



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A. C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Expresión heteróloga de péptidos
antiangiogénicos en *Pichia pastoris***

Tesis que presenta

M. en C. Sergio Calderón Salais

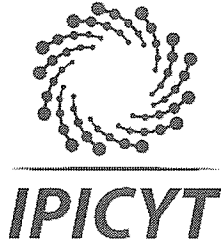
Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio De León Rodríguez

San Luis Potosí, SLP., septiembre de 2018.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Expresión heteróloga de péptidos antiangiogénicos en *Pichia pastoris***" presentada para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Sergio Calderón Salais** y aprobada el veintiséis de septiembre del dos mil dieciocho por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio De León Rodríguez
Director de la tesis

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa
Miembro del Comité Tutorial

Dr. Ana Silvia Pérez Martínez
Miembro del Comité Tutorial

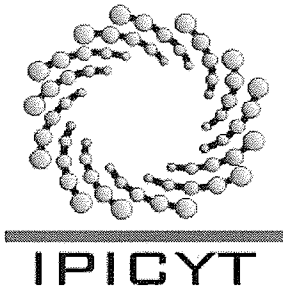
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio De León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (261084) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 102 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 26 días del mes de septiembre del año 2018, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Presidenta	IPICYT
Dra. Ana Silvia Pérez Martínez	Secretaria	UASLP
Dr. Antonio De León Rodríguez	Sinodal	IPICYT
Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Sergio Calderón Salais

sobre la Tesis intitulada:

Expresión heteróloga de péptidos antiangiogénicos en Pichia pastoris

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Antonio De León Rodríguez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:51 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 26 días del mes de septiembre de 2018.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico



Dedicatorias

En especial a Dafne, este doctorado es y siempre será de los dos.

A mis hijas Sofía y Natalia.

A mis padres Sergio y Norma.

A mis hermanos Jorge y Fidel.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (261084) por la manutención que me fue otorgada durante la realización del trabajo de tesis del año 2014 al 2018.

Agradezco a el Doctor Antonio De León Rodríguez por aceptarme en su exitoso grupo de trabajo, por su supervisión técnica y por sus correcciones realizadas al artículo, la tesis y demás documentos.

Agradezco a la Doctora Ana Silvia Pérez Martínez, a la Doctora Irene Castaño Navarro y a la Doctora Ana Paulina Barba de la Rosa, por ser parte de mi comité y por todo el esfuerzo y tiempo que eso conlleva.

Agradezco a Sergio Calderón Ibarra y a Norma Saláis Esparza por ayudarme económicamente en momentos difíciles y brindarme apoyo moral.

Agradezco a Dafne Karina Hernández Matamoros por su apoyo durante cada segundo de la realización del doctorado. Además, por darme la mayor motivación: Sofía y Natalia Calderón. Además, agradezco a Flavio Hernández Juárez y Elsa Matamoros Lerma por ser un apoyo constante para mi familia.

Agradezco a todos mis compañeros del laboratorio por sus consejos técnicos proporcionados y por sus comentarios en los seminarios internos. En especial, agradezco a Victor Balderas Hernández, por el apoyo técnico y las correcciones hechas en el artículo de investigación.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
Introducción	1
1. Angiogénesis	1
1.1 Cascada de eventos de la angiogénesis	1
1.2 Angiogénesis fisiológica	2
1.3 Angiogénesis patológica	3
2. Terapia antiangiogénica	3
2.1 Inhibidores de la vía de señalización VEGF	4
2.2 Inhibidores endógenos de la angiogénesis	4
2.2.1 Vasostatina	5
2.2.2 Vaso inhibina	6
3. Proteínas de fusión: aplicaciones en el área terapéutica.	8
4. <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión de proteínas con actividad antiangiogénica.	9
Justificación	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Metodología	13
1. Materiales	13
1.1 Cepas	13
1.2 Plásmidos	13
1.3 Secuencias de oligonucleótidos, genes y proteínas	13

2. Métodos de producción y manipulación de ADN	16
2.1 Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina	16
2.2 Extracción de ADN total de <i>Pichia pastoris</i>	16
2.3 Amplificación de genes por el método de PCR	16
2.4 Electroforesis en gel de agarosa	17
2.5 Recuperación de ADN en gel de agarosa	17
2.6 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	17
2.7 Cálculos y condiciones de ligación	18
2.8 Transformación de <i>E. coli</i> mediante choque térmico	18
3. Construcción de vectores de expresión	18
3.1 Síntesis y optimización de <i>osiris</i>	18
3.2 Inserción de <i>vs30</i> , <i>vi-ii-14.1</i> , <i>vs_vi</i> y <i>osiris</i> en los vectores de expresión	18
3.3 Método <i>in vitro</i> de multimerización del casete de expresión	19
4. Transformación de <i>Pichia pastoris</i>	21
4.1 Preparación de células electrocompetentes de <i>Pichia pastoris</i>	21
4.2 Linearización y concentración de vectores de expresión	21
4.3 Condiciones de electroporación y cultivo de transformantes	21
4.4 Método directo para la obtención de cepas hiperresistentes a G418	22
5. Métodos de expresión, detección, análisis y purificación de proteínas	22
5.1 Ensayos de expresión constitutiva e inducible a nivel matraz	22
5.2 Ensayos de expresión constitutiva a nivel biorreactor	22
5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	23
5.4 Tinción de proteína total y glicoproteínas	23
5.5 Cuantificación de proteínas	23
5.6 Transferencia semi-seca de proteínas a membranas de nitrocelulosa	24
5.7 Detección de proteínas recombinantes mediante colony blot, dot blot y western blot	24
5.8 Análisis de proteínas por densitometría	25
5.9 Purificación de <i>Vs30</i> por ultrafiltración	25
5.10 Purificación por cromatografía de afinidad	26
Resultados y discusión	27
1. Obtención de vectores de expresión y cepas transformantes	27

2. Ensayos de expresión y purificación de Vs30	29
2.1 Optimización del gene <i>vs30</i> y construcción de vectores multicopia	29
2.2 Selección de cepas secretoras de Vs30	30
2.3 Selección de las condiciones de cultivo para la producción de Vs30	31
2.4 Purificación de Vs30 por ultrafiltración	32
2.5 Expresión constitutiva de Vs30 en biorreactor	33
3. Ensayos de expresión y purificación de Vi-II-14.1	34
3.1 Optimización del gene <i>vi-ii-14.1</i>	34
3.2 Obtención de cepas hiperresistentes a G418	36
3.3 Selección de cepas secretoras de Vi-II14.1	37
3.4 Efecto del promotor, pH y tiempo de cosecha en la producción de Vi-II-14.1	38
3.5 Purificación de Vi-II-14.1 por cromatografía de afinidad	39
3.6 Detección de una versión glicosilada de Vi-II-14.1	40
4. Ensayos de expresión de VS_VI	41
5. Ensayos de expresión de OSIRIS	44
Conclusiones	48
Referencias	49
Anexos	58

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Proteínas de fusión con actividad inhibidora de la angiogénesis	9
2	Proteínas con actividad inhibidora de la angiogénesis producidas en <i>Pichia pastoris</i>	10
3	Lista de oligonucleótidos utilizados	13
4	Lista de secuencias de las proteínas de interés	15
5	Obtención de plásmidos y cepas de <i>Pichia pastoris</i>	28

Lista de figuras

Figura		Página
1	Cascada de eventos del proceso de la angiogénesis	1
2	Representación gráfica de la vasostatina	6
3	Representación gráfica de las principales versiones de la vasoinhibina	7
4	Representación gráfica de la proteína de fusión VS_VI	8
5	Secuencias y coordenadas de hibridación para los oligonucleótidos pGAP forward 5', Factor- α 5' y 3' AOX1	14
6	Esquema del ensamblaje de los vectores de expresión	19
7	Estrategia de multimerización <i>in vitro</i> de tipo <i>BamHI/BglII-BamHI</i>	20
8	Comparación entre la secuencia optimizada y nativa de <i>vs30</i>	29
9	Multimerización del vector de expresión con el gen <i>vs30</i>	30
10	Inmudetección en colonia y análisis electroforético de los sobrenadantes de las cepas <i>P-SMDVs30</i> y <i>P-SMDVs30.4x</i>	31
11	Efecto del pH y el tiempo de cosecha en la producción de <i>Vs30</i>	32
12	Purificación de <i>Vs30</i> por ultrafiltración	33
13	Cinética de crecimiento celular y de producción de <i>Vs30</i> del biorreactor batch de 1 L de la cepa <i>P-SMDVs30.4x</i>	33
14	Cálculo de valores cinéticos y estequiométricos del biorreactor batch de 1 L de la cepa <i>P-SMDVs30.4x</i>	34
15	Comparación entre la secuencia optimizada y nativa de <i>vi-ii-14.1</i>	35
16	Caracterización de las cepas transformadas por el método CASA	37
17	Inmunodetección en colonia de <i>Vi-II-14.1</i>	38
18	Expresión inducible y constitutiva de <i>Vi-II-14.1</i>	38
19	Efecto del pH y el tiempo de cultivo en la producción de <i>Vi-II-14.1</i>	39
20	Purificación de <i>Vi-II-14.1</i> por cromatografía de afinidad	40
21	Detección de una versión glicosilada de <i>Vi-II-14.1</i>	41
22	Multimerización del casete de expresión con el gene <i>vi_vi</i>	42
23	Inmunodetección en colonia de <i>VS_VI</i>	43
24	Efecto del número de copias en la producción de <i>VS_VI</i>	43
25	Representación gráfica de la proteína OSIRIS	44
26	Construcción de casetes de expresión para el gen <i>osiris</i>	45
27	Detección de pPIC9K-OSIRIS en el genoma de <i>Pichia pastoris</i>	46
28	Inmunodetección de OSIRIS	47

Resumen

Expresión heteróloga de péptidos antiangiogénicos en *Pichia pastoris*

La vasostatina (Vs30) y la vaso inhibina (Vi-II-14.1) son péptidos inhibidores de la angiogénesis que son derivados de la región N-terminal de la calreticulina y la prolactina humana, respectivamente. Anteriormente, Vs30, Vi-II-14.1 y VS_VI habían sido producidos en *E. coli*, no obstante, la producción de péptidos terapéuticos en bacterias generalmente requiere de pasos que pueden ser evitados empleando el sistema de *Pichia pastoris*, como: 1) la extracción de la proteína por lisis células, 2) el procesamiento de cuerpos de inclusión y 3) el análisis de controles adicionales para endotoxinas, las cuales pueden modular la proliferación de células endoteliales. Por lo tanto, en este trabajo de investigación se utilizó a *Pichia pastoris* como sistema de expresión para producir los péptidos Vs30, Vi-II-14.1 y VS_VI. Además, se propuso obtener la proteína de fusión OSIRIS, la cual consta de la vasostatina, una región de reconocimiento de proteasas MMP-2 y MMP-9, un enlazador GGPGG y la vaso inhibina. OSIRIS tiene como estrategia principal el aprovechar los ambientes tumorales con alta actividad proteolítica con el fin de activar de manera localizada péptidos inhibidores de la angiogénesis. Se desarrolló una batería de vectores de expresión que incluían promotores inducibles o constitutivos, con una copia o múltiples copias del casete de expresión. Posteriormente, se obtuvieron cepas de *Pichia pastoris* productoras y secretoras de las proteínas Vs30, Vi-II-14.1, VS_VI y OSIRIS. La estrategia para aumentar la producción de Vs30 consistió en utilizar cepas de *Pichia pastoris* con integraciones múltiples del vector de expresión constitutiva. De esta manera, se alcanzó una cantidad equiparable de 21.07 ± 0.9 mg/L de Vs30 en cultivos en matraz y en biorreactor utilizando una cepa con 4 integraciones del vector de expresión. Vs30 fue purificada por ultrafiltración y se recuperaron 10.4 mg/L con un 98% de pureza. Por otra parte, se realizó la expresión inducible de Vi-II-14.1 en *Pichia pastoris*, en la cual se alcanzó una producción de 68.5 mg/L. En cuanto a la expresión constitutiva, se obtuvo la cepa *p*-GS115-Vi la cual secretó 126.8 mg/L de Vi-II-14.1 a las 24 h de cultivo a pH 7. Vi-II-14.1 fue purificada mediante cromatografía de afinidad obteniendo una pureza superior al 90% con una recuperación de 2 mg/L. En conclusión, *Pichia pastoris* es capaz de producir y secretar los péptidos Vs30, Vi-II-14.1, VS_VI y la proteína de fusión OSIRIS. Este trabajo de tesis presenta estrategias moleculares con las que se aumentó la producción de los péptidos antiangiogénicos como la construcción de vectores multicopia, el uso de distintos promotores y un método novedoso para la obtención de cepas de *Pichia pastoris* hiperresistentes a G418.

PALABRAS CLAVE. Angiogénesis, proteína de fusión, vasostatina, vaso inhibina, vector multicopia, cepa hiperresistente.

Abstract

Heterologous expression of antiangiogenic peptides in *Pichia pastoris*

Vasostatin (Vs30) and vasoinhibin (Vi-II-14.1) are peptides that inhibit angiogenesis and are derived from the N-terminal region of human calreticulina and prolactin, respectively. Previously, Vs30, Vi-II-14.1 and VS_VI were expressed in *E. coli*, however, the production of therapeutic peptides in bacteria usually requires steps that can be avoided by using *Pichia pastoris*, such as: 1) protein extraction by cell lysis, 2) processing of inclusion bodies and 3) analysis of additional controls for endotoxins, which can modulate the proliferation of endothelial cells. Therefore, the aim of this thesis was to express Vs30, Vi-II-14.1 and VS_VI in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Furthermore, the OSIRIS fusion protein was proposed, which consists of the vasostatin, a region susceptible to MMP-2 and MMP-9 proteases, a GGPGG linker, and the vasoinhibin. The OSIRIS fusion aims to take advantage of tumor environments with high proteolytic activity in order to locally release peptides that inhibit angiogenesis. A battery of expression vectors was created with the genes of interest including vectors with inducible or constitutive promoters, and with one copy or multiple copies of the expression cassette. Subsequently, producing and secreting strains of the proteins Vs30, Vi-II-14.1, VS_VI and OSIRIS were obtained. The strategy to increase the production of Vs30 comprised of employing protease deficient strains of *Pichia pastoris* with multiple integrations of the constitutive expression vector. In this way, a comparable amount of Vs30 (21.07 ± 0.9 mg/L) was reached in flasks as well in bioreactor cultures by a strain with 4 integrations of the expression vector. Vs30 was purified by ultrafiltration, whereby 10.4 mg/L was recovered with 98% purity. On the other hand, the inducible expression of Vi-II-14.1 was performed in *Pichia pastoris*, in which 68.5 mg/L of Vi-II-14.1 was produced. About the constitutive expression, 126.8 mg/L of Vi-II-14.1 was secreted at 24 hours of culture at pH 7 by the *p*-GS115 strain. Vi-II-14.1 was purified by affinity chromatography with purity above of 90% and a recovery of 2 mg/L. In conclusion, *Pichia pastoris* is capable of producing and secreting Vs30, Vi-II-14.1, VS_VI, and the OSIRIS fusion protein. This thesis offers the reader a compilation of molecular strategies with which the production of the peptides was increased, such as construction of multicopy vectors, employment of diverse promoters, and a novel method for obtaining G418-hyperresistant strains of *Pichia pastoris*.

KEYWORDS. Angiogenesis, fusion protein, vasostatin, vasoinhibin, multi-copy vector, hyper-resistant strain.

Introducción

1. Angiogenesis

Los vasos sanguíneos pueden ser sintetizados *de novo* (vasculogénesis) o a partir de la vasculatura preexistente (angiogénesis). La túnica íntima de los vasos sanguíneos está constituida por una monocapa de células endoteliales (ECs) las cuales proliferan, remodelan la matriz extracelular y forman estructuras tubulares durante la angiogénesis [1]. Bajo condiciones fisiológicas, la angiogénesis es un proceso controlado que únicamente tiene lugar durante la cicatrización de heridas, el crecimiento esquelético, el ciclo menstrual y el embarazo [2]. Por otra parte, la angiogénesis se presenta de forma no controlada en numerosas enfermedades, entre ellas se encuentra el cáncer, la retinopatía diabética y la artritis reumatoide [3].

1.1 Cascada de eventos de la angiogénesis

La angiogénesis ramificante es un proceso que pueden ser dividido en tres etapas (Figura 1): 1) activación, 2) invasión y 3) maduración.

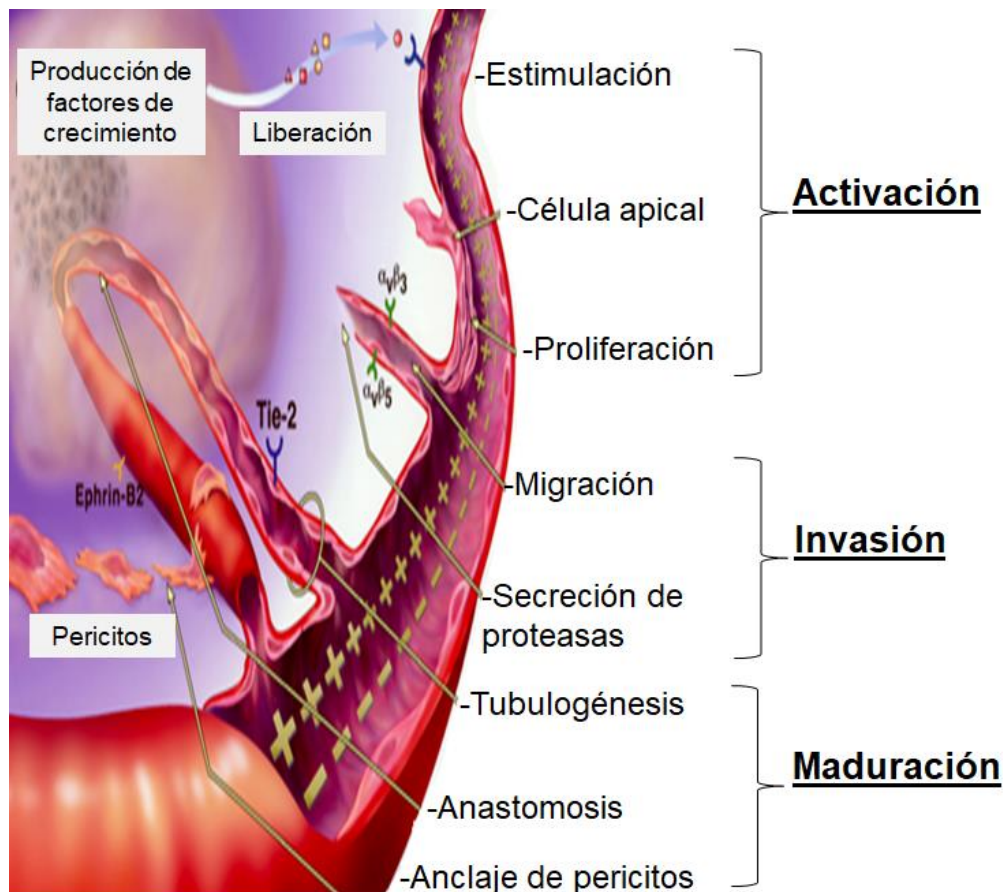


Figura 1. Cascada de eventos del proceso de la angiogénesis

En la etapa de activación, se da la estimulación de ECs mediante la unión de factores de crecimiento a sus receptores de membrana [4]. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF por sus siglas en inglés) y su receptor (VEGFR) tienen un papel protagónico en la estimulación de la angiogénesis [5–7], no obstante, existen otros factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del fibroblasto (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF-beta), entre otros [8, 9].

La estimulación de ECs desencadena los siguientes eventos: a) diferenciación de una célula endotelial apical que va a guiar el crecimiento de la nueva ramificación sanguínea [10], b) degradación de la membrana basal por metaloproteinasas de matriz (MMPs) producidas por ECs [11], c) desprendimiento de pericitos de la membrana basal [12] y d) proliferación de ECs [13].

La remodelación de la matriz extracelular permite la extensión y migración del vaso sanguíneo hacia el foco de estimulación. En este sentido, las ECs producen MMP2, MMP9 y matriz metaloproteinasa asociada a membrana de tipo 1 (MT1-MMP) para proteolizar los componentes de la matriz extracelular y para promover la liberación de factores de crecimiento adheridos a heparán sulfato proteoglicanos [14]. La migración de las células endoteliales es un evento complejo, en el cual las integrinas son el enlace entre los componentes de la matriz extracelular y los filamentos de actina intracelulares de las ECs [15]. Las integrinas que están implicadas en la angiogénesis son las siguientes: 1) $\alpha\beta3$ de unión a vitronectina, fibronectina, fibrinógeno, factor von Willebrand y formas proteolizadas de colágeno y laminina; 2) $\alpha4\beta1$ y $\alpha5\beta1$ de unión a fibrinectina; 3) $\alpha1\beta1$ y $\alpha2\beta1$ de unión a colágeno y 4) $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$ y $\alpha6\beta4$ de unión a laminina [16], [17].

En la fase de maduración vascular ocurre la anastomosis, evento donde ocurre la fusión entre vasos sanguíneos provenientes de distintas ramificaciones. Por otra parte, las ECs producen el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que promueve el anclaje de pericitos a la estructura tubular naciente. En este contexto, las ECs producen el inhibidor tisular de metaloproteinasas 2 y los pericitos producen TIMP3 (Inhibidor tisular de la metaloproteinasa-3). En consecuencia, el fenotipo proteolítico de las ECs se cancela y se restablece la quiescencia del vaso sanguíneo [18, 19].

1.2 Angiogénesis fisiológica

La angiogénesis es un proceso fundamental en la implantación del embrión durante la fase de establecimiento. El sistema cardiovascular es el primer órgano funcional en el desarrollo del embrión [20]. En este sentido, el plexo vascular primitivo es formado inicialmente por vasculogénesis y posteriormente es expandido mediante angiogénesis [21]. Durante el embarazo, el factor de crecimiento placentario (PLGF), el bFGF y VEGF-A son expresados en el endometrio, la decidua y la placenta humana [22]. Por otra parte, la angiogénesis participa en la osificación endocondral durante el desarrollo

del sistema esquelético fetal. En este proceso, los vasos sanguíneos invaden el cartílago que finalmente será sustituido por hueso [23].

En la adultez, la angiogénesis fisiológica únicamente tiene lugar en el ciclo menstrual y la curación de heridas. En la menstruación, la angiogénesis participa en el crecimiento y regresión del endometrio, el crecimiento folicular y el desarrollo de corpus luteum. En este contexto, la angiogénesis es estimulada por factores de crecimiento producidos en los siguientes eventos: 1) las células estromales uterinas producen VEGF-A a consecuencia de la acción hormonal del estradiol y la progesterona, 2) los neutrófilos infiltrados en el endometrio producen VEGF-A y 3) el corpus luteum produce VEGF-A posterior a la ovulación [24, 25].

En la curación de heridas, las plaquetas producen VEGF-A durante la fase de coagulación. Este evento desencadena la vasodilatación y en consecuencia, la extravasación de la fibronectina dentro del espacio extracelular para formar un coágulo sanguíneo de fibrina. Posteriormente, el tejido granular sustituye al coágulo inicial y se encarga de la remodelación tisular. El tejido granular está compuesto por fibroblastos, colágeno y vasos sanguíneos producidos por angiogénesis. En la curación de heridas, al menos 10 estimuladores de la angiogénesis (IL-1, TNF- α , EGF, TGF- β , HGF, FGF-2, PDGF, CTGF, IGF, VEGF, entre otros) son producidos por keratinocitos, fibroblastos, fibrocitos, células endoteliales y células inflamatorias [26–28].

1.3 Angiogénesis patológica

La angiogénesis patológica ocurre de forma deficiente o excesiva en numerosos desórdenes. En enfermedades isquémicas, la angiogénesis es defectuosa debido a la regresión de vasos sanguíneos, a la disfunción de las células endoteliales o a una revascularización deficiente [29, 30]. Por otra parte, en enfermedades como el cáncer o la artritis reumatoide, la estimulación persistente de la angiogénesis desencadena la sobreproducción de vasos sanguíneos, lo cuales presentan anomalías estructurales y pérdida de pericitos [31–33].

Un aspecto bien establecido en la biología del cáncer es la dependencia de la angiogénesis en el desarrollo tumoral, ya que los vasos sanguíneos son necesarios para la remoción de desechos metabólicos y para el suministro de oxígeno, nutrientes, hormonas y factores de coagulación. La angiogénesis es constantemente estimulada por factores de crecimiento producidos en exceso dentro del microambiente tumoral (TME) que está formado por células tumorales, fibroblastos, macrófagos, linfocitos T y demás células inflamatorias. Además, el TME genera un ambiente proteolítico que degrada la matriz extracelular y, posteriormente, permite el crecimiento del tumor, el ingreso de células tumorales a los vasos sanguíneos y la invasión a otras partes del organismo [34–37].

2. Terapia antiangiogénica

La investigación y el desarrollo de compuestos moduladores de la angiogénesis se han dirigido principalmente hacia el tratamiento del cáncer, ya que es una de las

enfermedades con mayor importancia biomédica [33, 38]. Sin embargo, también se han desarrollado compuestos para el tratamiento de la artritis reumatoide y para desórdenes oculares degenerativos [39, 40]. La propuesta de la terapia antiangiogénica para el tratamiento del cáncer, se establece con base en la observación de que los tumores necesitan de vasos sanguíneos para crecer más allá de 2 mm³. En este sentido, se espera que al inhibir la angiogénesis se restrinja el tamaño de los tumores quedándose en un estado de dormancia y provocando que el cáncer sea una enfermedad crónica y asintomática. En las últimas décadas de investigación clínica se ha actualizado el concepto de la terapia antiangiogénica, en la que no sólo se busca la regresión de vasos sanguíneos sino la normalización vascular en el TME. Esto debido a que la hipoxia provoca en ciertos tumores mayor agresividad y un fenotipo metastásico [41, 42].

2.1 Inhibidores de la vía de señalización VEGF

La vía de señalización VEGF es el blanco principal de la terapia antiangiogénica debido a su importancia en la estimulación y migración de células endoteliales. En este sentido, se han desarrollado: 1) anticuerpos contra el VEGF y sus receptores, 2) receptores solubles para el secuestro de VEGF, 3) moléculas de unión a receptores de VEGF, 4) bloqueadores de la auto-fosforilación de los receptores de VEGF y 5) compuestos que interactúan con el ARN mensajero del VEGF y bloquean la traducción [43], [44].

Algunos tumores tienen la capacidad de presentar resistencia hacia los inhibidores de la vía de señalización VEGF debido a que en el TME se producen factores de crecimiento alternos como el bFGF (Factor de crecimiento del fibroblasto básico) o el PDGF (Factor de crecimiento derivado de plaquetas) [33, 45]. Por lo que otra estrategia para el tratamiento del cáncer es realizar combinaciones de la quimioterapia convencional con inhibidores de la angiogénesis [46, 47]. También con la idea de evadir la resistencia de los tumores, se busca el desarrollo de compuestos terapéuticos capaces de inhibir múltiples eventos de la cascada de la angiogénesis.

2.2 Inhibidores endógenos de la angiogénesis

Los compuestos terapéuticos inhibidores de la angiogénesis pueden ser de naturaleza proteínica, fitoquímicos o moléculas sintéticas pequeñas. Los inhibidores exógenos generalmente tienen un blanco terapéutico único que es la vía de señalización VEGF. Por otra parte, los inhibidores endógenos tienen múltiples blancos en el proceso angiogénico [48].

Los inhibidores endógenos de la angiogénesis son proteínas o fragmentos peptídicos producidos dentro del organismo. Algunos ejemplos de inhibidores endógenos son el factor derivado del epitelio pigmentario, trombospondinas 1 y 2, el factor plaquetario 4, interleucina 12 y el interferón 2 alfa. Otros inhibidores endógenos son fragmentos peptídicos derivados principalmente de proteínas de la matriz extracelular (Ej. endostatina derivada del colágeno) y de componentes de la coagulación (Ej. angiostatina derivada del plasminógeno) [49,50].

Los péptidos inhibidores de la angiogénesis que son de interés en el presente trabajo de investigación son la vasostatina y la vasoinhibina, los cuales son fragmentos derivados de la región N-terminal de la calreticulina y de la prolactina humana, respectivamente. Ambos péptidos antiangiogénicos tienen la capacidad de inhibir la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* y tienen actividad antitumoral en modelos animales. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de acción por el que Vs30 y Vi-II-14.1 tienen la capacidad de inhibir la angiogénesis.

2.2.1 Vasostatina

La vasostatina (Figura 2) proviene de la región N-terminal que contiene los aminoácidos de 1 al 180 de la calreticulina humana (CALR). Sin embargo, también se le ha nombrado vasostatina a un fragmento derivado de la cromagranina A [51]. En este proyecto se trabajó con la vasostatina derivada de CALR de 46 kDa localizada principalmente en el retículo endoplasmático donde tiene actividad de chaperona. No obstante, la CALR también está implicada en la regulación intracelular de calcio [52].

La vasostatina fue inicialmente aislada de sobrenadantes de la línea celular VDS-O inmortalizada con el virus de Epstein-Barr. Este descubrimiento se logró con base en la observación de que la línea VDS-O inhibía la angiogénesis y podía promover la regresión experimental de linfoma de Burkitt, carcinoma de colon y otros tumores humanos en ratones atímicos. Consecuentemente, se determinó que la vasostatina inhibe la proliferación de células endoteliales *in vitro*, inhibe la angiogénesis *in vivo* y reduce el tamaño de tumores experimentales [53]. Posteriormente, se observó que la actividad antiangiogénica residía en el dominio compuesto por los aminoácidos 120-180 de la CALR [54].

A la fecha no se conoce el mecanismo de acción por el cual la vasostatina inhibe la angiogénesis. Sin embargo, se ha observado mediante experimentos *in vitro* que la vasostatina impide la adhesión de las células endoteliales a la laminina, por lo tanto, se propone que este evento provoque la inhibición de la proliferación y la migración de las células endoteliales [55]. Por otra parte, la vasostatina inhibe la tubulogénesis *in vitro* de células endoteliales del cordón umbilical (HUVECs) [56]. La vasostatina no inhibe el proceso de curación de heridas a concentraciones utilizadas en el tratamiento de tumores en ratones atímicos [57]. Además, se observó que la vasostatina tiene actividad antiinflamatoria en ratones y disminuye los niveles de angiopoyetina 2 [58].

La vasostatina se ha producido en *E. coli* de manera intacta y en versiones que facilitan su purificación como: a) la versión fusionada con 6 histidinas en la región C-terminal [59], b) la versión fusionada con el péptido derivado de la proteína de unión a maltosa en la región N-terminal [54] y c) la versión fusionada con la GST (Glutación S-transferasa) en la región N-terminal [60]. De este modo, se observó que todas las versiones recombinantes retienen la actividad antiangiogénica *in vitro* e *in vivo*. La vasostatina se ha unido con metodología de ADN recombinante con otros péptidos antiangiogénicos generando las siguientes proteínas de fusión: l) la fusión PFV compuesta por el fragmento C-13 del factor plaquetario 4 y la vasostatina (aminoácidos

135-164) [61], II) la fusión ALV compuesta por el fragmento ATF de la urokinasa y la vasostatina (aminoácidos 120-180) [62], III) la fusión VS_VI compuesta por la vasostatina (aminoácidos 135-164) y la vasoinhibina [59], y IV) la fusión VTF compuesta por la vasostatina (aminoácidos 120-180) y la tumstatina [63].

El fragmento activo de la vasostatina (Vs30) es un péptido compuesto por 30 aminoácidos (135-164) [61]. En nuestro grupo de trabajo, se produjo Vs30-6His (Vs30 fusionada con 6 histidinas) en *E. coli* BL21-SI cotransformada con un vector de expresión basado en el promotor T7. La Vs30-6His purificada inhibió *in vitro* la proliferación de células endoteliales coronarias de ratón (CEC) [59]. En este trabajo de tesis, se expresó constitutivamente la Vs30-6His en una cepa deficiente de proteasas de *Pichia pastoris*. La estrategia de expresión consistió en la optimización de la secuencia de ADN de *vs30* de acuerdo con el uso preferencial de codones en *Pichia pastoris*, así como de la multimerización del casete de expresión. La Vs30-6His producida en *Pichia pastoris* inhibió *in vitro* la proliferación y la formación de estructuras tubulares de las células endoteliales EA.hy926 [64].

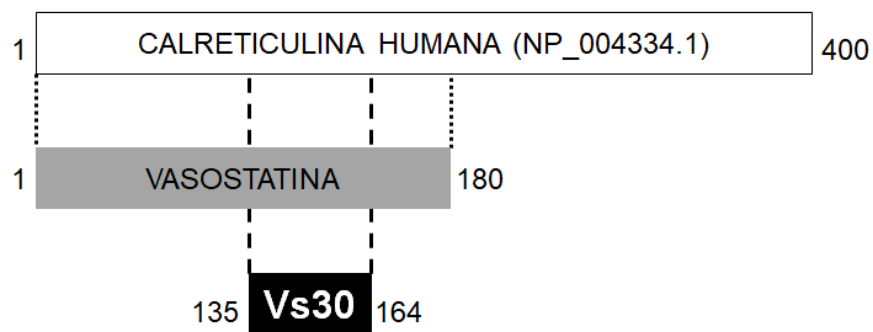


Figura 2. Representación gráfica de la vasostatina

En la figura se ofrecen las coordenadas de la vasostatina y Vs30, además la clave alfanumérica de acceso a la secuencia de aminoácidos de la calreticulina humana.

2.2.2 Vasoinhibina

Las vasoinhibinas (VIs) son fragmentos derivados de la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario [65]. Vi-II-14.1 es la vasoinhibina de estudio en el presente trabajo y proviene de la región N-terminal de la prolactina humana (hPRL), que es una hormona proteínica de 23 kDa producida principalmente por células lactótropas en la glándula pituitaria anterior. La hPRL tiene numerosas funciones que pueden clasificarse en distintas áreas como: la reproducción, el metabolismo, la regulación del sistema inmune, la osmoregulación y el comportamiento [66, 67].

Las VIs son heterogéneas en términos de longitud de aminoácidos y se encuentran en un rango de 80 (11 kDa) a 159 aminoácidos (18 kDa) [68]. Sin embargo, las Vis de 14-18 kDa han sido extensamente estudiadas como péptidos antiangiogénicos recombinantes. La VI de 16 kDa fue la versión estudiada inicialmente, la cual fue

producida *in vitro* mediante la proteólisis de la PRL de 23 kDa de rata [69]. En este estudio seminal, se observó que la VI inhibía *in vitro* la proliferación basal o estimulada por bFGF de células endoteliales capilares de bovino (BBE). Posteriormente, se realizó la producción recombinante de la VI humana de 16 kDa en *E. coli*. La VI humana inhibió *in vitro* la proliferación de células endoteliales BBE y HUVEC, inhibió la formación de estructuras capilares en geles de colágeno e inhibió la angiogénesis en membrana corioalantoidea de embrión de pollo [70]. Posteriormente, se observó una actividad opuesta en la modulación de la angiogénesis entre la VI de 16 kDa y la PRL intacta [71].

La VI está implicada en el arresto del ciclo celular de células endoteliales de aorta de bovino. Esto puede deberse a que la VI reduce los niveles de las ciclinas B1 y D1. Por otra parte, induce la expresión de p21 (cip1) y p27 (kip1) que son reguladores negativos del ciclo celular [72]. La VI induce la muerte celular programada de células endoteliales de bovino mediante la activación de caspasas, la regulación de los miembros de la familia Bcl-2 y la degradación del inhibidor κ B- α [73]. Además, la VI inhibe la activación de la quinasa regulada por señal extracelular (ERK1/2) inducida por bFGF y VEGF [74], [75]. La VI promueve la lisis de coágulos en ratones al inhibir la actividad antifibrinolítica del activador del inhibidor de plasminógeno -1 (PAI-1) [76].

Vi-II-14.1 es la VI que contiene los primeros 123 aminoácidos de la PRL (Figura 3) y es producida fisiológicamente por la acción proteolítica de MMPs y catepsina D [77, 78]. La Vi-II-14.1 recombinante y bioactiva se ha producido en *E. coli* y en células Sf9 de manera intacta y fusionada con 6 histidinas en la región C-terminal [79]. En nuestro grupo de trabajo se produjo la Vi-II-14.1-6His en *E. coli* y fue purificada mediante cromatografía de afinidad y mostró actividad antiproliferativa en CEC [59]. En este trabajo de tesis se expresó tanto de manera inducible como constitutiva la Vi-II-14.1-6His en *Pichia pastoris*. La Vi fue obtenida de sobrenadantes de cultivos de *Pichia pastoris* donde se detectó una versión glicosilada.

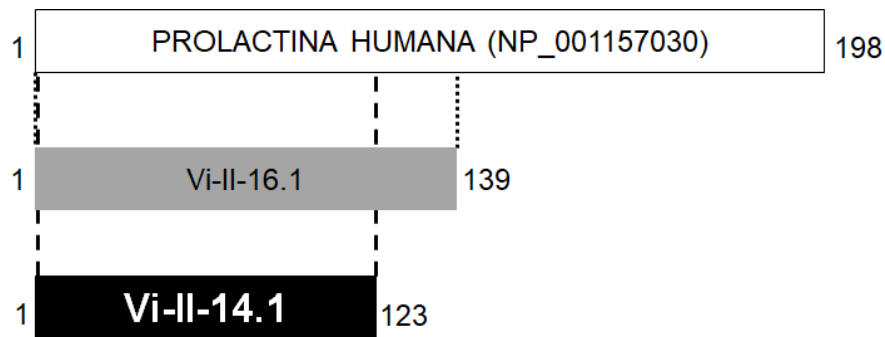


Figura 3. Representación gráfica de las principales versiones de vaso-inhibinas
 En la figura se ofrecen las coordenadas de Vi-II-16.1 y Vi-II-14.1, además la clave alfanumérica de acceso a la secuencia de aminoácidos de la prolactina humana.

3. Proteínas de fusión: aplicaciones en el área terapéutica.

Una proteína de fusión es el resultado de la unión artificial de genes que codifican para distintas proteínas o fragmentos peptídicos. En el área farmacéutica, el uso de proteínas de fusión tiene como objetivo extender la vida media en suero y combinar mecanismos de acción en una sola entidad proteínica. Esta estrategia de fusión posee valiosas ventajas como simplificar la manufactura, la liberación y el perfil de distribución del fármaco. Por otra parte, la unión de distintos péptidos y enlazadores puede tener efectos no deseados como la formación de epítomos. Además, existe la posibilidad de que un componente de la fusión interfiera con el sitio de unión de otro y de esta manera se vea afectada la actividad biológica de la proteína de fusión [80, 81].

El enlazador (linker en inglés) es una región peptídica que une dos o más módulos funcionales y contribuye a la arquitectura global de la proteína de fusión. En este sentido, el enlazador es un componente importante en el diseño peptídico ya que puede impedir el plegamiento erróneo e incrementar la estabilidad y la actividad biológica de la proteína de fusión. Los enlazadores pueden tener una longitud de 4 a 21 aminoácidos y pueden ser flexibles, rígidos, alfa hélices o sitios susceptibles a proteólisis [82].

En nuestro grupo de trabajo se realizó el diseño y la producción de la proteína de fusión VS_VI (Figura 4) que consta del fragmento activo de la vasostatina (Vs30), un enlazador flexible (GGPGG), la vasoinhibina (Vi-II-14.1) y una etiqueta de histidinas [59]. En la tabla 1 se muestra un listado de proteínas de fusión con actividad antiangiogénica, en la cual se incluyen las proteínas expresadas en este trabajo de tesis.

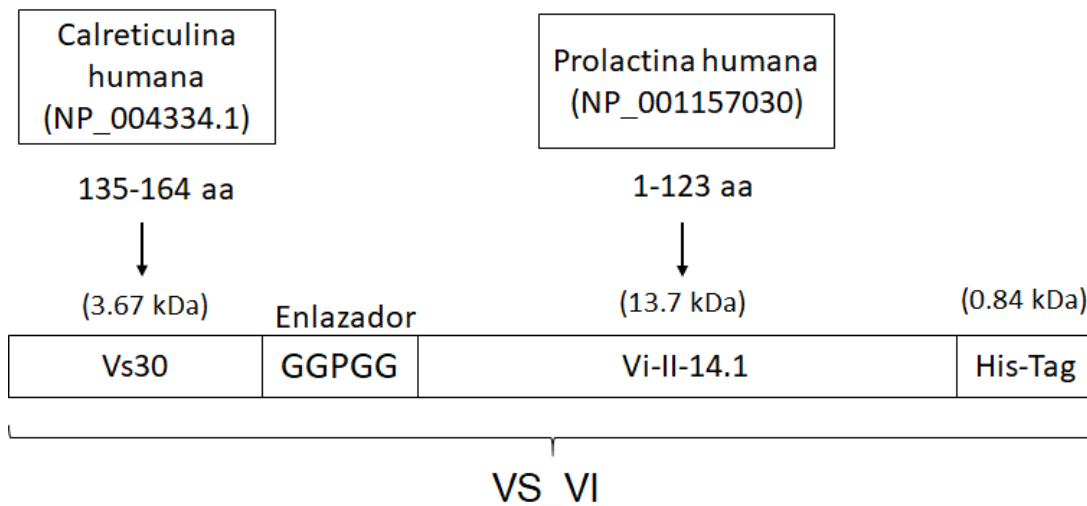


Figura 4. Representación gráfica de la proteína de fusión VS_VI

En la figura se ofrecen las coordenadas y la clave alfanumérica de acceso de las secuencias de aminoácidos de Vs30 y Vi-II-14.1 dentro de las proteínas parentales, el peso molecular teórico y la secuencia de aminoácidos del enlazador.

Tabla 1. Proteínas de fusión con actividad inhibidora de la angiogénesis.

Sistema de expresión	Proteína de fusión	Componentes			Ref.
		N-terminal	Enlazador	C-terminal	
<i>E. coli</i>	PFV	Fragmento C-13 del factor plaquetario 4	G-P-G	Vs30	[61]
	ALV	Fragmento ATF de la urokinasa	G ₄	VAS	[62]
	VS_VI	Vs30	G ₂ -P-G ₂	Vasoinhibina Vi-II-14.1	[59]
	VTF	VAS	(G-S-G) ₂	Tumstatina	[63]
	T-CAM	Fastatin	-	Fragmento de la fibronectina FIII(9-10)	[83]
<i>S. cerevisiae</i>	HSA-TIMP-2	HSA	-	TIMP-2	[84]
Células 293T	RBDV-Ig	RBDV dominio de unión a receptor del VEGF	-	Porción Fc de IgG1 humana	[85]
<i>Pichia pastoris</i>	E-K5	Endostatina Derivado colágeno tipo XVIII	-	Fragmento del plasminógeno Kringle 5	[86]
	rhHSA-VEGF165b	HSA	-	VEGF165b	[87]
	VS_VI	Vs30	G ₂ -P-G ₂	Vasoinhibina Vi-II-14.1	Este Trabajo
	OSIRIS	Vs30	Sitio de proteólisis para las MMP2-9	Vasoinhibina Vi-II-14.1	Este Trabajo

4. *Pichia pastoris* como sistema de expresión de proteínas con actividad antiangiogénica.

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica con estatus GRAS (siglas en inglés “*Generally recognized as safe*”) que representa un sistema eficiente para la producción y secreción de proteínas terapéuticas [88, 89]. Fármacos producidos en *Pichia pastoris*, como el péptido ecallantide (USA), la albumina sérica humana (Japón) y la ocrisplamina (Bélgica) son productos comerciales. Por otra parte, la producción de péptidos terapéuticos en *E. coli* generalmente requiere de pasos que pueden ser evitados mediante el uso de *Pichia pastoris*, como: 1) la extracción de la proteína por lisis células, 2) el procesamiento de cuerpos de inclusión y 3) el análisis de controles adicionales para endotoxinas, las cuales pueden modular la proliferación de células endoteliales [90]. El patrón de glicosilación es un aspecto importante en el desarrollo de fármacos, ya que influye en la vida media de la proteína en el suero y puede generar

una respuesta inmune no deseada. En este sentido, las glicosilaciones producidas en *Pichia pastoris*, en comparación con *S. cerevisiae*, son de menor tamaño y carecen de manosas terminales con enlaces α -1,3 [91]. Además, se han desarrollado cepas de *Pichia pastoris* que producen proteínas con patrones de glicosilación humanizados [92].

En *Pichia pastoris* se han expresado múltiples proteínas con actividad antiangiogénica enlistadas en la tabla 2. Generalmente se ha utilizado la expresión inducible para la producción de proteínas antiangiogénicas, a excepción de la Canstatina-N [93] y de las proteínas expresadas constitutivamente en este trabajo de tesis. Por otra parte, una estrategia utilizada para incrementar la cantidad de proteína recombinante por célula en *Pichia pastoris*, es aumentar la dosis génica de las cepas mediante múltiples inserciones del casete de expresión dentro del genoma [94]. En este trabajo de tesis se reporta por primera vez el uso de cepas multicopias para la producción de péptidos antiangiogénicos.

Tabla 2. Proteínas con actividad inhibidora de la angiogénesis producidas en *Pichia pastoris*.

Tipo de expresión	Antiangiogénico	Cepa/vector	Método de purificación	Ref.
Inducible (promotor de la AOX1)	Tumstatina	GS115/pPICZ α A	CIC (Resina-SP)	[95]
	CRT-N58	GS115/pPIC9K		[96]
	VAS	KM17/pPIC9K	CIA (Resina-DEAE)	[97]
	NQ-TK1-2	X-33/ pPICZ α C		[98]
	Endostatina	SMD1168/pPIC9K	CA (Resina-heparina)	[99]
		NR/ pPICZ α A		[100]
	Heparinasa 1	GS115/pPIC9K	NR	[101]
	Anginex	GS115 y X-33/ pPICZ α A	CA (Resina-níquel)	[102]
	PEDF	X-33/ pPICZ α A		[103]
	TIMP-4			[104]
Vi-II-14.1	GS115/pPIC9K			Este trabajo
Constitutiva (Promotor de la GAP)	Canstatina-N	GS115/pGAP9K	CIC (Resina-SP)	[93]
	Vs30	SMD1168/pGAPZ α A multicopia	UF (Membrana-PES 30-kDa)	[64] Este trabajo
	Vi-II-14.1	GS115/ pGAPZ α A	CA (Resina-níquel)	Este trabajo

AOX1= alcohol oxidasa 1, GAP= gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, CIC= cromatografía de intercambio catiónico, CIA= cromatografía de intercambio aniónico, CA= cromatografía de afinidad, UF= ultrafiltración, NR= no reportado, SP= sulfopropil, DEAE= dietilaminoetil, PES= polietersulfona

Justificación

Los péptidos inhibidores de la angiogénesis son de gran importancia científica, biomédica y económica. En el área farmacéutica, el uso de proteínas de fusión ofrece la posibilidad de combinar mecanismos de acción y simplificar la manufactura de los fármacos. En el presente trabajo, se propone realizar la producción de los péptidos antiangiogénicos vasostatina, vasoinhibina y las proteínas de fusión VS_VI y OSIRIS en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, la cual cuenta con ventajas únicas como sistema de expresión para proteínas terapéuticas.

Objetivo general

Producir y secretar los péptidos antiangiogénicos Vs30, Vi-II-14.1, VS_VI y OSIRIS mediante el uso de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como sistema de expresión.

Objetivos específicos

1. Construir una batería diversa de vectores de expresión con promotores constitutivos e inducibles y con casetes de expresión mono y multicopia.
2. Obtener cepas de *Pichia pastoris* que secreten los péptidos antiangiogénicos humanos Vs30, Vi-II-14.1, VS_VI y OSIRIS.
3. Establecer métodos de purificación eficientes para los péptidos antiangiogénicos de interés.

Metodología

1. Materiales

1.1 Cepas

Las construcciones de los vectores de expresión y la propagación de los plásmidos se realizó en *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen) con el genotipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*araleu*)7697 *galJ* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*. Las cepas comerciales de Invitrogen de *Pichia pastoris* se han reclasificado en dos especies: *Komagataella phaffii* y *Komagataella pastoris* [105]. Por tanto, para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizó la cepa GS115 (*his4*) de *Komagataella phaffii* y la cepa deficiente de proteasas SMD1168 (*pep4*) de *Komagataella pastoris*.

1.2 Plásmidos

El plásmido pET12a/VS_VI [59] sirvió como molde para amplificar el gen *vs_vi* y el plásmido pUC57-*opt1* (diseñado en este trabajo y sintetizado por *Genescript*) se utilizó como molde para amplificar los genes *vs30* y *vi-ii-14.1*. Los vectores de expresión utilizados son de la marca Invitrogen y tienen la señal de secreción del factor- α de *S. cerevisiae*. De este modo, el vector pGAPZ α A se utilizó para la expresión constitutiva, el cual cuenta con el promotor pGAP y un gen de resistencia a la zeocina que puede ser utilizado como marcador de selección en *E. coli* y en *Pichia pastoris*. Por otra parte, el vector de expresión inducible pPIC9K cuenta con el promotor de la AOX1 y un gen de resistencia a G418 para la selección en *Pichia pastoris* y un gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E. coli*.

1.3 Secuencias de oligonucleótidos, genes y proteínas

En la tabla 3, se enlistan los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de interés y los oligonucleótidos comerciales (Figura 5) para la verificación de la inserción de los vectores de expresión en el genoma de *Pichia pastoris*.

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados.

Secuencia a amplificar	Nombre de oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
Vs30	Vspp5'	GGCGAATTCGATATTTGCGGTCC
	Vspp3'	GTCTAGATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCCTGCATCTAATATC
vi-ii-14.1	Vipp5'	GGCGAATTCATGCTTCCAATTTGTC
	Vipp3'	GTCTAGATTAATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTC AATCTCAACTGCC
vs_vi	Vsvipp5'	GGCGAATTCGACATCTGTGGCC
	Vsvi3'	TCTAGATTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCATCTCTACAGCTTTGGATAGG
pGAPZ α A pPIC9K	pGAP forward 5'	GTCCCTATTTCAATCAATTGAA
	Factor- α 5'	TACTATTGCCAGCATTGCTGC
	3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC

Sitio de hibridación para oligonucleótido: pGAP forward 5'

421 CTCCTGACCC AAAGACTTTA AATTTAATTT ATTTGTCCTT ATTTCAATCA ATTGAACAAC

481 TATTTTCGAAA CG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala

532 GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG
Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr

Señal de secreción del Factor alfa

583 GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT
Ala Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp

634 TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG
Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

Sitio de hibridación para oligonucleótido: Factor-alfa 5'

685 TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser

736 CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAATTCAC GTGGCCCA GCCGGCCGTC TCGGATC
Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

Xho I* Kex2 EcoRI Pml I Sfi I
Ste13

793 GGTACCTCGA GCCGCGGCGG CCGCCAGCTT TCTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

Asp718 I Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I Epítipo Myc

Etiqueta de histidinas

851 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTTAGC CTTA
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

905 GACATGACTG TTCCTCAGTT CAAGTTGGGC ACTTACGAGA AGACCGGTCT TGCTAGATTC TAAT

Sitio de hibridación para oligonucleótido: 3' AOX1

969 CAAGAGGATG TCAGAATGCC ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTTCATTTTT GATACTTTTT TATT

Figura 5. Secuencias y coordenadas de hibridación para los oligonucleótidos pGAP forward 5', Factor- α 5' y 3' AOX1

En la tabla 4, se enlistan las secuencias de ADN y de aminoácidos correspondientes a las proteínas Vs30, Vi-II-14.1, VS_VI y OSIRIS.

Tabla 4. Lista de secuencias de las proteínas de interés.

Antiangiogénico	Longitud	Secuencia
Vs30	117 bp	GAATTCGATATTTGCGGTCCAGGAACCAAGAAGGTCCACGTCATTTT CAACTACAAGGGAAAGAATGTCCTTATTAACAAAGATATTAGATGCAA GCACCACCACCACCACCACTAA
	38 aa	EFDICGPGTKKVHVIFNYKGKNVLINKDIRCKHHHHHH.
Vi-II-14.1	390 bp	ATGCTTCCAATTTGTCCTGGTGGAGCAGCTAGATGCCAAGTCACTTT GAGAGATCTTTTTGACAGAGCTGTTGTCTTGAGTCATTACATCCACAA CCTTTCTCCGAAATGTTCTCAGAGTTCGATAAGAGATACACCCATGG TAGAGGTTTTACTAAGGCTATCAATTCTTGTCCACTTCAAGTTTTG GCTACACCAGAAGATAAGGAGCAAGCCCAACAGATGAACCAGAAAG ACTTCTTGTCTTATTGTTTCCATCTTGAGATCATGGAATGAACCTTT GTACCATCTTGTTACTGAAGTCAGAGGAATGCAGGAGGCCCTGAAG CCATTCTTCCAAGGCAGTTGAGATTGAACACCACCACCACCACCAT TAA
	129 aa	EFMLPICPGGAARCQVTLRDLFDRAVVLSHYIHNLSSEMSEFDKRYTH GRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKDFLSLIVSILRSWNEPLY HLVTEVRGMQEAPAILSKAVEIEHHHHHH.
VS_VI [59]	495 bp	GAATTCGACATCTGTGGCCCTGGCACCAAGAAGGTTTCATGTCATCTT CAACTACAAGGGCAAGAACGTGCTGATCAACAAGGACATCCGTTGCA AGGGTGGTCCAGGTGG TATGTTGCCCATCTGTCCCGCGGGGCTGC CCGATGCCAGGTGACCCTTCGAGACCTGTTTGACCGCGCCGTCGTC CTGTCCCCTACATCCATAACCTCTCCTCAGAAATGTTTCAGCGAATTC GATAAACGGTATACCCATGGCCGGGGGTTTATTACCAAGGCCATCAA CAGCTGCCACACTTCTTCCCTTGCCACCCCGAAGACAAGGAGCAA GCCCAACAGATGAATCAAAAAGACTTTCTGAGCCTGATAGTCAGCAT ATTGCGATCCTGGAATGAGCCTCTGTATCATCTGGTACGGAAGTAC GTGGTATGCAAGAAGCCCGGAGGCTATCCTATCCAAAGCTGTAGA GATTGAGCACCACCACCACCACCACTAA
	164 aa	EFDICGPGTKKVHVIFNYKGKNVLINKDIRCK GGPGG MLPICPGGAARCQ VTLRDLFDRAVVLSHYIHNLSSEMSEFDKRYTHGRGFITKAINSCHTSS LATPEDKEQAQQMNQKDFLSLIVSILRSWNEPLYHLVTEVRGMQEAPEA ILSKAVEIEHHHHHH.
OSIRIS	540 bp	GAATTCGATATTTGCGGTCCAGGAACCAAGAAGGTCCACGTCATTTT CAACTACAAGGGAAAGAATGTCCTTATTAACAAAGATATTAGATGCAA GTTGGTTCCAAGAGGTTCCGCTGCCAAACCTAGAGCCTTGACAGCA GGTGGACCAGGTGGAATGCTTCCAATTTGTCCTGGTGG AGCAGCTA GATGCCAAGTCACTTTGAGAGATCTTTTTGACAGAGCTGTTGTCTTGA GTCATTACATCCACAACCTTTCTCCGAAATGTTCTCAGAGTTCGATA AGAGATACACCCATGGTAGAGGTTTTACTAAGGCTATCAATTCTT GTCACACTTCAAGTTTGGCTACACCAGAAGATAAGGAGCAAGCCCAA CAGATGAACCAGAAAGACTTCTTGTCTTATTGTTTCCATCTTGAGA TCATGGAATGAACCTTTGTACCATCTTGTTACTGAAGTCAGAGGAATG CAGGAGGCCCTGAAGCCATTCTTCCAAGGCAGTTGAGATTGAACA CCACCACCACCACCATAG
	179 aa	EFDICGPGTKKVHVIFNYKGKNVLINKDIRCK LVPRGSAAKPRALTAGGP GG MLPICPGGAARCQVTLRDLFDRAVVLSHYIHNLSSEMSEFDKRYTH GRGFITKAINSCHTSSLATPEDKEQAQQMNQKDFLSLIVSILRSWNEPLY HLVTEVRGMQEAPAILSKAVEIEHHHHHH.

bp= pares de bases, aa= aminoácidos, Subrayado= secuencias correspondientes a enlazadores.

2. Métodos de producción y manipulación de ADN

2.1 Extracción de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina

Se utilizó el método de lisis alcalina [106] para la producción de ADN plasmídico, que se llevó a cabo de la siguiente manera:

a) Condiciones de cultivo y antibióticos.

Se sembró una colonia de *E. coli* TOP10F' en 2 mL de medio LB y se incubó entre 16-18 h en agitación constante a 37°C. Se utilizó el antibiótico zeocina (25 mg/L) y LB de bajas sales para la producción de los plásmidos derivados de pGAPZαA, para el resto se utilizó ampicilina (50 mg/L) y LB convencional. Después, se colocó el cultivo en un tubo de 1.5 mL, se centrifugó por 1 min a 12,000 rpm y se descartó el sobrenadante.

b) Lisis alcalina

Se agregaron 100 µL de la solución Birnboim I y se resuspendió la pastilla completamente. Después, se adicionaron 200 µL de la solución Birnboim II y se mezcló por inversión hasta que la mezcla estuviera transparente (Nota: una mezcla no transparente es señal de una lisis bacteriana deficiente). Luego, se agregaron 150 µL de la solución Birnboim III y se mezcló por inversión hasta la aparición de precipitados. Después, se agregaron 20 µL de cloroformo, se centrifugó a 12,500 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante.

c) Precipitación de ADN plasmídico

Se precipitó el ADN plasmídico de la siguiente manera: se agregaron 50 µL de acetato de sodio 3M y 1 mL de etanol absoluto frío. Después, se incubó la mezcla anterior durante 20-40 minutos a -20°C. Posteriormente, se centrifugó a 12,500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó la pastilla. Se resuspendió en 50 µL de H₂O y se agregó 0.5 µg de RNasa.

2.2 Extracción de ADN total de *Pichia pastoris*

Se extrajo ADN total de las transformantes de *Pichia pastoris* con el fin de verificar la inserción del casete de expresión en el genoma. El PCR de colonia es un método sencillo, económico y permite el procesamiento de un gran número de cepas en poco tiempo [107]. En este sentido, se coloca una colonia de las cepas transformantes de *Pichia pastoris* en 50 µL de H₂O y se incuba a 100°C durante 10 min (Nota: las colonias a analizar no deben superar 2 semanas de almacenamiento a 4°C). Después, se centrifuga el lisado a 12,500 rpm por 1 min y se utiliza 1 µL del sobrenadante como ADN molde para 15 µL de reacción de PCR. El sobrenadante puede almacenarse a 4°C durante 24 h.

2.3 Amplificación de genes por el método de PCR

Se utilizó el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los genes *vs30*, *vi-ii-14.1* y *vs_vi* (oligonucleótidos enlistados en tabla 3) con el fin de insertarlos en los vectores de expresión. Además, se utilizaron los oligonucleótidos

pGAP forward y 3´ AOX1 para amplificar el casete de expresión del plásmido pGAPZαA y los oligonucleótidos Factor-α y 3´ AOX1 para pPIC9K. Las condiciones de temperatura fueron las siguientes:

- a) 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min (15 min para PCR de colonia).
- b) 30 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de alineamiento de 60°C por 30 s y 72°C durante 40 s para todos los genes.
- c) 1 ciclo de extensión final de 72°C durante 10 min.

2.4 Electroforesis en gel de agarosa

La concentración de agarosa para los geles fue de 1.2 % para fragmentos menores de 500 bp, 1% para fragmentos de 500 bp a 4 Kb y 0.7 % para el análisis de fragmentos de vectores multicopia. Se utilizó buffer TBE y se configuró el voltaje a 100 V por 40 min para geles mayores de 1% de agarosa y a 70 V por 90 min para geles de 0.7% de agarosa. Se realizó la tinción del ADN con bromuro de etidio y se analizó en un transluminador de luz UV.

2.5 Recuperación de ADN en gel de agarosa

Se escindió la banda de interés sin exponer el gel por no más de 1 min a la luz UV. Una vez obtenida la banda se purificó por kit (Zymoclean™ Gel RNA Recovery Kit) o mediante el método casero “freeze-squeeze” [108]. El método casero consta de congelar la banda durante 30 min a -20°C y triturlarla con un cubreobjetos limpio. El líquido resultante se colocó en un tubo de 1.5 mL y se agregó 1 volumen de fenol-Tris. Posteriormente, se mezcló, se incubó por 30 min a -20°C y se centrifugó a 12,500 rpm por 10 min. Después, se recuperó la fase superior y se precipitó con alcohol como se describe en 2.1 de la sección de metodología. El precipitado se resuspendió en 15 µL de H₂O destilada estéril.

2.6 Preparación de células competentes de *E. coli*

Se obtuvieron células competentes de *E. coli* mediante el tratamiento con cloruro de rubidio [109], de la siguiente manera:

- a) Se sembró una colonia de *E. coli* TOP10F´ en 5 mL de LB y se incubó toda la noche en agitación constante a 37°C. Después, se añadieron 2 mL de precultivo en 200 mL de LB y se incubó en las mismas condiciones hasta llegar a una DO₅₅₀ de 0.5 (Nota: en aproximadamente 3 h).
- b) Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- c) Se resuspendió la pastilla celular en 10 mL de la solución reguladora I y se incubó por 20 min en hielo.
- d) Se repitió el paso b) y se resuspendió la pastilla celular en 2 mL de la solución reguladora II. Después, se realizaron alícuotas de 200 µL en tubos estériles de 1.5 mL y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

2.7 Cálculos y condiciones de ligación

Se utilizó el programa en línea NEBioCalculator™ v1.8.1 para calcular la cantidad necesaria de vector e inserto en una reacción de ligación. En la herramienta “ligation calculator” se ingresa la longitud del inserto, la longitud de vector y la masa del vector. Posteriormente, la herramienta en línea proporciona la masa requerida de inserto para tener relaciones de vector:inserto 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 y 1:7. Se utilizó una masa de vector de 100 ng y una relación 1:5 para todas las ligaciones realizadas en este trabajo. Después, se preparó la reacción de ligación con las cantidades de vector e inserto necesarias y se incubó con ligasa a temperatura ambiente por 1 h y a 4°C por 24 h. Almacenar la reacción de ligación a -20°C.

2.8 Transformación de *E. coli* mediante choque térmico

Se agregó una reacción de ligación a 100 µL de células competentes en un tubo de 1.5 mL y se incubó la mezcla durante 30 min en hielo. El choque térmico [110] se realizó a 42°C por 45 segundos y después se incubó en hielo durante 1 min. Posteriormente, se agregaron 500 µL de medio LB y se incubó a 37°C por 40 min en reposo y 20 min en agitación. Se centrifugó por 30 segundos a 3,000 rpm y se descartó el sobrenadante hasta un volumen de 50 µL. Se resuspendió el paquete celular en los 50 µL de sobrenadante y se sembró en una placa Petri con medio LB con ampicilina (50 µg/mL) o en medio LB de bajas sales con zeocina (25 µg/mL) para los plásmidos derivados de pGAPZαA.

3. Construcción de vectores de expresión

3.1 Síntesis y optimización de *osiris*

Se diseñó la proteína de fusión OSIRIS, la cual consta del fragmento activo de la vasostatina (Vs30), una secuencia de aminoácidos susceptible a proteólisis por las proteasas MMP2 y 9 [111], una secuencia enlazadora (G-G-P-G-G), la vasoinhibina Vi-II-14.1 y una etiqueta de 6 histidinas. La secuencia de *osiris* se optimizó de acuerdo con el uso preferencial de codones para *Pichia pastoris* utilizando el programa en línea OptimumGene™. Además, se especificó en el programa que evitara las secuencias de restricción *EcoRI*, *XbaI* y *AvrII*, ya que esto dificultaba el proceso de construcción de los vectores de expresión. De esta manera, se obtuvo el plásmido pUC57-*opt1* que contenía la secuencia sintética y optimizada del gen *osiris*.

3.2 Inserción de *vs30*, *vi-ii-14.1*, *vs_vi* y *osiris* en los vectores de expresión

Los genes *vs30* y *vi-ii-14.1* se amplificaron por PCR utilizando como molde el plásmido pUC57-*opt1* y se insertaron en el sitio de restricción *EcoRV* del vector de clonación pBluescript KS. El gen *vs_vi* se amplificó utilizando como molde pET12a/VS_VI [59] y se insertó en el vector de clonación pUC19. Se utilizaron los oligonucleótidos utilizados en la tabla 3, con los cuales se añadió a los genes en la región río arriba un sitio de restricción *EcoRI* y en la región río abajo una etiqueta de histidinas y un sitio de terminación de la traducción. De esta manera, se digirieron con *EcoRI* los vectores de clonación que contenían los genes *vs30*, *vi-ii-14.1*, *vs_vi* y *osiris*, con el fin de liberarlos

y poderlos integrar en fase en los vectores de expresión constitutiva e inducible, como se muestra en la Figura 6.

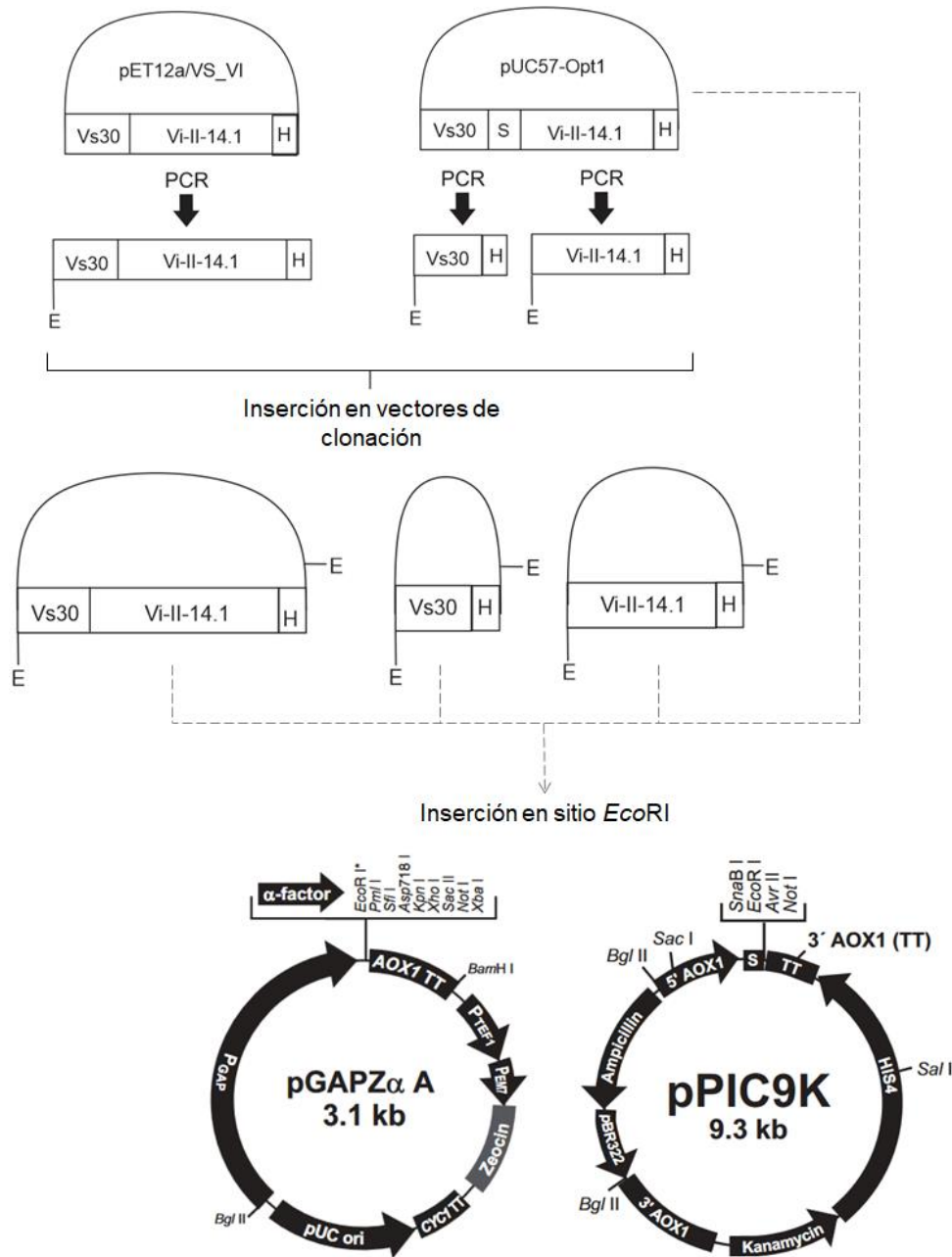


Figura 6. Esquema del ensamblaje de los vectores de expresión.

S= Secuencia susceptible a proteólisis por MMP2 y 9, H= Etiqueta de 6 histidinas y E= sitio de restricción EcoRI.

3.3 Método *in vitro* de multimerización del casete de expresión

Se utilizó la estrategia de multimerización *in vitro* de tipo *BamHI/BglII-BamHI* [112] para generar los vectores con repeticiones en tándem de los casetes que contenían los

genes *vs30* y *vs_vi*. Este método consta de realizar un corte enzimático en el sitio de restricción *Bam*HI de modo que pGAPZαA con el gen de interés sirva como vector, y al realizar una doble digestión del mismo plásmido en los sitios *Bam*HI y *Bgl*II, este sirva de inserto para la nueva construcción. De este modo, al repetir este proceso secuencialmente se obtienen plásmidos con números crecientes del casete de expresión como se muestra en la Figura 7.

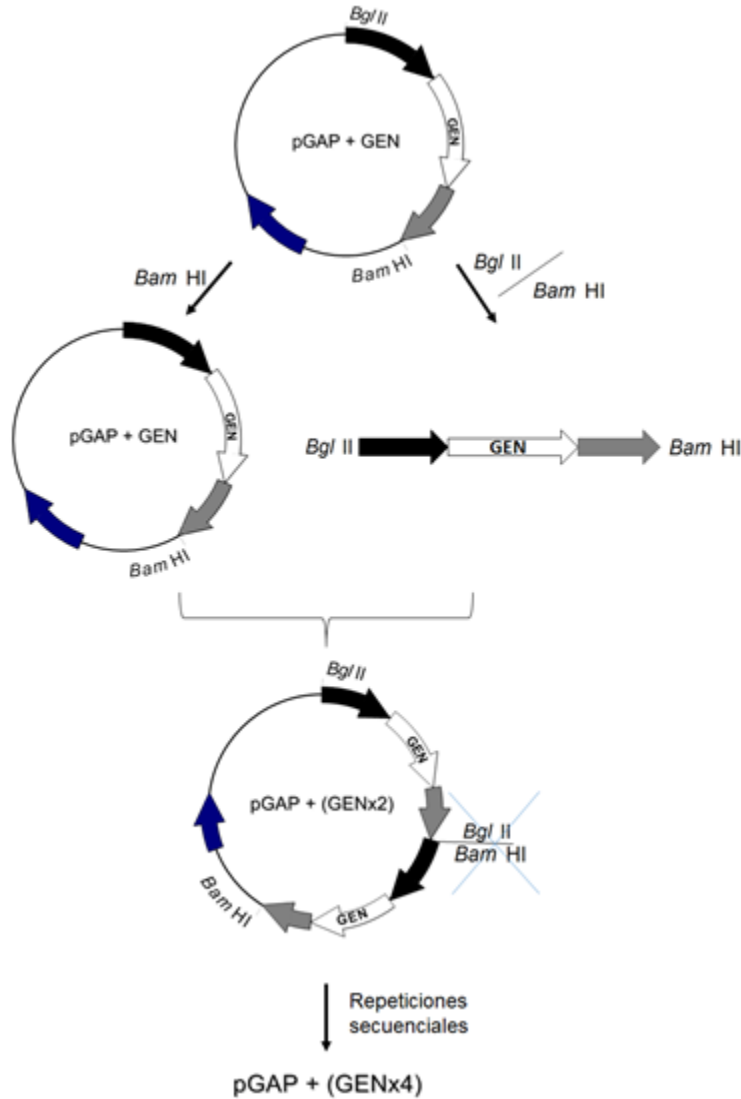


Figura 7. Estrategia de multimerización *in vitro* de tipo *Bam*HI/*Bgl*II-*Bam*HI

4. Transformación de *Pichia pastoris*

4.1 Preparación de células electrocompetentes de *Pichia pastoris*

- a) Se sembró una colonia de *Pichia pastoris* en 5 mL de YPD y se incubó toda la noche en agitación constante a 28°C. Después, se añadieron 125 µL del precultivo en 125 mL de YPD y se incubó en las mismas condiciones hasta llegar a una DO₆₀₀ de 1-1.3 (Nota: en aproximadamente 14 y 16 h).
- b) Se centrifugó a 5,000 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante.
- c) Se resuspendió la pastilla celular en 60 mL de H₂O estéril fría.
- d) Se repitió el paso b) y se resuspendió la pastilla celular en 30 mL de H₂O estéril fría.
- e) Se repitió el paso b) y se resuspendió la pastilla celular en 10 mL de sorbitol 1 M estéril frío.
- f) Se repitió el paso b) y se resuspendió la pastilla celular en 250 µL de sorbitol 1M estéril frío. Después, se realizaron alícuotas de 80 µL en tubos estériles de 1.5 mL y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Nota: no exceder las 12 h de almacenamiento.

4.2 Linearización y concentración de vectores de expresión

Para la transformación de *Pichia pastoris* por electroporación es necesario contar con 10-15 µg del vector de expresión linearizado en 10 µL de H₂O. Por tanto, se utilizaron las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I para linearizar los plásmidos derivados de pGAPZαA y pPIC9K, respectivamente. Se realizaron de 5-7 digestiones por separado de 2 µg de vector de expresión y se incubaron a 37°C por 3 h. Después, se unieron las reacciones de digestión en un tubo de 1.5 mL y se adicionó H₂O hasta llegar a un volumen de 250 µL. Luego, se agregaron 250 µL de fenol-tris, se mezcló y se centrifugó a 12,500 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente, se recuperó la fase superior y se precipitó con alcohol como se describe en 2.1 de la sección de metodología. El precipitado se resuspendió en 10 µL de H₂O destilada estéril.

4.3 Condiciones de electroporación y cultivo de transformantes

Se mezclaron 10-15 µg del vector de expresión linearizado y 80 µL de células competentes de *Pichia pastoris*. Después, se colocó la mezcla en una unidad de electroporación con un tamaño de ranura de 2 mm y se incubó en hielo por 20 min. Luego, se secó la unidad de electroporación, se colocó en el electroporador (Electroporator 2510, Eppendorf) y se dio un pulso a 1,500 V por 5 ms. Inmediatamente después, se agregó 1 mL de sorbitol 1 M frío en la unidad de electroporación, luego se transfirió la mezcla en un tubo de ensayo de vidrio estéril con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y se incubó a 28°C por 2 h en reposo. Posteriormente, se sembraron 400 µL de la transformación en cajas Petri con medio YPD adicionado con sorbitol 1M y con una concentración de 100 µg/mL de zeocina. Después, se incubaron las cajas Petri a 28°C durante 72 h. Se realizó PCR de colonia (2.2 y 2.3 de la sección de metodología) para verificar la inserción del vector de expresión en el genoma de *Pichia pastoris*.

4.4 Método directo para la obtención de cepas hiperresistentes a G418

Se llevó la transformación como se describe anteriormente con una modificación después del pulso eléctrico, de la siguiente manera:

- a) Se agregó 1 mL de sorbitol 1 M frío en la unidad de electroporación, luego se transfirió la mezcla en un tubo de ensayo de vidrio estéril y se incubó a 28°C por 2 h en reposo.
- b) Se adicionó 1 mL de YPD y se incubó por 10 h en agitación suave (20-30 rpm) a 28°C.
- c) Se sembraron 800 µL de la transformación en cajas Petri con medio YPD adicionado con sorbitol 1M y con una concentración de 2 y 4 mg/mL de G418. Después, se incubaron las cajas Petri a 28°C durante 72 h.

5. Métodos de expresión, detección, análisis y purificación de proteínas

5.1 Ensayos de expresión constitutiva e inducible a nivel matraz

Expresión constitutiva: Se sembró una colonia de *Pichia pastoris* en 5 mL de YPD con zeocina (50 µg/mL) y se incubó toda la noche en agitación constante a 28°C. Posteriormente, se realizó el cultivo con una $DO_{600}= 0.05-0.1$ en 25 mL de YPD en matraz de 250 mL y se incubó a 28°C por 120 h. El pH del medio de cultivo se modificó mediante la adición de una solución amortiguadora de fosfatos (Anexo 1).

Expresión inducible: Se sembró una colonia de *Pichia pastoris* en 5 mL de YPD con G418 (500 µg/mL) y se incubó toda la noche en agitación constante a 28°C. Posteriormente, se realizó un cultivo con una $DO_{600}= 0.05-0.1$ en 25 mL de BMGY (Buffered glicerol-complex medium) en matraz de 250 mL y se incubó a 28°C por 24 horas. Después, se centrifugaron 5 mL de cultivo anterior a 12,500 rpm por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante con el fin de retirar el glicerol residual. Posteriormente, se resuspendió la pastilla celular en 1 mL de medio BMMY (Buffered methanol-complex medium) y se inoculó el volumen necesario para tener una $DO_{600}=1$ en 25 mL de BMMY en matraz de 250 mL. Se incubó a 28°C y cada 24 horas se adicionó metanol absoluto estéril hasta lograr una concentración del 1%. (Nota: el metanol se agregó al cultivo después de la recolección de la muestra)

Recolección de muestras: En ambos tipos de expresión se recolectó 1 mL de cultivo cada 24 h y se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se separó el sobrenadante y la pastilla celular y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

5.2 Ensayos de expresión constitutiva a nivel biorreactor

Se sembró una colonia de *Pichia pastoris* en 25 mL de YPD con zeocina (50 µg/mL) y se incubó toda la noche en agitación constante a 28°C. Posteriormente, se realizó un cultivo de tipo batch con una $DO_{600}= 0.05$ en 1 L de YPD (pH6) en un biorreactor de tanque agitado de 1.2 L de capacidad (Applikon) conectado a una consola ez-Control (Applikon). El cultivo se mantuvo a una temperatura de 25°C, un pH de 6 y a una saturación de oxígeno superior a 20%. Además, para el control de espuma se agregó el

antiespumante utilizando una bomba peristáltica. El pH se controló mediante la adición de NH_4OH . El cultivo se inició a 500 rpm y se trató con 4 L/min de aire hasta que la saturación de oxígeno fuera de 25% (aprox. a las 14 h de cultivo), después se controló la saturación con una mezcla de oxígeno puro (pulsos) y aire (1-2 L/min). Se recolectaron muestras cada 2 h en la fase de crecimiento logarítmico y posteriormente a las 12, 24 y 36 h. Nota: las muestras se recolectaron y almacenaron como se describe en 5.1 de la sección de metodología.

5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se utilizó SDS-PAGE con amortiguación tris-tricina para la separación y análisis de las proteínas de interés, como se describe en [113]. Para todos los casos la concentración de poliacrilamida del gel concentrador fue de 4% y la del gel separador fue de 16%. Se incluyó un gel separador de 10% en el análisis de Vs30. Los geles tuvieron un espesor de 0.7 mm y se corrieron a un amperaje constante de 50 mA durante aproximadamente 6 horas. Nota: No mezclar las soluciones amortiguadoras del cátodo y del ánodo, las cuales se pueden reutilizar 3 veces.

5.4 Tinción de proteína total y glicoproteínas

Tinción general: Los geles de poliacrilamida se tiñeron con una solución que contenía azul de coomasie R-25 durante toda la noche en agitación pendular constante (20-30 rpm). Después, se recuperó la solución de tinción, se lavó con agua destilada y se trató 2 veces con 50 mL de la solución de desteñido por 1 h. Posteriormente, se almacenó el gel en H_2O a temperatura ambiente.

Tinción de glicoproteínas: Los geles de poliacrilamida se tiñeron con el kit Pierce™ glycoprotein staining (ThermoFisher). Se utilizó como control positivo a la peroxidasa de rabano (HRP) y como control negativo al inhibidor de la tripsina de soya (SBTI). Nota: realizar todos los pasos de tinción y preparación de reactivos en una campana de extracción. Se sumergió el gel en 100 mL de metanol al 50% por 30 minutos. Después, se recuperó el metanol y se realizaron 2 lavados con 100 mL de ácido acético al 3%. Nota: en este punto el gel puede ser almacenado en H_2O a 4°C por 1 semana. Posteriormente, se sumergió el gel en 15 mL de la solución oxidante y se agitó por 15 min a 20-30 rpm a temperatura ambiente. Después, se lavó el gel 2 veces con 100 mL de ácido acético por 5 min. Luego, se sumergió el gel en 15 mL de la solución de teñido y se agitó por 15 min. Posteriormente, se sumergió el gel en 15 mL de la solución reductora y se agitó por 5 min. El gel se desteñó con varios lavados de ácido acético al 3% y se almacenó en agua a -4°C.

5.5 Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford para cuantificar las proteínas de interés. La medición se llevó a cabo en microplacas, cada pozo contenía 40 μL de reactivo de Bradford (Bio-Rad) y un volumen final de 200 μL . Se realizó una curva de albumina sérica bovina (BSA) de 6 puntos (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 μg) y se midió la DO_{595} en el lector de microplacas iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Nota: se midió un blanco por triplicado de 160 μL de H_2O y 40 μL de reactivo de Bradford.

5.6 Transferencia semi-seca de proteínas a membranas de nitrocelulosa

Los geles se sumergieron en solución Towbin con 40% de metanol durante 20 minutos. Posteriormente, se humedecieron 6 papeles filtro y la membrana de nitrocelulosa en la solución Towbin. Después, se colocan en la cámara de transferencia los siguientes componentes en el siguiente orden: I) tres papeles filtro, II) membrana de nitrocelulosa, III) gel de poliacrilamida y IV) tres papeles filtro. Nota: se deben eliminar las burbujas entre los componentes utilizando un tubo de ensayo como rodillo. La transferencia se llevó en todos los casos a 10V por 20 min. Posteriormente, el gel de poliacrilamida se tiñó como se describe en 5.4 de la sección de metodología y la membrana se secó a temperatura ambiente y se almacenó en un recipiente seco hasta su procesamiento.

5.7 Detección de proteínas recombinantes mediante colony blot, dot blot y western blot.

Colony blot [114]: Se utilizó la metodología de inmunodetección en colonia para realizar un cribado en masa de cepas *Pichia pastoris* transformadas con plásmidos derivados de pGAPZαA. Se sembraron en medio YPD sólido múltiples cepas y se incubaron por 72 h a 28°C. Después, se colocó una membrana de nitrocelulosa en contacto directo con las colonias y se dejó incubar por 24 h a 28°C. Posteriormente, se retiró la membrana del cultivo y se procesó como se describe posteriormente. Nota: se debe incluir un como control negativo una cepa sin transformar de *Pichia pastoris* como SMD1168 o GS115.

Dot blot [115]: se utilizó el método de dot blot para el análisis de proteínas en sobrenadantes, lo cual nos permitió realizar comparaciones entre cepas y condiciones de cultivo como temperatura y pH. En este sentido, se incubaron 100 µL de sobrenadante a 95°C por 10 minutos y posteriormente se almacenó en hielo. Se agregaron 20-40 µL del sobrenadante directamente en la membrana de nitrocelulosa, la cual se secó a temperatura ambiente y se procesó como se describe posteriormente. Nota: se debe agregar el mismo volumen de las muestras a la membrana. Además, se debe incluir como control negativo 20-40 µL de sobrenadante de una cepa sin transformar de *Pichia pastoris*.

Western blot [116]: se utilizó este método con el fin de conocer el peso molecular de la proteína inmunodetectada. En este sentido, las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida como se describe en 5.3 y se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa como se describe en 5.6 de la sección de metodología. Después, la membrana se procesó y reveló como se describe a continuación.

Inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa:

- a) Se sumergió la membrana de nitrocelulosa en solución TBS con leche al 5% y se incubó a 20°C por 2 h.
- b) Se realizaron 2 lavados de 5 min con TBS y 2 lavados con TBST.

c) Se sumergió la membrana en TBST con el anticuerpo primario dirigido a la etiqueta de histidinas (Millipore) a una dilución de 1:10,000 y se incubó a 4°C en agitación pendular (20-30 rpm) durante toda la noche.

d) Se repitió el paso b) y se sumergió la membrana en TBST con el segundo anticuerpo IgG anti-ratón fusionado con la fosfatasa alcalina a una dilución de 1:25,000 y se incubó a 20°C en agitación pendular durante 2 h.

e) Se realizaron 2 lavados de 5 min con TBST y 2 lavados con TBS. Nota: se invierte el orden de los lavados ya que el tween 20 inhibe la acción de la fosfatasa alcalina.

f) La membrana se sumergió en buffer de revelado con cloruro de *p*-nitroazultetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato-toluidina (BCIP) a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con H₂O cuando aparecieron manchas de color morado. Después, se secó la membrana y se almacenó en un recipiente seco.

5.8 Análisis de proteínas por densitometría

Se realizó el análisis de imágenes utilizando el programa ImageJ 1.50i desarrollado por el NIH (National Institutes of Health, USA). En este sentido, se fotografiaron las membranas de nitrocelulosa y se almacenaron en formato .JPG. Después, se abrió la imagen en el software y se ajustó a 16 bits en el apartado *image/type*. Además, se ajustó el contraste en el apartado *image/adjust/brightnessContrast*. Posteriormente, se seleccionó la primera figura (banda de western blot o círculo de *dot blot*) a analizar en el apartado *analyze/gels/select first line*. Del mismo modo, se seleccionaron las demás figuras en el apartado *analyze/gels/select next line*. Una vez seleccionadas todas las figuras se realizó el procesamiento del gráfico en el apartado *analyze/gels/plot*. Posteriormente, con las herramientas *straight* y *wand* se realizó la cuantificación del área de cada figura. Nota: el área de selección debe de tener las mismas dimensiones para el análisis de todas las figuras.

5.9 Purificación de Vs30 por ultrafiltración

El cultivo (50-200 mL) se centrifugó a 5,500 rpm por 30 min a 4°C. Después, se recuperó el sobrenadante y se adicionó el cocktail de inhibidores de proteasa cComplete™ (Sigma) y se ajustó el pH a 6 con NH₄OH. Posteriormente, se agregó el sobrenadante a la unidad de ultrafiltración y se concentró 10 veces a 20°C utilizando una membrana de corte de 30 kDa. Además, se utilizó aire para presurizar el sistema a 10 psi. Después, se recolectó la fracción filtrada y la fracción retenida y se almacenaron a 4°C.

La fracción filtrada se precipitó mediante la adición de (NH₄)₂SO₄ hasta alcanzar una saturación de 80% y se incubó a 4°C por 12 h. Después, se recolectaron las proteínas precipitadas por centrifugación a 12,500 rpm por 30 min a 4°C. Posteriormente, se resuspendió el precipitado con ácido acético 0.1 % y se dializó utilizando una unidad de ultracentrifugación (Millipore) con corte de 4 kDa. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

5.10 Purificación por cromatografía de afinidad

Se centrifugaron 100 mL de cultivo a 5,500 rpm por 10 min a 4°C. Después, se recuperó el sobrenadante y se ajustó el pH a 7.8 con el buffer nativo de purificación 10X. Luego, se filtró el sobrenadante con un tamaño de poro de 0.2 µm y se transfirió a 2 tubos estériles de 50 mL. Posteriormente, se agregó 500 µL de agarosa Ni-NTA (Thermofisher) a cada tubo de 50 mL y se incubó por 12 h a 4°C en agitación pendular 20-30 rpm. Después, se retiró el sobrenadante y se almacenó a 4°C hasta su análisis. La agarosa se colocó en un tubo de 15 mL y se realizaron 3 lavados de 5 mL de buffer nativo de purificación pH 7.8 con imidazol 50 mM. Posteriormente, se realizó la elución durante 2 h con 10 mL de buffer nativo de purificación pH 7.8 con imidazol 250 mM. La fracción de elución se filtró (0.2 µm) y se dializó utilizando una unidad de ultracentrifugación (Millipore) con corte de 4 kDa. El buffer de intercambió fue H₂O con pH 7.2 ajustada con amortiguador de fosfatos. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

Resultados y discusión

1. Obtención de vectores de expresión y cepas transformantes

La expresión inducible y constitutiva en *Pichia pastoris* tienen diferentes características operacionales y grados de producción [117]. Los vectores comerciales de expresión inducible cuentan con el promotor de la Alcohol oxidasa (AOX), el cual es encendido en presencia de metanol y fuertemente reprimido en presencia de glucosa o glicerol. Por otra parte, el vector de expresión constitutiva pGAPZ α A cuenta con el promotor de la gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa (GAP), la cual es una enzima que participa en la glucólisis. Por tanto, con la idea de poder utilizar ambos promotores, se realizó la inserción de los genes de interés en vectores de clonación para tener la opción de reinsertarlos posteriormente en vectores de expresión constitutiva o inducible (Tabla 5). Además, el hecho de tener los genes de interés en vectores de clonación ofrece las siguientes ventajas [118]: a) almacenamiento en crio-cultivo de *E. coli* a -70°C , b) eficiente clonación in vivo en *E. coli* TOP10F' y c) los genes de interés se pueden extraer con la enzima *EcoRI* y posteriormente ser insertados en fase en los vectores de expresión pGAPZ α A y pPIC9K.

Son escasos los reportes de producción de proteínas antiangiogénicas bajo un promotor constitutivo (Tabla 2). Esto a pesar de las ventajas que ofrece la expresión constitutiva sobre la expresión inducible, como: a) fácil operación de cultivos a nivel matraz y biorreactor, b) no es necesario el uso de metanol, el cual es un reactivo altamente inflamable y puede formar mezclas explosivas con el aire, y c) se pueden utilizar fuentes de carbono alternas [119]. Por esto, en el presente trabajo, se dio preferencia a la expresión constitutiva y se insertaron todos los genes de interés en el vector pGAPZ α A (Tabla 5). Por otra parte, con el fin de comparar la producción de proteína recombinante bajo diferentes promotores, se obtuvieron cepas transformantes de *Pichia pastoris* que contenían en el genoma casetes de expresión constitutiva (para todas las proteínas de interés) e inducible (Vi-II-14.1 y OSIRIS).

Tabla 5. Obtención de plásmidos y cepas de *Pichia pastoris*.

PLÁSMIDOS		
Tipo	Nombre	Descripción
Clonación	pBSK-Vs30	- Origen de replicación para <i>E. coli</i> . - Resistentes a ampicilina. - Se puede extraer el gen de interés con la enzima <i>EcoRI</i> y reinsertar en fase en pGAPZαA y pPIC9K.
	pBSK-Vi	
	pUC18-VS_VI	
	pUC57-OSIRIS	
Expresión constitutiva	pGAP-Vs30	Plásmidos con 1, 2, 4 y 8 copias del casete de expresión constitutiva con el gen <i>vs30</i>
	pGAP-Vs2x	
	pGAP-Vs4x	
	pGAP-Vs8x	
	pGAP-Vi	Plásmido con 1 copia del gen <i>vi</i>
	pGAP-VS_VI	Plásmidos con 1, 2, 4 y 6 copias del casete de expresión constitutiva con el gen <i>vs_vi</i>
	pGAP-vsvi2x	
	pGAP-vsvi4x	
	pGAP-vsvi6x	
	pGAP-OSIRIS	Plásmido con 1 copia del gen <i>osiris</i>
Expresión inducible	pPIC9K-Vi	Plásmidos de expresión inducible derivados de pPIC9K.
	pPIC9K-OSIRIS	
CEPAS		
Expresión constitutiva	<i>P-SMDVs30</i>	<i>Pichia pastoris</i> con <i>vs30</i> bajo promotor constitutivo
	<i>P-SMDVs30.4x</i>	<i>Pichia pastoris</i> con 4 repeticiones en tándem del casete de expresión con <i>vs30</i>
	<i>P-SMDVS_VI</i>	<i>Pichia pastoris</i> con <i>vs-vi</i> bajo promotor constitutivo
	<i>P-SMDVS_VI.4x</i>	<i>Pichia pastoris</i> con 4 repeticiones en tándem del casete de expresión con <i>vs-vi</i>
	<i>P-GS115-Vi</i>	<i>Pichia pastoris</i> con pGAP-VI
Expresión inducible	<i>P-GS115-Vi-2mg</i>	<i>Pichia pastoris</i> con pPIC-Vi y resistente a 2 mg/mL de G418
	<i>P-GS115-Vi-4mg</i>	<i>Pichia pastoris</i> con pPIC-Vi y resistente a 4 mg/mL de G418
	<i>P-GS115-OSIRIS-2mg</i>	<i>Pichia pastoris</i> con pPIC9K-OSIRIS y resistente a 2 mg/mL de G418
	<i>P-GS115-OSIRIS-4mg</i>	<i>Pichia pastoris</i> con pPIC9K-OSIRIS y resistente a 4 mg/mL de G418

2. Ensayos de expresión y purificación de Vs30

2.1 Optimización del gene vs30 y construcción de vectores multicopia

La secuencia de vs30 se adaptó al uso preferencial de codones de *Pichia pastoris* sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Además, se consideraron otros aspectos para el diseño de la secuencia sintética de vs30, como: contenido de GC, estabilidad de ARN y sitios de corte y empalme crípticos. De esta forma, 18 de 30 codones se optimizaron, el contenido de GC se ajustó de 50% a 38,8% y el índice de adaptación de codones (CAI) aumentó de 0,7 a 0,84. En consecuencia, el 60% de los codones vs30 se incrementaron a la frecuencia más alta, y se eliminaron los codones raros (Figura 8).

Vs30	D*	I*	C*	G*	P*	G	T*	K	K	V
opt	G A T	A T T	T G C	G G T	C C A	G G A	A C C	A A G	A A G	G T C
nat	G A C	A T C	T G T	G G C	C C T	G G C	A C C	A A G	A A G	G T C
Vs30	H*	V	I*	F	N*	Y	K	G	K	N*
opt	C A C	G T C	A T T	T T C	A A C	T A C	A A G	G G A	A A G	A A T
nat	C A T	G T C	A T C	T T C	A A C	T A C	A A G	G G C	A A G	A A C
Vs30	V	L*	I*	N*	K*	D*	I*	R	C*	K
opt	G T C	C T T	A T T	A A C	A A A	G A T	A T T	A G A	T G C	A A G
nat	G T G	C T G	A T C	A A C	A A G	G A C	A T C	C G T	T G C	A A G
Vs30	H	H	H	H	H	H	STOP*			
opt	C A C	C A C	C A C	C A C	C A C	C A C	T A A			

Figura 8. Comparación entre la secuencia optimizada y nativa de vs30

(a) Línea Vs30= secuencia de aminoácidos de Vs30, Línea *opt*= secuencia optimizada de vs30 de acuerdo al uso preferencial de codones de *Pichia pastoris*, Línea *nat*= secuencia nativa de vs30 derivada del gene de la calreticulina humana (Número de acceso NM_004343), *= alta frecuencia de uso y fondo negro= sustitución de nucleótido.

Una estrategia que se ha utilizado para aumentar de manera eficiente la cantidad de proteína recombinante en *Pichia pastoris* es aumentar la dosis génica de las cepas mediante múltiples inserciones del casete de expresión en el genoma [94]. En consecuencia, los plásmidos pGAP-Vs30.1x, pGAP-Vs30.2x, pGAP-Vs30.4x y pGAP-Vs30.8x se obtuvieron con 1, 2, 4 y 8 copias del casete de expresión, que tiene una longitud de 1,35 Kb y consiste en el promotor constitutivo pGAP, la señal de secreción del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen Vs30 y terminador de alcohol oxidasa 1. Por lo tanto, la longitud del casete de expresión se duplicó en cada escalamiento, es decir, 2.7 Kb (2 copias), 5.4 kb (4 copias) y 10.8 kb (8 copias), mientras que el esqueleto del vector que contenía el gen de resistencia a la zeocina permaneció constante a 1.9 kb (Figura 9).

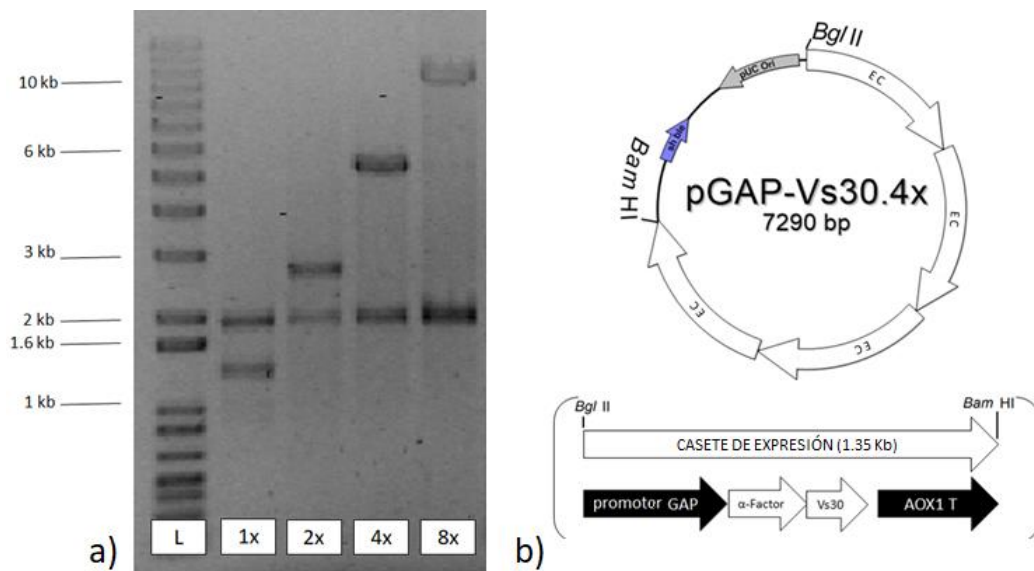


Figura 9. Multimerización del vector de expresión con el gen vs30

(a) Análisis de restricción con *Bam*HI/*Bgl*II de los vectores con 1, 2, 4 y 8 copias del casete de expresión vs30 (L=1 kb plus ladder, 1x= 1 copia del casete de expresión, 2x=2 copias, 4x= 4 copias y 8x= 8 copias). (b) Esquema del vector con 4 copias del casete de expresión. El casete de expresión tiene una longitud de 1.35 Kb y se representa con una flecha blanca la cual equivale a el promotor constitutivo pGAP, a la señal de secreción factor alpha, al gen vs30 y al terminador de la alcohol oxidasa 1.

2.2 Selección de cepas secretoras de Vs30

Se realizó el método de inmudetección en placa (*colony blot*) a las cepas de *Pichia pastoris* transformadas con pGAP-Vs30.1x y pGAP-Vs30.4x. Este método permite la identificación de transformantes secretoras mediante una señal desarrollada en membranas de nitrocelulosa, después del contacto directo y la incubación con colonias [114]. De esta manera, se seleccionó la cepa transformada con pGAP-Vs30.4x, la cual produjo señales más intensas en contraste con la cepa que contenía una copia de casete de expresión y con la cepa no transformada (Figura 10.a). Los sobrenadantes se precipitaron con metanol y se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 10.b). Por lo tanto, se visualizó una banda por debajo de 10 kDa, que coincide con el peso molecular teórico Vs30. Esta banda se observó únicamente en los sobrenadantes de la cepa *P-SMDVs30.4x*, en el SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. Por otra parte, se detectó por western blot la banda menor de 10 kDa en los sobrenadantes de las cepas *P-SMDVs30* y *P-SMDVs30.4x* (Figura 10.c). La mayoría de los estudios publicados han demostrado que la producción de proteínas es proporcional al número de copias de vectores de expresión integradas en el genoma de *Pichia pastoris* [120, 121]. Sin embargo, a veces el uso de cepas de múltiples copias tiene efectos negativos en la producción de proteínas [122]. Nuestros resultados demuestran que 4 copias del casete de expresión tienen una influencia positiva en la cantidad de Vs30 producida y secretada por *Pichia pastoris* SMD1168.

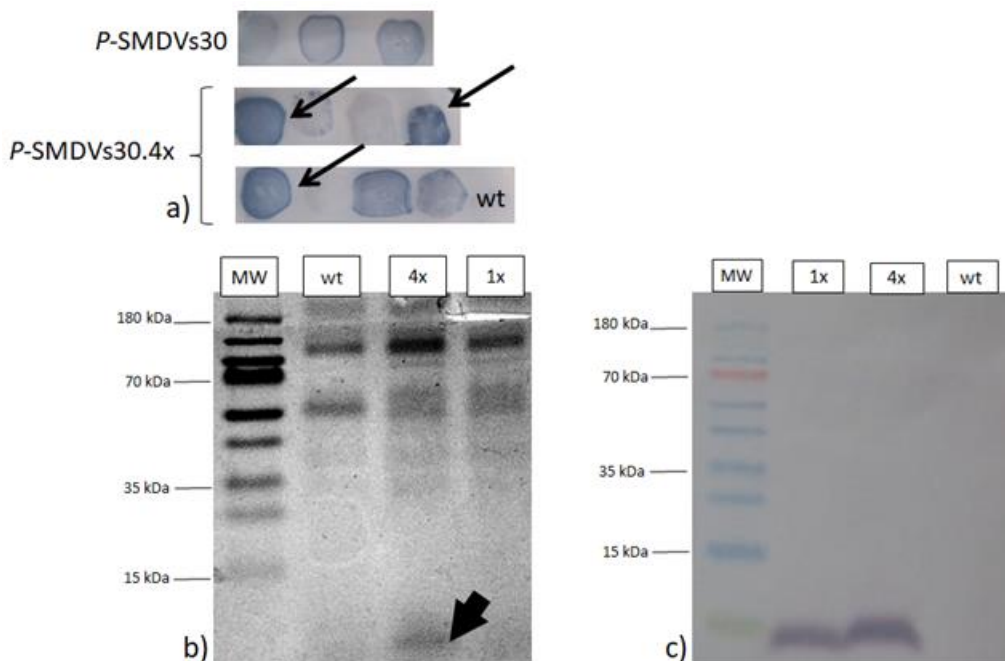


Figura 10. Inmudetección en colonia y análisis electroforético de los sobrenadantes de las cepas *P-SMDVs30* y *P-SMDVs30.4x*.

a) *Colony blot* a 11 transformantes diferentes. Las flechas indican una señal más intensa. b) SDS-PAGE. La flecha indica la presencia de una banda debajo de los 10kDa. C) Western blot. Carril MW= marcador de peso molecular, carril wt= *Pichia pastoris* SMD1168, carril 4x= cepa *P-SMDVs30* y carril 1x= cepa *P-SMDVs30*.

2.3 Selección de las condiciones de cultivo para la producción de Vs30

El pH en el cultivo es un parámetro importante para la expresión en *Pichia pastoris*. De hecho, el aumento en el tiempo de cultivo y el pH están relacionados con la secreción de proteasas en el medio de cultivo [123]. Por lo tanto, la cepa *P-SMDVs30.4x* se cultivó en diferentes condiciones de pH y se analizaron los sobrenadantes recolectados a las 48 h. De este modo, como se muestra en el gel de poliacrilamida (Figura 11.a), el número de proteínas nativas de *Pichia pastoris* encontradas en el sobrenadante se redujo drásticamente a pH 6, lo que facilita los procedimientos rio abajo de purificación. Por otra parte, el tiempo óptimo de cosecha del sobrenadante fue de 48 h. Después de 72 h de cultivo disminuyó la cantidad de Vs30 probablemente por una acción proteolítica (Figura 11.b).

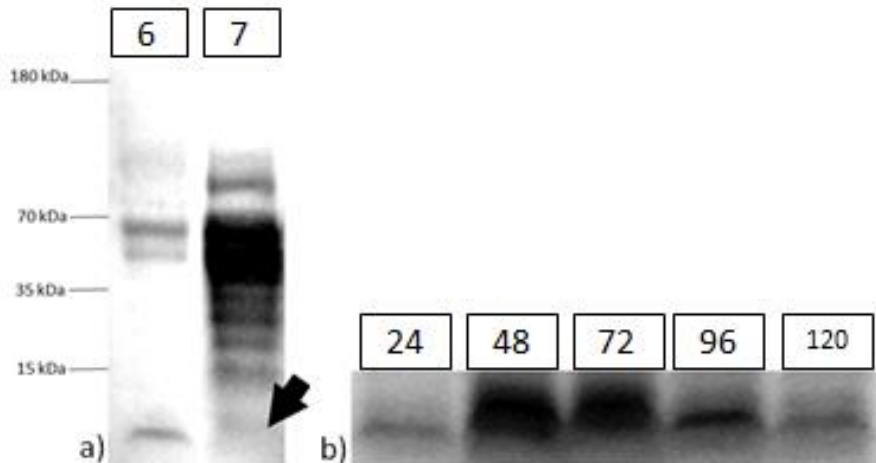


Figura 11. Efecto del pH y el tiempo de cosecha en la producción de Vs30

a) SDS-PAGE a sobrenadantes de la cepa *P-SMDVs30.4x* cultivada en diferentes pH's (6= pH 6, 7= pH 7, Flecha= Vs30). b) SDS-PAGE a sobrenadantes recolectados a pH 7 a las 24, 48, 72, 96 y 120 h.

2.4 Purificación de Vs30 por ultrafiltración

Los sobrenadantes de la cepa *P-SMDVs30.4x* se filtraron usando una celda agitada con una membrana de corte de 30 kDa. Por lo tanto, las fracciones retenidas y filtradas se recolectaron y analizaron mediante SDS-PAGE. Vs30 se visualizó como una banda única por debajo de 10 kDa únicamente en la fracción filtrada (Figura 12). En nuestro laboratorio, pudimos obtener 2.98 mg/L de Vs30 soluble utilizando *E. coli* BL21-SI como sistema de expresión [59]. En este trabajo de tesis, se expresó con éxito Vs30 en *Pichia pastoris* y se obtuvo 11.6 mg/L de proteína purificada. Luego, se optimizó el paso de purificación reduciendo el tiempo y el costo de producción. Además, la producción de péptidos terapéuticos en *E. coli* generalmente requiere de pasos que pueden ser evitados mediante el uso de *Pichia pastoris*, como: 1) la extracción de la proteína por lisis celular, 2) el procesamiento de cuerpos de inclusión y 3) de controles adicionales para endotoxinas, las cuales pueden modular la proliferación de células endoteliales. Previamente, VAS (120-180aa), una versión de mayor longitud que Vs30 (135-164aa), se expresó en *P. pastoris* KM17 bajo un promotor inducible de metanol [97]. Por otro lado, utilizamos el vector pGAPZαA basado en el promotor constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP). La expresión constitutiva simplifica el proceso de producción y evita el uso de metanol potencialmente peligroso y mantiene la transcripción continua del gen de interés con diferentes fuentes de carbono como glucosa, glicerol y sorbitol [119].

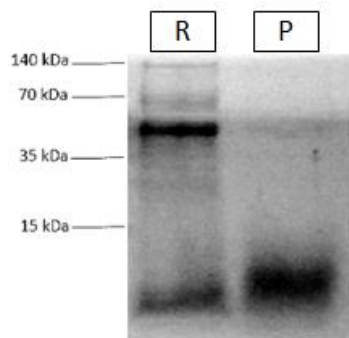


Figura 12. Purificación de Vs30 por ultrafiltración.

SDS-PAGE a las fracciones obtenidas de la ultrafiltración de sobrenadantes de la cepa *P-SMDVs30.4x*. Carril R= fracción retenida y carril P= fracción filtrada.

2.5 Expresión constitutiva de Vs30 en biorreactor

La cepa *P-SMDVs30.4x* se cultivó en un reactor de tanque agitado de 1L a pH 6, 28°C y a una saturación de oxígeno mayor a 20% siguiendo el protocolo descrito por [124]. La cantidad obtenida de Vs30 fue de 22.5 ± 0.05 mg/L a las 48 h de cultivo en biorreactor, la cual es similar a la cantidad obtenida en matraz (21.07 ± 0.9 mg/L). Sin embargo, la cantidad de Vs30 decae después de las 48 h de cultivo en matraz (Figura 11) mientras que en biorreactor se alcanza una concentración máxima de 27.66 ± 1.5 mg/L a las 72 h (Figura 13). Además, en la Figura 13 se observa una cinética producción de Vs30 asociada a crecimiento celular, lo cual es típico en cultivos de expresión constitutiva.

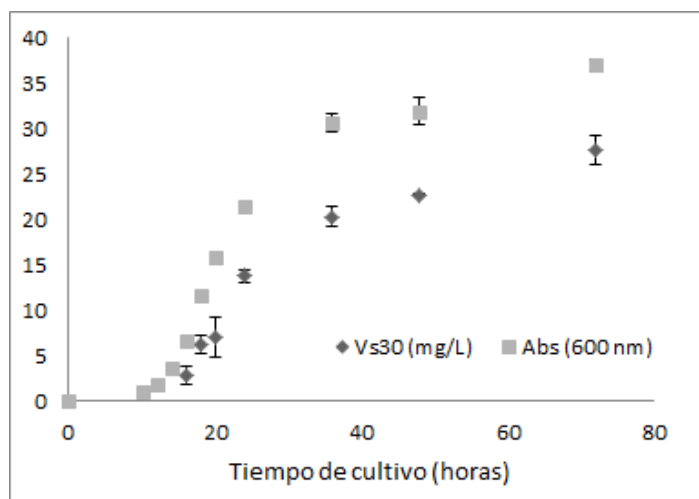


Figura 13. Cinética de crecimiento celular y de producción de Vs30 del biorreactor batch de 1 L de la cepa *P-SMDVs30.4x*

La biomasa máxima alcanzada (DCW) fue de 8.47 ± 0.12 g/L y la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.30 ± 0.01 h⁻¹ (Figura 14a). Ambos valores son similares a los reportados (DCW= 10.5 ± 0.5 g/L y $\mu=0.32 \pm 0.01$ h⁻¹) en la producción de la endochitinasa Ech42 en *Pichia pastoris*, donde se utilizó la misma cepa parental deficiente de

proteasas (SMD1168), un cultivo batch de 1L en el mismo biorreactor de tanque agitado y una saturación de oxígeno de 40% [124]. En la Figura 14.b se graficó en el eje Y la cantidad de Vs30 obtenida en sobrenadantes del cultivo en biorreactor y en el eje X la biomasa correspondiente en gramos de peso seco, con esto se determinó el rendimiento de producto sobre biomasa ($Y_{p/x}$) que fue de 3.45 mg/g. Posteriormente, se determinó la productividad específica (q_p) del cultivo en biorreactor que fue de 1.05 $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$, la cual se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$q_p = \mu \cdot Y_{p/x}$$

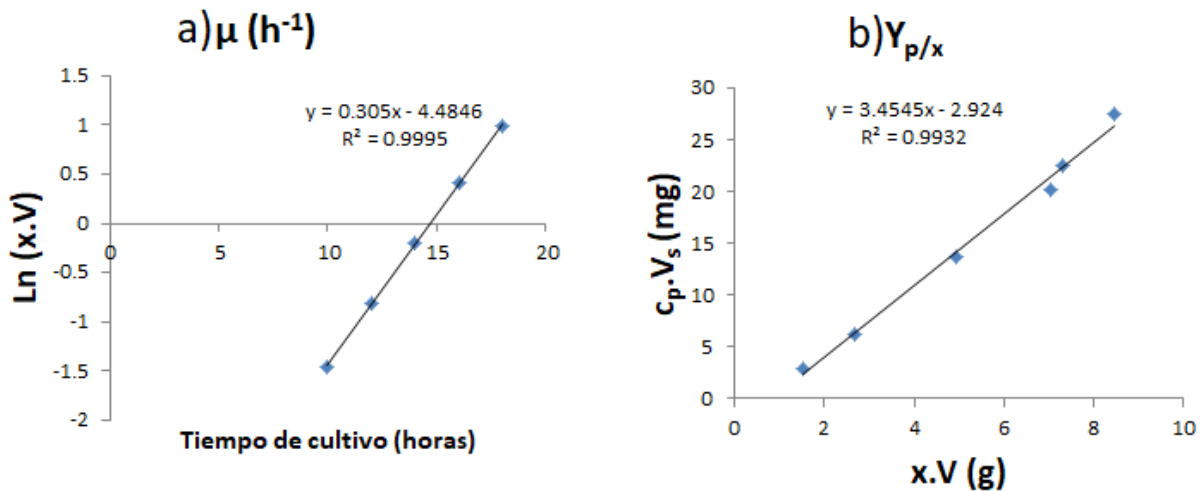


Figura 14. Cálculo de valores cinéticos y estequiométricos del biorreactor batch de 1 L de la cepa *P-SMDVs30.4x*

- a) μ = velocidad específica de crecimiento. b) $Y_{p/x}$ = rendimiento de producto sobre biomasa.
X= Biomasa (g peso seco), V= volumen de reactor, Vs= volumen de sobrenadante, Cp= concentración de la proteína recombinante.

3. Ensayos de expresión y purificación de Vi-II-14.1

3.1 Optimización del gene *vi-ii-14.1*

La optimización de codones es una estrategia para incrementar el nivel de expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*. Por lo tanto, la secuencia de *vi-ii-14.1* se adaptó al uso preferencial de codones de *Pichia pastoris* sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Además, se consideraron otros aspectos para el diseño de la secuencia sintética de *vi-ii-14.1*, como: contenido de GC, estabilidad de ARN y sitios de corte y empalme crípticos. De esta forma, se modificaron 99 nucleótidos, se optimizaron 89 de 123 codones y el índice de adaptación de codones (CAI) aumentó de 0,7 a 0,84 (Figura 15). El porcentaje de GC de los genes de *Pichia pastoris* es de 45% y el ajuste a este porcentaje en genes heterólogos puede aumentar la vida media de ARN mensajero y,

consecuentemente, la producción de proteína recombinante. Por lo tanto, el contenido de GC de *vi-ii-14.1* se ajustó de 53.33% a 42.38%.

Vi-II-14.1	M	L	P	I	C	P	G	G	A	A
opt	A T G	C T T	C C A	A A T	T T G	T C C	T G G	T G G	A G C	A G C
nat	A T G	T T G	C C C	A A T	C T G	T C C	C G G	C G G	G G C	T G C
Vi-II-14.1	R	C	Q	V	T	L	R	D	L	F
opt	A G A	T G C	C A A	A G T	C A C	T T T	G A G	A G A	T C T	T T T
nat	C G A	T G C	C A G	G G T	G A C	C C T	T C G	A G A	C C T	G T T
Vi-II-14.1	D	R	A	V	V	L	S	H	Y	I
opt	G A C	A G A	G C T	G T T	T G T	C T T	G A G	T C A	T T A	C A T
nat	G A C	C G G	C G C	G T C	C G T	C C T	T G T	C C C	C A C	T A C
Vi-II-14.1	H	N	L	S	S	E	M	F	S	E
opt	C A C	A A C	C T T	T T C	T T C	C G A	A A T	G T T	C T C	A G A
nat	C A T	A A C	C T C	T T C	C T C	A G A	A A T	G T T	C A G	C G A
Vi-II-14.1	F	D	K	R	Y	T	H	G	R	G
opt	T C C	G A T	A A A	G A G	A T A	C A C	C C A	T G G	T A G	A G G
nat	T T C	G A T	A A A	A C G	G T A	T A C	C C A	T G G	A A G	G G T
Vi-II-14.1	F	I	T	K	A	I	N	S	C	H
opt	T T T	A T T	A C T	A A G	G C T	A T C	A A T	T C T	T G T	C A C
nat	T T C	A T T	A C C	A A G	G C C	A T C	A A C	C A G	C T G	C A C
Vi-II-14.1	T	S	S	L	A	T	P	E	D	K
opt	A C T	T C A	A G T	T T G	G C T	A C A	C C A	A G A	A G A	T A A
nat	A C T	T C T	T C C	T T G	G C C	A C C	C C C	A G A	A G A	C A A
Vi-II-14.1	E	Q	A	Q	Q	M	N	Q	K	D
opt	G A G	C A A	G C C	C A A	C A G	A T G	A A C	C A G	A A A	G A C
nat	G A G	C A A	G C C	C A A	C A G	A T G	A A T	C A A	A A A	G A C
Vi-II-14.1	F	L	S	L	I	V	S	I	L	R
opt	T T C	T G T	C T C	T T C	T A T	T G T	T T C	C A T	C T T	G A G
nat	T T T	T G T	A G C	C T C	G A T	A G T	C A G	C A T	A T T	G C G
Vi-II-14.1	S	W	N	E	P	L	Y	H	L	V
opt	T C A	T G G	A A T	G A A	A C C	T T T	G T A	C C A	T C T	T G T
nat	T C C	T G G	A A T	G A A	G C C	T C T	G T A	T C A	T C T	G T C
Vi-II-14.1	T	E	V	R	G	M	Q	E	A	P
opt	A C T	G A A	G T C	A G A	G G A	A A T	G C A	G G A	G G C	C C C
nat	A C G	G A A	G T A	A C G	T G G	T A T	G C A	A G A	A G C	C C C
Vi-II-14.1	E	A	I	L	S	K	A	V	E	I
opt	G A A	G C C	A T T	C T T	T T C	C A A	G G C	A G T	T G A	G A T
nat	G A G	G C T	A T C	C T A	T C C	A A A	A G C	T G T	A G A	G A T
Vi-II-14.1	E	H	H	H	H	H	H	STOP		
opt	G A A	C A C	C A C	C A C	C A C	C A C	C A T	T A A		
nat	G A G	C A C	C A C	C A C	C A C	C A C	C A T	T A A		

Figura 15. Comparación entre la secuencia optimizada y nativa de *vi-ii-14.1*

(a) Línea Vi-II-14.1= secuencia de aminoácidos de Vi-II-14.1, Línea *opt*= secuencia optimizada de *vi-ii-14.1* de acuerdo al uso preferencial de codones de *Pichia pastoris*, Línea *nat*= secuencia nativa de *vi-ii-14.1* derivada del gene de la prolactina humana (Número de acceso NM_000948.5), fondo negro= sustitución de nucleótido.

3.2 Obtención de cepas hiperresistentes a G418

Un procedimiento para obtener cepas de *Pichia pastoris* con múltiples integraciones consiste en seleccionar cepas transformantes en altas concentraciones de antibiótico [94]. Está establecido que no se pueden obtener directamente cepas transformantes del vector de expresión inducible pPIC9K debido a que el gen de resistencia a G418 (*Tn903kan^r*) cuenta con un promotor bacteriano, el cual es débil en *Pichia pastoris* [125, 126]. Por lo tanto, para obtener cepas resistentes a la geneticina (G418) es necesario seleccionar inicialmente cepas transformantes His⁺ y, posteriormente, realizar un tamizaje a concentraciones crecientes de G418 [127]. Sin embargo, este método convencional requiere de una gran cantidad de tiempo y recursos. En nuestro grupo de trabajo, se desarrolló un método directo (CASA) para obtener cepas de *Pichia pastoris* hiperresistentes a G418, el cual requiere de una menor inversión de tiempo, recursos y esfuerzo. El método CASA consta de aumentar el tiempo de recuperación de las transformantes a 12 h, esto con el fin de permitir la expresión suficiente de *Tn903kan^r*. De esta manera, fueron obtenidas cepas transformantes resistentes a 2 y 4 mg/mL de G418.

El plásmido de expresión con la vasoinhibina (pPIC9K-Vi) no cuenta con una secuencia de replicación para *Pichia pastoris*, por lo cual, al momento de ser ingresado dentro de la célula tiene que integrarse al genoma para su replicación y conservación [128]. Así, con el fin de comprobar que la secuencia correspondiente a la vasoinhibina estuviera integrada en el genoma de *Pichia pastoris*, se realizó un PCR en colonia. El cual consta de lisar térmicamente la colonia y realizar la amplificación de la secuencia deseada de ADN. De esta manera, se analizó en un gel de agarosa el producto de PCR de las cepas problema, del plásmido pPIC9K-Vi que contenía la secuencia de la vasoinhibina (control positivo) y de la cepa parental GS115 (control negativo). En la Figura 16.a, se muestra la presencia de una única banda con el tamaño esperado (695 pares de bases) sólo en las cepas problema y en el control positivo, pero no en la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. Con base en este resultado, se puede concluir que las cepas analizadas en el presente estudio cuentan con la secuencia de ADN de la vasoinhibina. Por otra parte, en la Figura 16.b, se muestran los resultados de la inmunodetección de Vi-II-14.1 en colonia, donde se puede observar que la cepa *P*-GS115-Vi-4mg produjo señales más intensas en comparación con la cepa *P*-GS115-Vi-2mg. Asimismo, la cepa parental GS115 no generó señal. Adicionalmente, se detectaron dos bandas en un western blot realizado a las proteínas del sobrenadante de la cepa *P*-GS115-Vi-4mg (Figura 16.c). La banda de 15 kDa corresponde con el peso molecular teórico para la Vi-II-14.1 y la banda de 18 kDa puede deberse a la presencia de una versión glicosilada de Vi-II-14.1 o a un procesamiento ineficiente de proteólisis de la señal de secreción. Con base en los resultados presentados en esta sección, se puede concluir que las cepas obtenidas tienen la capacidad de producir y secretar Vi-II-14.1.

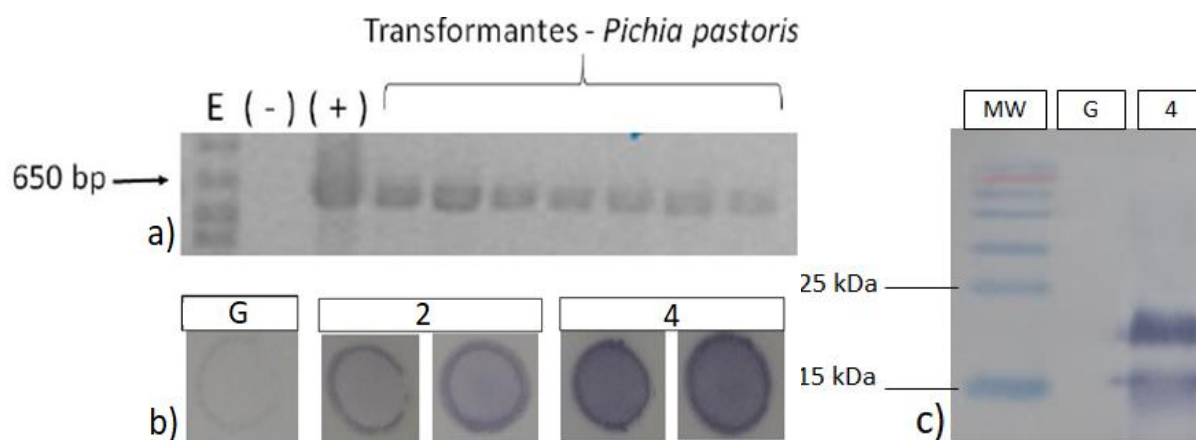


Figura 16. Caracterización de las cepas transformadas por el método CASA

- a) Análisis electroforético de productos de PCR. E= escalera de longitudes de ADN, Control negativo (-)= PCR a ADN genómico de la cepa GS115, control positivo (+)= PCR a pPIC9K-Vi.
 b) *Colony blot* a sobrenadante. c) Western blot a sobrenadante. G=cepa GS115, 2 = cepa *P*-GS115-Vi-2mg y 4= *P*-GS115-Vi-4mg.

3.3 Selección de cepas secretoras de Vi-II14.1

En *Pichia pastoris* prevalece la vía de recombinación de extremos no homólogos (NHEJ), lo cual resulta en una heterogeneidad clonal post-transformación y en una consecuente selección de cepas mediante procesos de cribado que consumen tiempo y recursos[129–131]. Por otra parte, se ha observado que la actividad antiangiogénica de la vasoinhibina depende del contacto con receptores de las células endoteliales y moléculas de la matriz extracelular, y no de una actividad enzimática específica. Por lo tanto, no es viable realizar un escrutinio económicamente masivo de cepas transformantes de *Pichia pastoris* debido a la naturaleza de los ensayos de bioactividad de las proteínas antiangiogénicas. Por otra parte, la inmunodetección de péptidos es una opción viable para este problema, por lo que utilizamos una metodología modificada descrita por [114], denominada “*colony blot*”. De esta manera, se analizaron paralelamente 51 cepas transformadas con el vector de expresión constitutiva pGAP-Vi. En la Figura 17.a, se observan las señales obtenidas por el *colony blot*, las cuales se clasificaron según su intensidad. En este sentido, se observó que la mayoría de cepas transformantes tenían un nivel de expresión bajo-medio, mientras que únicamente 3 cepas mostraron una expresión alta (Figura 17.b). Por lo tanto, se eligió una cepa de expresión alta (*P*-GS115-Vi) para realizar ensayos de expresión y para comparar el nivel de expresión con las cepas *P*-GS115-Vi-2mg y *P*-GS115-Vi-4mg.

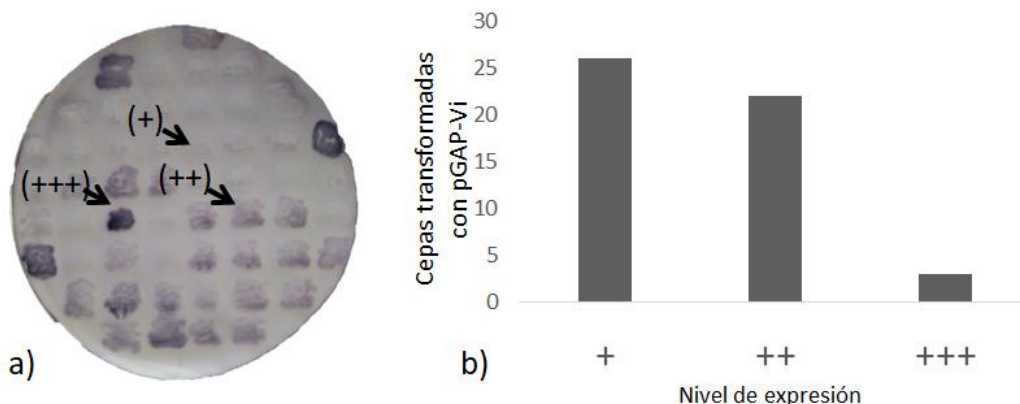


Figura 17. Inmunodetección en colonia de Vi-II-14.1

a) *Colony blot* a 51 cepas transformadas con pGAP-Vi. Flecha (+++)= señal intensa, flecha (++)= señal intermedia y flecha (+) señal debil. b) Gráfica de transformantes clasificadas de acuerdo a su nivel de expresión.

3.4 Efecto del promotor, pH y tiempo de cosecha en la producción de Vi-II-14.1

Se realizaron cultivos estándar a pH 6 de las cepas *P-GS115-Vi* (Constitutiva), *P-GS115-Vi-2mg* y *P-GS115-Vi-4mg* y, posteriormente, se analizaron los sobrenadantes a las 48 horas de cultivo. En este sentido, la cepa *P-GS115-Vi-2mg* produjo 55 mg/L y la cepa *P-GS115-Vi-4mg* produjo 68 mg/L, lo cual coincide con los resultados cualitativos de *colony blot* presentados en la Figura 16.b. Con base en estos resultados se puede decir que las cepas resistentes a 4 mg/mL produjeron una mayor cantidad de Vi-II-14.1 en comparación con las cepas resistentes a 2 mg/mL. Por otra parte, la cepa de expresión constitutiva *P-GS115-Vi* produjo una cantidad equiparable a la cepa hiperresistente *P-GS115-Vi-4mg* (Figura 18). Por lo tanto, se seleccionó a la cepa *P-GS115-Vi* para los ensayos de optimización de las condiciones de cultivo y para la purificación de Vi-II-14.1, esto debido a su nivel de producción y a las ventajas que ofrece la expresión constitutiva.

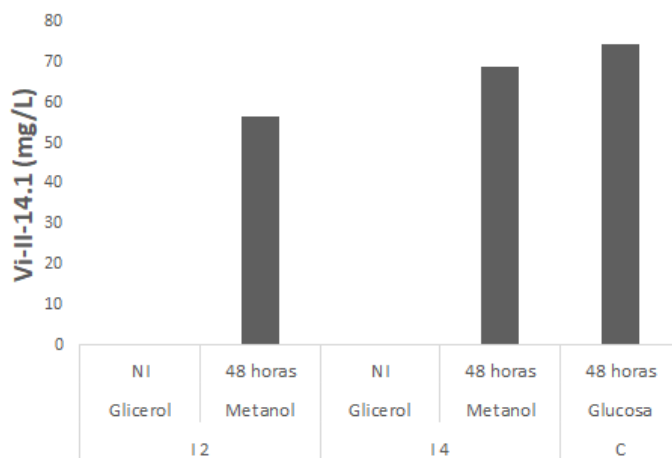


Figura 18. Expresión inducible y constitutiva de Vi-II-14.1

12 e 14 = Vi-II-14.1 producida mediante la inducción con metanol por 48 horas por las cepas *P-*

GS115-2mg y *P*-GS115-4mg, respectivamente. NI= cultivo no inducido con glicerol como fuente de carbono. C= Vi-II-14.1 producida constitutivamente en un cultivo de 48 horas con glucosa de la cepa *P*-GS115-Vi.

En la Figura 19, se observa que el tiempo de cosecha influyó drásticamente en la cantidad de Vi-II-14.1 encontrada en el sobrenadante de la cepa *P*-GS115-Vi. En este sentido, se redujo más de un 50% la cantidad de Vi-II-14.1 a las 48 h de cultivo. De este modo, las condiciones de cultivo seleccionadas fueron un pH de 7 y un tiempo de cosecha de 24 h, debido a que se alcanzó una producción más alta en estas condiciones (126.8 mg/L). La cantidad de Vi-II-14.1 secretada por la cepa *P*-GS115-Vi supera la cantidad de Vi-II-14.1 obtenida en lisados de *E. coli* BL21 (9 mg/L) [59]. Además, la producción de péptidos terapéuticos en *E. coli* generalmente requiere de pasos que pueden ser evitados mediante el uso de *Pichia pastoris*, como la extracción de la proteína por lisis celular y el análisis de controles adicionales para endotoxinas, las cuales pueden modular la proliferación de células endoteliales [90]. Por otra parte, se obtuvo 1 mg de Vi-II-16 en 4×10^7 células de insecto sf9 [79], lo cual es más eficiente en comparación con *Pichia pastoris*, teniendo en cuenta que una unidad de DO₆₀₀ equivale a alrededor de 5×10^7 células de levadura por mililitro de cultivo. Sin embargo, la producción de Vi-II-14.1 en *Pichia pastoris* es más viable económicamente y operacionalmente que la producción en cultivo de células de insecto sf9, debido al costo de los medios de cultivo y al procesamiento de la proteína intracelular.

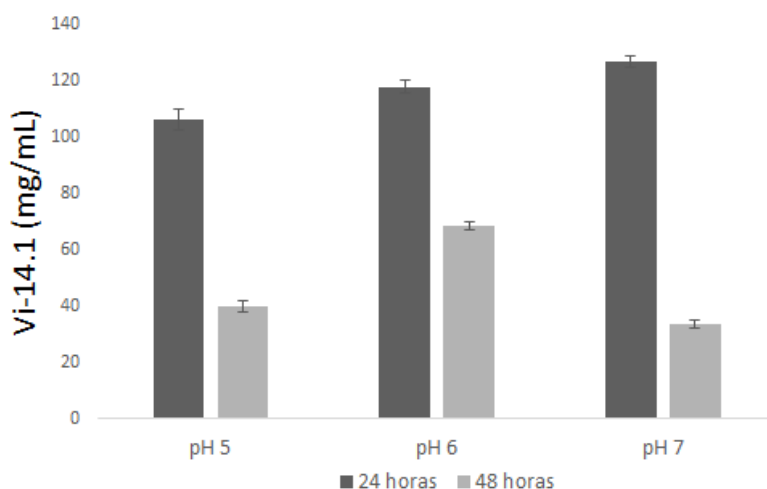


Figura 19. Efecto del pH y el tiempo de cultivo en la producción de Vi-II-14.1

Vi-II-14.1 producida constitutivamente por la cepa GS115-Vi. En la gráfica se presenta la cantidad de Vi-II-14.1 en los sobrenadantes recolectados a las 24 y 48 h de cultivos con pH 5, 6 y 7.

3.5 Purificación de Vi-II-14.1 por cromatografía de afinidad

Se purificó la Vi-II-14.1 con etiqueta de histidinas por cromatografía de afinidad utilizando agarosa Ni-NTA (Níquel- ácido nitriloacético) en condiciones nativas y en configuración batch. En este sentido, se monitoreó la efectividad de la purificación por SDS-PAGE. En la Figura 20, se observan 2 bandas en el carril de elución, una debajo

de los 15 kDa y una de 20 kDa, las cuales también se detectaron por western blot. El peso molecular teórico para Vi-II-14.1 es de 14.8 kDa, por lo cual coincide con la banda debajo de los 15 kDa. Sin embargo, la banda de 20 kDa se determinó que era una banda glicosilada (Figura 21). Posteriormente, se analizó el gel de poliacrilamida por el software ImageJ y se determinó que el grado de pureza era del 93.13%. El porcentaje de recuperación fue de 1.57%, es decir, se obtuvieron 2 mg/L de Vi-II-14.1 purificada. La purificación de Vi-II-14.1 se llevó a cabo mediante un protocolo estándar (Invitrogen), por lo tanto, es posible optimizar el proceso de purificación para aumentar el grado de pureza y el porcentaje de recuperación.

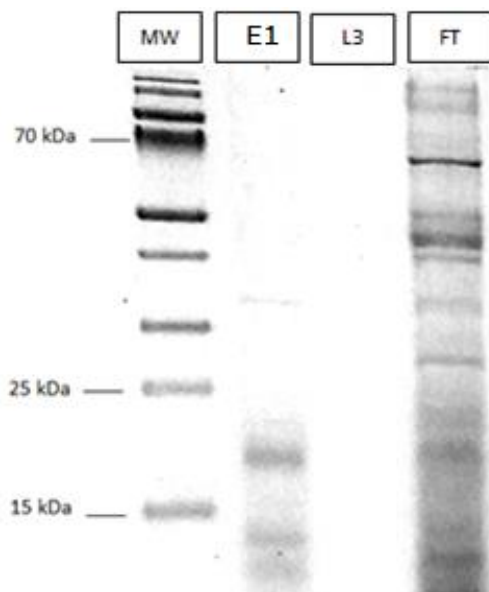


Figura 20. Purificación de Vi-II-14.1 por cromatografía de afinidad

SDS-PAGE a MW= marcador de peso molecular, E1= elución con 250 mM de imidazol, L3= tercer lavado con imidazol 50 mM y FT= Proteínas no adheridas a la resina.

3.6 Detección de una versión glicosilada de Vi-II-14.1

Se detectó la presencia de una banda extra de 20 kDa en el análisis electroforético y en el western blot de la Vi-II-14.1 purificada. Por lo tanto, se propuso que era una versión glicosilada de Vi-II-14.1. Para confirmarlo, se reveló un gel de poliacrilamida con un kit de tinción de glicoproteínas (Pierce™ glycoprotein staining). En la Figura 21, se observa una única banda de 20 kDa en el carril donde se analizó la Vi-II-14.1 purificada. Además, se observó una banda en el control positivo, la cual coincidía con el peso molecular teórico (~40 kDa) mientras que en el control negativo no se observó ninguna banda. Con base en este resultado se puede concluir que *Pichia pastoris* produce una versión glicosilada de Vi-II-14.1. Galfione et al. [79], detectó una versión glicosilada de 18 kDa producida por células de insecto sf9, la cual fue digerida mediante un tratamiento con PNGasaF (péptido N-glicosidasa F). Por lo tanto, se propuso que la glicosilación estaba en la asparagina número 31 de la vasoinhibina. Por otra parte, *Pichia pastoris* realiza típicamente la N-glicosilación en la secuencia N-X-S/T (Asparagina-cualquier aminoácido-serina/treonina) [132]. La Vi-II-14.1 tiene una

secuencia consenso N-L-S (asparagina-leucina-serina) en la posición 17, por lo cual, se propone esta coordenada como posible sitio de glicosilación en *Pichia pastoris*. En humano, se ha detectado una versión glicosilada de la prolactina de 25 kDa en la pituitaria, plasma y fluido amniótico [133]. La N-glicosilación de la prolactina humana es en la secuencia N-L-S en la posición 31 y se ha observado, en experimentos con ratas, que la versión glicosilada tiene un menor tiempo de vida media en la circulación [134]. Por otra parte, no se ha estudiado el efecto de la glicosilación del eje prolactina/vaso-inhibina en la modulación de la angiogénesis.

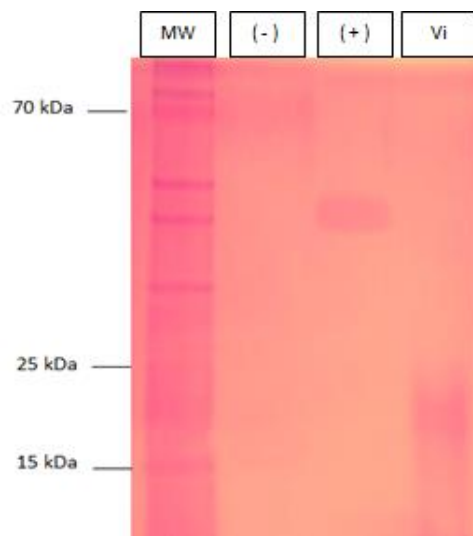


Figura 21. Detección de una versión glicosilada de Vi-II-14.1

SDS-PAGE a MW= marcador de peso molecular, control negativo (-)= Inhibidor de la tripsina de soya, control positivo (+)= peroxidasa de rabano y Vi= Vi-II-14.1 purificada por cromatografía de afinidad.

4. Ensayos de expresión de VS_VI

4.1 Construcción de vectores multicopia

En vista de que no se puede predecir la influencia de la dosis génica en el nivel de producción de la proteína de interés [112, 135]. En algunos casos, como en la expresión de aquaporinas en *Pichia pastoris*, se ha mejorado la producción de la proteína al aumentar la dosis génica [136]. Sin embargo, se ha reportado el decremento de la producción del tripsinógeno humano al aumentar la dosis génica [122]. VS_VI es una proteína de fusión novedosa y propuesta por nuestro grupo de trabajo [59], de la que no se ha estudiado el efecto de la dosis génica en la producción de la misma. En consecuencia, se realizó la construcción de vectores multicopia, la transformación de estos en *Pichia pastoris* y se caracterizaron las cepas resultantes con el fin de estudiar la influencia de la dosis génica en la producción y secreción de VS_VI.

Los plásmidos pGAP-vs_{vi}1x, pGAP-vs_{vi}2x, pGAP-vs_{vi}4x y pGAP-vs_{vi}6x se obtuvieron con 1, 2, 4 y 6 copias del casete de expresión, que tiene una longitud de 1.76 Kb y consiste en el promotor constitutivo pGAP, la señal de secreción del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen *vs_{vi}* y terminador de la AOX1. Por lo tanto, la longitud del casete de expresión aumentó en cada escala, es decir, 3.52 Kb (2 copias), 7.04 kb (4 copias) y 10.56 kb (6 copias), mientras que el esqueleto del vector que contenía el gen de resistencia a la zeocina permaneció constante a 1.9 kb (Figura 22).

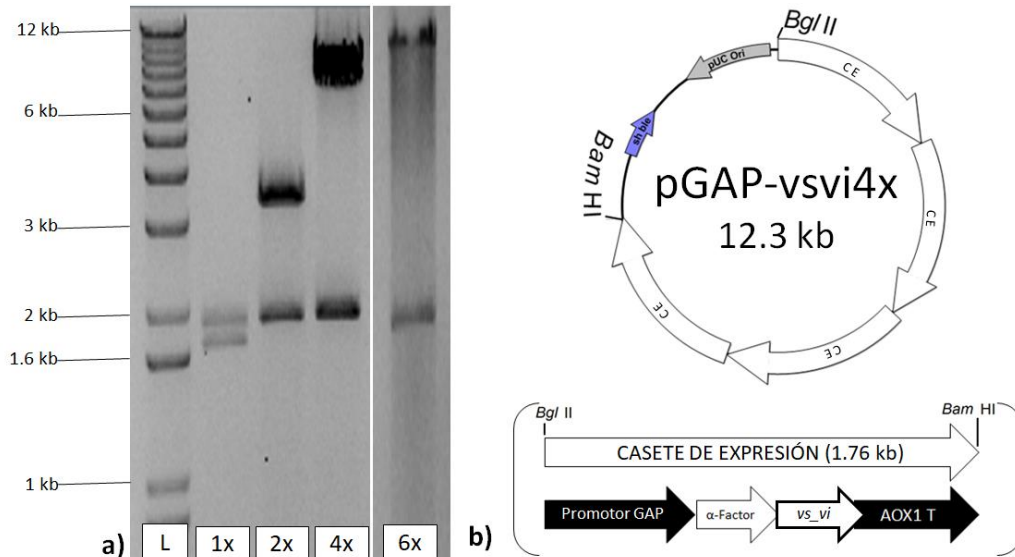


Figura 22. Multimerización del casete de expresión con el gen *vs_{vi}*

(a) Análisis de restricción con *Bam*HI/*Bgl*II de los vectores con 1, 2, 4 y 6 copias del casete de expresión *vs_{vi}* (L=1 kb plus ladder, 1x= 1 copia del casete de expresión, 2x=2 copias, 4x= 4 copias y 6x= 6 copias). (b) Esquema del vector con 4 copias del casete de expresión. El casete de expresión tiene una longitud de 1.76 Kb y se representa con una flecha blanca la cual equivale a el promotor constitutivo pGAP, a la señal de secreción factor alfa, al gen *vs_{vi}* y al terminador de la alcohol oxidasa 1.

4.2 Obtención y caracterización de cepas multicopia de *Pichia pastoris*

Se transformó la cepa SMD1168 de *Pichia pastoris* con los vectores de expresión pGAP-vs_{vi} (1 copia) y pGAP-vs_{vi}.4x (4 copias). Se aislaron 59 cepas transformantes, se sembraron en medio YPD sólido y se les realizó el análisis de “*colony blot*”. Las cepas se clasificaron según la intensidad que generaron en el “*colony blot*” y se graficaron como se ve en la Figura 23. De este modo, se observó un mayor número de cepas transformadas con pGAP-vs_{vi}.4x con un alto nivel de expresión en comparación con las cepas transformadas con pGAP-vs_{vi}. Con base en este resultado, se puede decir que el aumento de 1 a 4 copias del casete de expresión en el plásmido incrementa la probabilidad de obtener transformantes con nivel alto de expresión de VS_{VI}.

Se realizaron ensayos de expresión constitutiva a nivel matraz como se describe en 5.1 de la sección de metodología. Posteriormente, se analizaron por “*dot blot*” los sobrenadantes de cultivos de 48 horas de la cepa SMD1168, de la cepa *P-SMDVS_VI* (monocopia) y de la cepa *P-SMDVS_VI.4x* (tetracopia). En la Figura 24.a, se observó que la cepa tetracopia generó una mayor intensidad colorimétrica en comparación con la cepa monocopia. Posteriormente, se realizó un “*western blot*” a los sobrenadantes de las cepas en cuestión como se observa en la Figura 24.b. De este modo, se detectó una banda única alrededor de los 20 kDa en los sobrenadantes de las cepas mono y tetracopia, la cual coincide con el peso molecular teórico de la VS_VI que es de 18.5 kDa. Además, se observó que la cepa tetracopia produjo una banda con mayor intensidad, al igual que en los inmunoensayos anteriores, es decir, en el “*colony blot*” y “*dot blot*”. Con base en estos resultados, se concluyó que el cuadruplicar la dosis génica tiene un efecto positivo en la producción y secreción de VS_VI.

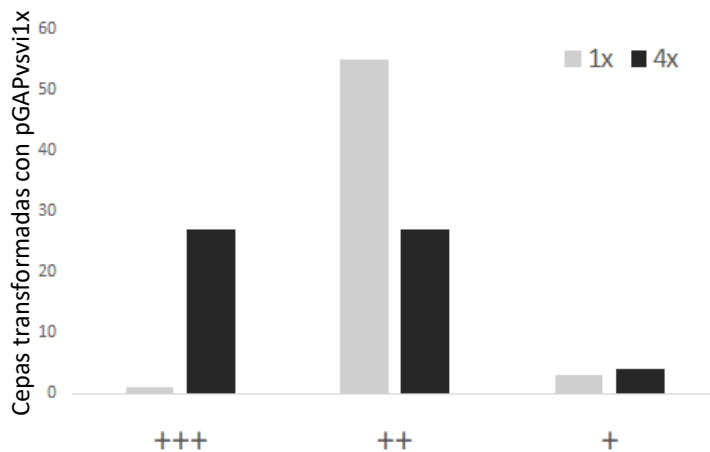


Figura 23. Inmunodetección en colonia de VS_VI

Gráfica de cepas transformadas con pGAPvsvi1x (1x, barras color gris) o pGAPvsvi4x (4x, barras color negro) clasificadas de acuerdo a su nivel de expresión. +++= señal intensa, ++= señal intermedia y +=señal débil.

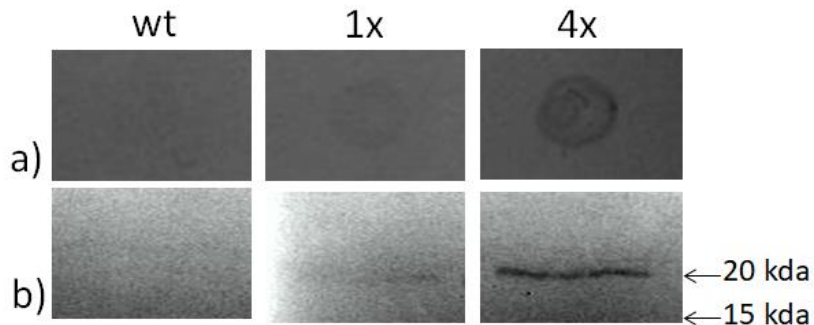


Figura 24. Efecto del número de copias en la producción de VS_VI

a) *dot blot* y b) *western blot*. wt = *Pichia pastoris* SMD1168, 1x= cepa transformada con pGAP-vsvi1 y 4x= cepa transformada con pGAP-vsvi4x.

5. Ensayos de expresión de OSIRIS

La angiogénesis tiene un papel crucial en la formación de tumores y la metástasis, debido a que las células cancerosas necesitan de una fuente de nutrientes y oxígeno para su desarrollo y propagación [34, 137]. En el proceso de la angiogénesis se da la remodelación de la matriz extracelular debido a la secreción de proteasas por parte de las células endoteliales. Por otra parte, algunos tipos de cáncer tienen la habilidad de sobreproducir proteasas que le permiten promover la angiogénesis, así como de abrir canales que permitan su diseminación a otras partes del cuerpo [137–139]. De esta manera, en este trabajo de tesis se plantea como estrategia el aprovechar los ambientes proteolíticos angiotumorales para activar de manera localizada los péptidos con actividad terapéutica. En la Figura 25, se presenta la representación gráfica de OSIRIS, una proteína compuesta por Vs30, un enlazador multicomponente, Vi-II-14.1 y una etiqueta de polihistidinas. El enlazador consta de la secuencia de corte de la trombina [140], la secuencia A3 [111] y una región flexible de tipo GGPGG [59]. La secuencia A3 es un sitio de reconocimiento para la matriz metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, que son las enzimas presentes en los sitios hiperproteolíticos angiotumorales. De esta manera, la secuencia de ADN de OSIRIS fue sintetizada de acuerdo a la secuencia teórica de aminoácidos y al uso preferencial de codones de *Pichia pastoris*. La secuencia de ADN de *osiris* (ver en tabla 4) fue optimizada mediante el uso del programa en línea OptimumGene™ y sintetizada por Genescript. De este modo, *osiris* fue previamente secuenciada e insertada en el plásmido pUC57.

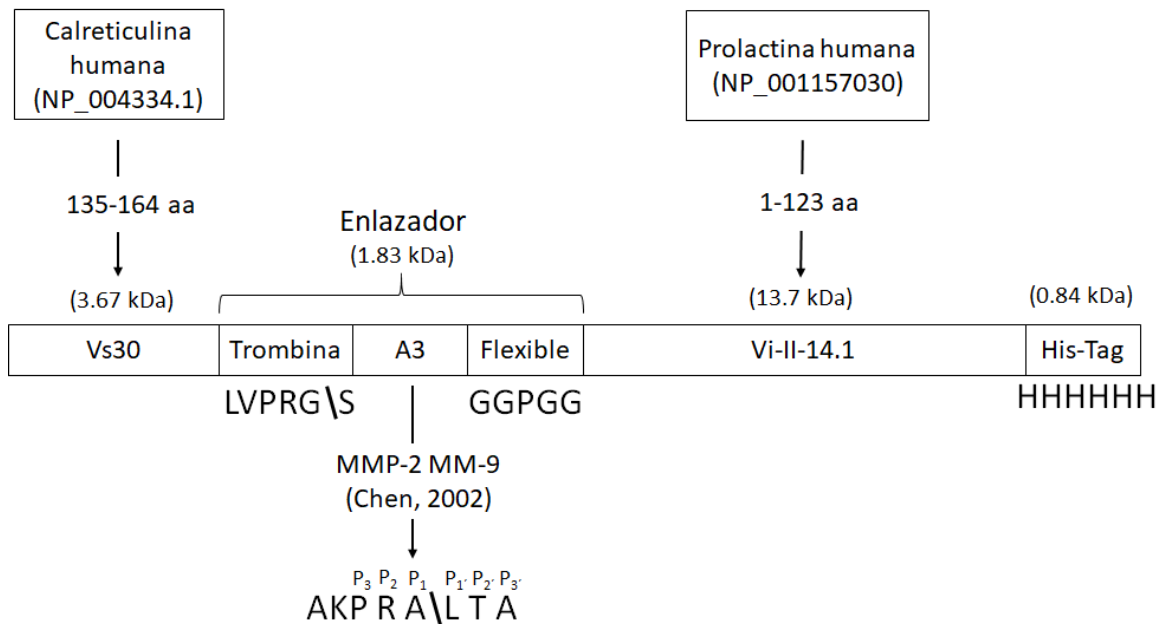


Figura 25. Representación gráfica de la proteína OSIRIS

En la figura se ofrecen las coordenadas y la clave alfanumérica de acceso de las secuencias de aminoácidos de Vs30 y Vi-II-14.1 dentro de las proteínas parentales, el peso molecular teórico y la secuencia de los componentes del enlazador. La diagonal en las secuencias representan el sitio de corte de la proteasa en cuestión.

Como no es posible predecir que promotor será el más eficiente para la producción de una proteína en particular. Además, puede ser que la proteína de interés resulte tóxica para el organismo hospedador [117, 119, 122]. En este sentido, OSIRIS es una proteína propuesta y diseñada en el presente trabajo de tesis, por lo que no se ha producido en ningún organismo hospedador. Por tanto, se decidió insertar *osiris* en el vector de expresión constitutiva pGAPZaA y en el vector de expresión inducible pPIC9K. De este modo, *osiris* fue extraído del plásmido pUC57-OSIRIS mediante el corte enzimático con *EcoRI* e insertado en el sitio *EcoRI* de los vectores de expresión. En consecuencia, fue necesario conocer la orientación de *osiris* mediante análisis de restricción. En la Figura 26.a, se muestra el análisis electroforético del producto de digestión de pGAP-OSIRIS con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I, en el que las longitudes de las bandas resultantes fueron de 3.2 kb y de 500 pb. Por otra parte, en la Figura 26.b, se muestra el análisis electroforético del producto de digestión de pPIC9K-OSIRIS con la enzima *Xba*I, en el que las longitudes de las bandas resultantes fueron de 9 kb y de 850 pb. De esta manera, con base en los resultados presentados en la Figura 26, se puede decir que los vectores de expresión fueron ensamblados correctamente.

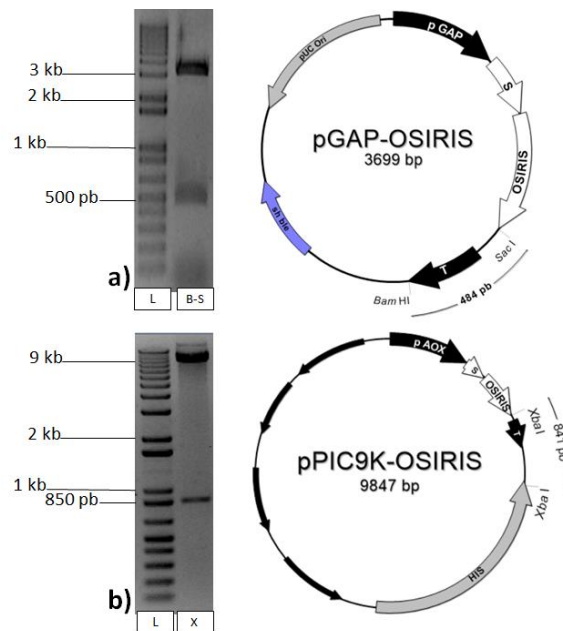


Figura 26. Construcción de casetes de expresión constitutiva e inducible para el gen *osiris*

a) Análisis electroforético de productos de digestión *Bam*HI-*Sac*I y representación gráfica del casete pGAP-OSIRIS. b) Análisis electroforético de productos de digestión *Xba*I y representación gráfica del casete pPIC9K-OSIRIS. Carril L= escalera de longitudes de ADN, carril B-S= fragmentos resultantes de la digestión de pGAP-OSIRIS con *Bam*HI-*Sac*I, carril X= fragmentos resultantes de la digestión de pPIC9K-ORISIS con *Xba*I. En los diagramas: pGAP= promotor de la gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa (GAPDH), pAOX= promotor de la alcohol oxidasa (AOX), S= señal de secreción del factor alfa (*Saccharomyces cerevisiae*), T= terminador de la AOX.

Se optó por el sistema de expresión inducible como primera opción para la producción de OSIRIS en *Pichia pastoris*. Por lo tanto, se transformó por electroporación la cepa GS115 de *Pichia pastoris* con el vector de expresión pPIC9K. Posteriormente, se realizó un PCR de colonia con los oligonucleótidos Factor- α 5' y 3' AOX (ver secuencia en tabla 3), con el fin de comprobar que pPIC9K-OSIRIS estuviera integrado en el genoma de *Pichia pastoris*. De esta manera, se analizó en un gel de agarosa el producto de PCR de las cepas transformadas, del plásmido pPIC9K, del plásmido pPIC9K-OSIRIS (control positivo) y de la cepa parental GS115 (control negativo). En la Figura 27, se muestra la presencia de una única banda con el tamaño esperado (850 pares de bases) sólo en las cepas transformadas y en el control positivo, pero no en la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. Con base en este resultado, se confirmó la presencia del casete de expresión inducible pPIC9K-OSIRIS en las clonas seleccionadas.

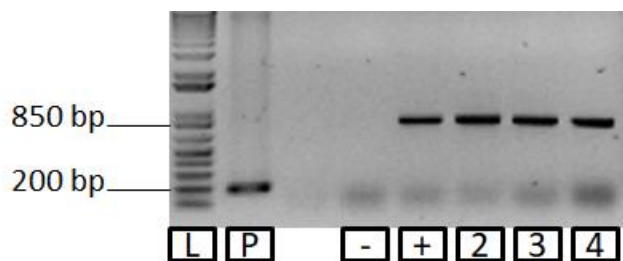


Figura 27. Detección del vector de expresión pPIC9K-OSIRIS en el genoma de *Pichia pastoris*

a) Análisis electroforético de productos de PCR. E= escalera de longitudes de ADN, P= PCR a plásmido pPIC9K, control negativo (-)= PCR a ADN genómico de la cepa GS115, control positivo (+)= PCR a pPIC9K-OSIRIS, carril 2-3= cepas transformadas con pPIC9K-OSIRIS.

La secreción de proteínas de interés es un paso recomendable en el proceso de producción, debido a que se evita la lisis celular para la extracción de proteínas, lo cual facilita el proceso de purificación de las proteínas de interés [112, 127, 141]. Se realizaron cultivos estándar de la cepa *P*-GS115-OSIRIS y se analizaron por western blot los sobrenadantes resultantes a las 72 horas de inducción con 0.5 % de metanol. En la Figura 28, se observa una banda única de 20 kDa inmunodetectada solamente en el sobrenadante de la cepa *P*-GS115-OSIRIS, la cual coincide con el peso molecular teórico de la proteína OSIRIS. Con base en este resultado se concluye que la levadura metalotrófica *Pichia pastoris* tiene la capacidad de producir y secretar la proteína OSIRIS.

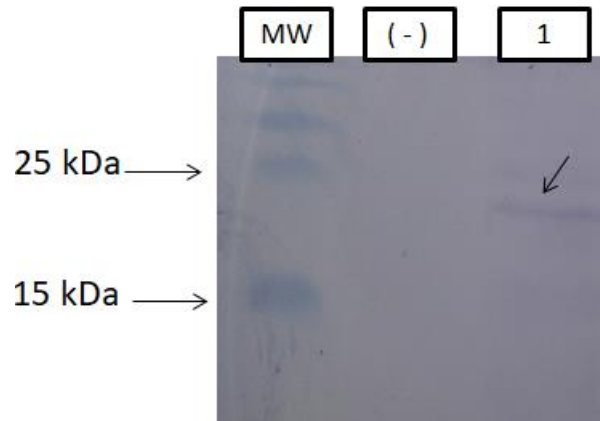


Figura 28. Inmunodetección de OSIRIS.

Western blot a sobrenadantes de cultivos de 72 h. MW= marcador de peso molecular. Control negativo (-) = sobrenadante de la cepa GS115. Carril 1= sobrenadante de la cepa *P*-GS115-OSIRIS-4mg.

Conclusiones

-*Pichia pastoris* tiene la capacidad de producir y secretar Vs30, Vi-II-14.1, VS_VI y OSIRIS.

-El aumento en la dosis génica del vector de expresión tiene un efecto positivo en la producción de Vs30 en *Pichia pastoris*.

-El cultivo de *P-SMDVs30* a pH 6 disminuye la cantidad de proteínas nativas secretadas en el medio lo que simplifica la recuperación de Vs30.

-El método de purificación por ultrafiltración proporciona una manera eficiente de obtener Vs30 soluble con 98 % de pureza.

-En los cultivos en matraz y en bioreactor se obtiene una cantidad equiparable de Vs30 (21.07 ± 0.9 mg/L). Sin embargo, la cantidad de Vs30 decrece después de las 48 h de cultivo en matraz mientras que en bioreactor se alcanza una concentración de 27.66 ± 1.5 mg/L a las 72 h.

-Es posible seleccionar cepas de *Pichia pastoris* hiperresistentes a G418 mediante el método directo CASA desarrollando en este trabajo de tesis.

-*Pichia pastoris* expresa eficientemente el gen *vi-ii-14.1* en las construcciones moleculares usando tanto promotores inducibles y constitutivos. En ambos casos se produce una cantidad similar de la proteína Vi-II-14.1. Sin embargo, la expresión constitutiva presenta ventajas operacionales por lo que se recomienda usar esta construcción para su escalamiento.

-*Pichia pastoris* produce una versión glicosilada de Vi-II-14.1 de 20 kDa.

-La construcción de la expresión inducible de OSIRIS es funcional.

Referencias

- [1] Z. K. Otkrock, R. A. R. Mahfouz, J. A. Makarem, and A. I. Shamseddine, "Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms," *Blood Cells, Mol. Dis.*, vol. 39, no. 2, pp. 212–220, 2007.
- [2] A. S. Chung and N. Ferrara, "Developmental and Pathological Angiogenesis," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 27, no. 1, pp. 563–584, 2011.
- [3] M. Potente, H. Gerhardt, and P. Carmeliet, "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis," *Cell*, vol. 146, no. 6, pp. 873–887, 2011.
- [4] E. D. Adamson, "Review Article - Growth Factors and Their Receptors in Development," *Dev. Genet.*, vol. 14, pp. 159–164, 1993.
- [5] M. Shibuya, "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies," *Genes and Cancer*, vol. 2, no. 12, pp. 1097–1105, 2011.
- [6] N. Ferrara, "Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress," *Endocr. Rev.*, vol. 25, no. 4, pp. 581–611, 2004.
- [7] A. N. N. Hoeben *et al.*, "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.," *Pharmacol. Rev.*, vol. 56, no. 4, pp. 549–580, 2004.
- [8] P. N. Matkar, R. Ariyagunarahaj, H. Leong-Poi, and K. K. Singh, "Friends turned foes: Angiogenic growth factors beyond angiogenesis," *Biomolecules*, vol. 7, no. 4, pp. 1–46, 2017.
- [9] G. Ahrendt, D. E. Chickering, and J. P. Ranieri, "Angiogenic Growth Factors: A Review for Tissue Engineering," *Tissue Eng.*, vol. 4, no. 2, pp. 117–130, 1998.
- [10] J. C. Pelton, C. E. Wright, M. Leitges, and V. L. Bautch, "Multiple endothelial cells constitute the tip of developing blood vessels and polarize to promote lumen formation," *Development*, vol. 141, no. 21, pp. 4121–4126, 2014.
- [11] J. E. Rundhaug, "Matrix metalloproteinases and angiogenesis Angiogenesis Review Series," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 9, no. 2, pp. 267–285, 2005.
- [12] C. Schrimpf, O. E. Teebken, M. Wilhelmi, and J. S. Duffield, "The role of pericyte detachment in vascular rarefaction," *J. Vasc. Res.*, vol. 51, no. 4, pp. 247–258, 2014.
- [13] R. Pakala, T. Watanabe, and C. R. Benedict, "Induction of endothelial cell proliferation by angiogenic factors released by activated monocytes," *Cardiovasc. Radiat. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 95–101, 2002.
- [14] W. G. Stetler-Stevenson, "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: A moving target for therapeutic intervention," *J. Clin. Invest.*, vol. 103, no. 9, pp. 1237–1241, 1999.
- [15] Q. X. Sang, "Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis.," *Cell Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 171–7, 1998.
- [16] L. Lamalice, F. Le Boeuf, and J. Huot, "Endothelial cell migration during angiogenesis," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 6, pp. 782–794, 2007.
- [17] C. J. Avraamides, C. J. Avraamides, B. Garmy-Susini, B. Garmy-Susini, J. A. Varner, and J. A. Varner, "Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 8, no. 8, pp. 604–17, 2008.

- [18] C. Betz, A. Lenard, H.-G. Belting, and M. Affolter, "Cell behaviors and dynamics during angiogenesis," *Development*, vol. 143, no. 13, pp. 2249–2260, 2016.
- [19] K. Xu and O. Cleaver, "Tubulogenesis during blood vessel formation," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, no. 9, pp. 993–1004, 2011.
- [20] K. Alitalo, T. Tammela, and T. V. Petrova, "Lymphangiogenesis in development and human disease," *Nature*, vol. 438, no. 7070, pp. 946–953, 2005.
- [21] T. Tammela and K. Alitalo, "Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise," *Cell*, vol. 140, no. 4, pp. 460–476, 2010.
- [22] M. Zygmunt, F. Herr, K. Münstedt, U. Lang, and O. D. Liang, "Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy," *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, vol. 110, no. SUPPL., pp. 10–18, 2003.
- [23] H. Nagai and M. Aoki, "Inhibition of growth plate angiogenesis and endochondral ossification with diminished expression of MMP-13 in hypertrophic chondrocytes in FGF-2-treated rats," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 20, no. 3, pp. 142–147, 2002.
- [24] R. Demir, A. Yaba, and B. Huppertz, "Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation," *Acta Histochem.*, vol. 112, no. 3, pp. 203–214, 2010.
- [25] J. W. Maas, P. G. Groothuis, G. A. Dunselman, A. F. de Goeij, H. A. Struyker Boudier, and J. L. Evers, "Endometrial angiogenesis throughout the human menstrual cycle.," *Hum. Reprod.*, vol. 16, no. 8, pp. 1557–1561, 2001.
- [26] P. Kumar, S. Kumar, E. P. Udupa, U. Kumar, P. Rao, and T. Honnegowda, "Role of angiogenesis and angiogenic factors in acute and chronic wound healing," *Plast. Aesthetic Res.*, vol. 2, no. 5, p. 243, 2015.
- [27] T. N. Demidova-Rice, J. T. Durham, and I. M. Herman, "Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing," *Adv. Wound Care*, vol. 1, no. 1, pp. 17–22, 2012.
- [28] M. G. Tonnesen, X. Feng, and R. A. F. Clark, "Angiogenesis in wound healing," *J. Investig. Dermatology Symp. Proc.*, vol. 5, no. 1, pp. 40–46, 2000.
- [29] D. W. Losordo and S. Dimmeler, "Review : Clinical Cardiology : New Frontiers Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for," *Online*, vol. 109, no. 21, pp. 2487–2491, 2004.
- [30] J. Anthony Ware and M. Simons, "Angiogenesis in ischemic heart disease," *Nat. Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 158–164, 1997.
- [31] H. A. Elshabrawy, Z. Chen, M. V. Volin, S. Ravella, S. Virupannavar, and S. Shahrara, "The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis," *Angiogenesis*, vol. 18, no. 4, pp. 433–448, 2015.
- [32] P. E. Brenchley, "Antagonising angiogenesis in rheumatoid arthritis.," *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 60 Suppl 3, pp. iii71-4, 2001.
- [33] A. Abdollahi and J. Folkman, "Evading tumor evasion: Current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy," *Drug Resist. Updat.*, vol. 13, no. 1–2, pp. 16–28, 2010.
- [34] V. Baeriswyl and G. Christofori, "Seminars in Cancer Biology The angiogenic switch in carcinogenesis," vol. 19, pp. 329–337, 2009.
- [35] M. J. Duffy, "The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis," *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 10, no. 3, pp. 145–155, 1992.
- [36] B. R. Zetter, "The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research.," *Nat. Rev.*

- Cancer*, vol. 8, no. 8, pp. 647–54, 2008.
- [37] M. De Palma, D. Biziato, and T. V. Petrova, “Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 17, no. 8, pp. 457–474, 2017.
- [38] Z. Wang *et al.*, “Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 35, pp. S224–S243, 2015.
- [39] S. D. L. Colville-Nash PR, “Angiogenesis and rheumatoid arthritis: Pathologic and therapeutic implications,” *Ann Rheum Dis.*, vol. 51, no. 7, pp. 919–925, 1992.
- [40] M. Rajappa, P. Saxena, and J. Kaur, *Ocular Angiogenesis: Mechanisms and Recent Advances in Therapy*, 1st ed., vol. 50, no. 10. Elsevier Inc., 2010.
- [41] W. Ye, “The Complexity of Translating Anti-angiogenesis Therapy from Basic Science to the Clinic,” *Dev. Cell*, vol. 37, no. 2, pp. 114–125, 2016.
- [42] W.-H. Yang, J. Xu, J.-B. Mu, and J. Xie, “Revision of the concept of anti-angiogenesis and its applications in tumor treatment,” *Chronic Dis. Transl. Med.*, vol. 3, no. 1, pp. 33–40, 2017.
- [43] D. H. Kong, M. R. Kim, J. H. Jang, H. J. Na, and S. Lee, “A review of anti-angiogenic targets for monoclonal antibody cancer therapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 8, pp. 1–25, 2017.
- [44] P. G. Johnston, “Oncologist,” *Oncol.*, pp. 549–557, 2007.
- [45] G. Bergers and D. Hanahan, “Modes of resistance to anti-angiogenic therapy,” vol. 8, no. 11, 2008.
- [46] L. Ma *et al.*, “Complete eradication of hepatocellular carcinomas by combined vasostatin gene therapy and B7H3-mediated immunotherapy,” *J. Hepatol.*, vol. 46, no. 1, pp. 98–106, 2007.
- [47] S. A. Mousa, T. Sudha, and P. J. Davis, *Anti-Angiogenesis Therapy and its Combination with Chemotherapy: Impact on Primary Tumor and its Metastasis*. Elsevier Inc., 2017.
- [48] Y. Cao, “Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 33, no. 4, pp. 357–369, 2001.
- [49] D. Ribatti, “Endogenous inhibitors of angiogenesis. A historical review,” *Leuk. Res.*, vol. 33, no. 5, pp. 638–644, 2009.
- [50] N. Rao, Y. F. Lee, and R. Ge, “Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 36, no. 10, pp. 1177–1190, 2015.
- [51] A. Blois, B. Srebro, M. Mandalà, A. Corti, K. B. Helle, and G. Serck-Hanssen, “The chromogranin A peptide vasostatin-I inhibits gap formation and signal transduction mediated by inflammatory agents in cultured bovine pulmonary and coronary arterial endothelial cells,” *Regul. Pept.*, vol. 135, no. 1–2, pp. 78–84, 2006.
- [52] M. Michalak, E. F. Corbett, N. Mesaali, K. Nakamura, and M. Opas, “Calreticulin: one protein, one gene, many functions.,” *Biochem. J.*, vol. 344 Pt 2, pp. 281–92, 1999.
- [53] S. E. Pike *et al.*, “Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth.,” *J. Exp. Med.*, vol. 188, no. 12, pp. 2349–56, 1998.
- [54] S. E. Pike *et al.*, “Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth.,” *Blood*, vol. 94, no. 7, pp. 2461–2468, 1999.
- [55] L. Yao, S. E. Pike, and G. Tosato, “Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function.,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 71, no. 1, pp. 47–53, 2002.

- [56] Q. Shu, W. Li, H. Li, and G. Sun, "Vasostatin inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation, tube formation and induces cell apoptosis under oxygen deprivation," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 4, pp. 6019–6030, 2014.
- [57] B. Lange-Asschenfeldt *et al.*, "The angiogenesis inhibitor vasostatin does not impair wound healing at tumor-inhibiting doses," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 117, no. 5, pp. 1036–1041, 2001.
- [58] R. Huegel *et al.*, "Novel anti-inflammatory properties of the angiogenesis inhibitor vasostatin.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, no. 1, pp. 65–74, 2007.
- [59] G. Vazquez Rodriguez, C. Gonzalez, and A. De Leon Rodriguez, "Novel fusion protein derived from vasostatin 30 and vasoinhibin II-14.1 potently inhibits coronary endothelial cell proliferation," *Mol. Biotechnol.*, vol. 54, no. 3, pp. 920–929, 2013.
- [60] Q. M. Sun *et al.*, "Expression, purification of human vasostatin120-180 in *Escherichia coli*, and its anti-angiogenic characterization," *Protein Expr. Purif.*, vol. 39, no. 2, pp. 288–295, 2005.
- [61] X. Li *et al.*, "Inhibition of angiogenesis by a novel small peptide consisting of the active fragments of platelet factor-4 and vasostatin," *Cancer Lett.*, vol. 256, no. 1, pp. 29–32, 2007.
- [62] Q. Sun *et al.*, "A hybrid protein comprising ATF domain of pro-UK and VAS, an angiogenesis inhibitor, is a potent candidate for targeted cancer therapy," *Int. J. Cancer*, vol. 123, no. 4, pp. 942–950, 2008.
- [63] Q. Gu, C. Sun, J. Luo, T. Zhang, and L. Wang, "Inhibition of angiogenesis by a synthetic fusion protein VTF derived from vasostatin and tumstatin," *Anticancer. Drugs*, vol. 25, no. 9, pp. 1044–1051, 2014.
- [64] S. Calderon-Salais, P. Velazquez-Bernardino, V. E. Balderas-Hernandez, A. P. Barba de la Rosa, and A. De Leon-Rodriguez, "Constitutive expression of the active fragment of human vasostatin Vs30 in *Pichia pastoris* SMD1168H," *Protein Expr. Purif.*, vol. 144, no. September 2017, pp. 40–45, 2018.
- [65] C. Clapp, J. Aranda, C. González, M. C. Jeziorski, and G. M. de la Escalera, "Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 17, no. 8, pp. 301–307, 2006.
- [66] J. Triebel *et al.*, "Principles of the Prolactin/Vasoinhibin Axis," *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.*, p. ajpregu.00256.2015, 2015.
- [67] C. Clapp, L. Martínez de la Escalera, and G. Martínez de la Escalera, "Prolactin and blood vessels: A comparative endocrinology perspective," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 176, no. 3, pp. 336–340, 2012.
- [68] C. Clapp *et al.*, "Vasoinhibins: A family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function," *Front. Horm. Res.*, vol. 35, pp. 64–73, 2006.
- [69] N. Ferrara, C. Clapp, and R. Weiner, "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells," *Endocrinology*, vol. 129, no. 2, pp. 896–900, 1991.
- [70] C. Clapp, J. Martial, R. Guzman, R.-D. F, and R. Weiner, "The 16-Kilodalton N-Terminal Fragment of Human Prolactin Is a Potent Inhibitor of Angiogenesis," *Endocrinology*, vol. 133, no. 3, pp. 1292–1299, 1993.
- [71] I. Struman *et al.*, "Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 4, pp. 1246–51, 1999.

- [72] S. P. Tabruyn, N.-Q.-N. Nguyen, A. M. Cornet, J. A. Martial, and I. Struman, "The Antiangiogenic Factor, 16-kDa Human Prolactin, Induces Endothelial Cell Cycle Arrest by Acting at Both the G₀ – G₁ and the G₂ –M Phases," *Mol. Endocrinol.*, vol. 19, no. 7, pp. 1932–1942, 2005.
- [73] S. P. Tabruyn *et al.*, "The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 17, no. 9, pp. 1815–23, 2003.
- [74] G. D'Angelo, I. Struman, J. Martial, and R. I. Weiner, "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. July, pp. 6374–6378, 1995.
- [75] G. D'Angelo, J. F. Martini, T. Iiri, W. J. Fantl, J. Martial, and R. I. Weiner, "16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells.," *Mol. Endocrinol.*, vol. 13, no. 5, pp. 692–704, 1999.
- [76] K. Bajou *et al.*, "PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin," *Nat Med*, vol. 20, no. 7, pp. 741–747, 2014.
- [77] C. Clapp *et al.*, "The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 91, no. 22, pp. 10384–8, 1994.
- [78] Y. Macotela, "Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin," *J. Cell Sci.*, vol. 119, no. 9, pp. 1790–1800, 2006.
- [79] M. Galfione *et al.*, "Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells," *Protein Expr. Purif.*, vol. 28, no. 2, pp. 252–258, 2003.
- [80] S. Berger, P. Lowe, and M. Tesar, "Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges: Editor Stefan R Schmidt," *MAbs*, vol. 7, no. 3, pp. 456–460, 2015.
- [81] D. M. Czajkowsky, J. Hu, Z. Shao, and R. J. Pleass, "Fc-fusion proteins: New developments and future perspectives," *EMBO Mol. Med.*, vol. 4, no. 10, pp. 1015–1028, 2012.
- [82] X. Chen, J. L. Zaro, and W. C. Shen, "Fusion protein linkers: Property, design and functionality," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 10, pp. 1357–1369, 2013.
- [83] J. O. Nam, M. Y. Jung, N. Thapa, B. H. Lee, R. W. Park, and I. S. Kim, "T-CAM, a fastatin-FIII 9-10 fusion protein, potently enhances anti-angiogenic and anti-tumor activity via $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins," *Exp. Mol. Med.*, vol. 40, no. 2, pp. 196–207, 2008.
- [84] W. K. Kang *et al.*, "A biologically active angiogenesis inhibitor, human serum albumin-TIMP-2 fusion protein, secreted from *Saccharomyces cerevisiae*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 53, no. 2, pp. 331–338, 2007.
- [85] F. J. Tseng *et al.*, "A fusion protein with the receptor binding domain of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) is an antagonist of angiogenesis in cancer treatment: Simultaneous blocking of VEGF receptor-1 and 2," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 10, no. 9, pp. 865–873, 2010.
- [86] A. Venkatachalam, "Effect of mutant Endostatin and Kringle 5 fusion protein on Tumor angiogenesis," 2016.
- [87] R. Y. Zhu *et al.*, "Expression and purification of recombinant human serum albumin fusion protein with VEGF165b in *Pichia pastoris*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 85, no. 1, pp. 32–37, 2012.
- [88] Z. Yang and Z. Zhang, "Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 1, pp. 182–195, 2018.

- [89] D. Weinacker, C. Rabert, A. B. Zepeda, C. A. Figueroa, A. Pessoa, and J. G. Farías, “Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry,” *Brazilian J. Microbiol.*, vol. 44, no. 4, pp. 1043–1048, 2013.
- [90] I. Mattsby-Baltzer, A. Jakobsson, J. Sörbo, and K. Norrby, “Endotoxin is angiogenic.,” *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 75, no. 3, pp. 191–196, Jun. 1994.
- [91] R. B. Trimble *et al.*, “Characterization of N- and O-linked glycosylation of recombinant human bile salt-stimulated lipase secreted by *Pichia pastoris*,” *Glycobiology*, vol. 14, no. 3, pp. 265–274, 2004.
- [92] R. K. Bretthauer, “Genetic engineering of *Pichia pastoris* to humanize N-glycosylation of proteins,” *Trends Biotechnol.*, vol. 21, no. 11, pp. 459–462, 2003.
- [93] H. Yin *et al.*, “Intracellular expression and purification of the Canstatin-N protein in *Pichia pastoris*,” *Gene*, vol. 504, no. 1, pp. 122–126, Aug. 2012.
- [94] R. Aw *et al.*, “Can too many copies spoil the broth?,” *Microb. Cell Factories 2013 121*, vol. 12, no. 1, pp. 11–23, 2012.
- [95] Q.-L. Gu, T.-Y. Zhang, J.-X. Luo, J.-J. Gan, and F. Xiao, “[Expression of human tumstatin in *Pichia pastoris* and its bioactivity].,” *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, vol. 22, no. 3, pp. 451–456, May 2006.
- [96] D. X. Su *et al.*, “Inducible expression of calreticulin-N58 in *Pichia pastoris* by high density cell culture.,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 38, no. 8, pp. 5003–5008, Nov. 2011.
- [97] Y. Lin, X. Yang, M. Lu, H. Zhuang, and Z. C. Hua, “Expression, purification and biological characterization of human vasostatin120-180 in *Pichia pastoris*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 92, no. 2, pp. 141–147, 2013.
- [98] S. B. Lee, H. K. Oh, H. K. Kim, and Y. A. Joe, “Expression of the non-glycosylated kringle domain of tissue type plasminogen activator in *Pichia* and its anti-endothelial cell activity,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 50, no. 1, pp. 1–8, 2006.
- [99] T. Boehm, S. Pirie-Shepherd, L. B. Trinh, J. Shiloach, and J. Folkman, “Disruption of the KEX1 gene in *Pichia pastoris* allows expression of full-length murine and human endostatin,” *Yeast*, vol. 15, no. 7, pp. 563–572, 1999.
- [100] M. Dhanabal, R. Volk, R. Ramchandran, M. Simons, and V. P. Sukhatme, “Cloning, expression, and in vitro activity of human endostatin.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 258, no. 2, pp. 345–52, 1999.
- [101] P. Yu, J. Yang, and H. Gu, “Expression of Hpal in *Pichia pastoris* and optimization of conditions for the heparinase i production,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 106, no. 1, pp. 223–229, 2014.
- [102] R. J. M. G. E. Brandwijk, I. Nesmelova, R. P. M. Dings, K. H. Mayo, V. L. J. L. Thijssen, and A. W. Griffioen, “Cloning an artificial gene encoding angiostatic anginex: From designed peptide to functional recombinant protein,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 333, no. 4, pp. 1261–1268, 2005.
- [103] F. Sánchez-Sánchez *et al.*, “Expression and purification of functional recombinant human pigment epithelium-derived factor (PEDF) secreted by the yeast *Pichia pastoris*,” *J. Biotechnol.*, vol. 134, no. 1–2, pp. 193–201, 2008.
- [104] C. A. Fernández and M. A. Moses, “Modulation of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-4,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 345, no. 1, pp. 523–529, 2006.
- [105] D. Mattanovich *et al.*, “Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the

- protein production host *Pichia pastoris*,” *Microb. Cell Fact.*, vol. 8, pp. 1–13, 2009.
- [106] D. J. Birnboim HC, “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 8, no. 19, pp. 4321–4326, 1980.
- [107] J. Haaning, C. Oxvig, M. T. Overgaard, and L. Sottrup-Jensen, “Simple and reliable procedure for PCR amplification of genomic DNA from yeast cells using short sequencing primers,” *Biochem. Mol. Biol. Int.*, vol. 42, no. 1, pp. 169–172, 1997.
- [108] D. Tautz and M. Renz, “An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels,” *Anal. Biochem.*, vol. 132, no. 1, pp. 14–19, 1983.
- [109] R. Green and E. J. Rogers, *Transformation of chemically competent E. coli*, 1st ed., vol. 529. Elsevier Inc., 2013.
- [110] A. Froger and J. E. Hall, “Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method,” *J. Vis. Exp.*, no. 6, p. 2007, 2007.
- [111] E. I. Chen, S. J. Kridel, E. W. Howard, W. Li, A. Godzik, and J. W. Smith, “A unique substrate recognition profile for matrix metalloproteinase-2,” *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 6, pp. 4485–4491, 2002.
- [112] D. Teng *et al.*, “Multiple copies of the target gene enhances plectasin secretion in *Pichia pastoris* X-33,” *Process Biochem.*, vol. 50, no. 4, pp. 553–560, Apr. 2015.
- [113] D. A. Hoozemans, R. Schats, C. B. Lambalk, R. Homburg, and P. G. A. Hompes, “Human embryo implantation: Current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology,” *Reprod. Biomed. Online*, vol. 9, no. 6, pp. 692–715, 2004.
- [114] M. Holmquist, D. C. Tessier, and M. Cygler, “High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 11, no. 1, pp. 35–40, 1997.
- [115] M. Maggi and A. L. Catapano, “A dot-blot assay for the low density lipoprotein receptor,” vol. 28, pp. 108–112, 1987.
- [116] H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, “Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354, 1979.
- [117] E. Anane, E. van Rensburg, and J. F. Görgens, “Comparison of constitutive and inducible β -fructofuranosidase production by recombinant *Pichia pastoris* in fed-batch culture using defined and semi-defined media,” *South African J. Chem. Eng.*, vol. 22, pp. 17–22, 2016.
- [118] J. D. Oliner, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, “In vivo cloning of PCR products in *E. coli*,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 22, pp. 5192–5197, 1993.
- [119] A. L. Zhang *et al.*, “Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*,” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 36, no. 6, pp. 1611–1619, 2009.
- [120] T.-C. Kuo, J.-F. Shaw, and G.-C. Lee, “Improvement in the secretory expression of recombinant *Candida rugosa* lipase in *Pichia pastoris*,” *Process Biochem.*, vol. 50, no. 12, pp. 2137–2143, Dec. 2015.
- [121] T. Zhu, H. Sun, P. Li, Y. Xue, Y. Li, and Y. Ma, “Constitutive expression of alkaline β -mannanase in recombinant *Pichia pastoris*,” *Process Biochem.*, vol. 49, no. 12, pp. 2025–2029, Dec. 2014.
- [122] H. Hohenblum, B. Gasser, M. Maurer, N. Borth, and D. Mattanovich, “Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 85, no. 4, pp. 367–375, Feb. 2004.

- [123] P. Çalık *et al.*, "Influence of pH on recombinant human growth hormone production by *Pichia pastoris*," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 85, no. 12, pp. 1628–1635, 2010.
- [124] A. S. Pérez-Martínez, A. De León-Rodríguez, L. J. Harris, A. Herrera-Estrella, and A. P. Barba de la Rosa, "Overexpression, purification and characterization of the *Trichoderma atroviride* endochitinase, Ech42, in *Pichia pastoris*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 55, no. 1, pp. 183–188, 2007.
- [125] C. A. Scorer, J. J. Clare, W. R. McCombie, M. A. Romanos, and K. Sreekrishna, "Rapid selection using g418 of high copy number transformants of *pichia pastoris* for high-level foreign gene expression," *Bio/Technology*, vol. 12, no. 2, pp. 181–184, 1994.
- [126] P. K. Joan Lin-Cereghino, Matthew D. Hashimoto, Allison Moy, James Castelo, Claire C. Orazem and A. C. and G. P. L.-C. See Xiong, Vishal Gandhi, Christopher T. Hatae, "Direct selection of *Pichia pastoris* expression strains using new G418 resistance vectors," *Yeast*, vol. 25, no. 4, pp. 293–299, 2008.
- [127] J. J. Clare *et al.*, "Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies," *Gene*, vol. 105, no. 2, pp. 205–212, 1991.
- [128] P. Z. Li *et al.*, "Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 142, no. 2, pp. 105–124, 2007.
- [129] V. Looser *et al.*, "Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 1177–1193, 2014.
- [130] L. Näätäsaari, B. Mistlberger, C. Ruth, T. Hajek, F. S. Hartner, and A. Glieder, "Deletion of the *pichia pastoris* ku70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology," *PLoS One*, vol. 7, no. 6, 2012.
- [131] J. P. Schwarzhans, D. Wibberg, A. Winkler, T. Luttermann, J. Kalinowski, and K. Friehs, "Non-canonical integration events in *Pichia pastoris* encountered during standard transformation analysed with genome sequencing," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. November, pp. 1–12, 2016.
- [132] R. Montesino, R. García, O. Quintero, and J. A. Cremata, "Variation in N-linked oligosaccharide structures on heterologous proteins secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 14, no. 2, pp. 197–207, 1998.
- [133] Y. N. Sinha, "Prolactin variants," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 3, no. 3, pp. 100–106, 1992.
- [134] T. Hoffmann, C. Penel, and C. Ronin, "Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance," no. 4, pp. 807–816, 1993.
- [135] V. K. Dagar and Y. P. Khasa, "Combined effect of gene dosage and process optimization strategies on high-level production of recombinant human interleukin-3 (hIL-3) in *Pichia pastoris* fed-batch culture," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 108, pp. 999–1009, 2018.
- [136] K. Nordén, M. Agemark, J. J. T. Danielson, E. Alexandersson, P. Kjellbom, and U. Johanson, "Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*," *BMC Biotechnol.*, vol. 11, 2011.
- [137] Y. a DeClerck *et al.*, "Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section.," *Am. J. Pathol.*, vol. 164, no. 4, pp. 1131–1139, 2004.
- [138] C. M. Overall and C. López-Otín, "Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 9, pp. 657–672, 2002.
- [139] S. Rakash, "Role of proteases in cancer: A review," *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 7, no. 4, pp. 90–101, 2012.

- [140] D. S. Waugh, "An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags," vol. 80, no. 2, pp. 283–293, 2012.
- [141] C. A. Scorer, R. G. Buckholz, J. J. Clare, and M. A. Romanos, "The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," *Gene*, vol. 136, no. 1–2, pp. 111–119, 1993.

Anexo

Artículo publicado

S. Calderon-Salais, P. Velazquez-Bernardino, V. E. Balderas-Hernandez, A. P. Barba de la Rosa, and A. De Leon-Rodriguez. 2018. “**Constitutive expression of the active fragment of human vasostatin Vs30 in Pichia pastoris SMD1168H.**” *Protein Expr. Purif.*, vol. 144: 40–45, 2018. doi: 10.1016/j.pep.2017.12.002.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.12.002>