journal of Microbiology* 48, 286–293 (2017).
18. Terpe, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 523–533 (2003).
19. Ogiso, H. et al. Crystal Structure of the Complex of Human Epidermal Growth Factor and Receptor Extracellular Domains. *Cell* 110, 775–787 (2002).
20. Lu, H.-S. et al. Crystal Structure of Human Epidermal Growth Factor and Its Dimerization. *J. Biol. Chem.* 276, 34913–34917 (2001).
21. Yang, M. et al. Role of N-linked glycosylation in the secretion and enzymatic properties of *Rhizopus chinensis* lipase expressed in *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact* 14, 1–14 (2015).
22. Santoso, A., Herawati, N. & Rubiana, Y. Effect of Methanol Induction and Incubation Time on Expression of Human Erythropoietin in Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris*. *Makara Journal of Technology* 16, 5 (2012).
23. Barrera, Q. B. P. CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris* SOBREPRODUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO. (Universidad Autónoma de Nuevo León, 2000).
24. Tutrina, A. & Zhurilov, P. Efficacy assessment of different cryoprotectants for preserving the viability of Enterobacterales strains at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . *Scientific Reports* 2024 14:1 14, 1–12 (2024).
25. Nakamura, Y. et al. A stable, autonomously replicating plasmid vector containing *Pichia pastoris* centromeric DNA. *Appl Environ Microbiol* 84, (2018).
26. Baumann, K. et al. The impact of oxygen on the transcriptome of recombinant *S. cerevisiae* and *P. pastoris* - a comparative analysis. *BMC Genomics* 12, 218 (2011).
27. Baffled VS Standard Erlenmeyer Flasks. <https://www.fdcell.com/productstags/baffled-vs-standard-erlenmeyer-flasks.html>
28. Joseph, J. A., Akkermans, S. & Van Impe, J. F. M. Effects of Temperature and pH on Recombinant Thaumatin II Production by *Pichia pastoris*. *Foods* 11, 1438 (2022).