



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN
DE LA VASOINHIBINA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN PABLO ROBLES ALVAREZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CARMEN CLAPP JIMÉNEZ-L.
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR:
DRA. ROCÍO BRENDA ANGUIANO SERRANO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

JURIQUILLA, QUERÉTARO, QUERÉTARO. ENERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L

Índice

Índice	iii
Resumen	vi
Abstract.....	vii
Agradecimientos.....	viii
Tabla de Abreviaturas.....	ix
1. Introducción	1
2. Antecedentes inmediatos.....	7
2.1. Angiogénesis.....	7
2.2. Vasoinhibina	7
2.3. Efectos biológicos y mecanismos de acción de la vasoinhibina.....	9
2.4. Generación de la vasoinhibina.....	11
2.5. Preguntas sin resolver	13
3. Justificación.....	15
4. Pregunta de Investigación	17
5. Hipótesis.....	17
6. Objetivos	17
6.1. Objetivo General.....	17
6.2. Objetivos Específicos	17
7. Métodos.....	18
7.1. Simulación de Dinámica Molecular	18
7.2. Análisis de Dinámica Molecular.....	19
7.3. Construcción de plásmidos codificantes para isoformas de vasoinhibina recombinante.....	21

7.4.	Procedimientos de cultivo celular	22
7.5.	Producción estable de vasoinhibina recombinante por HEK 293T/17 transducidas con lentivirus codificante para vasoinhibina.....	23
7.6.	SDS-PAGE tricina y Western blot.....	24
7.7.	Proliferación celular.....	24
7.8.	Proliferación de células endoteliales transducidas con lentivirus codificantes para distintas isoformas de vasoinhibina.	26
7.9.	Migración celular	26
7.10.	PCR cuantitativo (tiempo real)	27
7.11.	Análisis estadístico	28
8.	Resultados	29
8.1.	Estructura terciaria de la vasoinhibina.....	29
8.2.	Estructura secundaria de la vasoinhibina.....	38
8.3.	Superficie Accesible al Solvente de la vasoinhibina	43
8.4.	Potencial electrostático de la superficie de la vasoinhibina.....	45
8.5.	Potencial hidrofóbico de la superficie de la vasoinhibina	48
8.6.	Dinámica molecular de distintas isoformas de vasoinhibina.....	50
8.7.	Una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos es antiangiogénica.....	56
8.8.	Dinámica molecular de una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos.	65
9.	Discusión.....	70
10.	Referencias	77
11.	Índice de Figuras	90
12.	Anexos.....	93
12.1.	Análisis de Acoplamiento Bibliográfico	94
12.2.	Descubrimiento de la vasoinhibina	96
12.3.	Proteasas generadoras de vasoinhibina	104

12.3.1.	Isoformas de vasoinhibina recombinantes	105
12.4.	Mecanismos de acción de la vasoinhibina	107
12.4.1.	Proteínas de unión/Receptores de la vasoinhibina	109
12.5.	Efectos de la vasoinhibina.....	111
12.6.	Implicaciones de la vasoinhibina en la fisiología y la patología	113
12.7.	La vasoinhibina como agente terapéutico.	115
12.8.	Artículo de investigación derivado de esta tesis.....	117
12.9.	Material Suplementario de artículo de investigación.	136

Resumen

La vasoinhibina es un inhibidor de la angiogénesis con gran potencial terapéutico en enfermedades como el cáncer, la retinopatía diabética, la artritis reumatoide, la cardiomiopatía del postparto y la preeclampsia. La vasoinhibina se genera mediante el corte proteolítico de la hormona prolactina (PRL) que resulta en la pérdida de su α -hélice 4 (H4). El hecho de que la PRL no posee propiedades antiangiogénicas, indica que el procesamiento proteolítico induce cambios conformacionales que conllevan a una nueva estructura funcional. No obstante, se desconoce la estructura tridimensional y la ubicación del dominio bioactivo de la vasoinhibina. Encontramos que la simulación por dinámica molecular (DM) mostró que la pérdida de la H4 de la PRL expone el núcleo hidrofóbico y deriva en la compresión hacia una estructura en racimo de 3 α -hélices que le permite ocultar el núcleo hidrofóbico y adquirir una conformación estable. La compresión ocurre gracias al movimiento del asa 1 o “loop”1 (L1) y su interacción con la α -hélice 1 (H1). Esto confiere a estas regiones (H1 y L1) propiedades de superficie, electrostáticas e hidrofóbicas, distintas a las de la molécula íntegra de la PRL, que pudieran corresponder al dominio funcional de la vasoinhibina. Este modelo predice un dominio funcional antiangiogénico comprendido en los primeros 79 aminoácidos de la PRL, correspondientes a las regiones H1 y L1. La generación de una isoforma de vasoinhibina recombinante con esta secuencia primaria, mostró experimentalmente actividad antiangiogénica, i.e., inhibió la proliferación y migración, e indujo la expresión de genes blanco de la vasoinhibina en células endoteliales en cultivo. La bioactividad de esta vasoinhibina recombinante fue similar a la de la isoforma de vasoinhibina mejor caracterizada conformada por 123 aminoácidos que comprenden las regiones H1, L1, H2, L2 y H3 de la PRL. Estos hallazgos amplían la familia de la vasoinhibina a fragmentos mucho más pequeños y proveen información estructural potencialmente relevante para el desarrollo de fármacos con actividad agonista y antagonista de la vasoinhibina, así como para el desarrollo de un muy necesario ensayo cuantitativo para evaluar los niveles séricos de la vasoinhibina en la clínica.

Abstract

Vasoinhibin is an angiogenesis inhibitor generated when the fourth α -helix (H4) of the hormone prolactin (PRL) is removed by specific proteolytic cleavage. The antiangiogenic properties are absent in uncleaved PRL, indicating that conformational changes create a new bioactive domain. However, the solution structure of vasoinhibin and the location of its bioactive domain are unknown. Molecular dynamic simulation (MD) showed that the loss of H4 exposes the hydrophobic nucleus of PRL and leads to the compression of the molecule into a three-helix bundle that buries the hydrophobic nucleus again. Compression occurs by the movement of loop 1 (L1) and its interaction with α -helix 1 (H1) generating a new L1 conformation with electrostatic and hydrophobic surfaces distinct from those of PRL, that may correspond to a bioactive domain. Consistent with this model, a recombinant protein containing the first 79 amino acids comprising H1 and L1 of human PRL inhibited the proliferation and migration of endothelial cells and upregulated the vasoinhibin target genes, IL1A and ICAM1. This bioactivity was comparable to that of a conventional vasoinhibin having the 123 residues encompassing H1, L1, H2, L2, and H3 of human PRL. These findings extend the vasoinhibin family to smaller proteins and provide important structural information, which will aid in antiangiogenic drug development.

Agradecimientos

Al excelente apoyo técnico de Luis Alberto Aguilar¹, Alejandro de León Cuevas¹, Adriana González Gallardo², Michael Jeziorski², Anaid Antaramian², Xarubet Ruiz-Herrera y Fernando López Barrera.

A la asistencia de los laboratoristas Antonio Prado Galán y Daniel Mondragón Huerta.

A la asistencia y apoyo cotidiano a lo largo de estos estudios a Leonor Casanova Rico³, Carmen Mendoza López³, Ma. De Lourdes Lara Ayala⁴, Ramón Martínez Olvera⁵, Alberto Lara Rubalcava⁵, Omar Hernández⁵, Anel Martínez Morales⁵, José Martín García Servín⁶, Alejandra Castilla⁶.

Al Dr. Vlad Constantin Manea⁷ y el Dr. Alfredo Varela por el acceso al súper-cómputo.

A Jessica González Norris por la edición del manuscrito para publicación.

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) de la UNAM. (matrícula:513004009)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (394345).

Al CONACYT por el financiamiento otorgado (220574).

A la UNAM por el financiamiento otorgado (UR405-PC).

A mis alumnos María Magdalena Zamora Corona, María Miriam Tovar Hernández, Juan Alfonso Ledezma Estrada, Sebastián Perea Vázquez y Jocelyn Salas Guevara.

-
1. Laboratorio Nacional de Visualización científica Avanzada, UNAM
 2. Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología, UNAM
 3. Unidad de Enseñanza, Instituto de Neurobiología, UNAM
 4. Unidad de Videoconferencia, Instituto de Neurobiología, UNAM
 5. Unidad de Computo, Instituto de Neurobiología, UNAM
 6. Laboratorio Universitario de Bioterio, Instituto de Neurobiología, UNAM
 7. Centro de Geociencias, UNAM

Tabla de Abreviaturas

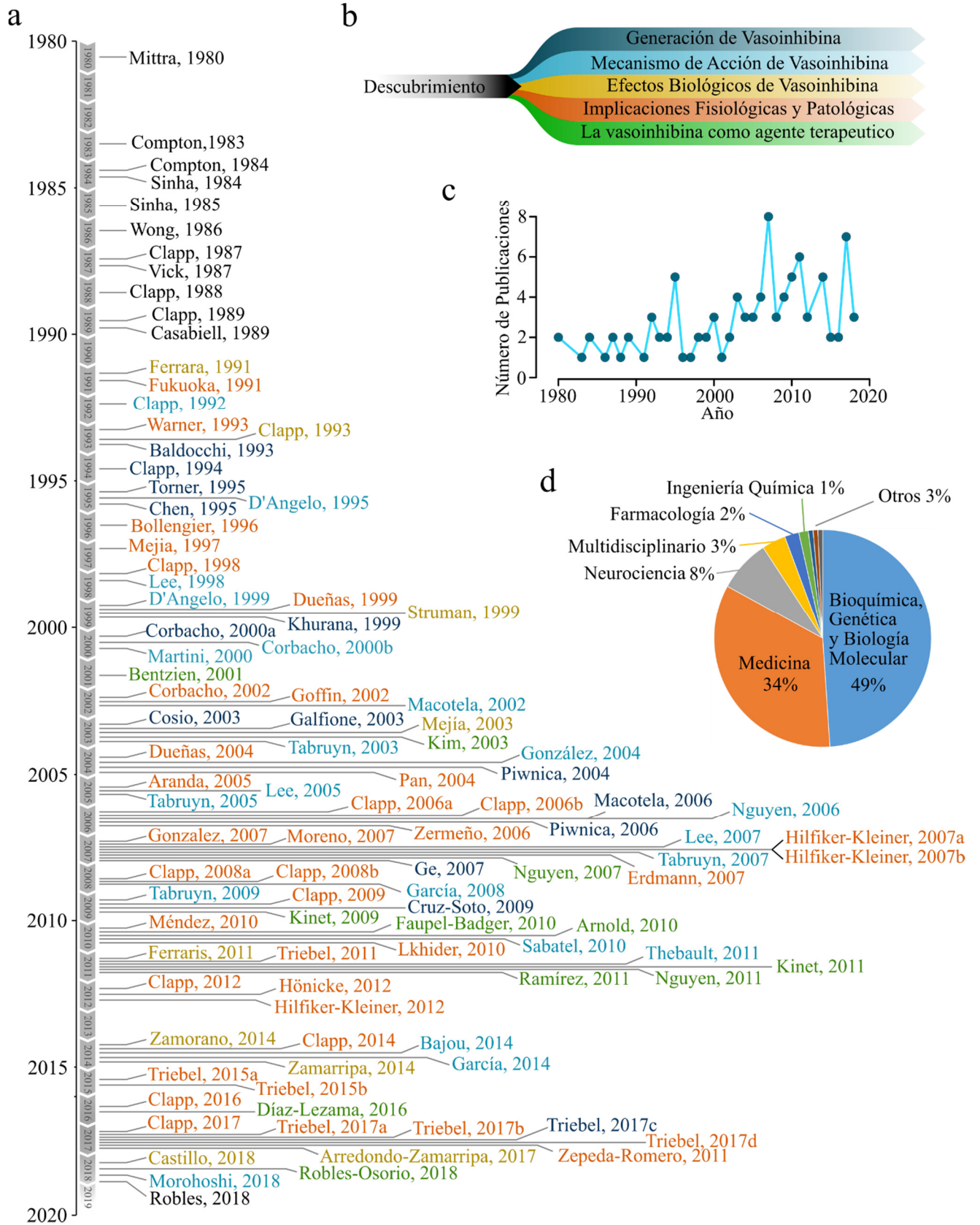
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BUVEC	Células endoteliales de la vena umbilical bovina
CPAE	Células endoteliales de la arteria pulmonar bovina
DM	Simulación por dinámica molecular
DMEM	Medio <i>Eagle</i> modificado por Dulbecco
ΔG_0	Diferencial de energía libre de Gibbs
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
EdU	5-Etínil-2'-desoxiuridina
EV	Vector eigen
FEL	Perfil de energía libre
H1	Hélice 1 de la PRL
H1 _{vi}	Hélice de la vasoinhibina
H4	Hélice 4 de la PRL
HEK293T/17	Subclona 17 de células humanas de riñón embrionario
hPRL	Prolactina humana
ICAM1	Molécula de adhesión intercelular 1
IL1A	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IP3	Inositol trifosfato
L1	Loop 1 de la PRL
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos
MHP	Potencial hidrofóbico molecular
NOS	Sintasa de Óxido Nítrico
P94	Prolina 94
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1
PCA	Análisis de componentes principales
PDB	Banco de datos de proteínas
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PLC γ	Fosfolipasa C gamma
PPIA	Isomerasa A péptido-propil
Pre-Vi	Prevasoinhibina
PRL	Prolactina
PST	Topografía de superficie de proteína
Rg	Radio de giro
RMSD	Desviación estándar de la media cuadrática
RMSF	Fluctuación estándar de la media cuadrática
S90	Serina 90
SASA	Área de superficie accesible al solvente
ΔQ -SASA	Diferencial de coeficiente de SASA
SFB	Suero fetal bovino
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
Vi	Vasoinhibina
Vi123	Vasoinhibina de 123 aminoácidos
Vi79	Vasoinhibina de 79 aminoácidos

1. Introducción

La vasoinhibina forma parte de una familia de proteínas derivadas de la proteólisis de la hormona prolactina (PRL) con acciones inhibitorias sobre la proliferación, permeabilidad y dilatación de los vasos sanguíneos (Clapp et al., 2015). Esta familia se descubrió en 1980, hace cerca de cuatro décadas (Figura 1.1a), cuando se le implicó como mediador de las acciones mitogénicas de la PRL (Mitra, 1980b), sin embargo, pronto fue claro que la vasoinhibina era un agonista débil o nulo del receptor de esta hormona. El descubrimiento de sus efectos vasculares en la década de los 90's dió un impulso importante al campo, que a partir de entonces, se enfocó en identificar a las proteasas responsables de generar a la vasoinhibina, su mecanismo de acción, los efectos y tejidos blanco, sus implicaciones fisiológicas y patológicas y su uso como agente terapéutico (Figura 1.1b). Esta variabilidad temática incrementó el número de publicaciones sobre la vasoinhibina (Figura 1.1c). El número de publicaciones indizadas relacionadas directamente con este tema son aproximadamente 100 hasta la fecha. Según un análisis de las áreas del conocimiento de Scopus, el 49% de estas publicaciones se inscriben en los campos de la bioquímica, la genética y la biología molecular y un 34% de la medicina (Figura 1.1d), entre otros.

La dinámica del impacto de este campo se puede apreciar con un análisis de acoplamiento bibliográfico, que identifica trabajos científicos y los relaciona con las citas que reciben. Los artículos que se publicaron

Figura 1.1. Historia de la Vasoinhibina. (Página siguiente) **a)** Representación temporal de todas las publicaciones de la vasoinhibina desde su descubrimiento en 1980, se muestra el primer autor de cada publicación y el año. El color se refiere a las distintas categorías de la investigación sobre vasoinhibina después de su descubrimiento **(b).** **c)** Número de publicaciones por año de la vasoinhibina. **d)** Análisis de Scopus sobre áreas de conocimiento en las que se enmarcan las publicaciones de vasoinhibina.



en la década de los ochenta fueron pocos y no tuvieron un gran impacto y fue hasta el descubrimiento de las acciones antiangiogénicas de la vasoinhibina en 1993 (Clapp et al., 1993) que el campo se expandió (Figura 2.3). Desde entonces, trabajos como el de Ana Corbacho et al. en el 2002, el de Ingrid Struman et al. en 1999 y el de Hilfiker-Kleiner et al. en el 2007 encabezan la lista de los más citados. Por su parte la revista científica “Endocrinology” concentró la mayoría de estos trabajos. Y cabe mencionar que México ha sido el principal país en desarrollar este tema. Los análisis del acoplamiento bibliográfico entre las revistas científicas y los países donde se publican y desarrollan las investigaciones sobre la vasoinhibina se muestran en el Anexo 12.1.

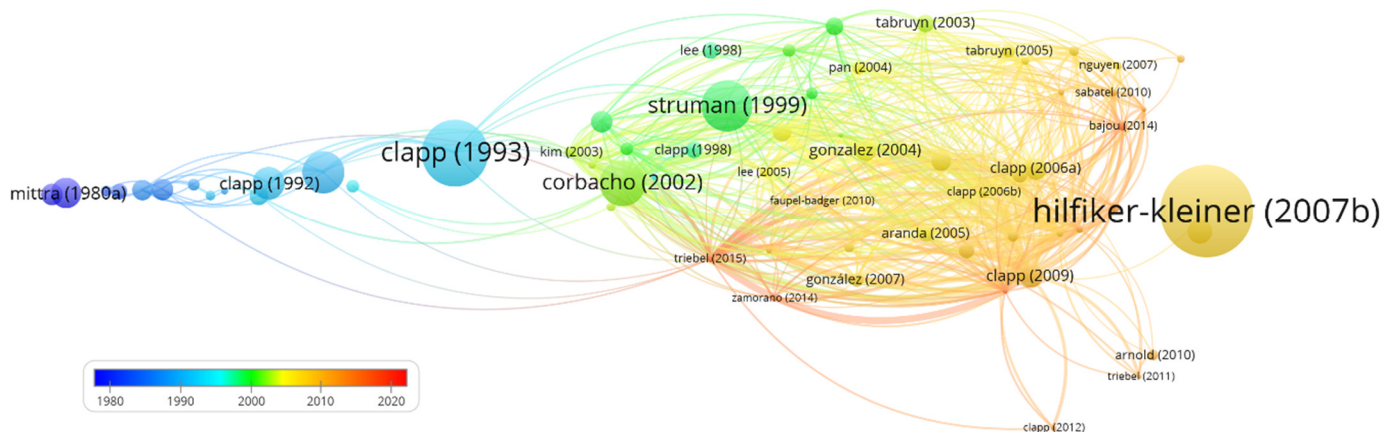


Figura 1.2. Acoplamiento bibliográfico de los artículos de vasoinhibina en base a las citas comunes. Después del artículo de Clapp, 1993 se puede observar un mayor número de nodos y de relaciones. El tamaño del nodo indica el número de citas, las líneas representan las relaciones (citas entre los trabajos), la distancia entre los nodos implica una mayor asociación. El color indica el año en que se publicaron esos trabajos. El mapa fue creado y visualizado con VOSviewer (van Eck y Waltman, 2010). Usando las 100 publicaciones de vasoinhibina se seleccionaron las que tenían 10 o más citas.

A lo largo de esta historia, se han identificado diversas proteasas que procesan a la PRL hacia vasoinhibina y se ha mostrado la presencia endógena de varios de los productos de dicha

proteólisis (Triebel et al., 2015a). Asimismo, se han caracterizado los efectos vasculares de la vasoinhibina y se conocen, si bien parcialmente, sus mecanismos de señalización (Clapp et al., 2015). También, se han identificado acciones no vasculares de las vasoinhibinas que incluyen efectos pro-fibrinolíticos (Bajou et al., 2014), inflamatorios (Macotela et al., 2002; Tabruyn et al., 2007) y neurales (Castillo et al., 2017). Se ha explorado la contribución fisiológica de la vasoinhibina, particularmente en la inhibición de la vascularización de órganos y tejidos, donde la angiogénesis está altamente restringida, como la retina y el cartílago (Clapp et al., 2009; Clapp et al., 2015). También se han evaluado sus implicaciones en la patogenia de enfermedades angiogénico-dependientes como el cáncer (Bentzien et al., 2001; Nguyen et al., 2007), la artritis reumatoide (Clapp et al., 2016), la retinopatía diabética (Triebel et al., 2011), la cardiomiopatía del postparto (Hilfiker-Kleiner et al., 2007a) y la preeclampsia (Gonzalez et al., 2007). Esta información se ha traducido en dos ensayos clínicos donde la vasoinhibina es la molécula blanco a ser modificada. Uno de estos estudios, aún en curso, busca disminuir las alteraciones vasculares de la retina en pacientes con retinopatía diabética y edema macular diabético a través de elevar farmacológicamente los niveles circulantes de PRL y con ello los niveles oculares de vasoinhibina (Robles-Osorio et al., 2018). El otro estudio clínico, ya culminado, mostró que el bloqueo farmacológico de la secreción hipofisiaria de PRL disminuye a la vasoinhibina circulante y protege contra la cardiomiopatía del postparto (Hilfiker-Kleiner et al., 2012).

El término de vasoinhibina surgió tardíamente (Clapp et al., 2006), si bien su uso se ha consolidado y actualmente es el predominante. El análisis de los términos contenidos en los títulos y resúmenes de todas las publicaciones y sus relaciones permite apreciar la evolución

de las distintas denominaciones con los que la comunidad científica se ha referido a la vasoinhibina, por ejemplo, fragmento 16K y 16K hPRL entre otros (Figura 2.5).

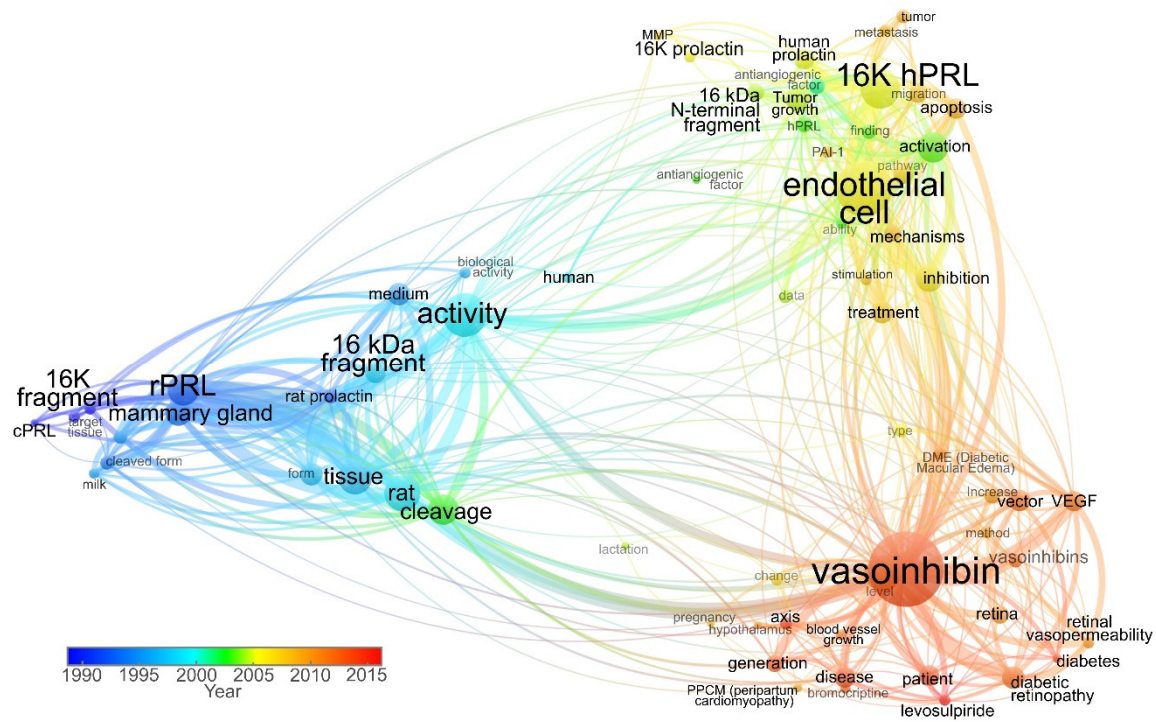


Figura 1.3. Mapa de co-ocurrencia para el análisis de términos relacionados con vasoinhibina en títulos y resúmenes de los trabajos a través del tiempo. El tamaño de los nodos representa la frecuencia absoluta de aparición de los términos. Las líneas indican la relación y las distancias la asociación. El color indica el año en promedio de la distribución de los términos. El mapa fue creado y visualizado con VOSviewer (van Eck y Waltman, 2010), usando los 71 términos con más de 60% de relevancia, seleccionados de 119 palabras que aparecían más de 7 veces en los títulos y resúmenes de todas las publicaciones relacionadas con la vasoinhibina colectadas en Scopus.

Los hallazgos del campo se refieren en extenso a través de las diferentes secciones de los anexos, a saber: anexo 12.2 (Descubrimiento); anexo 12.3 (Proteasas generadoras de vasoinhibina); anexo 12.4 (Mecanismos de acción); anexo 12.5 (Efectos biológicos), anexo 12.6 (Implicaciones fisiológicas y patológicas) y anexo 12.7 (La vasoinhibina como agente

terapéutico). A continuación se describen brevemente los aspectos de cada una de estas secciones que son los más relevantes para el propósito de esta tesis.

2. Antecedentes inmediatos

2.1. Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso mediante el cual tiene lugar la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente. Los nuevos vasos sanguíneos generados por este proceso determinan el crecimiento de los tejidos durante el desarrollo y en la vida adulta en asociación con los eventos reproductivos femeninos (Carmeliet, 2005). Sin embargo, la angiogénesis anormal está asociada a la progresión de enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide, la retinopatía diabética, la neurodegeneración, la preeclampsia y la cardiomiopatía del postparto (Folkman, 2006; Chung y Ferrara, 2011). De modo que la inhibición de la angiogénesis es considerada una estrategia terapéutica potencial (Ferrara y Kerbel, 2005). Diversos factores antiangiogénicos son derivados de la proteólisis específica de proteínas endógenas sin actividad sobre la angiogénesis, como son algunas proteínas de la matriz extracelular y de la membrana basal, así como factores de crecimiento, citocinas, proteínas circulantes y hormonas (Cao, 2001; Nyberg et al., 2005).

2.2. Vasoinhibina

La vasoinhibina es una molécula que se genera cuando la PRL pierde la cuarta α -hélice y el extremo C-terminal mediante corte proteolítico. El fragmento que conserva la región N-terminal de la PRL se denomina vasoinhibina por sus efectos vasculares inhibitorios sobre la angiogénesis, la vasodilatación y la vasopermeabilidad (Clapp et al., 2006). Existen diversas isoformas de vasoinhibina que difieren en su tamaño y que incluyen proteínas que van desde el aminoácido 1 de la PRL madura hasta los aminoácidos 123, 132, 139, 142, 147, 150, 155 o 159, lo cual las coloca en un rango de masas moleculares que oscilan entre los 14 y 18 kDa.

Estas isoformas han probado ser bioactivas, pero no se ha comparado la potencia biológica entre ellas (Triebel et al., 2015a).

La PRL humana está compuesta por 199 aminoácidos que forman 4 α -hélices principales (H1-4) agrupadas en un racimo con una configuración “arriba-arriba-abajo-abajo”,

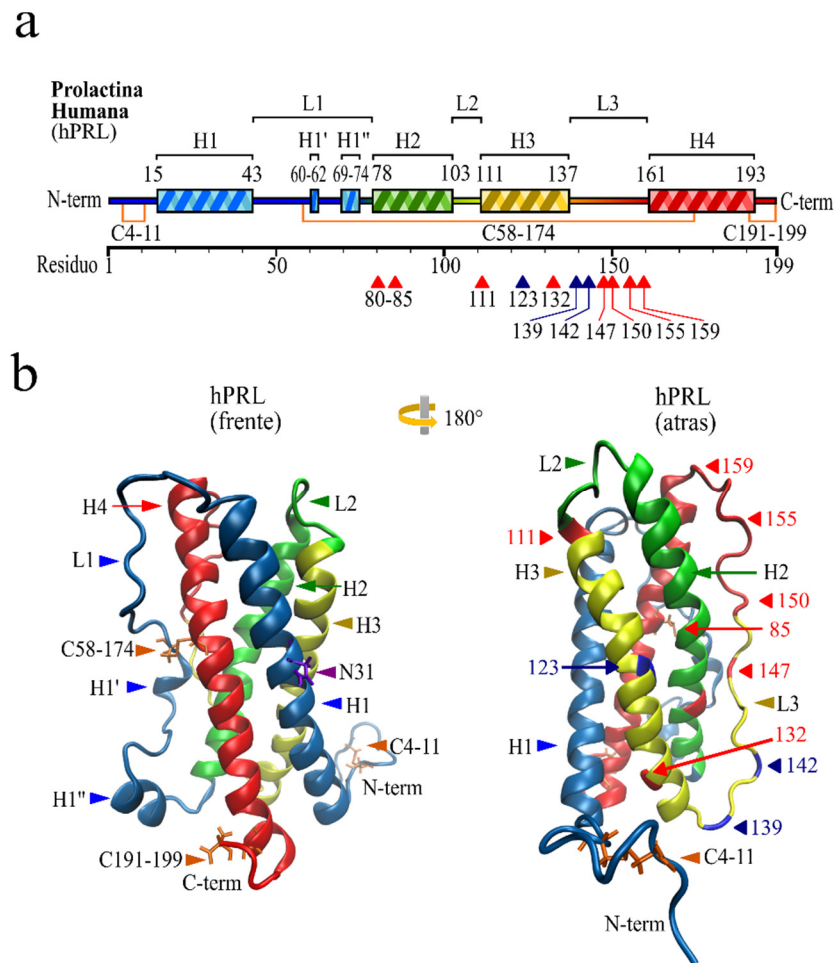


Figura 2.1. Estructura Soluble de la prolactina humana (hPRL). (a). Diagrama lineal de la estructura secundaria. Los aminoácidos que conforman las α -hélices (H1-4), las asas o *loops* (L1-3), y los 3 puentes disulfuro están indicados (C4-11, C58-174, C191-199). Los sitios donde se generan las diferentes isoformas de vasoinhibina por corte proteolítico (flechas rojas) o por técnicas recombinantes (flechas azules) se concentran en la H3 y L3 (se indica el número de aminoácidos de la vasoinhibina resultante). (b). Representación tridimensional de la hPRL soluble (registro de *Protein Data Bank* (PDB) 1RW5). Se indica (flecha morada) el único sitio de glicosilación de la hPRL, la asparagina 31 (N31). La molécula se giró 180° para poder observar los sitios de generación de vasoinhibina en H3 y L3.

conectadas por 3 asas o *loops* (L1-3) y flanqueadas por pequeñas asas N- y C-terminales (Figura 2.1). Además, el L1 contiene 2 hélices pequeñas, una hélice 3_{10} (H1') y una α -hélice (H1''), y la molécula está estabilizada por 3 puentes disulfuro que forman 2 pequeñas asas en los extremos N- y C-terminales (C4-11 y C191-199, respectivamente) y un asa mayor que conecta el L1 con la H4 (C58-174) (Figura 2.1). Los distintos aminoácidos donde las isoformas de vasoinhibina terminan, se encuentran a lo largo del asa 3 (L3), lo cual sugiere que la vasoinhibina conserva 3 hélices.

2.3. Efectos biológicos y mecanismos de acción de la vasoinhibina

La vasoinhibina inhibe la angiogénesis a través de disminuir la proliferación, migración y supervivencia de las células endoteliales (Clapp et al., 2006). La vasoinhibina actúa sobre las células endoteliales a través de formar de un complejo proteico multimérico conformado por PAI-1, el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa y su receptor (Bajou et al., 2014). También se han reportado otros posibles receptores o moléculas de unión en las membranas de células endoteliales (Clapp y Weiner, 1992; Triebel et al., 2015a). Como resultado de su unión al endotelio, la vasoinhibina actúa a nivel de la proteína Ras para inhibir la activación de las MAPK inducida por VEGF y FGF, lo cual lleva al arresto del ciclo celular (D'Angelo et al., 1995; D'Angelo et al., 1999; Tabruyn et al., 2005). Además, la vasoinhibina disminuye la migración de células endoteliales estimuladas con IL-1 β a través de la vía que involucra a Ras y otros mensajeros río abajo como Tiam, Rac1 y Pak1 (Lee et al., 2007). Como mecanismo alternativo de bloqueo de la migración celular, la vasoinhibina incrementa los niveles de expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) a través de activar a NF- κ B lo cual disminuye la actividad de urokinasa que requiere el endotelio para migrar (Lee et al., 1998). Por otra parte, la vasoinhibina induce la activación de NF- κ B para activar

proteínas proapoptóticas que incluyen a la caspasa 3- y a BCL-Xs (Martini et al., 2000; Tabruyn et al., 2003). Finalmente, la vasoinhibina interfiere con la formación de estructuras capilares por las células endoteliales y la maduración de los vasos sanguíneos en el reclutamiento de pericitos (Clapp et al., 1993; Nguyen et al., 2011).

Otros efectos vasculares de la vasoinhibina incluyen la inhibición de la vasodilatación y la vasopermeabilidad en respuesta a sustancias vasoactivas como el VEGF, la bradicinina, y la acetilcolina (Gonzalez et al., 2004; Garcia et al., 2008; Thebault et al., 2011). Estas acciones involucran la inhibición de la producción de óxido nítrico (NO), debido a la defosforilación/inactivación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). Esta acción involucra la activación de la fosfatasa de proteína 2A (PP2A) que defosforila a la eNOS y la inhibición de la movilización intracelular de Ca^{2+} , vía la inhibición del sistema $\text{PLC}\gamma$ -IP3-eNOS, que se requiere para que el sistema Ca^{2+} -calmodulina active a la eNOS (Gonzalez et al., 2004; Garcia et al., 2008; Thebault et al., 2011). La inhibición de la vasopermeabilidad y la vasodilatación por la vasoinhibina forma parte de sus efectos fisiológicos sobre la vasculatura de la retina bajo condiciones normales (Aranda et al., 2005), pero también bajo condiciones patológicas derivadas de la diabetes (Ramírez et al., 2011; Diaz-Lezama et al., 2016). La vasoinhibina también tiene acciones sobre blancos no vasculares. Se han reportado acciones proinflamatorias de la vasoinhibina en fibroblastos de pulmón, que son células protagonistas de reacciones inflamatorias en las vías respiratorias (Macotela et al., 2002). Al respecto, se mostró que la vasoinhibina induce la activación de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) con una potencia muy similar a la de una combinación de citocinas proinflamatorias ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{INF-}\gamma$) (Corbacho et al., 2000b) mediante un mecanismo dependiente de la activación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Macotela et al., 2002). Otras células blanco de la

vasoinhibina son los leucocitos, donde la vasoinhibina actúa favoreciendo su infiltración al tejido tumoral a través de inducir la expresión de las moléculas de adhesión, ICAM-1 y E-selectina (Tabruyn et al., 2007).

Recientemente, se mostró que la unión de la vasoinhibina al PAI-1 resulta en el bloqueo de los efectos mantenedores del coagulo de PAI-1, lo que se traduce en acciones profibrinolíticas (Bajou et al., 2014). También se han reportado efectos de la vasoinhibina sobre el tejido nervioso, donde promueve la neurosecreción hormonal (Mejia et al., 1997; Mejia et al., 2003), la conducta de ansiedad (Zamorano et al., 2014) e inhibe la emisión de neuritas (Castillo et al., 2017).

En apoyo a los efectos biológicos de la vasoinhibina, se ha reportado su presencia en la hipófisis, en el hipotálamo, en el endotelio vascular, en la circulación, y en tejidos donde la vascularización es altamente restringida o ausente como son la retina o la córnea y el cartílago, respectivamente (Clapp et al., 2009; Triebel et al., 2015a). Además, se ha observado que la inmunoneutralización de la vasoinhibina resulta en la proliferación y dilatación de vasos sanguíneos en la retina (Aranda et al., 2005) y la córnea (Dueñas et al., 1999).

2.4. Generación de la vasoinhibina

La catepsina D (Piwnica et al., 2004), las metaloproteasas de matriz (Macotela et al., 2006) y la proteasa morfogénica de hueso-1 (Ge et al., 2007) cortan a la PRL predominantemente en el L3 para generar distintas proteínas que van desde los primeros 80 hasta los primeros 159 aminoácidos (Figura 2.1). Solamente se ha investigado la actividad biológica de isoformas de vasoinhibina de ≥ 123 aminoácidos (Clapp et al., 2015; Triebel et al., 2015a). Los fragmentos bioactivos tienen en común la pérdida de la H4 y del asa C-terminal debido

al corte proteolítico y a la reducción del puente disulfuro C58-174 (Figura 2.2) (Clapp et al., 2015; Triebel et al., 2015a). El hecho de que la PRL completa no tiene los efectos vasculares de la vasoinhibina sugiere que la pérdida de estas regiones crea una conformación con un nuevo dominio funcional.



Figura 2.2. Diagrama secuencial de la generación de la vasoinhibina (Vi) a partir de la PRL. Inicialmente la PRL sufre un corte proteolítico en el L3 que genera la PRL-cortada. Posteriormente, esta tiene que ser reducida para perder la H4 (Pre-Vi) y finalmente, tiene lugar un cambio conformacional que da lugar a la vasoinhibina.

La catepsina D genera fragmentos de PRL que comprenden los aminoácidos 1-132 (15 kDa), 1-147 (16.5 kDa) y 1-150 (17 kDa) (Piwnica et al., 2004). La catepsina D requiere de un pH ácido para actuar y se mostró que el pH de los gránulos de secreción de las células adenohipofisarias que producen PRL (lactotropos) es ácido, que dichos gránulos contienen catepsina D y que esta proteasa genera las isoformas de vasoinhibina durante el almacenamiento y secreción adenohipofisaria de la PRL (Cruz-Soto et al., 2009). Otros microambientes ácidos que favorecen la acción de la catepsina D generadora de vasoinhibina incluyen el tumoral y el inflamatorio (Cosio et al., 2003). La vasoinhibina también se produce a un pH neutro en el microambiente de los órganos blanco mediante la acción de las metaloproteasas de matriz (MMP) (Macotella et al., 2006) y de la proteasa morfogénica de hueso 1 (BMP1) (Ge et al., 2007). Se demostró que MMPs secretadas por cultivos primarios de células del cartílago (condrocitos), o las MMP-8, 13, 3, 1, 2 y 9 puras, cortan a la PRL en

el L3 hacia fragmentos de 17, 16, 15 y 14 kDa (Macotela et al., 2006). Por su parte, la BMP1 también genera una vasoinhibina de 17 kDa bajo condiciones de pH neutro (Ge et al., 2007).

La producción de la vasoinhibina es función de la cantidad de PRL producida por la hipófisis anterior o por tejidos extrahipofisarios, como de la actividad de las proteasas específicas. Esto es evidente cuando se induce hiperprolactinemia, una condición que tiene como consecuencia la acumulación de la vasoinhibina en la retina (Arnold et al., 2010). Asimismo, el aumento en la actividad de la catepsina D en el corazón en un modelo de cardiomiopatía de postparto en el ratón, se asocia con una mayor concentración de la vasoinhibina circulante (Hilfiker-Kleiner et al., 2007a).

Por lo tanto, es claro que la generación de vasoinhibina se regula a distintos niveles (hipotálamo, pituitaria, y tejidos blanco) lo que ha llevado a proponer el concepto del eje PRL/vasoinhibina (Triebel et al., 2015a). La alteración de este eje contribuye a la patogenicidad y progresión de la retinopatía diabética (Triebel et al., 2011), la retinopatía del prematuro (Zepeda-Romero et al., 2017), la cardiomiopatía del postparto (Hilfiker-Kleiner et al., 2007a) y la preeclampsia (Gonzalez et al., 2007). Una revisión histórica más detallada de las implicaciones patológicas de la alteración del eje PRL/vasoinhibina se encuentra en la sección de anexos (Anexo 12.6).

2.5. Preguntas sin resolver

A pesar de los avances en el campo de la vasoinhibina, aún hay muchas preguntas que no se han resuelto. Muchas de estas cuestiones están íntimamente ligadas a la relación estructura-función de estas moléculas. Por ejemplo, se desconoce si las diferencias en las masas moleculares de las distintas isoformas de vasoinhibina impactan en su función. Además, no se han cuantificado las distintas isoformas presentes en la circulación o en los tejidos. La

falta de información sobre los niveles endógenos de la vasoinhibina se debe a la ausencia de un método cuantitativo específico, ya que no se cuenta con anticuerpos capaces de reaccionar exclusivamente con la vasoinhibina y no con la PRL. El conocimiento de los determinantes estructurales de la vasoinhibina, que no están presentes en la PRL, ayudará a generar anticuerpos dirigidos a esa zona que permitan discernir entre la PRL y la vasoinhibina (Triebel et al., 2015a). Además, la identificación de los determinantes estructurales de la vasoinhibina permitirá diseñar agonistas y antagonistas para uso en la clínica.

Hasta el momento, no se conoce la estructura tridimensional de la vasoinhibina, si bien se ha reportado que una región de 14 aminoácidos hidrofóbicos localizada en la α -hélice 2 de la PRL tiene efectos inhibitorios sobre la angiogénesis (aunque de baja potencia en relación a la molécula íntegra de vasoinhibina) y se ha sugerido que esa región podría estar relacionada con su actividad (Nguyen et al., 2006).

Dado que la PRL no posee actividad antiangiogénica, se propone que el dominio antiangiogénico oculto en esta hormona se expone después de su procesamiento proteolítico. Las consecuencias funcionales de este procesamiento son la base del presente análisis que investiga la transición estructural de la PRL a vasoinhibina y la localización del dominio antiangiogénico de la vasoinhibina.

3. Justificación

El sistema prolactina (PRL)/vasoinhibina constituye un nuevo eje endócrino donde la hormona PRL es convertida proteolíticamente hacia una familia de proteínas (vasoinhibina) con acciones inhibitorias sobre el crecimiento (angiogénesis), dilatación y permeabilidad de los vasos sanguíneos. La desregulación del eje PRL/vasoinhibina y, como consecuencia de ello, la sub- o la sobre-producción de la vasoinhibina, son factores importantes en la etiología de enfermedades de gran impacto en la población humana como el cáncer, la retinopatía diabética, la artritis reumatoide, la cardiomiopatía del postparto y la preeclampsia. Actualmente, se encuentran en curso dos estudios clínicos en fase II que tienen como blanco terapéutico a la vasoinhibina. Uno orientado a determinar la eficacia de la vasoinhibina para inhibir las alteraciones vasculares retinianas en pacientes con retinopatía diabética (Clinical Trial NCT03161652), y otro, para contrarrestar las acciones de la vasoinhibina e incrementar la vascularización cardíaca en pacientes que presentan cardiomiopatía del postparto (Clinical Trial NCT00998556). Sin embargo, el empleo de terapias para reforzar o inhibir la señal vasoinhibinérgica se ha visto limitado por la falta de agonistas y antagonistas selectivos y de anticuerpos específicos para cuantificar los niveles circulantes de estos mensajeros químicos. El hecho de que las propiedades vasculares de la vasoinhibina están ausentes en la molécula completa de la PRL, indica que el procesamiento proteolítico induce cambios conformacionales que conllevan a un nuevo dominio funcional. Sin embargo, se desconoce la estructura tridimensional de la vasoinhibina y la localización de su dominio antiangiogénico. En este trabajo empleamos simulación de dinámica molecular y tecnología de ADN recombinante para identificar el denominador estructural común de la vasoinhibina, y definir la estructura mínima funcional de esta familia. Los resultados encontrados ampliaron a la familia de la vasoinhibina incluyendo ahora a proteínas sustancialmente más

pequeñas que las identificadas con anterioridad, y brindan información muy relevante para el diseño de agonistas y antagonistas selectivos, así como de métodos de cuantificación sensibles y específicos para la vasoinhibina, los cuales tendrán una aplicación inmediata en la investigación y en la clínica, por lo tanto, se protegerán con diversas patentes antes de su comercialización.

4. Pregunta de Investigación

¿Qué estructura tiene la vasoinhibina y dónde se localiza su dominio antiangiogénico?

5. Hipótesis

La estructura de la vasoinhibina es similar a la de la PRL debido a que tiene la misma secuencia primaria a excepción de la α -hélice 4 (H4), sin embargo, es en las diferencias estructurales entre la PRL y la vasoinhibina donde radica el dominio antiangiogénico.

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

Modelar la estructura de la vasoinhibina, localizar un posible dominio antiangiogénico basado en las diferencias con la PRL y validar el dominio con tecnología recombinante.

6.2. Objetivos Específicos

- 6.2.1. Modelar la estructura de una isoforma representativa de la vasoinhibina a partir de la estructura soluble de PRL mediante simulación de la dinámica molecular.
- 6.2.2. Proponer un dominio funcional basado en las diferencias estructurales de la vasoinhibina con la PRL.
- 6.2.3. Verificar que una isoforma recombinante de vasoinhibina que contenga el dominio funcional propuesto es bioactiva.

7. Métodos

7.1. Simulación de Dinámica Molecular

Las coordenadas de la estructura soluble de la PRL humana se descargaron del *Protein Data Bank* (PDB, código 1RW5) (Teillum et al., 2005). Para la generación de la vasoinhibina se eliminó el fragmento C-terminal de la molécula a partir del residuo 151. Para generar las distintas isoformas de la vasoinhibina (Vi79, Vi123, Vi132, Vi139 y Vi159), se eliminó el fragmento C-terminal a partir del residuo 80, 124, 133, 140 y 160, respectivamente.

Se llevó a cabo una simulación clásica de DM para las estructuras de PRL y vasoinhibina usando el paquete computacional GROMACS 5.1 (Van Der Spoel et al., 2005; Pronk et al., 2013). Para generar la topología de la molécula (parametrización) se usó el campo de fuerza de átomo libre CHARMM27 (MacKerell et al., 1998). Todas las simulaciones se llevaron a cabo en un pH neutro, en donde los estados de protonación y las condiciones de tautomerización de las histidinas se obtuvieron con los softwares en línea H⁺⁺ (Anandakrishnan et al., 2012) (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>) y PROTOSS (Bietz et al., 2014) (<http://proteinplus.zbh.uni-hamburg.de/>), respectivamente. Las proteínas fueron solvatadas en el modelo de agua TIP3P (Bondi, 1964; Jorgensen et al., 1983), en una caja cúbica con condiciones de límites periódicos, usando una distancia de 1.0 nm de la proteína a la superficie de la caja. Los sistemas fueron neutralizados con iones de carga agregados de acuerdo a cada sistema. Asimismo, se usó una concentración de sal de 120 nM al adicionar 50 iones Na⁺ y 50 iones Cl⁻ a una caja de 700 nm³. Posteriormente la energía del sistema fue minimizada con 1000 pasos del protocolo *steep descend* sin restricciones de movimiento, y equilibrado con 100 ps de simulación de DM. Para esto, se generó una

temperatura de 37°C (310 K) con el ensamble canónico NVT. La presión y la densidad fueron generadas con el ensamble isobárico-isotérmico NPT. Estos pasos de equilibrio se llevaron a cabo con restricción de movimiento de la molécula. Finalmente, la simulación de DM se llevó a cabo con condiciones de NPT, pero sin restricción de la molécula. Las coordenadas, velocidades y energías se registraron cada 2 ps. El tratamiento de las interacciones electrostáticas largas se llevó a cabo con el algoritmo PME (*Particle Mesh Ewald*) (Darden et al., 1993), con un esquema de tipo Verlet para las interacciones electrostáticas de rango corto, y con un umbral de Van der Waals de 1 nm. La temperatura y presión del sistema se mantuvieron estables con el termostato modificado de Berendsen y el baróstato Parrinello-Rahman, respectivamente. La restricción de longitud de los enlaces se llevó a cabo por el algoritmo LINCS (Miyamoto y Kollman, 1992; Hess, 2008). Las simulaciones se llevaron a cabo en 2 clusters de computación de alto rendimiento, HORUS con 170 núcleos (4-8 núcleos lógicos por nodo), conectado con un *switch* de puerto HP Procurve 48G-2900 1000T-48 (Centro de Geociencias, UNAM) y ADA con 192 núcleos conectados por un Infiniband de 40 Gpbs (LAVIS: Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada). Las simulaciones se corrieron en un ambiente paralelizado MPI con un total de 135 núcleos de HORUS o de 6 núcleos en ADA (Hess et al., 2008; Pronk et al., 2013; Páll et al., 2015). Otros campos de fuerza como son GROMOS96 54A7 (de átomo unido) y AMBER P5A (de átomo libre) fueron usados en las mismas condiciones para apoyar los resultados.

7.2. Análisis de Dinámica Molecular

Los softwares GROMACS y VMD 1.9.1 (Humphrey et al., 1996) se usaron para analizar las trayectorias y la calidad de las simulaciones de DM. Las herramientas *gmx_gyrate* y

gmx_sasa fueron usadas para determinar el radio de giro de la molécula (compresión) y el área de superficie accesible al solvente, respectivamente. Para el análisis del movimiento, los valores de las fluctuaciones de la media cuadrática (RMSF) por residuo y la desviación de la media cuadrática (RMSD) total se obtuvieron con las herramientas *gmx_rmsf* y *gmx_rms*. La obtención de RMSF por residuo, así como la estructura secundaria a través del tiempo, se realizaron con la herramienta *Timeline* del software VMD 1.9.1 (Humphrey et al., 1996). El análisis de componentes esenciales o principales (David y Jacobs, 2014) de las trayectorias se llevó a cabo usando las herramientas *gmx_covar* y *gmx_anaeig*. El porcentaje de tiempo en que un residuo pertenece a una hélice (helicidad) se analizó con la herramienta *gmx_helix* también del software GROMACS.

Para identificación de la estructura de vasoinhibina de mínima energía se llevó a cabo un análisis del perfil de energía libre de la simulación (FEL) (Frauenfelder et al., 1991), el cual se obtuvo con la estimación de la probabilidad conjunta de distribución del plano esencial de los 2 vectores eigen principales (Tournier y Smith, 2003). Para el análisis de la superficie accesible al solvente (SASA) desglosada para cada residuo, se usó la herramienta *gmx_sasa* y el software en línea POPS 1.8.0 (Cavallo et al., 2003). Las gráficas de las trayectorias fueron creadas con Xmgrace (Paul J. Turner, Center for Coastal and Land-Margin Research, Oregon Graduate Institute of Science and Technology Beaverton, Oregon). El cálculo automatizado del potencial electrostático se obtuvo con el servidor APBS (Baker et al., 2001)-PDB2PQR (Dolinsky et al., 2004; Dolinsky et al., 2007). Las moléculas y trayectorias fueron visualizadas en el software VMD 1.9.1 en el sistema de visualización inmersiva de alto rendimiento CAVE (VisCubeC4, Visbox, IL. USA). El potencial hidrofóbico molecular (MHP) y la superficie de *conolly* se obtuvieron con el

software PLATINUM (Pyrkov et al., 2009). La topografía de la superficie molecular (PST) se obtuvo con los datos de la superficie de Connolly como se describió anteriormente (Koromyslova et al., 2014). Para la generación de las figuras se usó el software Inkscape 0.92 (Inkscape Project, <https://inkscape.org>).

El software HELANAL (Kumar y Bansal, 2012) y el *plugin* de VMD Bendix (Dahl et al., 2012) se usaron para analizar la geometría y los ángulos del eje de las hélices. Los ángulos entre las hélices se obtuvieron con la herramienta Axes/Planes/Centroid del paquete informático USCF Chimera (Pettersen et al., 2004). Para la evaluación de los puentes de sal se usó el software en línea ESBRI (Costantini et al., 2008), la distancia mínima calculada con la herramienta de GROMACS *gmx_mindist* se usó para el análisis de puentes de sal.

7.3. Construcción de plásmidos codificantes para isoformas de vasoinhibina recombinante.

El cDNA de las distintas isoformas de vasoinhibina se obtuvo del cDNA de PRL previamente clonado en el vector pcDNA3. La secuencia se encontraba río abajo del promotor CMV, de un sitio de restricción BamHI (5'-G'GATCC-3') y la secuencia kozak (5'-GCCACC-3'). Los cDNA se obtuvieron mediante PCR con la mezcla de reacción Green master mix (Thermo Scientific, catálogo #K1081, Waltham, MA, USA). El oligo pCMV forward 5'-CCCACTTGGCAGTACATCA-3' y los oligos reverse Vi79-SalI 5'-TTTTTTGTCGACTTAGTCTTTTTGATTCATCTGTTGGGC-3' y Vi123-SalI 5'-TTTTTTGTCGACTTAGGTTTGCTCCTCAATCTCTACAGC-3' se usaron para la generación de vasoinhibina de 79 o de 123 aminoácidos, respectivamente. Se introdujo en la secuencia un codón de paro (**negritas**) y un sitio de restricción para la enzima SalI (*itálicas*) (5'-G'TCGAC-3') en el codón Phe80 para la vasoinhibina 79 o en la Lys124 para la

vasoinhibina 123. Para la generación de un vector vacío, una secuencia no-codificante de 20 pb, con extremos pegajosos para BamH1 y Sall, fue diseñada y sintetizada. Los productos de PCR y la secuencia no condificante fueron subclonados en el plásmido pLenti CMV-GFP-Puro (658-5), una donación de Eric Campeau y Paul Kaufman (Addgene #17448) (Campeau et al., 2009), mediante una clonación de restricción-ligación con BamH1 (Jena Biosciences, catálogo #EN-103, Jena, DE), Sall (New England Biolabs, catálogo #R0138S, Ipswich, MA, USA), y la ligasa T4DNA (Fermentas, catálogo #EL0014, Waltham, MA, USA). Los plásmidos ligados (pLenti CMV-Vi79-Puro y CMV-Vi123-Puro) se propagaron en *E. coli* competentes transformadas por choque térmico y seleccionadas con 100 µg ml⁻¹ de ampicilina (Sigma-Aldrich, catálogo #A9518, St. Louis, MO, USA). La obtención y concentración del plásmido se llevó a cabo con el Kit Plasmid *Plus* Maxi Kit (Qiagen, catálogo #12963, Hilden, DE), según las instrucciones del fabricante. La construcción se verificó con restricción y secuenciación del DNA con el Big Dye en el ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología, UNAM). Las secuencias se manipularon y analizaron con la herramienta de análisis del Cuaderno Electrónico de Laboratorio Benchling (<http://benchling.com>) (San Francisco, CA, USA).

7.4. Procedimientos de cultivo celular

Las líneas celulares de riñón de embrión humano HEK293T/17 (ATCC®CRL-11268TM) y de arteria pulmonar bovina CPAE (ATCC®CCL-209TM) se obtuvieron de la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC, Manassas, VA, USA). Las células BUVEC se obtuvieron como se describió previamente (Cajero-Juarez et al., 2002). Las células HEK293T/17 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (Gibco by Life Technologies,

catálogo #12100-380, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco by Life Technologies, catálogo #26140-079). Las células CPAE se mantuvieron en medio EMEM (ATCC®30-2003™) suplementadas con 20% de SFB (Gibco by Life Technologies). Las células BUVEC se mantuvieron en medio F12K (Gibco) suplementado con 10% SFB (Gibco). Se previno la contaminación con 100 U ml⁻¹ de penicilina-estreptomicina (Biowest, catálogo #L0022-100, Nuaille, France) y 100 µg ml⁻¹ de Normosina (InvivoGen, catálogo #ant-nr-1, San Diego, CA, USA). Las células en cultivo se mantuvieron a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂.

7.5. Producción estable de vasoinhibina recombinante por HEK 293T/17 transducidas con lentivirus codificante para vasoinhibina.

La producción de distintas isoformas de vasoinhibina recombinante se llevó a cabo en células de riñón de embrión humano HEK293T/17 (ATCC®CRL-11268™) transducidas de manera estable con vectores lentivirales codificantes para isoformas de vasoinhibina de 79 y 123 aminoácidos (Vi79 y Vi123, respectivamente). Las partículas lentivirales se generaron mediante una transfección transitoria con fosfato de calcio en células HEK293T/17 con el pLenti CMV-Vi79-Puro, CMV-Vi123-Puro o el CMV-vacio-Puro como control, cotransfectados con pMDLg/pRRE (Addgene #12251), pRSV-Rev (Addgene #12253) (Dull et al., 1998) y pMD2-G (Addgene #12259), todos fueron regalos de Didier Trono. El medio condicionado conteniendo las partículas lentivirales se recolectó. Para la generación de cepas estables, las células fueron transducidas con partículas lentivirales contenidas en el medio condicionado y seleccionadas con 3 µg ml⁻¹ de puromicina (Sigma-Aldrich, catálogo #P8833) por 24 h y posteriormente se expandieron. El medio condicionado conteniendo vasoinhibina fue obtenido cada 48 h por 2 semanas y guardado a -70°C hasta su uso posterior.

7.6. SDS-PAGE tricina y Western blot

La presencia de vasoinhibina en el medio condicionado, su concentración, y su peso molecular, fue confirmado con SDS-PAGE Tricina (Schagger, 2006) con geles de acrilamida de 16%T y 6%C, con el marcador preteñido de peso molecular Precision Plus ProteinTMDual Xtra (BioRad, catálogo #1610377, Hercules, CA, USA), seguido de inmunoblotting con un anticuerpo policlonal anti-PRL (CL-1) o un anticuerpo monoclonal anti PRL N-terminal 5602 (Piwnica et al., 2004) (para cuantificación). La detección se llevó a cabo por quimioluminiscencia con el anticuerpo anti-conejo o anti-ratón acoplado a peroxidasa, Peroxidase AffiniPure donkey anti-rabbit IgG (H&L) (Jackson ImmunoResearch, catálogo #711-035-132, West Grove, PA, USA), el sustrato SuperSignalTMWest Pico PLUS Chemiluminescent substrate(Thermo Scientific , catálogo #34577) y el sistema Fluor ChemTME (Protein Simple, San Jose, CA, USA). La concentración de vasoinhibina fue cuantificada interpolando a una curva de estándar de PRL en el mismo blot, como se describió previamente (Clapp, 1987; Ferrara et al., 1991). El peso molecular de las distintas isoformas de vasoinhibina fue confirmado mediante la remoción de las N-glicosilaciones con la Peptide N-glycosidase F (New England Biolabs, catálogo #P0704S) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los geles se digitalizaron y las imágenes fueron analizadas con el software Quantity One 1-D (BioRad).

7.7. Proliferación celular

La proliferación se analizó mediante la detección de 2 análogos de timidina incorporados en la síntesis del DNA, el EdU y [³H]timidina. Para detectar el análogo EdU, se usó la reacción click (Salic y Mitchison, 2008). Inicialmente, se sembraron células CPAE a una densidad de 6'250 células cm⁻² en placas de 96 pozos (Corning, catálogo #3599, NY, USA).

Posteriormente, se redujo la concentración de SFB a 0.5% por 24h y después se trataron con 50 μ l de medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas con lentivirus codificantes para isoformas de vasoinhibina y el no codificante como control, en un volumen final de 100 μ l por 24 h en condiciones de 0.5% de SFB. Las células CPAE se marcaron en cultivo con 10 μ M del análogo de timidina 5-Etínil-2'-deoxiuridina (EdU) (Sigma-Aldrich, catálogo #T511285) durante el tratamiento con vasoinhibina. Finalmente las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos, y se permeabilizaron con 0.5% de TritonX-100 en TBS1X por 1h. Entre cada paso las células se lavaron con TBS1X por 2 minutos en un agitador orbital. El EdU presente en el ADN de las células se detectó mediante la tinción con una azida fluorescente en 20 minutos de reacción click. Esta reacción click se llevó a cabo con una mezcla de tinción fresca de 100 nM de Tris, 0.5 nM CuSO₄, 50 mM de ácido ascórbico y 20 μ M de Azida de Fluor 545 (Sigma-Aldrich, catálogo #760757), seguido de un paso de lavado de 30 minutos con TritonX-100 en TBS1X. El ADN nuclear fue contrateñido con 5 μ g ml⁻¹ de bisBenzimida Hoechst 33342 trihydrochloride (Sigma-Aldrich, catálogo #B2261) (Chazotte, 2011). Las fotografías se obtuvieron con el microscopio básico invertido IX51 (Olympus, Tokyo, JP), con un sistema de fluorescencia reflejada con el espejo dicroico DM400 y DM570 para la tinción de Hoechst y EdU, respectivamente. Las imágenes fueron analizadas usando el software de análisis de imágenes CellProfiler (Carpenter et al., 2006; Kamentsky et al., 2011) (<https://cellprofiler.org/>), usando el proceso *Cell/particle counting and scoring % of stained objects*. Finalmente las imágenes se sobrepusieron en el software ImageJ 1.X (Schneider et al., 2012).

La síntesis de DNA fue cuantificada también por la incorporación de [³H]-timidina como se describió previamente (Ferrara et al., 1991). Se sembraron células CPAE en platos de 48

pozos a una densidad de 526 células cm^{-2} (Corning, catálogo #3548), una vez adheridas se redujo el SFB al 0.5% por 24 h y posteriormente, se trataron con 20 μl de medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas con lentivirus codificantes para isoformas de vasoinhibina y el no codificante como control, en un volumen total de 200 μl por 24 horas. Durante el tratamiento de vasoinhibina, las células fueron pulsadas con 0.5 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ de [^3H]-timidina (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). La [^3H]-timidina que no se incorporó fue removida mediante 4 pasos de lavado con ácido tricloroacético al 5% frío. La [^3H]-timidina incorporada se solubilizó con una solución 0.25 N de NaOH a 95°C, y se adicionó a 3 ml de solución de centelleo ASCII (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) y se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman, Pasadena, CA, USA).

7.8. Proliferación de células endoteliales transducidas con lentivirus codificantes para distintas isoformas de vasoinhibina.

Células BUVEC fueron sembradas en placa de 6 pozos a una densidad de 10'000 células cm^{-2} y fueron transducidas con vectores lentivirales codificantes para isoformas de vasoinhibina de 79 y 123 aminoácidos, y un lentivirus vacío como control, en presencia de 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de polybreno (Sigma-Aldrich, catálogo # 107689). El medio fue remplazado 24 horas después de la transducción y las células se contaron cada 24 horas por 3 días. Después de 72 horas después de la transducción, el ADN nuclear fue teñido con 2.5 mg ml^{-1} de bisBenzimide Hoechst 33342 (Chazotte, 2011). Las fotografías se obtuvieron en un microscopio invertido IX51(Olympus, Tokio, JP), con sistema de espejo dicróico DM400 con fluorescencia reflejante. El número de núcleos y el tamaño fue determinado automáticamente usando el software Image J (Schneider et al., 2012).

7.9. Migración celular

La migración celular fue evaluada mediante el ensayo de herida en placa (scratch wound healing assay) (Liang et al., 2007). Se sembraron células CPAE a confluencia en placas de 6 pozos (Nest Biotechnology, catálogo #0211^a, Rahway, NJ, USA) y la herida fue realizada con la punta de un dispositivo de raspado (cell scraper) (Corning, catálogo #3010). Enseguida el medio fue sustituido por medio nuevo conteniendo el 50% del medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas con lentivirus codificantes para isoformas de vasoinhibina y el no codificante como control, en un volumen final de 2 ml. Después de 24 horas, se obtuvieron fotografías del sitio de la herida en un microscopio invertido básico IX51 (Olympus) y se analizaron con el software CellProfiler (<http://cellprofiler.org/>) (Carpenter et al., 2006).

7.10. PCR cuantitativo (tiempo real)

Células CPAE se sembraron en un plato de 12 pozos (Corning, catálogo #3527) y se esperó a que alcanzaran el 90% de confluencia. Entonces, se colocaron en condiciones de bajo SFB (0.5%) por 24 horas. Después se agregó medio nuevo conteniendo el 50% de medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas con lentivirus codificantes para isoformas de vasoinhibina y el no codificante como control, en un volumen final de 1 ml a cada pozo. Después de 4 horas de tratamiento, el RNA total se aisló usando el reactivo Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se retrotranscribió con el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los productos de PCR se cuantificaron usando la mezcla Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en una reacción final de 10 µl con 0.25 µM de cada oligo. La PCR se llevó a cabo en el termociclador de tiempo real CFX96 (Bio-Rad) en lo que incluía 10 minutos de desnaturalización a 95°C, seguidos de 35 ciclos de amplificación (10

seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de *annealing* de los respectivos oligos y 30 segundos a 72°C), finalizando con 5 minutos a 72°C. Se usaron los siguientes oligos bovinos: IL1A forward (5'-TCAAGGAGAATGTGGTGATG-3') IL1A reverse (5'- CTGGAAGCTG TAATGTGCTG-3'), ICAM1 forward (5'-CGTTAAGCTACACCCACCTT-3'), and ICAM1 reverse (5'-AGGTAAGGGTCTCCATCACA-3'). La diferencia de veces de cambio fue calculada por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) usando la ciclofilina A (PPIA) como gen constitutivo (housekeeping) con los oligos PPIA forward (5'-GGTCCCAGTTTTTCA TTTG-3') y reverse (5'- ATGGTGATCTTCTTGCTGGT-3').

7.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de comparaciones múltiples con la prueba de corrección de Bonferroni (el umbral de significancia se mantuvo a $p < 0.001$). El análisis se llevó a cabo con el software GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

8. Resultados

El objetivo de este trabajo fue modelar la vasoinhibina y ubicar su dominio antiangiogénico para poder entender su relación estructura-función. El logro de estos objetivos se basó en la generación de hipótesis basadas en el trabajo *in silico* de simulación por dinámica molecular (DM), y su posterior comprobación mediante la generación de isoformas recombinantes de distintos tamaños de vasoinhibina mediante técnicas de ingeniería genética con el fin de observar los efectos de las variantes estructurales sobre la actividad. El hecho de que actualmente no se conoce la estructura tridimensional de la vasoinhibina nos llevó a modelarla por simulación de DM (primer objetivo específico), para posteriormente determinar un dominio funcional putativo a través de la comparación con la estructura de la PRL (segundo objetivo específico), y finalmente validar la hipótesis del dominio funcional propuesto con una isoforma de vasoinhibina recombinante (tercer objetivo específico).

8.1. Estructura terciaria de la vasoinhibina

La determinación de la estructura de la vasoinhibina se llevó a cabo con una isoforma de vasoinhibina de 150 aminoácidos, la cual es generada de manera natural por el corte proteolítico en el L3 de la PRL con catepsina D (Piwnica et al., 2004) y que tiene un peso molecular de 17'146 Da. Este problema se abordó utilizando la estructura de la PRL (PDB 1RW5), el precursor de la vasoinhibina, de la cual ya ha sido determinada su estructura en condiciones solubles (Teilum et al., 2005). A partir de la estructura de la PRL, a la cual se le borró el fragmento C-terminal (aminoácidos 151 al 199) para dar origen a la Pre-vasoinhibina (Pre-Vi) (Figura 8.1.1), se llevaron a cabo simulaciones de DM de 20 ns, con la vasoinhibina y con la PRL, en condiciones fisiológicas de salinidad, temperatura y pH. Este análisis

permitió observar los cambios estructurales de la transición de PRL a vasoinhibina, y la estructura que permite la estabilidad de la molécula.

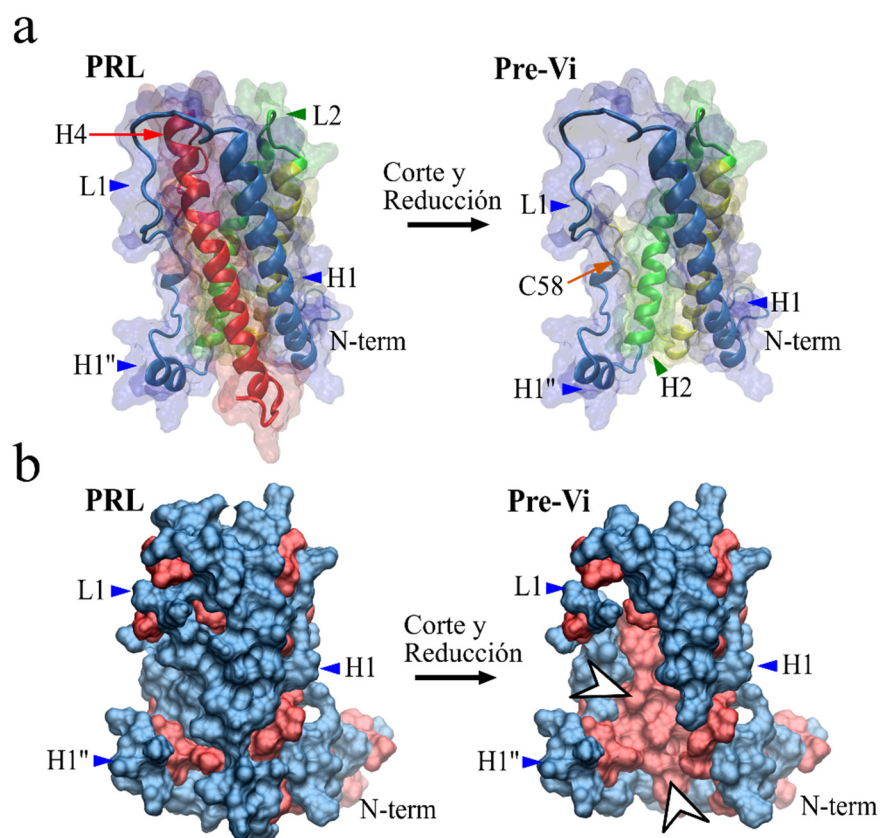


Figura 8.1.1. Exposición del núcleo hidrofóbico de la PRL después de la remoción de la H4. (a). Estructuras de la PRL y de la pre-vasoinhibina (Pre-Vi) de 150 residuos en representación de listones sobrepuesta con el modelo de superficie translucido para apreciar las distintas regiones. **(b).** Representación de la superficie hidrofílica (azul) e hidrofóbica (rojo) de los residuos en la PRL y en la Pre-Vi. El núcleo hidrofóbico expuesto de la Pre-Vi después de la pérdida de la H4 de la PRL está indicado (flechas blancas).

Las α -hélices de la PRL se agrupan en un racimo por interacciones intermoleculares no-covalentes principalmente (Keeler et al., 2003; Teilum et al., 2005; Huising et al., 2006). la unión covalente del puente disulfuro central (C58-174) que une a la L1 con la H4, sugiere su participación en la estabilidad del racimo. De hecho, la reducción específica de este puente

disulfuro, causa la pérdida de la actividad de PRL (Doneen et al., 1979), lo cual sugiere un rol estructural de este puente disulfuro que impacta en la señalización de la PRL (Brooks, 2012). No obstante, la reducción de C58-174 es requerida para separar el fragmento N-terminal del C-terminal después de la proteólisis enzimática, en la generación de la vasoinhibina (Figura 1.2). En este caso, la isoforma de vasoinhibina de 150 aminoácidos al remover la H4, expone su núcleo hidrofóbico (Figura 8.1.1). Esta conformación parcialmente plegada e inestable, sugiere la necesidad de cambios estructurales importantes que deriven en una molécula estable.

Para comprender los cambios estructurales que le permitan a la vasoinhibina ser una molécula estable, se llevaron a cabo simulaciones de DM de la PRL y de la vasoinhibina de 150 aminoácidos. El análisis de las trayectorias mostró que la vasoinhibina se compactaba más que la PRL, y que una vez que alcanzaba su mayor compresión, ésta se mantenía estable. El análisis de radio de giro (R_g) mostró que la pérdida de la H4 provocaba la compresión de la vasoinhibina a una estructura más compacta (~ 1.5 nm) que la PRL. La vasoinhibina alcanzaba el R_g mínimo alrededor de los 5 ns. La PRL no alteró su R_g durante la simulación (Figura 8.1.2a). Conforme la compresión de la vasoinhibina ocurrió, su área de superficie también se redujo ($\sim 20\text{nm}^2$), mientras que la PRL no sufrió cambios importantes (Figura 8.1.2b). Estos resultados sugieren que los cambios importantes ocurren en los primeros nanosegundos de la simulación. Para probar que la vasoinhibina se mantiene estable después de alcanzar los mínimos de R_g y de Área de superficie, se analizó la desviación de la media cuadrada media (RMSD, por sus siglas en inglés) y se observó que mientras la RMSD era estable para la PRL, en la vasoinhibina incrementó sustantivamente la RMSD durante los primeros ~ 5 ns, y posteriormente se estabilizó (Figura 8.1.2c).

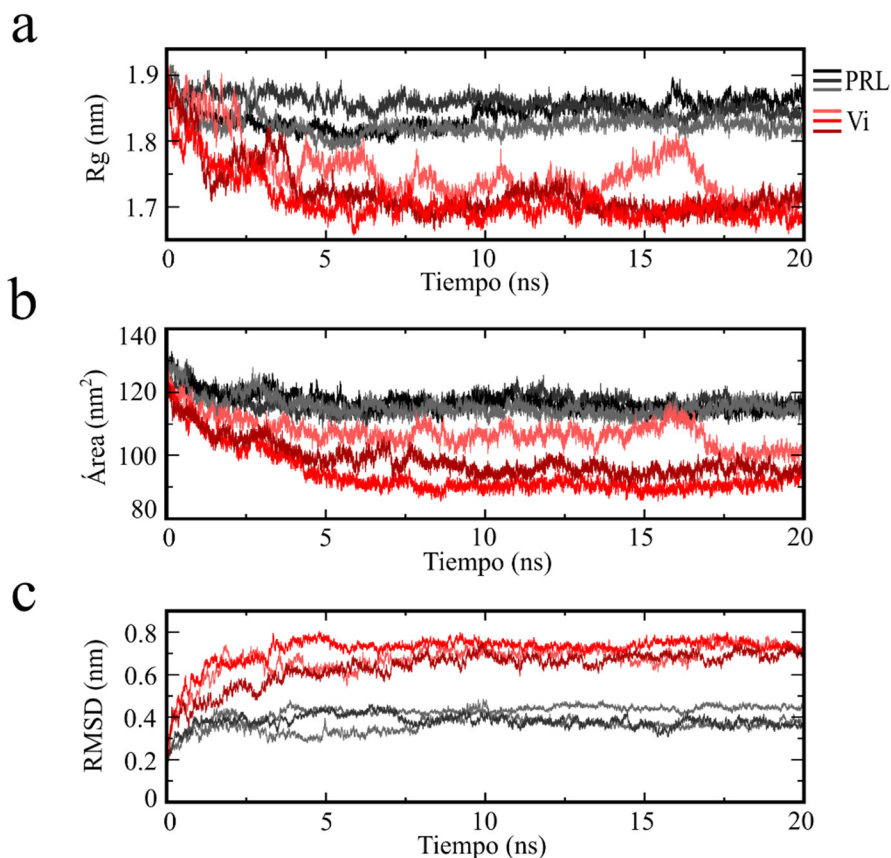


Figura 8.1.2. Compresión y estabilización de una isoforma de vasoinhibina de 150 aminoácidos (Vi). Radio de giro (Rg) (a), área de superficie (b) y la desviación de la media cuadrática (RMSD) (c) de la Vi en 20 ns de simulación de DM. Tres simulaciones diferentes para la Vi y para la PRL se llevaron a cabo en las mismas condiciones.

La comprensión observada en el análisis de trayectorias, nos llevó a preguntarnos qué región de la vasoinhibina era la responsable del cambio conformacional. Una región que se esperaba tuviera mucho movimiento en comparación con las demás regiones, era precisamente el L1, debido a que es desorganizada, y que en la PRL presenta muchas interacciones intramoleculares no-covalentes con residuos de la H4. Asimismo, el puente disulfuro C59-174 ocurre entre estas dos estructuras (L1 y H4) se encuentra reducido en la vasoinhibina,

dejando la C58 libre. Aunado a esto, la región L1 no mantiene una estructura secundaria particular. Todas estas características nos llevaron a sugerir que esta área se movía mucho y que podría estar involucrada en los cambios estructurales de la vasoinhibina.

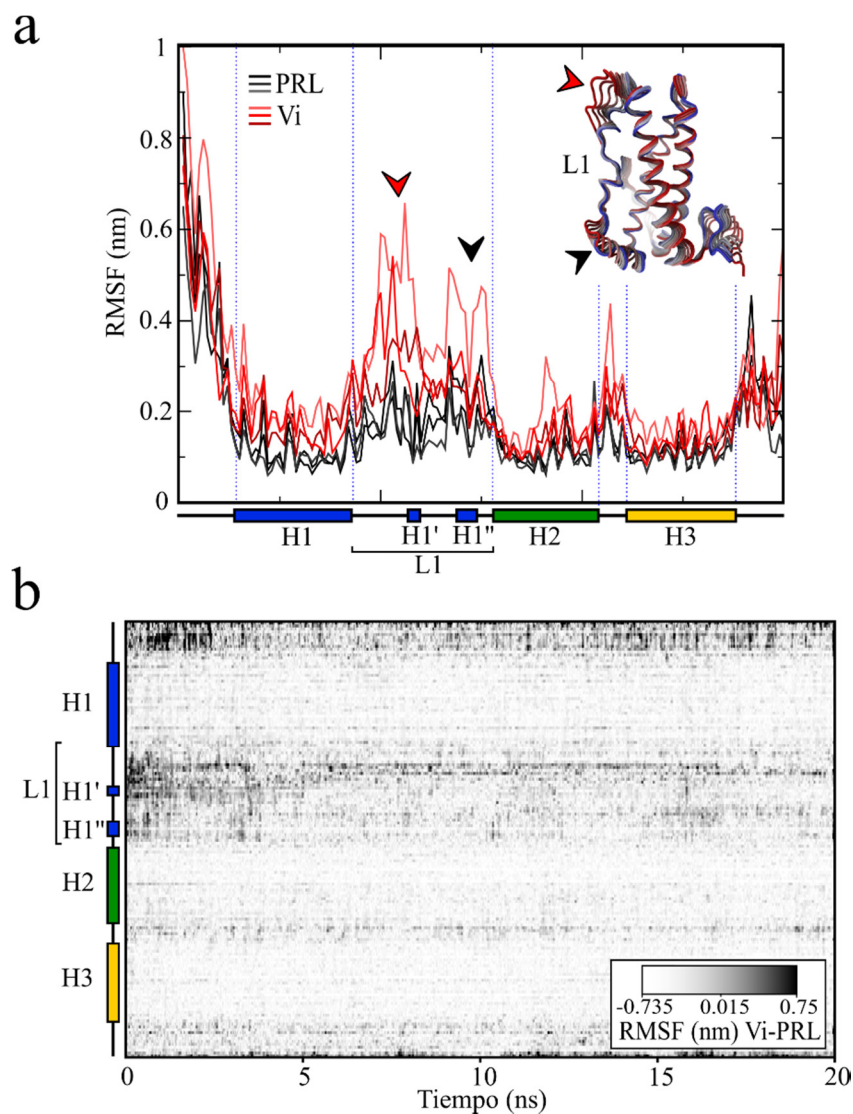


Figura 8.1.3. Regiones de mayor movimiento en la vasoinhibina (Vi). (a). Fluctuación total de la media cuadrática (RMSF) de la Vi y PRL durante 20 ns de simulación por DM. Dos zonas de discrepancia ocurren entre la Vi y la PRL dentro la L1, en la primera mitad (flecha roja) y la segunda mitad (Flecha negra). Las zonas de mayor movimiento en la región L1 se pueden observar en un modelo de tubos con las distintas estructuras a lo largo del tiempo superpuestas. El color rojo y azul representan el mínimo (0 ns) al máximo (20 ns), respectivamente. (b). Fluctuación promedio de la RMSF de la Vi normalizada con la PRL, a lo largo del tiempo.

El análisis de las trayectorias confirmó que la movilidad de la vasoinhibina durante su estabilización residía principalmente en la región L1. El análisis de las fluctuación de la media cuadrática (RMSF) de cada uno de los residuos, mostró discrepancias importantes en la región L1 entre la PRL y la vasoinhibina (Figura 8.1.3a).

Adicionalmente, la región N-terminal mostró un incremento en la movilidad vista por la fluctuación de la RMSF. Al igual que la región L1, durante los primeros 2.5 ns su intensidad fue mayor (Figura 8.1.3b).

La trayectoria de la DM se visualizó mediante el software VMD, y se analizaron los cambios estructurales. Se observó que la compresión de la vasoinhibina ocurría desde los 0.2 ns, en los cuales la estructura H1'' en la región L1, se acercaba a la H1, estableciendo contacto con aminoácidos de la H1 (Figura 8.1.4).

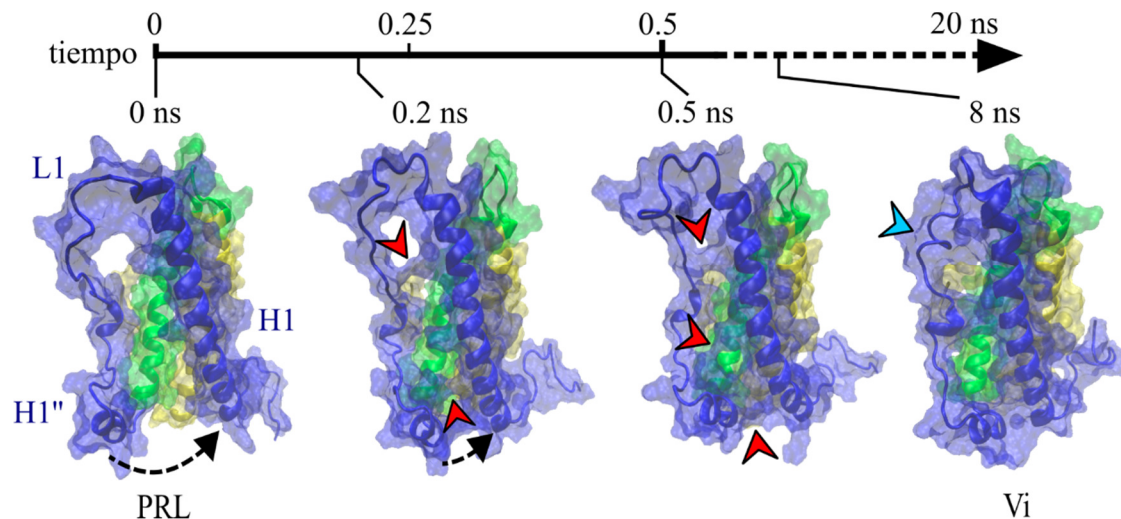


Figura 8.1.4. Visualización de la trayectoria de la vasoinhibina (Vi) desde PRL. Imágenes del cambio conformacional en distintos momentos de la simulación por DM. Se ilustra el movimiento de L1 hacia H1 en los primeros 0.2 ns (flechas negras). Se ilustra el movimiento de L1 hacia H1 en los primeros 0.2 ns (flechas negras). Las interacciones intramoleculares de residuos de L1 y H1 se señalan a los 0.2 y 0.5 ns (flechas rojas). Se observan cambios conformacionales más lentos (8 ns) con características de hélice (flecha azul).

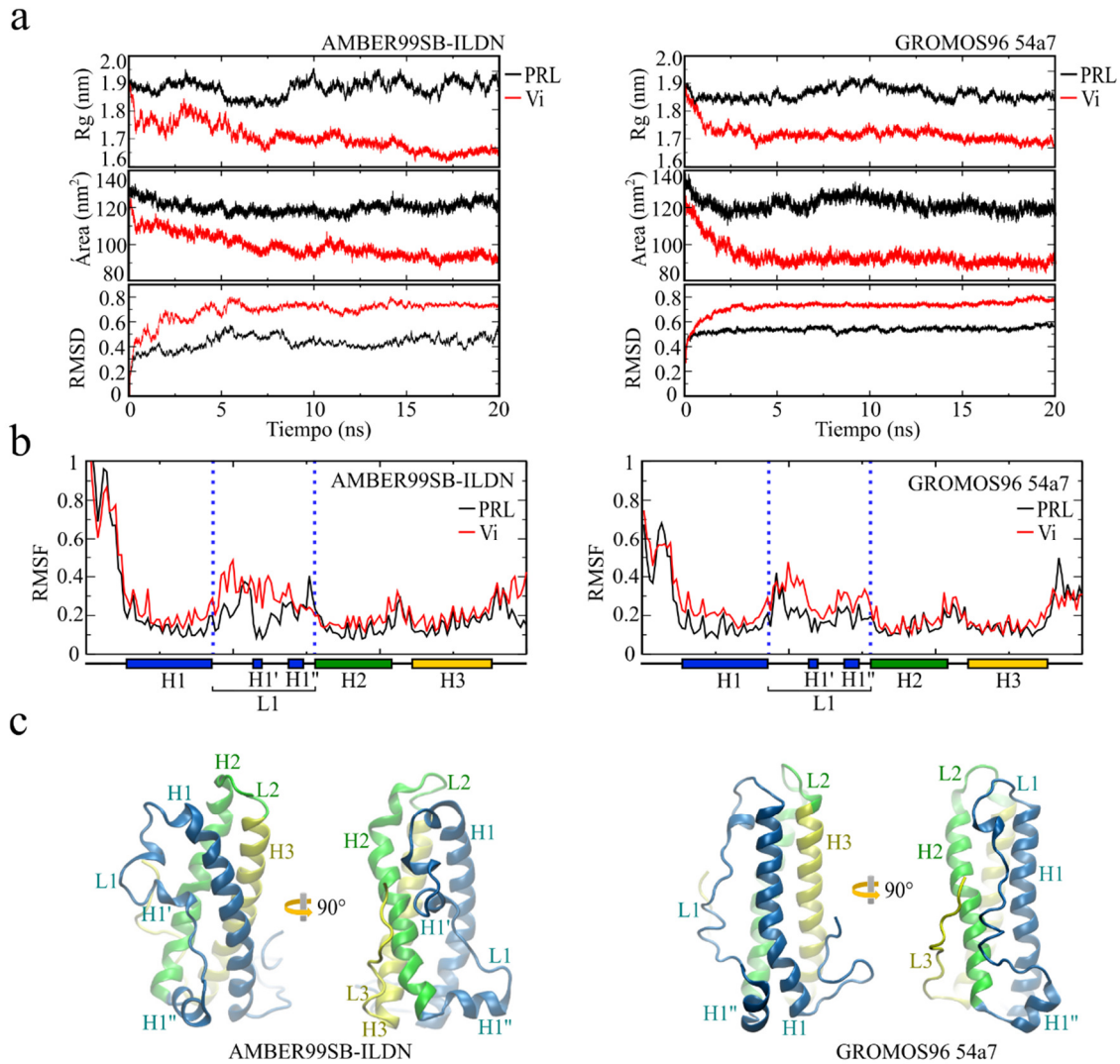


Figura 8.1.5. Análisis de trayectoria de vasoinhibina (Vi) con campo de fuerza AMBER99SB-ILDN o GROMOS96 54A7. (a). Radio de giro (Rg), área de superficie y la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) de una simulación molecular de 20 ns. **(b).** Fluctuación total de la raíz cuadrada media (RMSF) por residuo de la vasoinhibina relativo a la PRL. El loop 1 (L1) está flanqueado por líneas punteadas azules. **(c).** Estructura representativa de la vasoinhibina después de 20 ns de DM en una vista frontal y lateral.

La velocidad del colapso de la molécula, es muy probable que se deba a fuerzas hidrofóbicas generadas por la exposición del núcleo hidrofóbico (Figura 8.1.1). Estos contactos a lo largo de la simulación, se extienden a lo largo de L1 y H1. En particular la primera parte del L1,

después de 8 ns de DM, adquiere características de hélice, cambios que persisten hasta el final de las simulaciones (Figura 8.1.4). Lo cual soporta la idea de que la vasoinhibina alcanzan una estructura estable alrededor de los 8 ns. Estos resultados se replicaron con otros cambios de fuerza (GROMOS96 y AMBER22) (Figura 8.1.5).

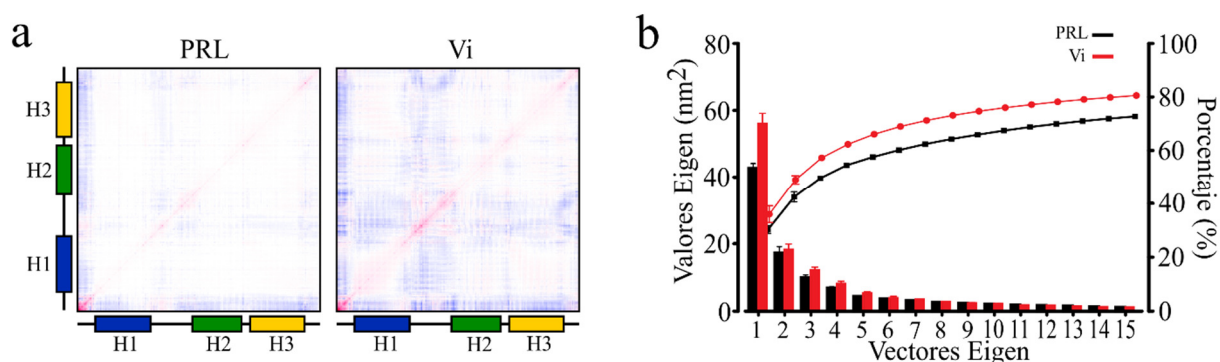


Figura 8.1.6. Análisis de componentes principales de la trayectoria de la vasoinhibina (Vi). (a). Matriz de covarianza promedio de la cadena de carbonos alfa de la PRL y de la vasoinhibina (Vi). Los movimientos correlacionados son rojos y los de poca correlación son azules. La intensidad del rojo en la diagonal de la matriz indica la amplitud de las fluctuaciones. (b). Los primeros 15 vectores eigen de la matriz de covarianza de la PRL y de la vasoinhibina (barras) y la suma acumulativa representado en porcentaje de la fluctuación total (líneas).

Para entender los movimientos fundamentales de la transición de PRL a vasoinhibina durante la simulación y comprobar lo observado anteriormente, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés). Inicialmente, se generaron matrices simétricas de covarianza utilizando la herramienta PCA de GROMACS. La vasoinhibina tuvo un movimiento altamente correlacionado dentro de la región L1, pero un movimiento poco correlacionado con otras estructuras de la molécula (H1, H2 y H3). Lo cual indica que la L1 es una región que tiene una gran fluctuación independiente de la molécula, comparado con la PRL (Figura 8.1.6). El análisis de los vectores eigen, reveló que los primeros 15

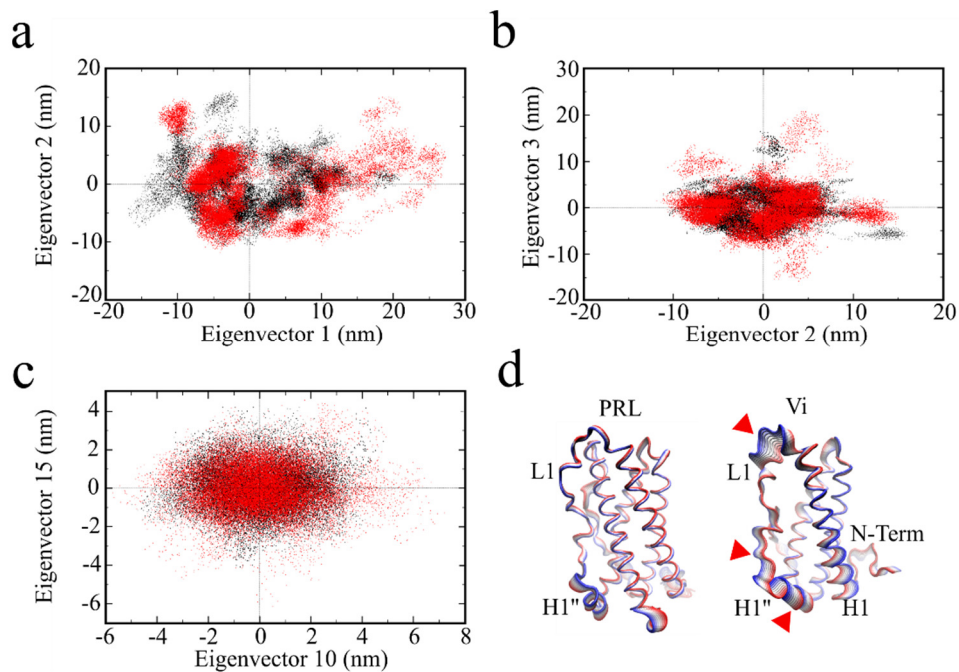


Figura 8.1.7. Proyecciones de los vectores eigen de la trayectoria de la vasoinhibina (Vi). Proyecciones de dos dimensiones de los vectores eigen de la PRL (negro) y de la vasoinhibina (rojo), proyección 1 y 2 **(a)**, 2 y 3 **(b)** y 10 y 15 **(c)**, la escala de cada proyección se ajustó a los datos. **(d)**. Proyección del primer vector eigen en la estructura de la vasoinhibina, representado en un modelo de tubos con las distintas estructuras a lo largo del tiempo superpuestas. El color rojo y azul representan el mínimo (0 ns) al máximo (20 ns), respectivamente. Se indican las zonas de mayor movimiento en el vector eigen 1 (flechas rojas).

vectores eigen ($>1 \text{ nm}^2$) contribuyen al 80.56 y al 72.70% del movimiento total en la vasoinhibina y la PRL respectivamente. En particular el vector 1, fue notablemente más elevado en la vasoinhibina (56 nm^2) que en la PRL (42 nm^2), representando el 35% y el 30% del movimiento total de la PRL y la vasoinhibina, respectivamente, indicando que el movimiento de la vasoinhibina estuvo menos limitado al subespacio y que tuvo mayor número de dimensiones, es decir, más movimiento (Figura 8.1.7).

8.2. Estructura secundaria de la vasoinhibina

La estructura secundaria de la PRL, como la de otros miembros de la familia de las citocinas helicoidales de clase 1 (Chaiken y Williams, 1996), está constituida por 4 α -hélices que se arreglan en un racimo (Teilum et al., 2005; Huising et al., 2006; Brooks, 2012). Hasta ahora se observó que la estructura de la PRL no parece estar alterada en 20 ns de simulación por DM. Asimismo, la vasoinhibina a pesar de sólo conservar las 3 primeras α -hélices de la PRL y de colapsar para dar lugar a una estructura más compacta, no parece sufrir cambios significativos en 20 ns en la estructura de las hélices. Para confirmar estas observaciones se procedió a realizar un análisis más profundo a la estructura secundaria de estas moléculas.

El análisis de la estructura secundaria reveló que las cuatro α -hélices y las 3 α -hélices de la PRL y de la vasoinhibina, respectivamente, se mantenían estables durante los 20 ns de la simulación (Figura 8.2.1). Sin embargo, en la vasoinhibina se observaron cambios importantes en la región L1. Después de los primeros ~ 5 ns de la simulación, la primera mitad del L1 la cual prevelece en forma de giro, comenzó a organizarse en una estructura helicoidal que fluctuaba entre α -hélice y hélice-3₁₀ (Figura 8.2.1b). Esta hélice fue nombrada H1_{vi} debido a su presencia exclusiva en la vasoinhibina. Asimismo, la H1' la cual en la PRL se mantenía como una hélice-3₁₀, en la vasoinhibina alternó con una conformación de α -hélice, lo cual se puede interpretar como una señal de relajación de esta región. Finalmente, la región N-terminal también sufrió cambios interesantes, mientras que en la PRL se organizaba en giros, α -hélices y hélices-3₁₀, en la vasoinhibina fluctuaba entre hoja- β y giros.

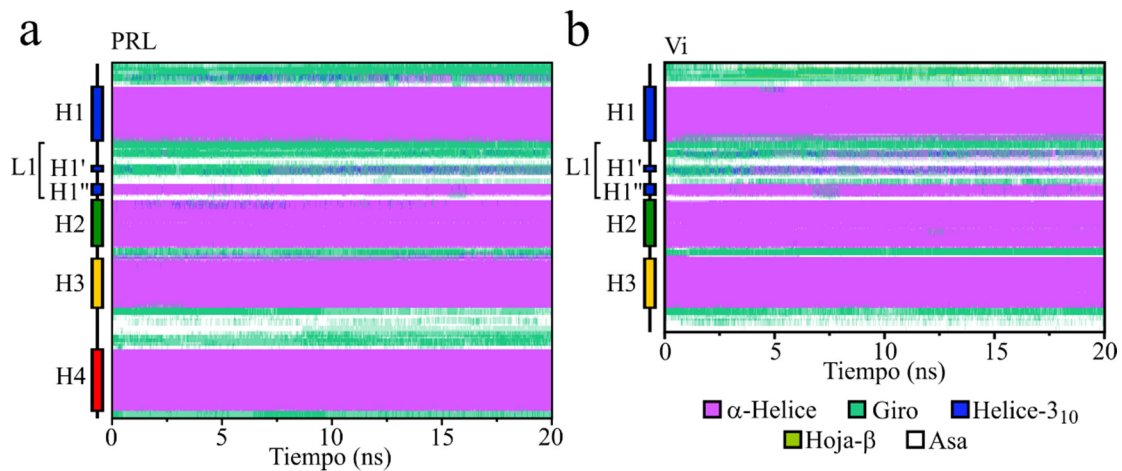


Figura 8.2.1. Análisis de estructura secundaria por residuo de la vasoinhibina (Vi). Perfil de estructura secundaria de los aminoácidos a través de la simulación de 20 ns de la PRL (a) y la vasoinhibina (b). Composición promedio de los análisis de 3 simulaciones independientes de DM.

Con el fin de entender mejor la tendencia a la formación de hélices, se comparó el porcentaje temporal de pertenencia de los distintos residuos a una α -hélice, en una simulación de DM de la vasoinhibina extendida a 200 ns (Figura 8.2.2). Este análisis indicó que las principales diferencias ocurrieron en los residuos de la L1, y que nuevas hélices se conservan mejor en la vasoinhibina en comparación con la PRL. Particularmente en los residuos del 50 al 53 y del 58 al 60, correspondientes a la $H1_{Vi}$ y a la $H1'$, respectivamente.

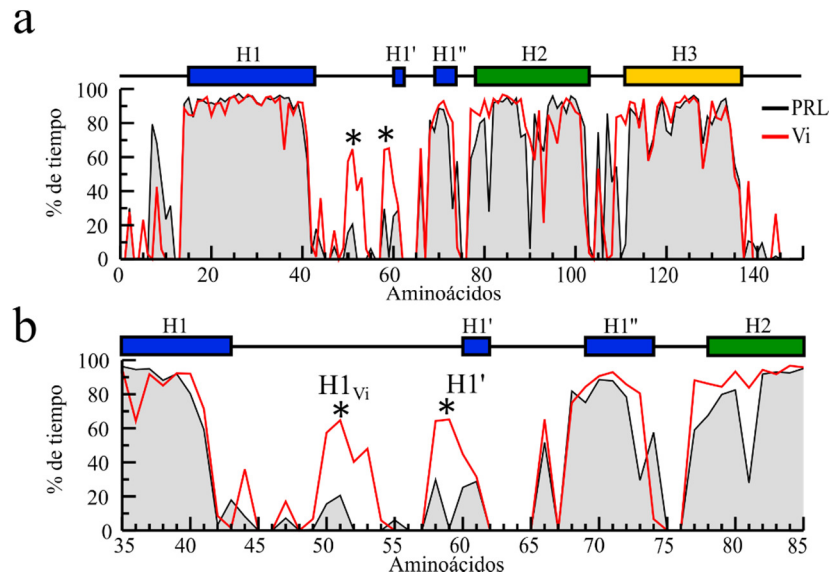


Figura 8.2.2. Porcentaje de helicidad de los aminoácidos de la vasoinhibina (Vi). Perfil de helicidad de los aminoácidos de la PRL y la Vi a través de la simulación de 200 ns. Se ilustra la secuencia total de la vasoinhibina **(a)** y un acercamiento a los aminoácidos del L1 **(b)**.

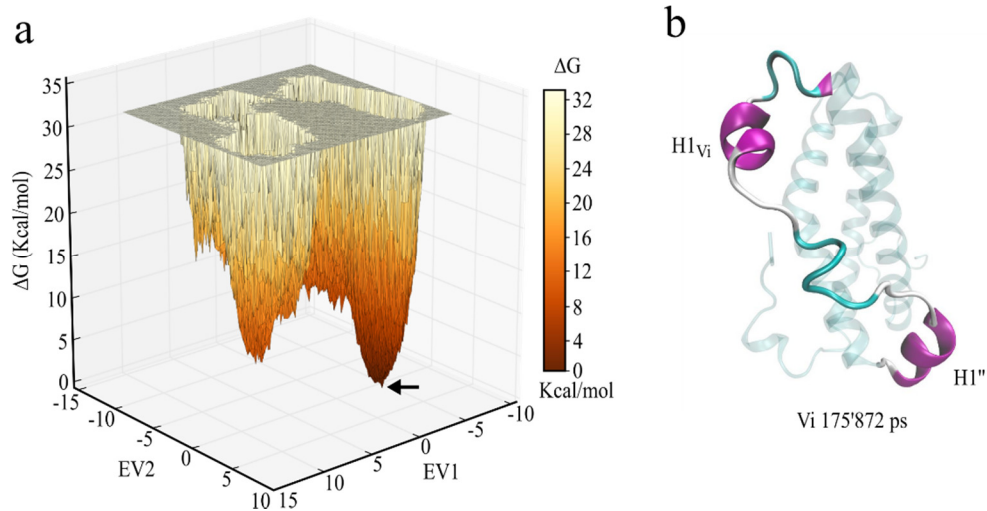


Figura 8.2.3. Identificación de la estructura nativa de vasoinhibina (Vi) mediante el análisis del perfil de energía libre. **(a).** Energía libre de la vasoinhibina a través de 200 ns de simulación por DM. El punto de energía mínima está indicado (flecha negra). **(b).** Estructura de la vasoinhibina del marco de 175'872 ps, el cual corresponde a la estructura con energía mínima.

Finalmente, para identificar la estructura nativa de la vasoinhibina, es decir, la estructura que requiere la energía mínima para permanecer plegada, se utilizó un análisis del perfil de energía libre (FEL, free-energy landscape), y después se seleccionó la estructura con la menor energía (Figura 8.2.3). El análisis de energía libre se llevó a cabo proyectando las trayectorias de los dos principales vectores eigen (EV1 y EV2) como coordenadas de reacción. De este análisis se identificó que la estructura que apareció en el marco del picosegundo 175'872, resultó tener la energía mínima de toda la simulación de 200 ns (Figura 8.2.3b). Esta estructura contenía una hélice H1_{Vi} evidente, pero una helice H1' desplegada, sugiriendo que la H1_{Vi} puede ofrecer mayor estabilidad a la molécula.

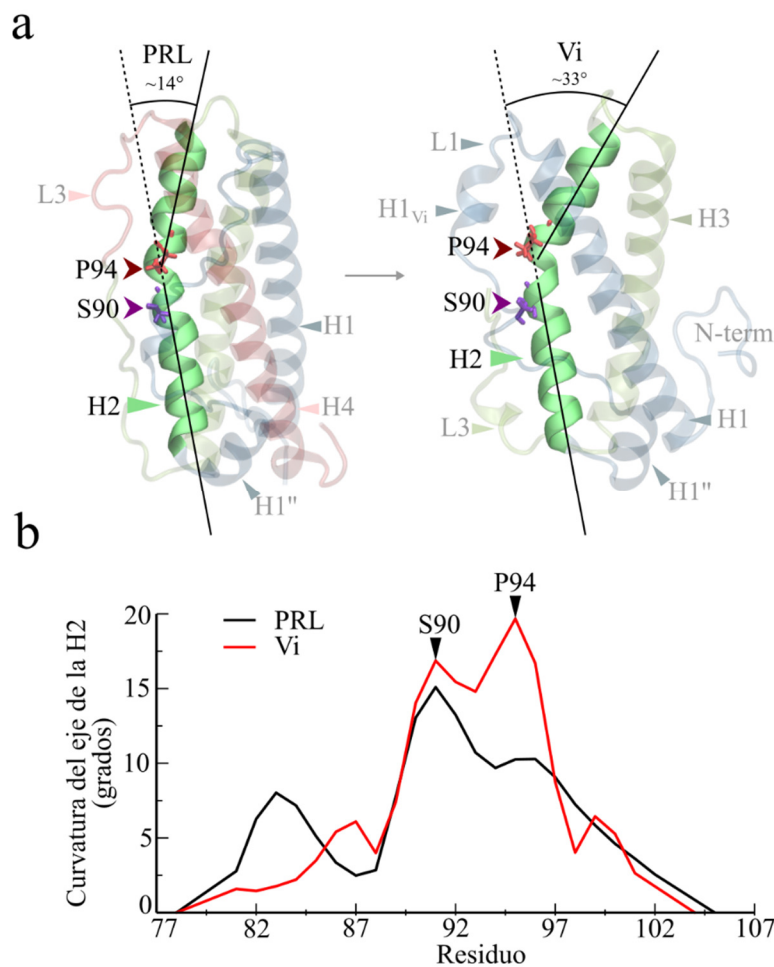


Figura 8.2.4. Análisis de la geometría de la H2 de la vasoinhibina (Vi). (a). Representación de caricatura de el pliegue en H2 en donde se indican los ángulos de PRL y Vi. La prolina 94 (P94) y serina 90 (S90) se indican y están representadas por enlaces. (b). Cuantificación de la curvatura a lo largo del eje de H2 en la PRL y Vi. Los puntos de inflexión máximos son indicados (P94 y S90).

Tanto la PRL como la vasoinhibina mostraron un pliegue en la H2, que corresponde a un doblez en el ángulo central de la hélice. Este doblez se debe a la prolina en la posición 94 (P94) la cual interfiere con la hélice y la pliega entre la serina en la posición 90 (S90) y la P94 (Figura 8.2.4a). El pliegue en la PRL es menos evidente debido a su ángulo de $\sim 14^\circ$ con el punto máximo de flexión en la S90, mientras que en la vasoinhibina tuvo un ángulo de $\sim 33^\circ$ con el punto máximo de flexión en P94 (Figura 8.2.4b). La ausencia de la H4 puede ser la explicación del incremento en el ángulo de flexión de la vasoinhibina.

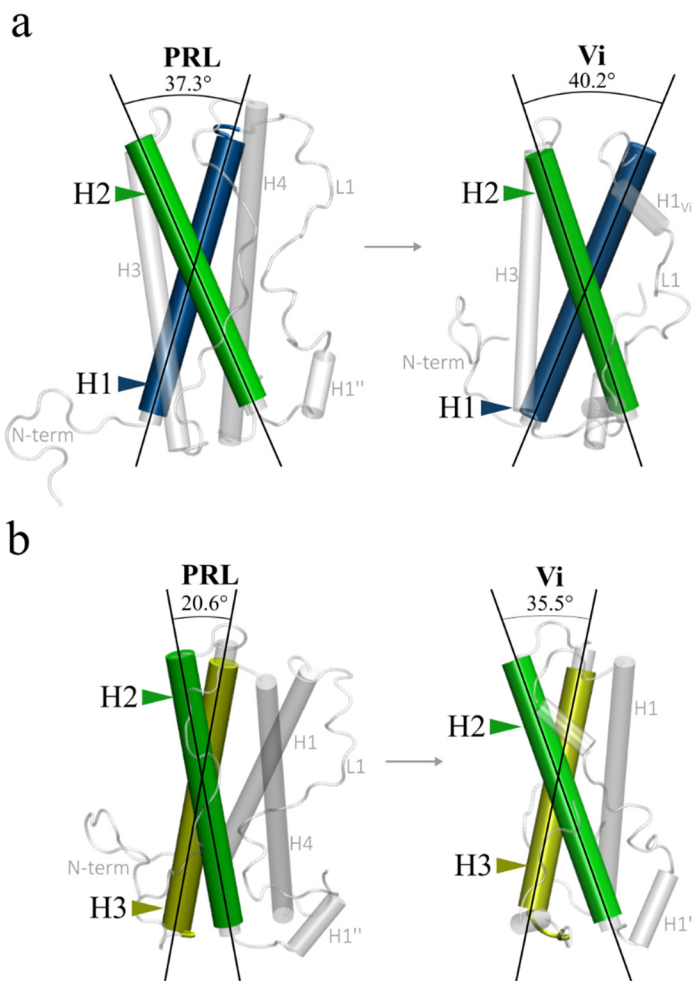


Figura 8.2.5. Análisis de los ángulos inter-hélice de la vasoinhibina (Vi). Ángulos inter-hélice de H1- H2 (a) y H2-H3 (b), la línea negra indica el eje de la hélice.

A pesar del pliegue en H2, el ángulo inter-hélice H2-H1 no cambió en la vasoinhibina (40.2°) con respecto a la PRL (37.3°) (Figura 8.2.5a). Pero, el ángulo H2-H3 sí incrementó a 35.5° en la vasoinhibina con respecto a 20.6° de la PRL (Figura 8.2.5b).

8.3. Superficie Accesible al Solvente de la vasoinhibina

La estructura terciaria y secundaria de la vasoinhibina difiere principalmente en la conformación del L1, con respecto a la PRL. Esta diferencia podría representar epítopes importantes para la actividad biológica de la vasoinhibina, de la cual carece la PRL. El hecho de que la vasoinhibina sea muy parecidas a su molécula precursora, hace evidente la importancia de buscar diferencias entre ambas, las cuales se podrían traducir en una configuración de la superficie distinta entre la vasoinhibina y la PRL. La exposición de diversos residuos en la superficie, la cual es importante para la actividad (Larsen et al., 1998), sería de las principales evidencias de cambios estructurales que nos permitiría localizar el dominio activo de la vasoinhibina. En este análisis se evaluó la accesibilidad al solvente de los distintos aminoácidos, así como las propiedades electrostáticas e hidrofóbicas de la vasoinhibina. Las diferencias con respecto a la PRL se consideraron elementos probables del dominio activo de la vasoinhibina.

El análisis del área de superficie accesible al solvente (SASA, por sus siglas en inglés) de una isoforma de vasoinhibina de 150 aminoácidos y de la PRL a través de una simulación de DM de 200 ns, mostró discrepancias importantes con respecto a la PRL particularmente en el L1, H3 y L3 (Figura 8.3.1a). No obstante, debido al hecho de que los residuos de H3 y L3 están ausentes en una vasoinhibina biológicamente activa de 123 aminoácidos, nos enfocamos en las diferencias de SASA localizadas en el L1, el cual es uno de los determinantes estructurales importantes para la estabilidad de la vasoinhibina (Figura 8.3.1b). Los residuos D41, R43, I51, I55, T60, S61, T65, Q71 y M75 tuvieron un SASA mayor en la vasoinhibina, comparado con la PRL. Mientras que los aminoácidos K53, A54, N56, H59, K69, Q73, N76 y Q77 tuvieron menor SASA en la vasoinhibina que en la PRL

(Figura 8.3.1b). Asimismo, se obtuvo el coeficiente (Q) diferencial SASA (ΔQ -SASA) a partir de la resta de los valores SASA de la conformación nativa de la PRL soluble (PDB 1RW5) (Teilum et al., 2005), y de los valores de la conformación mínima de la vasoinhibina (tiempo: 175872 ps, Figura 8.2.3).

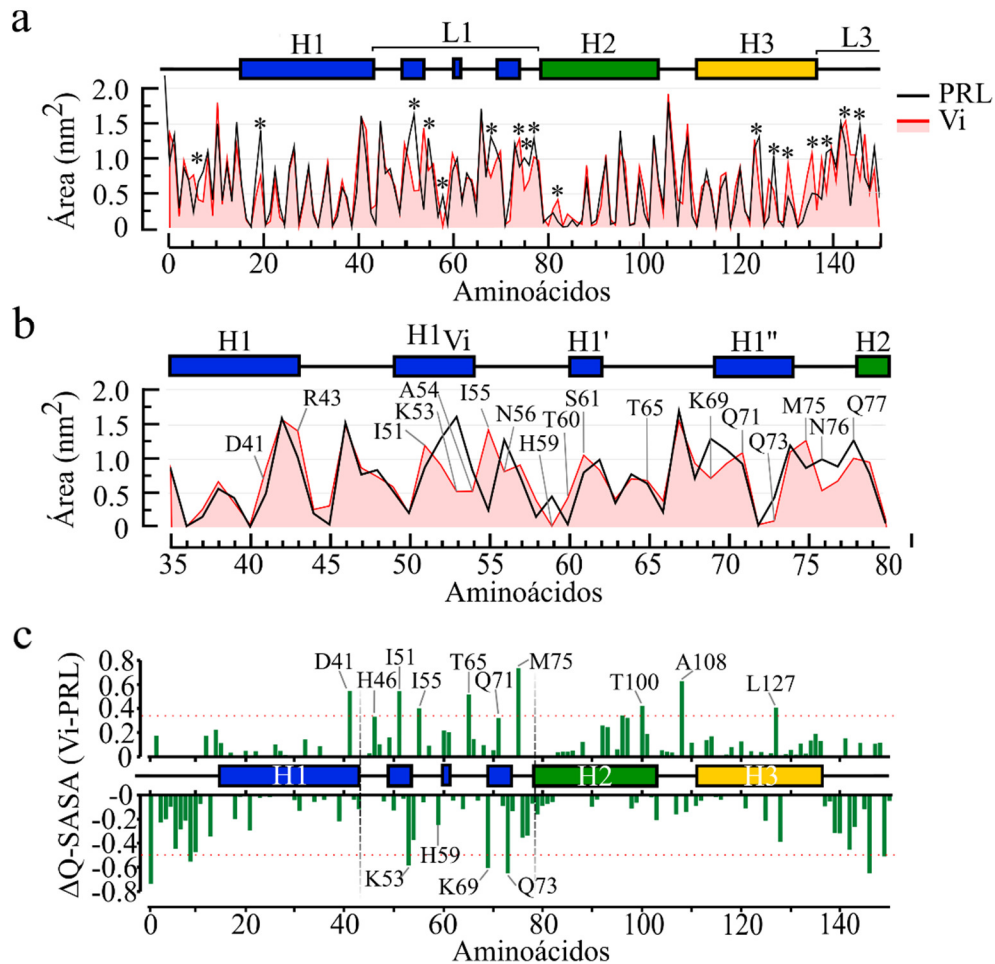


Figura 8.3.1. Área de superficie accesible al solvente (SASA) de la vasoinhibina (Vi). Promedio de SASA de PRL y Vi por residuo en 200 ns de simulación por DM. Las discrepancias más evidentes se indicaron (*) (a). Detalle del promedio de SASA en el L1, residuos con discrepancias se indicaron (b). Coeficiente diferencial de SASA (ΔQ -SASA) de la estructura de vasoinhibina de menor energía y la de la PRL. Los valores positivos o negativos indican que los residuos están más o menos expuestos, respectivamente, en la vasoinhibina con respecto a la PRL. Los residuos que cambiaron por arriba o por abajo del percentil 90 (líneas punteadas) son considerados significativamente más o menos expuestos, respectivamente.

Este análisis indicó que los aminoácidos D41, H46, I51, I55, T65, Q71 y M75 se encontraban más expuestos al solvente, y los residuos K53, K69 y Q73 estaban menos expuestos en la vasoinhibina en comparación con la PRL (Figura 8.3.1c), y por lo tanto, estos residuos podrían formar parte del dominio bioactivo.

Por otro lado, algunos residuos en la región del loop N-terminal de la vasoinhibina, tuvieron una SASA menor que en la PRL (Figura 8.3.1c), lo cual sugiere que esta región adquiere una mayor estabilidad estructural en la vasoinhibina. Esta observación es consistente con el análisis de RMSF en el que se observó que el loop N-terminal tenía una fluctuación mayor en los primeros 2.5 ns de simulación (Figura 8.1.3). Además, esta región mostró fluctuaciones entre estructuras de hoja- β y de giros, distinta a la PRL, lo cual la coloca como una de las estructuras probablemente importantes en su actividad o estabilidad (Figura 8.2.1).

8.4. Potencial electrostático de la superficie de la vasoinhibina

La nueva configuración de la superficie involucró cambios en distintos residuos con propiedades electrostáticas, lo cual nos llevó a analizar el impacto de este cambio estructural en las propiedades electrostáticas de superficie. La representación del potencial electrostático en la superficie de ambas proteínas en su conformación nativa muestra que mientras que la PRL tiene una superficie equilibrada en cargas, la vasoinhibina tienen una superficie predominantemente negativa, localizada en la región del L1 (Figura 8.4.1b). Mientras que el resto de la molécula prácticamente no mostraba cambios. Estos cambios electrostáticos están influenciados por la menor exposición de los residuos básicos K53, H59 y K69. Mientras que los residuos ácidos del L1 (D41, E67, D68 y E79), prácticamente no modificaron su exposición en la superficie.

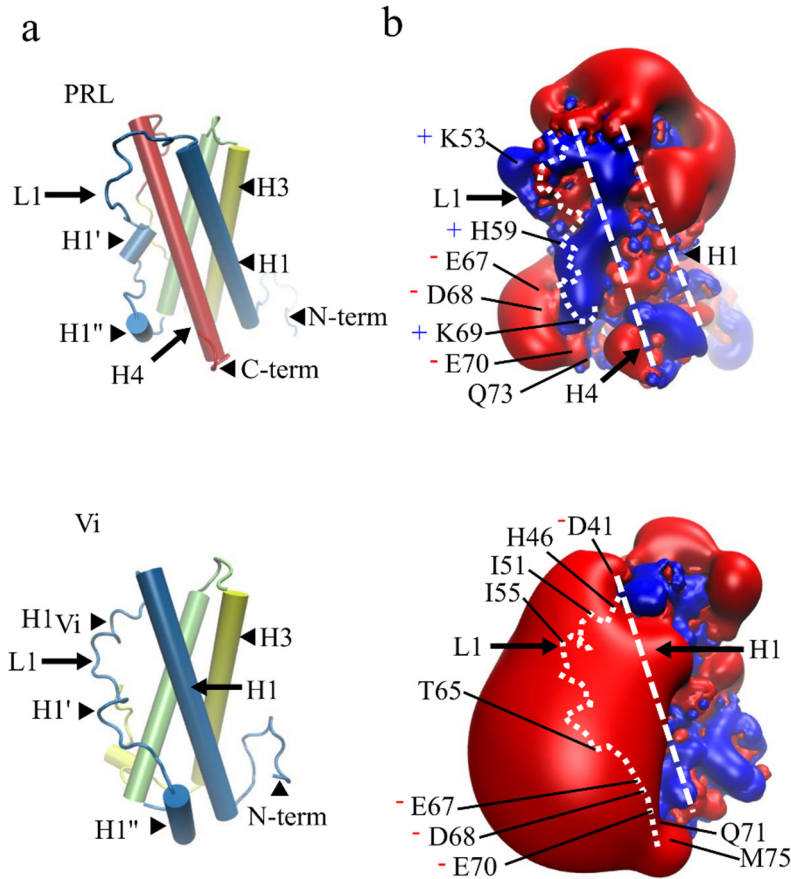


Figura 8.4.1. Potencial electrostático de superficie de la vasoinhibina (Vi). (a). Representación de tubos de la PRL (arriba) y de la vasoinhibina (abajo). (b). Potencial electrostático positivo (azul) o negativo (rojo) de la isosuperficie (nivel de contorno $\pm 2 \text{ KTe}^{-1}$) de la PRL y vasoinhibina. La posición de la H1, H4 y L1 están indicados con líneas punteadas. Los aminoácidos significativos en el cambio de exposición al solvente (SASA) están indicados. Los aminoácidos ácidos (-) y básicos (+) involucrados en el cambio de potencial están indicados.

Debido a que los residuos cargados que se internalizan en la proteína requieren de la formación de puentes de sal específicos, se llevó a cabo un análisis computacional con el servidor ESBRI (Costantini et al., 2008) para determinar los puentes de sal en la PRL y en la vasoinhibina. La PRL contiene distintos puentes de sal intramoleculares, la mayoría de ellos se encuentran entre estructuras laterales, excepto por el R164-E101 el cual atraviesa el núcleo de la molécula. Los residuos K53 y K69 se internalizan en la vasoinhibina, ambos están

localizados en L1 y forman puentes de sal con E93 en la H2 y D20 en la H1 (Figura 8.4.2a). El análisis de la distancia mínima de estos residuos involucrados en puentes de sal, mostró que el enlace K53-E93 es menos estable que el K69-D20 (Figura 8.4.2b).

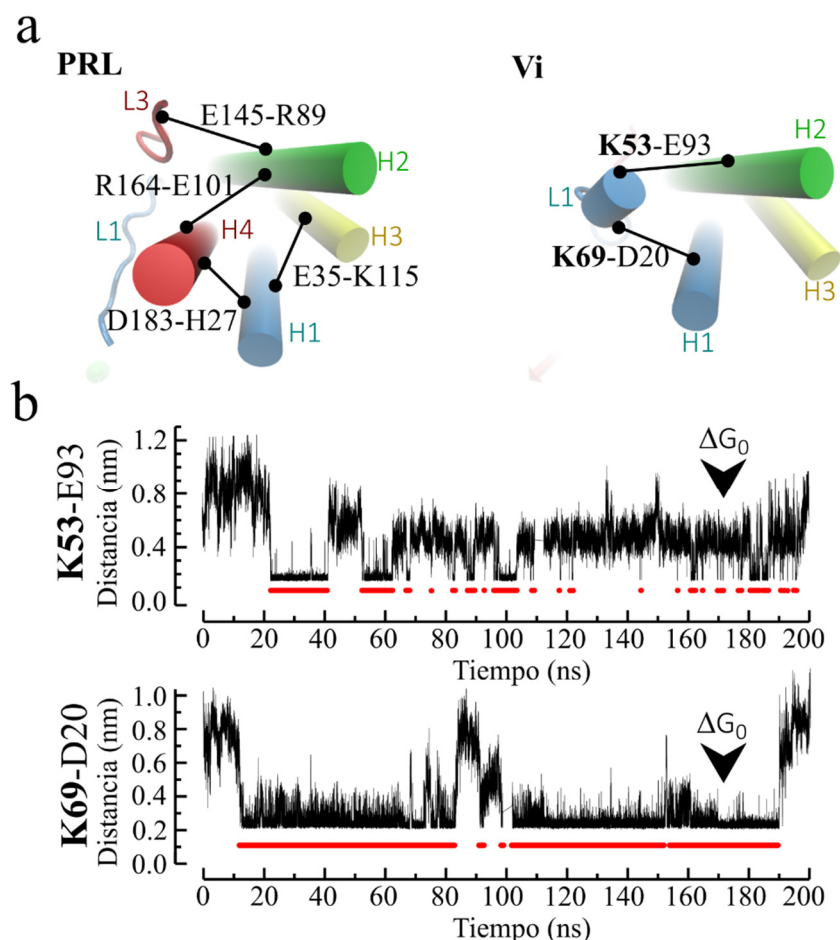


Figura 8.4.2. Análisis de los puentes de sal intermoleculares de la vasoinhibina (Vi). (a). Esquema de la PRL (PDB 1RW5) y la conformación de mínima energía de la vasoinhibina vista desde arriba del racimo de hélices y *loops* para ilustrar los puentes de sal. L1 no tiene puentes de sal en la PRL. La Vi forma puentes de sal con los aminoácidos K53 y K69 en L1, los cuales se porean con E93 y D20, respectivamente. (b). Análisis de la distancia mínima entre K53 y E93, y K69 y D20 durante 200 ns de DM. La línea roja indica la distancia mínima alcanzada por estos residuos. Esto se consideró indicativo de la formación de puentes de sal. La cabeza de flecha indica el tiempo donde ocurrió la estructura de mínima energía de vasoinhibina (ΔG_0).

8.5. Potencial hidrofóbico de la superficie de la vasoinhibina

La hidrofobicidad es una de las fuerzas primarias que participan en la interacción proteína-proteína (Larsen et al., 1998). Específicamente en la región H1-L1, diversos residuos hidrofóbicos se exponen más en la superficie de la vasoinhibina que en la de la PRL (Figura 8.5.1). Por lo cual, esta región podría ser un sitio importante para la formación de complejos vasoinhibina-proteína que pudiera estar regulando su actividad biológica. Los sitios hidrofóbicos incluyen la región de H1_{Vi} y la región H1'' en donde, respectivamente, los residuos I51, A54 y I55, y los residuos L63, A64, P66 y A72 se exponen más en la vasoinhibina que en la PRL (Figura 8.5.1b).

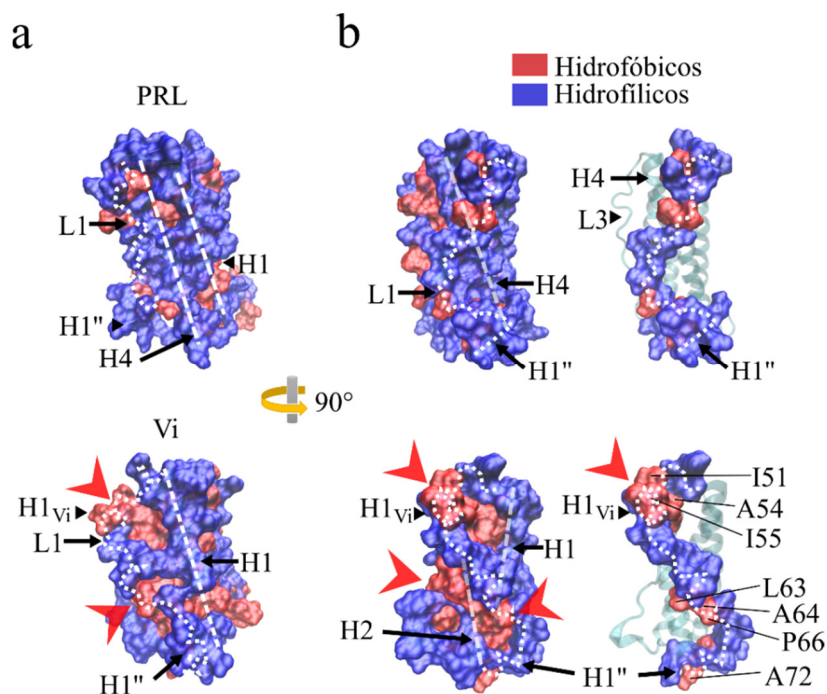


Figura 8.5.1. Superficie hidrofóbica de la vasoinhibina (Vi). Representación de la superficie de la PRL y las Vi de frente (a) y lateral (b) de los aminoácidos hidrofílicos (azul) e hidrofóbicos (rojos). Las regiones con cambios de hidrofobicidad están indicadas (flechas rojas). Los aminoácidos involucrados en los cambios de hidrofobicidad se indican en la vista lateral en superficie del L1 (b).

Con el fin de evaluar con mayor detalle las propiedades hidrofóbicas de la vasoinhibina, se calculó el potencial hidrofóbico molecular (Pyrkov et al., 2009) de ambas proteínas, y se proyectó en un mapa esférico de 2 dimensiones utilizando el método de topografía de superficie de proteínas (Koromyslova et al., 2014) (Figura 8.5.2). En la PRL, se observa que la superficie molecular del H4, colinda en sus fronteras con el H1 y el L1, sin que estas regiones (H1 y L1) colinden. En contraste, la vasoinhibina muestra a las regiones H1 y L1 con una frontera entre ellas, y a lo largo de toda su superficie.

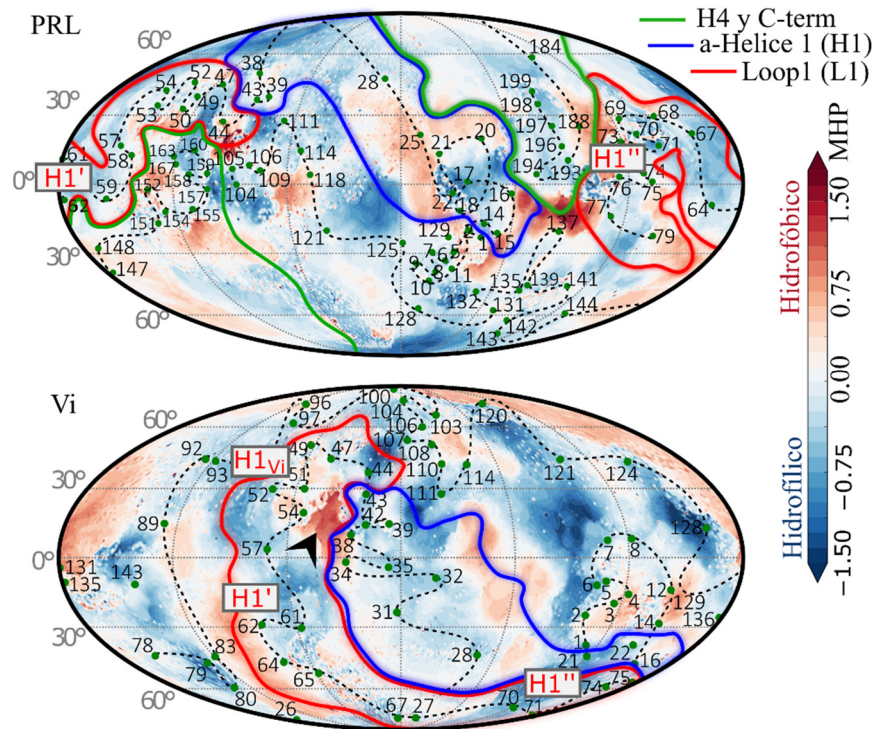


Figura 8.5.2. Potencial hidrofóbico de superficie de la vasoinhibina (Vi). Representación del potencial hidrofóbico mediante el método de topografía de superficie de la PRL y las vasoinhibina (Vi) Algunos aminoácidos están indicados (puntos verdes) y conectados secuencialmente (línea punteada). Los parches de colores representan las distintas regiones de estructuras secundarias de la PRL y la vasoinhibina. Las estructuras secundarias del L1 (H1_{vi}, H1' y H1'') se indican. La zona de alta hidrofobicidad está indicada (cabeza de flecha negra).

Esta nueva configuración de superficie es la característica diferencial más notable entre PRL y vasoinhibina, por lo cual podría ser parte del dominio funcional de la vasoinhibina. Consistente con esta posibilidad, un sitio altamente hidrofóbico se localizó precisamente en esta colindancia entre H1 y L1, al nivel de H1_{vi} (Figura 8.5.2). El hecho de que la hidrofobicidad participa en la interacción proteína-proteína (Larsen et al., 1998), sugiere que este bolsillo hidrofóbico podría favorecer la interacción de la vasoinhibina con su receptor, y esto determinaría su bioactividad. Asimismo, a favor de esta idea, se observa que una región hidrofóbica en los límites de H1-L1 y H4 en la PRL, es parte del sitio de unión 2 de la PRL a su receptor (Brooks, 2012).

Este análisis indica que la región L1 es un determinante estructural en la vasoinhibina. Los cambios en las propiedades electrostáticas e hidrofóbicas sugieren su participación en la actividad de la vasoinhibina.

8.6. Dinámica molecular de distintas isoformas de vasoinhibina

La vasoinhibina es una familia de péptidos de distintos pesos moleculares que van desde 123 a 159 aminoácidos, los cuales son determinados por la enzima que los genera a partir del corte proteolítico de la PRL. La catepsina D produce 3 fragmentos dominantes de 132, 147 y 150 aminoácidos, de 15, 16.5 y 17 kDa, respectivamente (Piwnica et al., 2004). Las metaloproteasas de matriz cortan a la PRL principalmente entre los residuos 155 y 156 generando una isoforma dominante de 17.7 kDa (Macotela et al., 2006). Finalmente, la proteasa morfogenética de hueso genera la isoforma de mayor tamaño (18 kDa) que comprende los primeros 159 aminoácidos de la PRL (Ge et al., 2007). Adicionalmente, otras isoformas de vasoinhibina se han producido de manera recombinante, mediante la inserción

de un codón de paro en la secuencia de la PRL en la lisina 124 (K124) o en la glicina 140 (G140) para las isoformas de 123 (Clapp et al., 1993) o 139 aminoácidos (Struman et al., 1999), respectivamente.

Para confirmar los cambios estructurales observados en la vasoinhibina de 150 aminoácidos, se llevaron a cabo simulaciones de DM de la PRL y distintas isoformas de vasoinhibina que abarcan todo el rango de 123 a 159 aminoácidos, y que han resultado ser bioactivas. El análisis de trayectorias mostró que las distintas isoformas de vasoinhibina se compactaban más que la PRL y que su compresión parecía ser estable y converger a excepción de la de 123 aminoácidos (Figura 8.6.1a). El grado de compresión en los últimos 10 ns de la DM fue

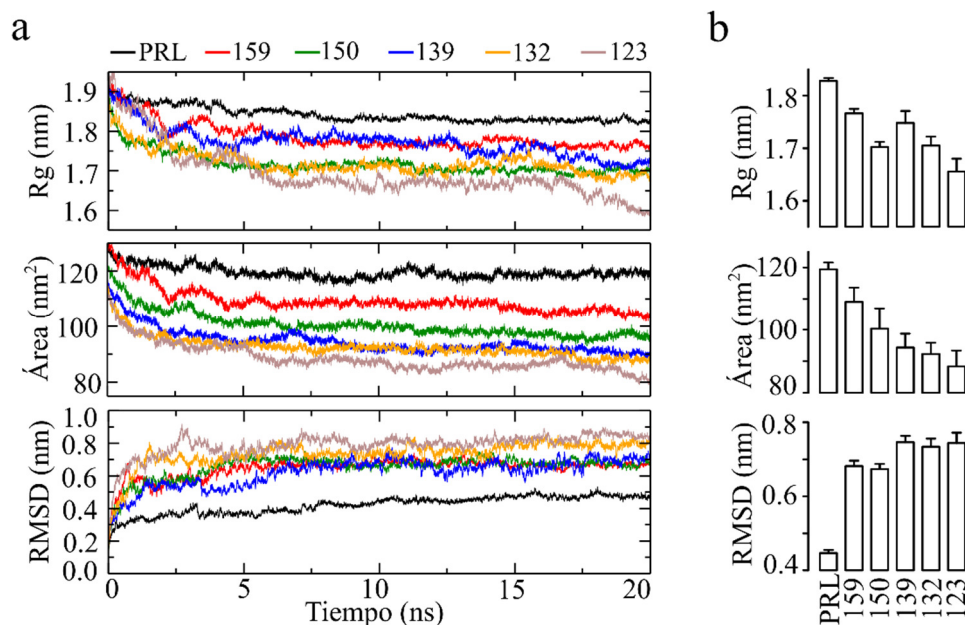


Figura 8.6.1. Análisis de trayectoria de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi). (a). Radio de giro (Rg), área de superficie y la desviación de la raíz cuadrada media (RMSD) de una simulación molecular de 20 ns. (b). Promedio y desviación estándar de la Rg, el área de superficie y la RMSD de los últimos 10 ns de la trayectoria.

menor para las isoformas de vasoinhibina más pequeñas, a excepción de la de 150 aminoácidos (Figura 8.6.1b). Estos resultados confirman que la compresión de la vasoinhibina ocurre en los primeros ns de la simulación. Asimismo, como era de esperarse el área de superficie mostró una reducción de acuerdo al tamaño de las distintas isoformas. Para confirmar que las distintas isoformas se mantenían estables se analizó la desviación de la media cuadrática (RMSD), en la cual se observó que la RMSD de la PRL no cambió mientras que las de todas las isoformas aumentaron significativamente en los primeros nanosegundos, comparado con la PRL, y posteriormente se estabilizaron (Figura 8.6.1). El RMSD de las isoformas de mayor tamaño (150 y 159 aminoácidos) fue menor al de las otras isoformas, lo cual puede deberse a una estabilidad conferida por el L3 (Figura 8.6.1b).

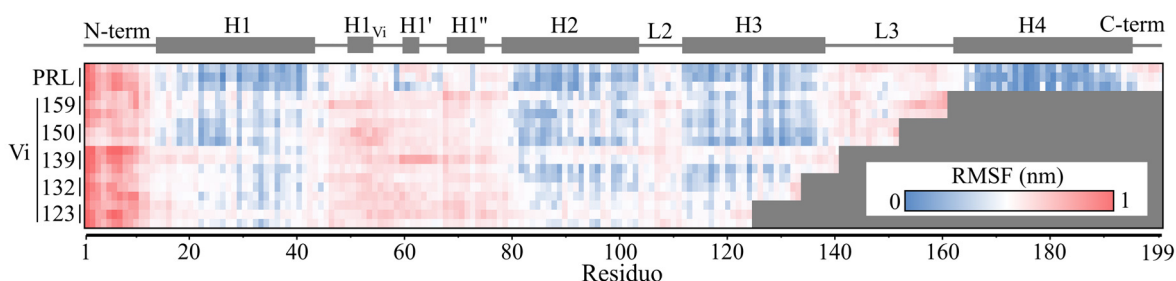


Figura 8.6.2. Fluctuación de la media cuadrática (RMSF) de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi). Raster de la fluctuación total de la media cuadrática (RMSF) de las distintas isoformas de vasoinhibina (Vi) y PRL durante 20 ns de simulación por DM. La discrepancia más significativa de las isoformas de vasoinhibina con la PRL ocurre a lo largo del L1. Análisis de tres simulaciones independientes.

Enseguida, se evaluó la región de las isoformas de vasoinhibina de mayor movimiento mediante el análisis de la fluctuación de la media cuadrática (RMSF) de los residuos. Las distintas isoformas de vasoinhibina tuvieron una fluctuación incrementada común en el área

del L1 lo que sustenta la observación de que esa región es la de mayor movimiento en las isoformas activas de vasoinhibina (Figura 8.6.2).

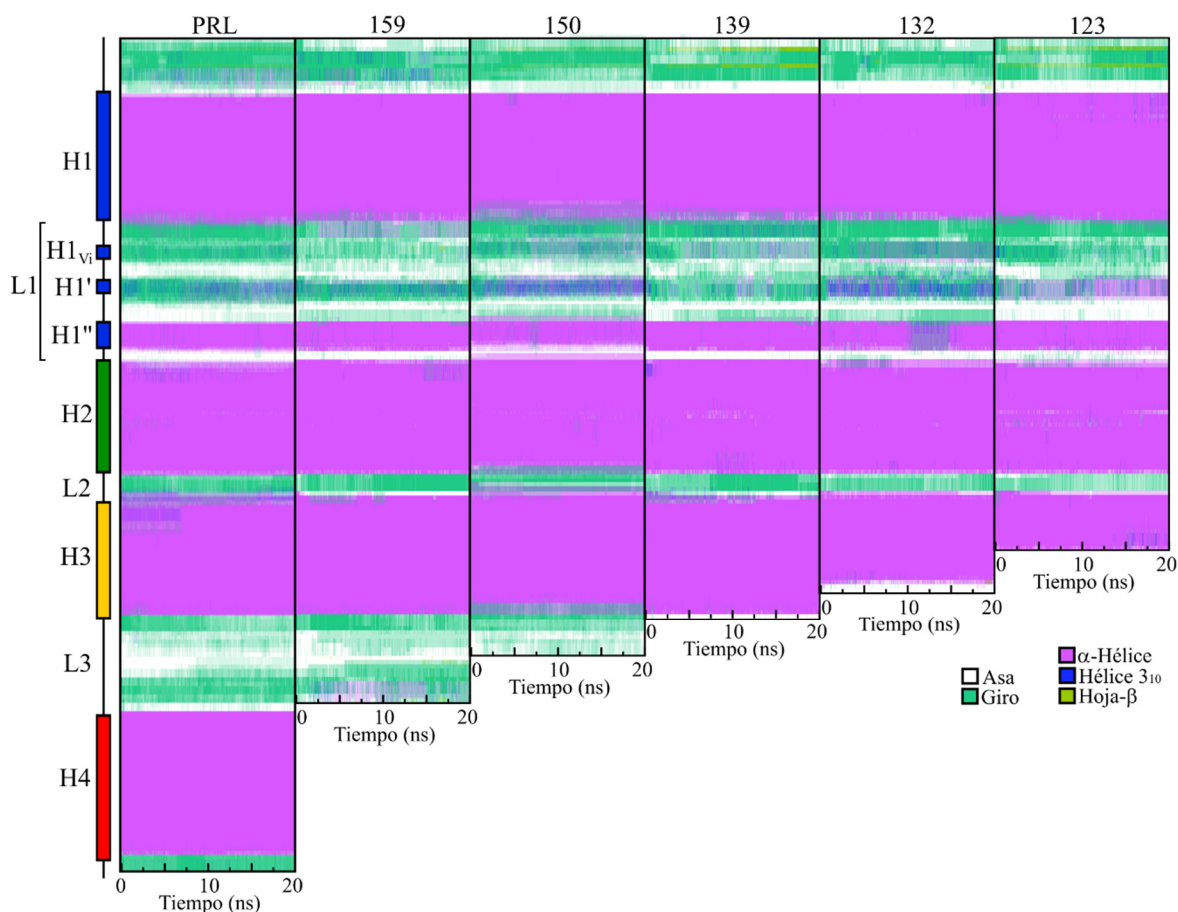


Figura 8.6.3. Análisis de la estructura secundaria de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi). Perfil de estructura secundaria de los aminoácidos a través de la simulación de 20 ns de la PRL y las distintas isoformas de vasoinhibina. Composición promedio de los análisis de por lo menos tres simulaciones independientes de DM para cada isoforma.

El análisis de la estructura secundaria reveló que las α -hélices de las distintas isoformas de vasoinhibina se mantienen durante una simulación de 20 ns, incluso las que truncan a la H3 (isoforma de 132 y 123 aminoácidos) (Figura 8.6.3). Sin embargo, en la región L1 se observaron cambios importantes para todas las isoformas, con tendencia de α -hélice en la

H1' para la isoforma de 123 aminoácidos, y una hélice 3_{10} dominante en las isoformas de 150 y 132 aminoácidos. Para las isoformas de 150, 139 y 132 fue más evidente la tendencia a formar hélices en la región denominada H1_{Vi} (Figura 8.6.3). Sin embargo, este análisis extendido a distintas isoformas de vasoinhibina sugiere una naturaleza desorganizada en la región del L1. Sin embargo, para confirmar la tendencia a formar hélices en esta región con respecto a la PRL, se analizó la helicidad de las distintas isoformas (Figura 8.6.4), la cual no mostró cambio entre las isoformas y la PRL, pero si en la desviación estándar, lo que soporta la idea de una estructura desorganizada de L1. La normalización del porcentaje de helicidad con respecto a la PRL, evidenció los cambios, los cuales se concentraron en el L1, y en la H2 con una mayor tendencia a formar hélices (Figura 8.6.4).

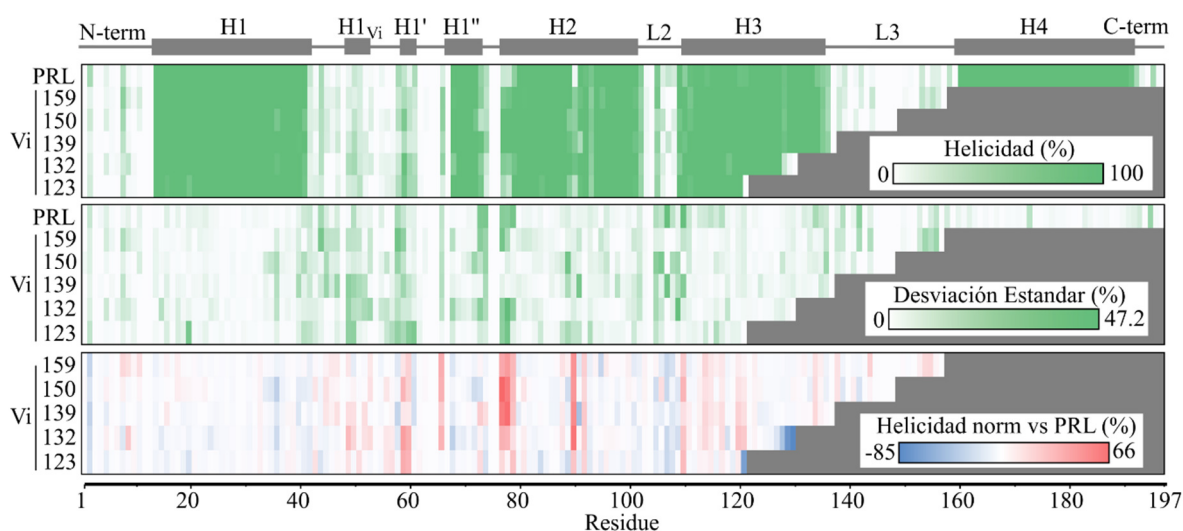


Figura 8.6.4. Porcentaje de helicidad de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi). Raster del promedio del porcentaje de helicidad de los aminoácidos de distintas isoformas de vasoinhibina a través de 20 ns (arriba), la desviación estándar de la helicidad (en medio) y la helicidad normalizada a la de la PRL (abajo) de tres simulaciones independientes. Las mayores discrepancias en la desviación estándar y contra la PRL se localizaron en el L1.

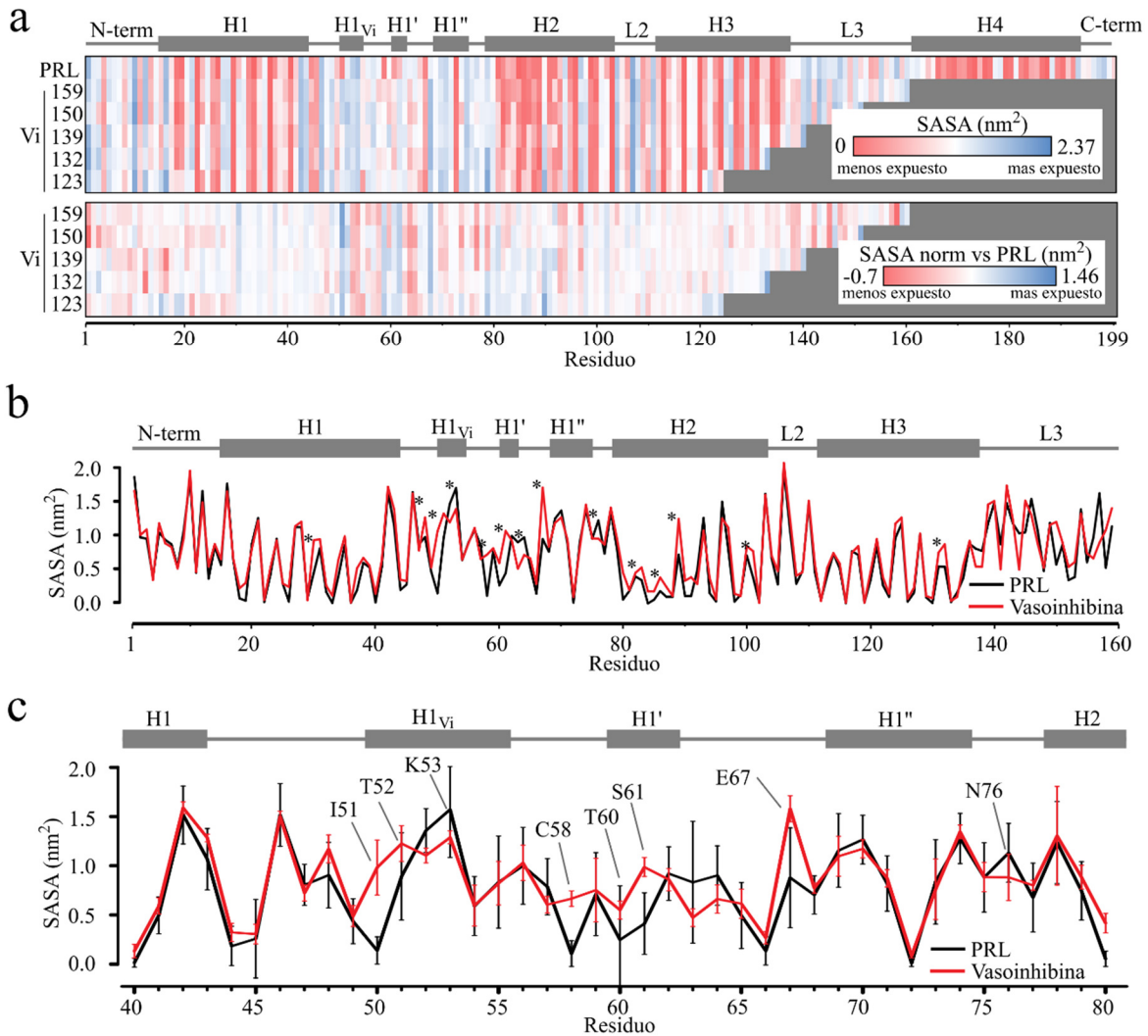


Figura 8.6.5. Área de superficie accesible al solvente (SASA) de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi). (a). Raster del promedio de SASA de PRL y de las distintas isoformas de vasoinhibina por residuo en 20 ns de simulación por DM (arriba) y el SASA normalizado contra la PRL (abajo) promedio de tres simulaciones independientes. Las mayores discrepancias contra la PRL se localizaron en el L1. (b). Promedio de SASA de PRL y de todas las isoformas de vasoinhibina por residuo en 20 ns de simulación por DM. Las discrepancias más evidentes se indicaron (*). (c). Detalle del promedio de SASA en el L1, residuos con discrepancias se indicaron.

Con la finalidad de corroborar la importancia del L1 en el modelo de vasoinhibina, se realizó un análisis del área de superficie accesible al solvente (SASA) de las distintas isoformas de

vasoinhibina a través de una simulación de DM de 20 ns. Este análisis reveló que los cambios en SASA ocurrieron en mayor grado en el L1 (Figura 8.6.5a). Asimismo con el fin de identificar aminoácidos clave en la acción de la vasoinhibina, se promediaron todos los datos de SASA de todas las isoformas de vasoinhibina y se compararon con los de la PRL (Figura 8.6.5b). Los datos de SASA mostraron que las discrepancias más importantes con respecto a la PRL ocurrieron en el L1 (Figura 8.6.5b). El hecho de que los residuos de H3 y L3 están ausentes en la vasoinhibina de 123 aminoácidos, nos llevó a enfocarnos en la región del L1 (Figura 8.6.5c). Los residuos I51, T52, C58, T60, S61 y E67 se expusieron significativamente más en todas las isoformas de vasoinhibina, y el residuo K53 evidentemente se ocultó en todas las isoformas con respecto a la PRL.

Hasta ahora, estos datos confirman la importancia estructural del L1 en la transición de PRL a vasoinhibina y sugieren que esta región tiene el potencial de participar en la actividad biológica de la vasoinhibina. Con el fin de validar esta posibilidad, se evaluaron las propiedades antiangiogénicas de un péptido recombinante que contenía los primeros 79 aminoácidos de la PRL humana, que corresponden a solo la región N-terminal, H1 y L1.

8.7. Una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos es antiangiogénica

La simulación por DM ayudó a identificar al L1 como el determinante estructural distintivo en la vasoinhibina con respecto a la PRL, el cual podría corresponder al dominio bioactivo. Para validar esta posibilidad, se evaluaron las propiedades antiangiogénicas de una proteína recombinante que contiene los primeros 79 aminoácidos de la PRL. Células HEK293T/17 fueron transducidas con vectores lentivirales que codifican para los primeros 123 aminoácidos de la PRL (vasoinhibina control), para los primeros 79 aminoácidos, o un vector

no codificante (control negativo). El medio condicionado de las células transducidas mostró bandas inmunoreactivas con los pesos moleculares esperados de 9 y de 14 kDa para las proteínas de 79 y de 123 aminoácidos, respectivamente (Figura 8.7.1a). Adicionalmente, se observaron bandas inmunoreactivas de peso molecular aparentemente mayor de 14 y de 18 kDa, para las proteínas de 79 y de 123 aminoácidos, respectivamente, las cuales corresponden a isoformas glicosiladas de las proteínas recombinantes. La PRL contiene un sitio de N-glicosilación en la asparagina 31 (N-31) localizada en la H1 (Figura 1.1), la cual se conserva en ambas proteínas. El tratamiento con una enzima N-deglicosilasa F (PNGase F) la cual remueve los N-oligosacáridos, resultó en únicamente las bandas de peso molecular esperado de 9 y de 14 kDa para las proteínas de 79 y 123 aminoácidos (Figura 8.7.1b). Ninguna banda inmunoreactiva se observó en el medio condicionado de células transducidas con el vector lentiviral no codificante (Figura 8.7.1).

Tampoco se observaron bandas inmunoreactivas en el borde del gel que se pudieran deber a la presencia de agregados de los fragmentos de PRL. No obstante, el análisis por Western blot en condiciones no reductoras del medio condicionado reveló que ambas isoformas de vasoinhibina forman dímeros por puentes disulfuro de aproximadamente 18 y 28 kDa para las isoformas de 79 y de 123 aminoácidos, respectivamente (Figura 8.7.2b). La vasoinhibina de 123 aminoácidos mostró el dímero y el monómero, mientras que para el fragmento de 79 aminoácidos únicamente se detectó el dímero. Los agregados por puente disulfuro se sugiere se deben a la presencia de un grupo SH libre de la cisteína 58 (C58).

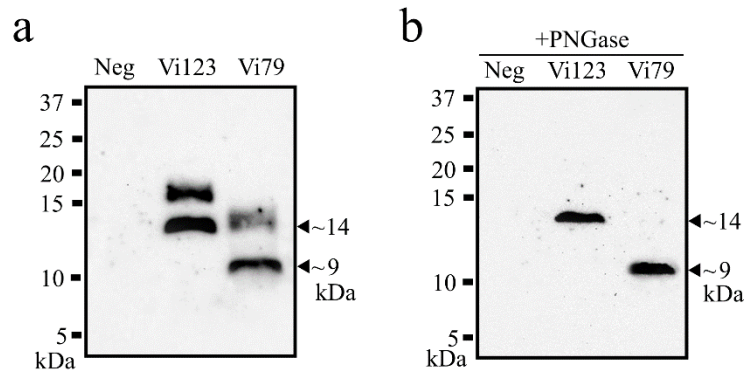


Figura 8.7.1. Generación de una isoforma recombinante de vasoinhibina de 79 aminoácidos. (a). Análisis por Western blot de medio condicionado obtenido de células HEK293T/17 transducidas establemente por vectores lentivirales codificantes para isoformas de vasoinhibina de 79 (Vi79) o de 123 (Vi123) aminoácidos, de ~9 y ~14 kDa de peso molecular, respectivamente. El medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas con un vector vacío se usaron como control negativo (Neg). (b). Western blot de los medios condicionados en (a) tratados con la enzima deglicosilasa PNGase F. Los números en la izquierda indican el peso molecular del estándar de proteína.

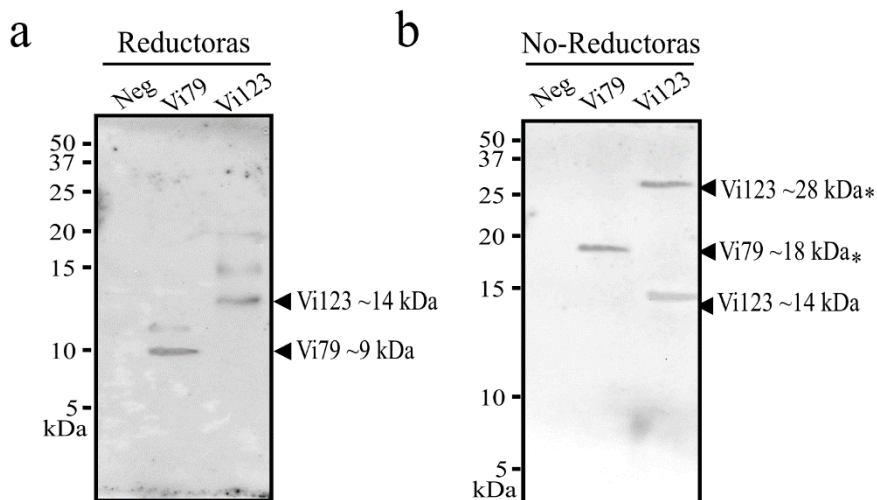


Figura 8.7.2. Análisis de la agregación por puentes disulfuro de la isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos. SDS-PAGE con tricina y Western blot en condiciones reductoras (a) y no reductoras (b) del medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas establemente por vectores lentivirales codificantes para isoformas de vasoinhibina de 79 (Vi79) o de 123 (Vi123) aminoácidos, de ~9 y ~14 kDa de peso molecular, respectivamente. El medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas con un vector vacío se usaron como control negativo (Neg).

Asimismo, se cuantificó la proteína producida y la concentración de ambas isoformas de vasoinhibina en el medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas establemente por vectores lentivirales codificantes para isoformas de vasoinhibina de 79 (Vi79) o de 123 (Vi123) aminoácidos se encontró alrededor de 200 nM sin diferencia significativa entre las isoformas (Figura 8.7.3).

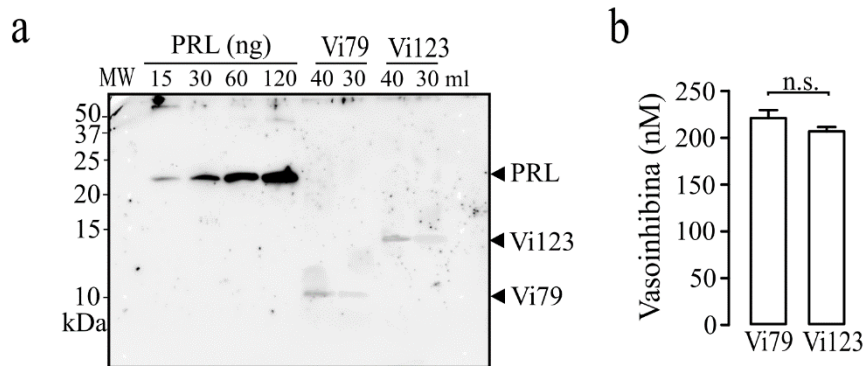


Figura 8.7.3. Concentración de isoformas de vasoinhibina de 79 y de 123 aminoácidos en medio condicionado. (a). Western blot representativo de una curva de PRL estándar y de 2 volúmenes diferentes (40 y 30 μ l) de medio condicionado de células HEK293T/17 transducidas establemente por vectores lentivirales codificantes para isoformas de vasoinhibina de 79 (Vi79) o de 123 (Vi123) aminoácidos. **(b).** Cuantificación de la concentración de las isoformas de vasoinhibina obtenida por la interpolación de la densidad óptica de las bandas inmunoreactivas en la curva de PRL. Datos de tres distintos Western blots.

La vasoinhibina, incluyendo la isoforma de 123 aminoácidos de la PRL humana, inhibe la proliferación (Clapp et al., 1993) y migración (Lee et al., 2007) de células endoteliales. Con el fin de determinar si la proteína correspondiente a los primeros 79 aminoácidos de la PRL es antiangiogénica, el medio condicionado conteniendo las proteínas de 123 y de 79 aminoácidos en dosis equivalentes (Figura 8.7.3), se agregó a células endoteliales de la arteria pulmonar bovina (CPAE) en cultivo y se evaluó su efecto en la síntesis de DNA cuantificada

por la incorporación de 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) y la reacción click (Figura 8.7.4). Los medios condicionados conteniendo las proteínas de 123 y de 79 aminoácidos respectivamente, inhibieron la proliferación de células endoteliales CPAE estimulada con el

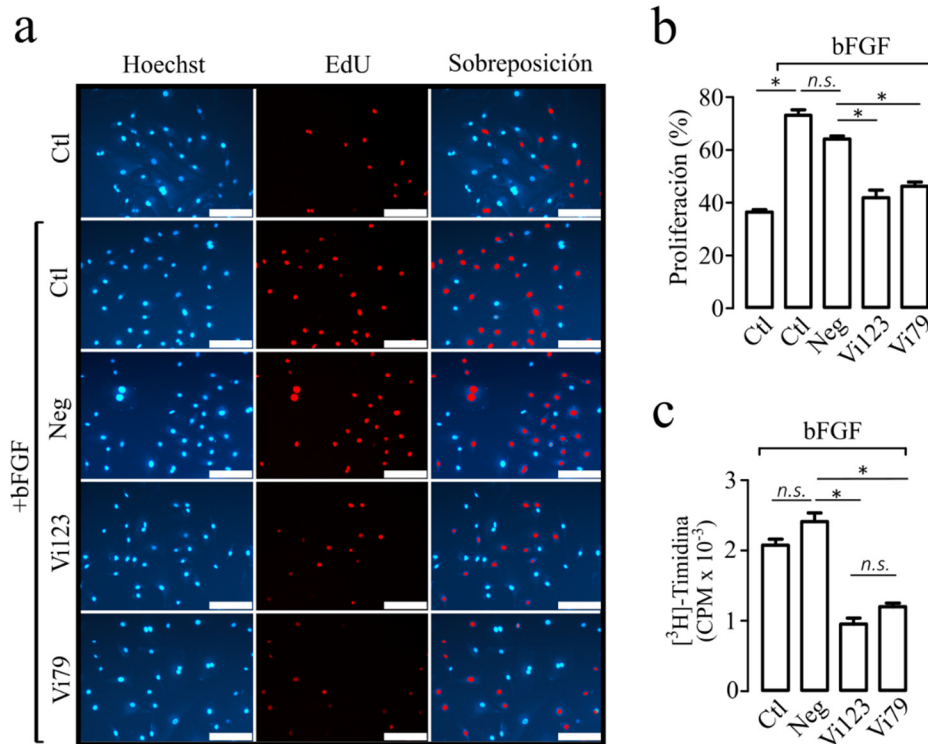


Figura 8.7.4. Inhibición de la proliferación de células endoteliales por una proteína que comprende los aminoácidos 1 a 79 de la PRL. (a). Campos representativos de células endoteliales de arteria pulmonar bovina (CPAE) teñidas para ADN (Hoechst), ADN sintetizado (EdU), y sobrepuestas. Las células fueron incubadas por 24 horas sin y con el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y los distintos medios condicionados de células HEK293T/17 transducidas establemente por vectores lentivirales codificantes para isoformas de vasoinhibina de 79 (Vi79) o de 123 (Vi123) aminoácidos o el vector no codificante (Neg); las células control (Ctl) corresponden a células incubadas con y sin bFG pero sin medio condicionado. Barra de calibración, 100 μ m. **(b).** Cuantificación de la proliferación celular por la reacción EdU-click expresada por el total de número de células en el campo. Los valores son media \pm error estándar de triplicados (* $p < 0.001$). **(c).** Proliferación celular evaluada por la incorporación de [³H]-timidina en CPAE incubada con los mismos medios condicionados que (b). Los valores son media \pm error estándar de triplicados (* $p < 0.001$).

factor de crecimiento de fibroblasto (bFGF) comparados con el medio condicionado del negativo (Neg) o de las células control no tratadas con medio condicionado (Ctl) (Figura 8.7.4a y b).

Efectos similares fueron observados en la proliferación de las CPAE al medir la incorporación de timidina tritiada (Figura 8.7.4c).

La potencia biológica de las proteínas de 79 y de 123 aminoácidos se evaluó con una curva dosis-respuesta de ambas proteínas, las cuales inhibieron la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) evaluadas por la reacción de EdU-click, dependiente de la dosis y con la misma potencia (Figura 8.7.5).

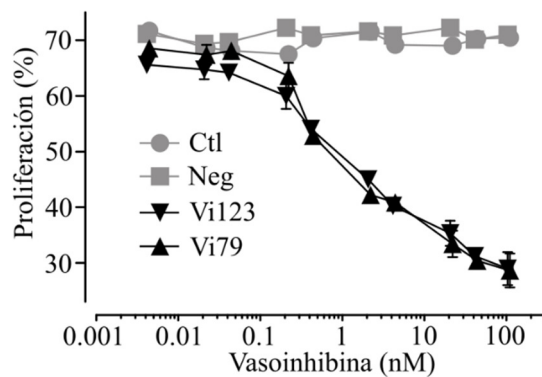


Figura 8.7.5. Potencia biológica de una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos. Inhibición dosis dependiente de la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) inducida con factor de crecimiento de fibroblasto bFGF en combinación con medios condicionados de HEK293T/17 conteniendo isoformas de vasoinhibina de 123 y de 79 aminoácidos. La proliferación fue cuantificada por la reacción EdU-click y se expresó con el número total de células en el campo. Los valores son la media \pm error estándar de triplicados.

Para evaluar las acciones de la vasoinhibina de 79 aminoácidos sobre la migración de células endoteliales, se usó el ensayo de herida en monocapa (Liang et al., 2007). Las células CPAE en el control y en el negativo, cubrieron alrededor del 80% del área de herida después de 24

h de realizada la herida. Sin embargo, las células que fueron tratadas con el medio condicionado de células HEK293T/17 productoras de isoformas de vasoinhibina de 123 y 79 aminoácidos únicamente mostraron una cobertura de alrededor del 50% a las 24 h (Figura 7.7.6).

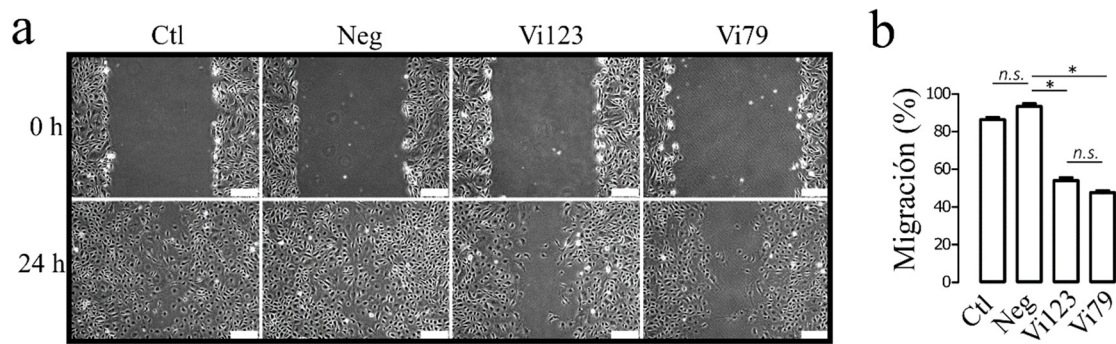


Figura 8.7.6. Una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos inhibe la migración de células endoteliales. (a). Imágenes representativas de monocapas de células endoteliales de arteria pulmonar bovina (CPAE) que fueron dañadas con una herida y fueron tratadas por 24 horas con medio (Ctl) o en combinación con medio condicionado de células HEK293T/17 productoras de vasoinhibina de 79 y de 123 aminoácidos, o con medio condicionado del negativo (Neg). La barra de calibración, 100 μ m. **(b).** Cuantificación del porcentaje de migración dentro de la herida relativo a las 0 h. Los valores son la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes (* $p < 0.001$).

Finalmente, los genes blanco de la vasoinhibina interleucina 1-alfa (*IL-1 α*) y la molécula de adhesión intercelular-1 (*ICAM1*) (Tabruyn et al., 2007), los cuales incrementan su expresión con la vasoinhibina en células endoteliales, se sobre-expresaron en células CPAE tratadas con medios condicionados conteniendo la vasoinhibina. pero no en los controles (Figura 8.7.7).

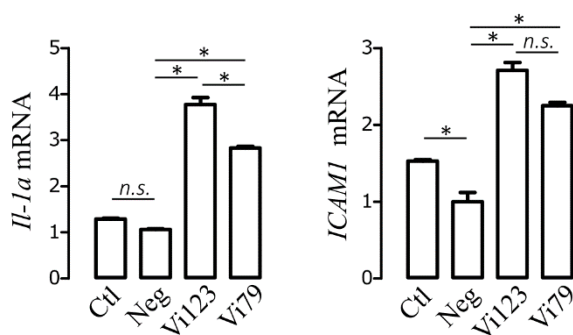


Figura 8.7.7. Inhibición de los genes blanco de vasoinhibina por una isoforma de 79 aminoácidos. a.

Cuantificación de la expresión de genes blanco de la vasoinhibina, interleucina 1-alfa (*IL-1α*) y la molécula de adhesión intercelular-1 (*ICAM1*) a través de PCR cuantitativo tiempo-real normalizado contra ciclofilina-A

(*PPIA*). Las células CPAE se trataron por 4 horas con medio (Ctl) o combinado con medio condicionado conteniendo las distintas isoformas de vasoinhibina de 123 y 79 aminoácidos, o con medio condicionado del negativo (Neg). Los valores son la media \pm el error estándar de tres experimentos independientes (* $p < 0.001$).

Para evaluar mejor el efecto de las distintas isoformas de vasoinhibina, se comparó la proliferación de células BUVEC no transducidas o transducidas con el vector vacío, con aquellas transducidas con el vector lentiviral codificante para la vasoinhibina de 79 y 123 residuos (Figura 8.7.8). Las células transducidas con los vectores codificantes para las isoformas de vasoinhibina redujeron su tasa de proliferación significativamente (Figura 8.7.8a, b), La reducción de la densidad celular a las 48 y 72 horas se correlacionó con la acumulación de las respectivas isoformas de vasoinhibina en el medio condicionado (Figura 8.7.8b, c).

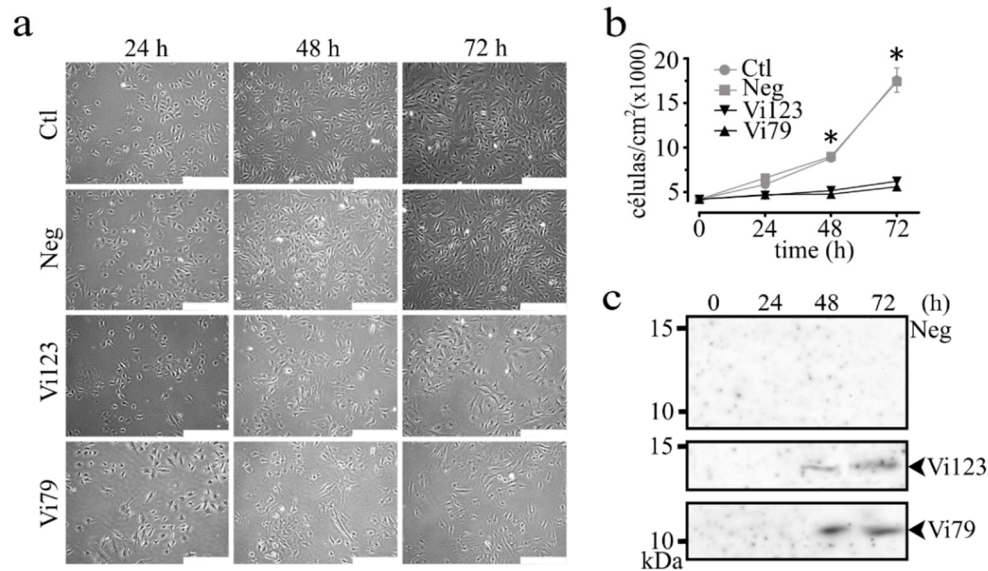


Figura 8.7.8. Proliferación de células endoteliales productoras de una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos (Vi79). (a). Campos representativos de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) a 24, 48, 72 h después de ser transducidas o no (Ctl) con vectores lentivirales codificantes para la vasoinhibina de 79 (Vi79) o de 123 (Vi123) residuos o con el vector vacío (Neg). Barra de calibración, 500 μm . (b). Cuantificación de la densidad de BUVEC a 24, 48 y 72 horas post transducción. Los valores son la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (* $p < 0.001$ vs Ctl and Neg). c. Análisis de Western blot de medio condicionado de BUVEC a 0, 24, 48 y 72 horas post transducción con los vectores lentivirales codificantes para Vi79 (~9 kDa) y Vi123 (~14 kDa) o el vector vacío (Neg).

Se observó un gran número de núcleos pequeños en el control (Ctl) y en las células BUVEC transducidas con el vector vacío (Neg) (Figura 8.7.9a) además de un mayor número de células (Figura 8.7.9a y b). En cambio, las células transducidas con las isoformas de vasoinhibina de 123 y 79 aminoácidos además de presentar un menor número de células también tuvieron núcleos significativamente más grandes (Figura 8.7.9c y d), lo cual podría ser una señal de que hay una disminución en la proliferación, pues la senescencia es típicamente acompañada por un morfología celular alargada en parte por un núcleo y nucléolo alargado (Maeshima et al., 2011; Sadaie et al., 2015).

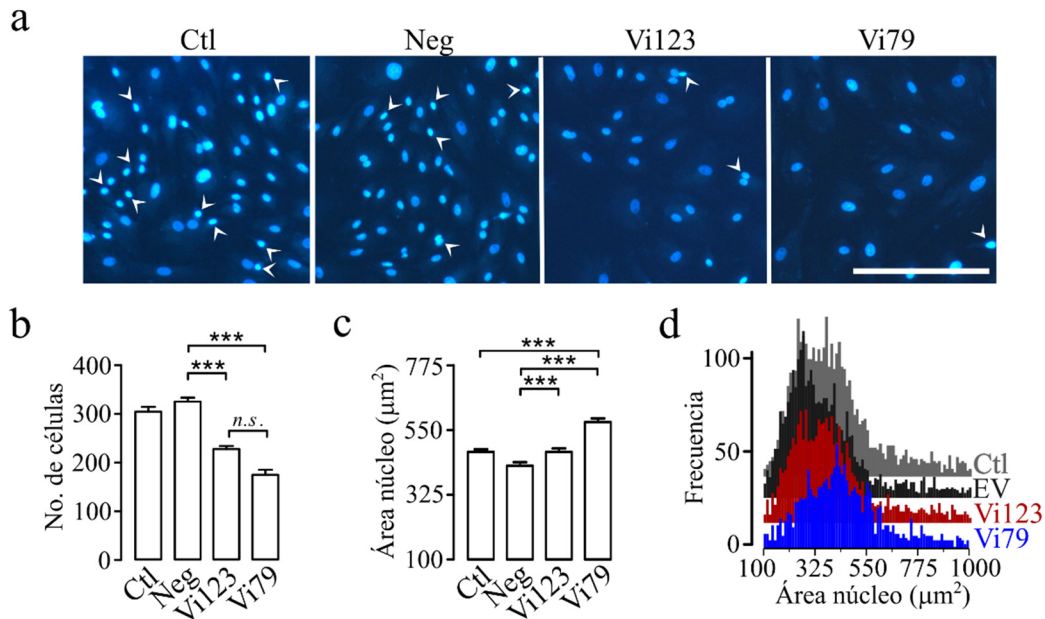


Figura 8.7.9. Área nuclear de células endoteliales productoras de una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos (Vi79). (a). Campos representativos de células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) teñidas con Hoechst a 72 h después de ser transducidas o no (Ctl) con vectores lentivirales codificantes para la vasoinhibina de 79 (Vi79) o de 123 (Vi123) residuos o con el vector vacío (Neg). La proliferación se ilustra con núcleos pequeños y brillantes (cabeza de flecha blanca). Barra de calibración, 250 μm. (b). Cuantificación del número de células totales en distintos campos. Los valores son la media ± error estándar de tres experimentos independientes (***) $p < 0.001$ vs Ctl and Neg) (c). Cuantificación del área promedio de los núcleos de BUVEC. Los valores son la media ± error estándar de tres experimentos independientes (***) $p < 0.001$ vs Ctl and Neg). (d). Gráfica de distribución de frecuencia de área de los núcleos.

8.8. Dinámica molecular de una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos.

Con el fin de identificar el determinante estructural que mantiene la función en la vasoinhibina, llevamos a cabo la simulación por DM de las isoformas de vasoinhibina conteniendo los aminoácidos 1 a 79 o 1 a 123 de la PRL, y se compararon con la de 1 a 150 aminoácidos. La DM ocurrió muy similar entre la vasoinhibina de 123 y la vasoinhibina de

150 residuos. Ambas mostraron una compresión inmediata (5 ns), la reducción del área y valores incrementados de RMSD, los cuales se estabilizaron después de ese tiempo (Figura 8.8.1a). La extensión de la simulación a 200 ns mostró que no hubo cambios significativos después de los 20 ns (Figura 8.8.4). Similar a la isoforma de vasoinhibina de 150 aminoácidos, la isoforma de 123 aminoácidos mostró una discrepancia mayor en la fluctuación de los residuos (RMSF) relativa a la PRL en la primera parte del L1 (Figura 8.8.1b). Asimismo, las tres hélices mantuvieron su estabilidad a lo largo de la simulación y el L1 mostró una propensión a formar hélices (Figura 8.8.2).

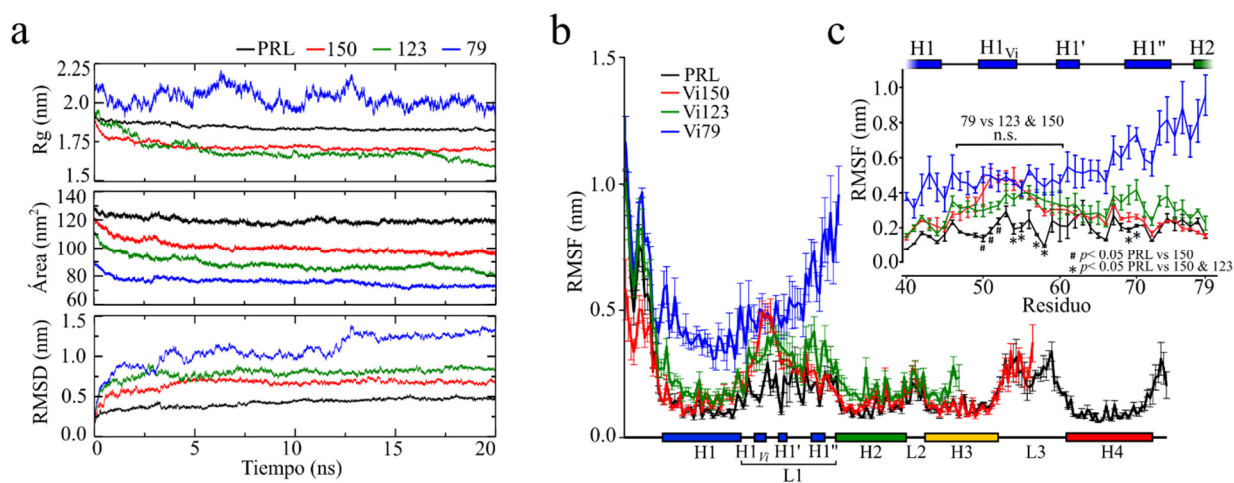


Figura 8.8.1. Comparación de DM de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos. (a). Análisis de trayectoria de PRL y de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos (Vi150, Vi123 y Vi79, respectivamente) durante 20 ns de simulación de DM. Radio de giro (Rg), área de superficie y la desviación de la media cuadrática (RMSD) son promedio de tres dinámicas moleculares. (b). Media \pm error estándar de la fluctuación de la media cuadrática (RMSF) por residuo de tres simulaciones independientes. c. Valores de RMSF en la región L1. Los valores de cada residuo de la PRL son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) de isoformas de vasoinhibina Vi150 y Vi123 (*), o sólo de la isoforma Vi150 (#) como se indica. El corchete horizontal indica la región del L1 en la cual las 3 isoformas de vasoinhibina tienen valores de RMSF similares (residuos del 47 al 60).

En contraste, la estructura de la isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos se compactó menos, y se movió mucho. Su Rg, RMSD, y RMSF fueron mucho mayores (Figura 7.8.1). La estructura tuvo muchas fluctuaciones, después de 20 ns la isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos tuvo una estructura más compacta, pero la estructura no fue del todo estable ya que a los ~150 ns mostro de nuevo un incremento en Rg (Figura 8.8.4b).

No obstante, en la primera parte del L1 (los residuos 47 a 60), la RMSF de las tres isoformas de vasoinhibina (de 79, 123 y 159 aminoácidos) fue muy similar entre ellas pero distinto de la PRL (Figura 8.8.1b, c). Asimismo a pesar del estado desorganizado del L1, éste mantuvo una propensión a formar hélices y una hélice estable ($H1_{Vi}$) a través del tiempo (Figura 8.8.2; Figura 8.4.3; Figura 8.4.4c).

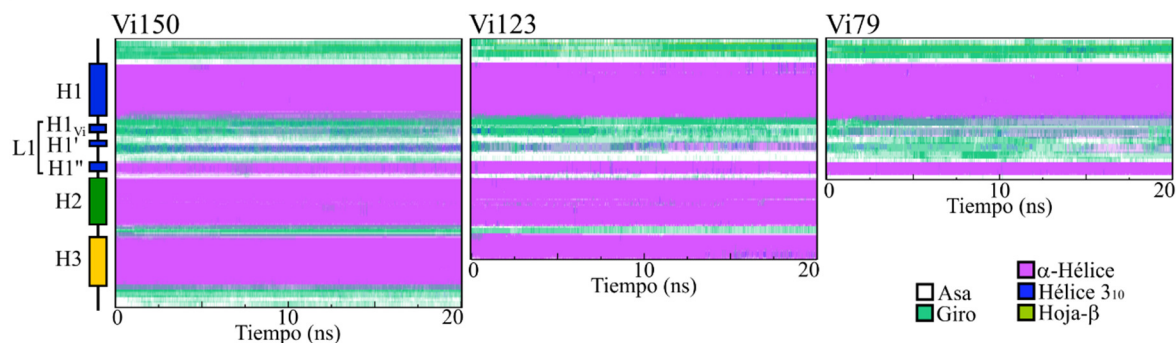


Figura 8.8.2. Comparación de estructura secundaria de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos. Cambios del perfil de estructura secundaria por residuo de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos (Vi150, Vi123 y Vi79, respectivamente) durante 20 ns de simulación de DM. Composición de imágenes de por lo menos tres simulaciones independientes.

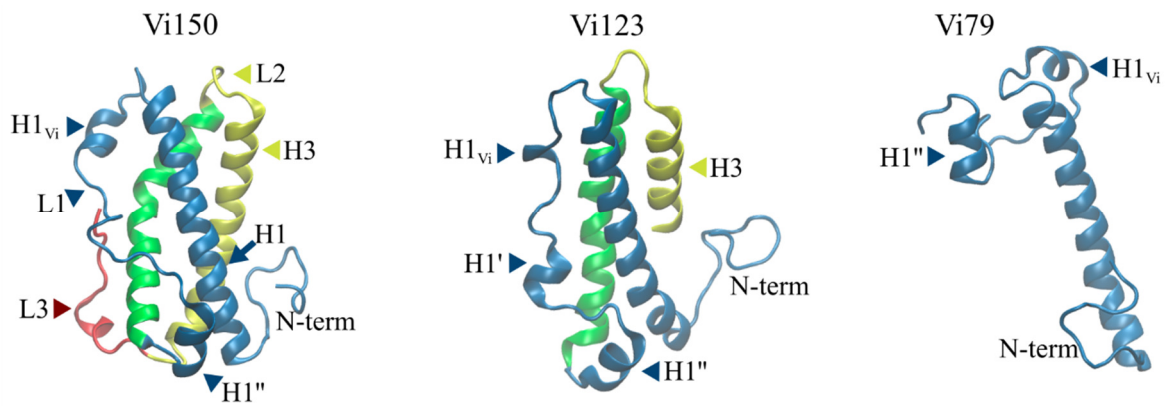


Figura 8.8.3. Comparación de estructura terciaria de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos. Comparación de la estructura terciaria de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos (Vi150, Vi123 y Vi79, respectivamente) después de 20 ns de simulación de DM. Los dominios estructurales están indicados.

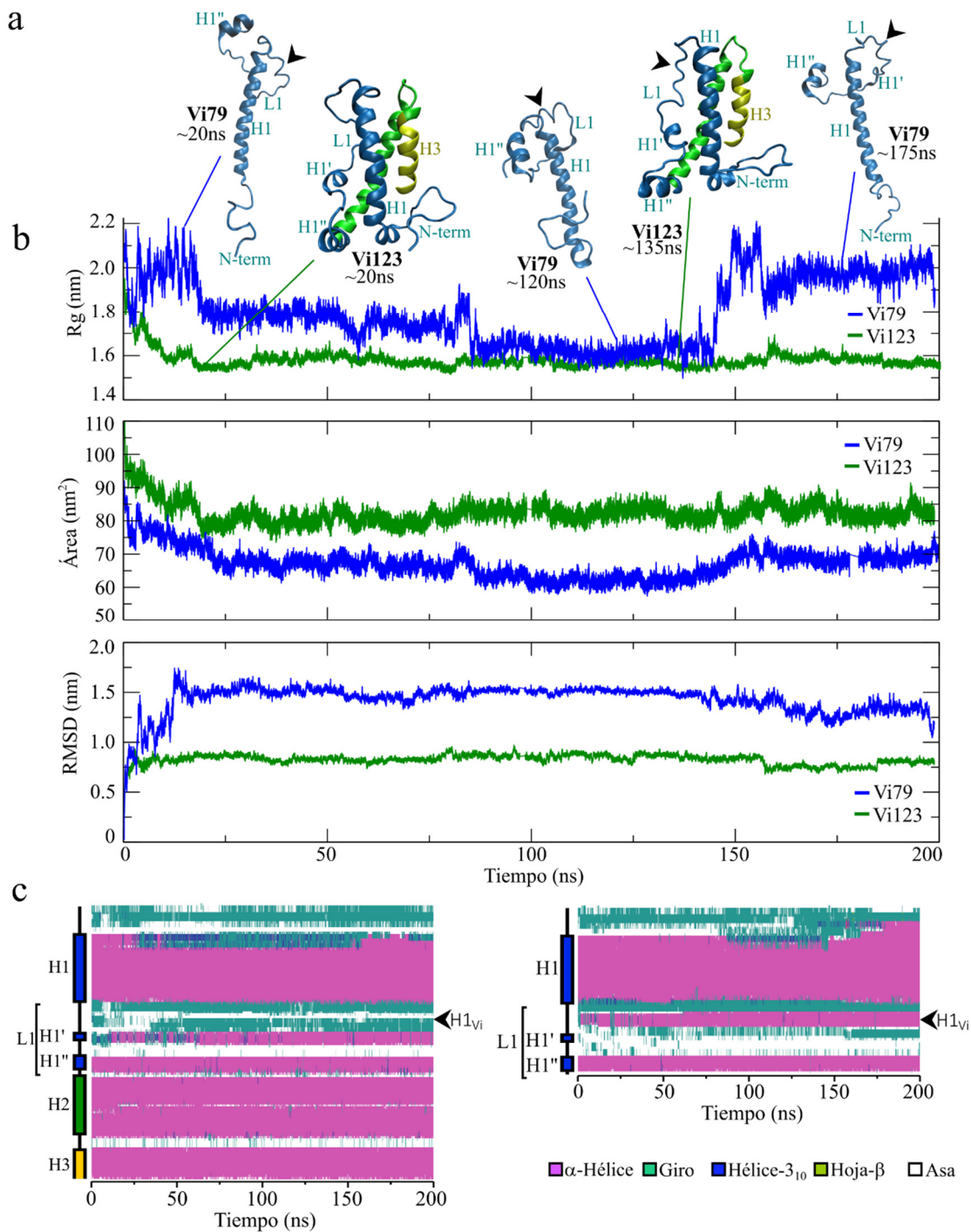


Figura 8.8.4. Análisis de la simulación de DM de isoformas de vasoinhibina de 123 y 79 aminoácidos extendida a 200 ns. (a). Imágenes representativas de la estructura molecular a lo largo de la simulación por DM, el tiempo aproximado y los distintos dominios están indicados. La $H1_{Vi}$ está indicada (cabeza de flecha). **(b).** Radio de giro (R_g), área de superficie y la desviación de la media de la media cuadrática. **(c).** Perfil de estructura secundaria a lo largo de la secuencia aminoácida a lo largo de 200ns de DM.

9. Discusión

El sistema PRL/vasoinhibina constituye un nuevo eje endócrino (Triebel et al., 2015a) que regula la angiogénesis necesaria para el crecimiento y la función de los órganos- tanto reproductivos como no reproductivos, y contribuye a la patogénesis de padecimientos angiogénico-dependientes de la retina y del corazón y de enfermedades que ocurren durante y después del embarazo(Clapp et al., 2009; Triebel et al., 2011; Hilfiker-Kleiner y Sliwa, 2014). Las diferencias funcionales entre la vasoinhibina y su precursor, la PRL, indican que los diversos cortes proteolíticos que la generan inducen cambios conformacionales que conllevan a efectos vasculares específicos. De hecho, la conversión de la PRL a vasoinhibina es la base de dos estudios clínicos que tienen como blanco terapéutico a la vasoinhibina (Triebel et al., 2017). Sin embargo, la transición de la PRL a vasoinhibina es poco clara y no se conoce la estructura de la vasoinhibina. Es claro que la comprensión de la relación estructura-función de la vasoinhibina generará conocimiento valioso capaz de sentar las bases para el diseño de agonistas y antagonistas selectivos para su uso en diversos padecimientos, así como de métodos de cuantificación sensibles y específicos que permitan valorar los niveles de esta familia de péptidos en la clínica. En el presente trabajo hemos modelado la estructura de la vasoinhibina mediante DM y mostrado que esta proteína adquiere una conformación estable en racimo de tres α -hélices a consecuencia del movimiento del L1 y de su interacción con la H1. La nueva superficie molecular generada por dicha interacción presenta propiedades de accesibilidad al solvente, electrostáticas e hidrofóbicas diferentes a las de la PRL y, por ende, podría representar el dominio funcional antiangiogénico de la vasoinhibina. Consistentemente con esta hipótesis, mostramos que una

proteína recombinante formada exclusivamente por las regiones H1 y L1 de la PRL tiene efectos antiangiogénicos.

La conformación en racimo de tres α -hélices ocurre de manera generalizada en proteínas que se caracterizan por interacciones de alta afinidad como enzimas, inhibidores enzimáticos y factores de transcripción (Schneider et al., 1998). En la isoforma de vasoinhibina de 150 aminoácidos, la conformación en racimo de tres α -hélices se adquiere gracias a la inmediata compresión de la molécula que se observa en todas las DM y bajo diferentes campos de fuerza (GOMOS96 54A7, AMBER y CHARMM27). Esto sugiere que una propiedad física robusta, como la hidrofobicidad (Daggett y Fersht, 2003), define la transición y estabilidad de la vasoinhibina. Efectivamente, la remoción de la H4 expone al núcleo hidrofóbico de la PRL, que se oculta de nuevo en forma inmediata por el movimiento del L1 y sus contactos con la H1. Además, el L1 despliega una mayor propensión para formar α -hélices y genera una nueva α -hélice ($H1_{vi}$). Estos cambios estructurales definen la transición hacia la vasoinhibina y persisten en la conformación de mínima energía de la vasoinhibina nativa.

Los residuos contenidos en la H1 y el L1 en la vasoinhibina son los que muestran las mayores discrepancias en accesibilidad al solvente con respecto a la PRL. Además, las regiones H1 y L1 poseen una superficie predominantemente negativa que se asocia al ocultamiento de residuos básicos no presente en la PRL. Finalmente, la vasoinhibina expone más residuos hidrofóbicos que generan sitios hidrofóbicos en la zona de interacción H1 y L1 y a nivel de la $H1_{vi}$. Dado que la exposición al solvente de residuos activos y sus interacciones polares e hidrofóbicas influyen la interacción proteína-proteína requerida para la bioactividad (Jones y Thornton, 1996), proponemos que la alteración de las regiones H1 y L1, generada a consecuencia del corte proteolítico de la PRL, corresponde al dominio antiangiogénico de la

vasoinhibina. En apoyo a esta posibilidad, mostramos que los primeros 79 aminoácidos que comprenden a las regiones H1 y L1 de la PRL son suficientes para ejercer acciones antiangiogénicas.

La antiangiogénesis se demostró a través de la inhibición de la proliferación y migración de células endoteliales en cultivo. El efecto antiangiogénico de la proteína recombinante de 79 aminoácidos posee una potencia similar ($EC_{50} \approx 1$ nM) a la de la vasoinhibina mejor caracterizada de 123 residuos que abarca las regiones H1, L1, H2, L2, y parte de la región H3 de la PRL, y es comparable a la reportada previamente (Clapp et al., 1993). En cuanto a la glicosilación y a la dimerización mediante puentes disulfuro de los fragmentos de PRL, parecen no tener influencia sobre su bioactividad pues la actividad de ambas isoformas de vasoinhibina (de 79 y 123 residuos) tienen una potencia similar ($EC_{50} = 1$ nM) a una vasoinhibina de 123 residuos no glicosilada producida en *E.coli*, en la cual la C58 fue mutada a serina para evitar los agregados por puentes disulfuro intra- e inter-moleculares (Clapp et al., 1993).

Las acciones antiangiogénicas de la proteína de 79 aminoácidos demostraron que el dominio bioactivo de la vasoinhibina reside en las regiones H1 y L1 de la PRL. Este hallazgo es consistente con observaciones previas que muestran que los fragmentos de la PRL con efecto de vasoinhibina contienen el extremo N-terminal de la hormona (Triebel et al., 2015a), mientras que el fragmento C-terminal no posee propiedades antiangiogénicas (Khurana et al., 1999). Sin embargo, la secuencia primaria H1 y L1, por si misma, no es responsable de la inhibición de la angiogénesis, dado que la contiene la PRL íntegra sin efectos antiangiogénicos. Más bien, es a consecuencia del corte proteolítico que emerge una nueva conformación antiangiogénica en las regiones H1 y L1.

Para profundizar en el determinante estructural de la vasoinhibina que pudiera corresponder a su dominio antiangiogénico, comparamos la DM de las isoformas de vasoinhibina de 79, 123 y 150 aminoácidos. La estructura de las isoformas de vasoinhibina de 123 y 150 aminoácidos es muy similar. Ambas se comprimen para formar un racimo de tres α -hélices mediante el movimiento de L1 y su interacción con la H1. Su L1 muestra una alta propensión a organizarse en hélices y las dos isoformas de vasoinhibina generan una nueva H1_{vi}. En contraste, y como se esperaba, la conformación de la vasoinhibina de 79 aminoácidos es diferente. Su plegamiento es menos compacto y posee un movimiento global elevado debido a la alta movilidad y estado desorganizado del L1. Sin embargo, la movilidad de los aminoácidos en la primera porción del L1 (residuos 47 al 60) es similar entre las tres isoformas de vasoinhibina y diferente a la PRL. Además, en las tres isoformas de vasoinhibina, el L1 muestra una alta propensión para formar hélices y formar la H1_{vi}. Estos resultados se corroboraron con la simulación de DM de las isoformas de vasoinhibina de 123, 132, 139, 150 y 159 aminoácidos.

El corte de la PRL sin reducción del puente disulfuro C58-174 no le confiere propiedades antiangiogénicas (Ferrara et al., 1991); se debe perder la H4 para que L1 adquiera la configuración móvil y la alta propensión a formar α -hélices. Concluimos que estos cambios conformacionales de L1 son los principales denominadores estructurales de la vasoinhibina y determinantes de sus propiedades biológicas. De manera consistente con esta propuesta, un péptido de 14 aminoácidos (residuos 45 a 58) correspondiente a la primera parte del L1 de la PRL de búfalo posee efectos antiangiogénicos (Lee et al., 2011). Este péptido se investigó debido a que su secuencia tiene una homología del 35.7% con la somatostatina humana, que es un conocido factor antiangiogénico (Florio et al., 2003). Sin embargo, también se ha

propuesto que el dominio activo de la vasoinhibina se localiza en la H2, específicamente en una secuencia de 14 aminoácidos (residuos 80 al 93) con características “tilted” (Nguyen et al., 2006). Los péptidos “tilted” son pequeños y poseen una distribución asimétrica de sus residuos hidrofóbicos cuando forman parte de una hélice. Cuando se sintetizó fusionando a la proteína de fusión a maltosa para conferirle solubilidad, la secuencia “tilted” de la PRL humana inhibió la angiogénesis. Sin embargo, su potencia es baja (4 a 32 veces menor a la de la vasoinhibina mejor caracterizada) y la actividad antiangiogénica de la vasoinhibina se altera muy poco cuando se eliminan las características estructurales de la secuencia “tilted” por mutación (Nguyen et al., 2006). Más aún, el péptido “tilted” se encuentra oculto por las otras tres α -hélices y el L3 de la PRL, y no es claro si se expone a consecuencia del procesamiento proteolítico. A este respecto, la DM de la vasoinhibina de 150 aminoácidos mostró una mayor exposición al solvente de la región que no contiene la secuencia “tilted”, mas no de la que la contiene. Es posible que el efecto antiangiogénico de la vasoinhibina involucre diversos determinantes antiangiogénicos, sin embargo, el hecho de que la proteína recombinante de 79 aminoácidos posee efectos similares a los de isoformas de vasoinhibina más extensas indica que el dominio vasoactivo más importante se localiza en la H1 y el L1, y que dominios más allá de estas regiones no son esenciales para la actividad antiangiogénica. Además de la angiogénesis, la vasoinhibina actúa sobre células endoteliales para regular otros aspectos de la fisiología vascular. Por ejemplo, promueve la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión celular, como la ICAM1 y la IL1A, para estimular la extravasación leucocitaria (Tabruyn et al., 2007). El hecho de que la vasoinhibina de 79 aminoácidos induce la expresión de la ICAM1 y la IL1A en células endoteliales implica que el dominio antiangiogénico es responsable de este efecto. Otros efectos vasculares de la vasoinhibina

incluyen a la inhibición de la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) para reducir la vasodilatación y la vasopermeabilidad (Gonzalez et al., 2004; Garcia et al., 2008) y la unión al inhibidor del activador de plasminógeno 1 para promover la fibrinólisis (Bajou et al., 2014). La vasoinhibina también ejerce efectos no-vasculares. Actúa en el epitelio pigmentado de la retina para inhibir a la permeabilidad de la barrera hematorretiniana externa (Arredondo Zamarripa et al., 2014); activa procesos proinflamatorios en los fibroblastos del pulmón (Corbacho et al., 2000b); y afecta al sistema nervioso para estimular respuestas neuroendócrinas (Mejia et al., 2003), promueve conductas asociadas a la ansiedad y la depresión (Zamorano et al., 2014), y actúa directamente en las neuronas inhibiendo la neuritogénesis (Castillo et al., 2017). Queda por determinar si todos los efectos vasculares y no vasculares involucran el mismo dominio antiangiogénico de la molécula.

La heterogeneidad molecular de la familia de vasoinhibina se debe a que varias proteasas cortan a la PRL en distintos sitios de la molécula y bajo diversos contextos celulares y tisulares. La catepsina D, las metaloproteasas de matriz y la proteasa morfogénica de hueso 1 generan fragmentos de PRL que varían entre los primeros 80 a los primeros 159 aminoácidos (Triebel et al., 2015a). En tejidos y fluidos biológicos de roedores y humanos se ha reportado la presencia endógena de fragmentos de la PRL de los tamaños correspondientes a estas secuencias (Triebel et al., 2015b), pero solamente se ha investigado la actividad biológica, e identificado como vasoinhibina, a fragmentos de la PRL que contienen los primeros 123 a 159 residuos (14 a 18 kDa) (Ge et al., 2007; Clapp et al., 2015). Aquí hemos ampliado a la familia de la vasoinhibina a una PRL de 79 aminoácidos y una masa molecular de ~9 kDa. Un fragmento similar se genera por las Metaloproteasas (Macotela et al., 2006) y está presente en el líquido amniótico de mujeres con preeclampsia

(Gonzalez et al., 2007), lo cual implica que corresponde a un miembro activo de la vasoinhibina.

En resumen, nuestros resultados extienden a la familia de la vasoinhibina a proteínas de menor tamaño y proveen información estructural relevante para el desarrollo de agonistas y antagonistas más potentes. La DM y la tecnología recombinante proveen evidencia sólida de que el dominio funcional se localiza en la primera mitad del L1. Estudios en proceso están identificando los residuos de esta región que al ser mutados alteran la formación de complejos de unión y las propiedades biológicas. Esta información impactará positivamente la generación de drogas y de métodos cuantitativos para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades discapacitantes y mortales de alto impacto en nuestro país como son las complicaciones de la diabetes como la retinopatía diabética y el edema macular diabético, así como padecimientos como el cáncer y la preeclampsia, entre otros.

10. Referencias

- Anandakrishnan, R., Aguilar, B. y Onufriev, A.V. (2012). H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res* 40, W537-541.
- Aranda, J., Rivera, J.C., Jeziorski, M.C., Riesgo-Escovar, J., Nava, G., Lopez-Barrera, F., . . . Clapp, C. (2005). Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 2947-2953.
- Arnold, E., Rivera, J.C., Thebault, S., Moreno-Paramo, D., Quiroz-Mercado, H., Quintanar-Stephano, A., . . . Clapp, C. (2010). High levels of serum prolactin protect against diabetic retinopathy by increasing ocular vasoinhibins. *Diabetes* 59, 3192-3197.
- Arredondo Zamarripa, D., Diaz-Lezama, N., Melendez Garcia, R., Chavez Balderas, J., Adan, N., Ledesma-Colunga, M.G., . . . Thebault, S. (2014). Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front Cell Neurosci* 8, 333.
- Bajou, K., Herkenne, S., Thijssen, V.L., D'Amico, S., Nguyen, N.Q., Bouche, A., . . . Struman, I. (2014). PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nature medicine* 20, 741-747.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. y McCammon, J.A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10037-10041.
- Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S. y Nicoll, C.S. (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133, 935-938.
- Bentzien, F., Struman, I., Martini, J.F., Martial, J. y Weiner, R. (2001). Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res* 61, 7356-7362.
- Bietz, S., Urbaczek, S., Schulz, B. y Rarey, M. (2014). Protoss: a holistic approach to predict tautomers and protonation states in protein-ligand complexes. *J Cheminform* 6, 12.
- Bollengier, F., Mahler, A., Matton, A. y Vanhaelst, L. (1996). Molecular heterogeneity and glycosylation modulation of rat pituitary prolactin isoforms synthesized and secreted in vitro in postnatal ontogeny, gestation, lactation and weaning. *J Neuroendocrinol* 8, 721-730.
- Bondi, A. (1964). van der waals volumes and radii. *J Phys Chem* 68, 441-451.
- Brooks, C.L. (2012). Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocrine reviews* 33, 504-525.
- Cajero-Juarez, M., Avila, B., Ochoa, A., Garrido-Guerrero, E., Varela-Echavarria, A., Martinez de la Escalera, G. y Clapp, C. (2002). Immobilization of bovine umbilical vein

endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *European journal of cell biology* 81, 1-8.

Campeau, E., Ruhl, V.E., Rodier, F., Smith, C.L., Rahmberg, B.L., Fuss, J.O., . . . Kaufman, P.D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS one* 4, e6529.

Cao, Y. (2001). Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *The international journal of biochemistry & cell biology* 33, 357-369.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438, 932-936.

Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., . . . Sabatini, D.M. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100.

Casabiell, X., Robertson, M.C., Friesen, H.G. y Casanueva, F.F. (1989). Cleaved prolactin and its 16K fragment are generated by an acid protease. *Endocrinology* 125, 1967-1972.

Castillo, X., Melo, Z., Varela-Echavarria, A., Tamariz, E., Arona, R.M., Arnold, E., . . . Martinez de la Escalera, G. (2017). Vasoinhibin Suppresses the Neurotrophic Effects of VEGF and NGF in Newborn Rat Primary Sensory Neurons. *Neuroendocrinology*.

Cavallo, L., Kleinjung, J. y Fraternali, F. (2003). POPS: A fast algorithm for solvent accessible surface areas at atomic and residue level. *Nucleic Acids Res* 31, 3364-3366.

Clapp, C. (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121, 2055-2064.

Clapp, C., Adan, N., Ledesma-Colunga, M.G., Solis-Gutierrez, M., Triebel, J. y Martinez de la Escalera, G. (2016). The role of the prolactin/vasoinhibin axis in rheumatoid arthritis: an integrative overview. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73, 2929-2948.

Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M.C. y Martinez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 17, 301-307.

Clapp, C., Lopez-Gomez, F.J., Nava, G., Corbacho, A., Torner, L., Macotella, Y., . . . Martinez de la Escalera, G. (1998). Expression of prolactin mRNA and of prolactin-like proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *The Journal of endocrinology* 158, 137-144.

Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delure, F. y Weiner, R.I. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133, 1292-1299.

Clapp, C., Sears, P.S. y Nicoll, C.S. (1989). Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology* 125, 1054-1059.

Clapp, C., Sears, P.S., Russell, D.H., Richards, J., Levay-Young, B.K. y Nicoll, C.S. (1988). Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* 122, 2892-2898.

Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M.C. y Martínez De La Escalera, G. (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological reviews* 89, 1177-1215.

Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J. y Martínez de la Escalera, G. (2015). Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol* 846, 83-95.

Clapp, C., Torner, L., Gutierrez-Ospina, G., Alcantara, E., Lopez-Gomez, F.J., Nagano, M., . . . Martínez de la Escalera, G. (1994). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10384-10388.

Clapp, C. y Weiner, R.I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130, 1380-1386.

Compton, M.M. y Witorsch, R.J. (1983). Proteolytic fragmentation of rat prolactin by the rat ventral prostate gland. *The Prostate* 4, 231-246.

Compton, M.M. y Witorsch, R.J. (1984). Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* 115, 476-484.

Corbacho, A., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin-growth hormone-placental lactogen family in angiogenesis. *The Journal of endocrinology* 173, 2019-2238.

Corbacho, A.M., Macotela, Y., Nava, G., Torner, L., Duenas, Z., Noris, G., . . . Clapp, C. (2000a). Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms. *The Journal of endocrinology* 166, 53-62.

Corbacho, A.M., Nava, G., Eiserich, J.P., Noris, G., Macotela, Y., Struman, I., . . . Clapp, C. (2000b). Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *The Journal of biological chemistry* 275, 13183-13186.

Cosio, G., Jeziorski, M.C., Lopez-Barrera, F., De La Escalera, G.M. y Clapp, C. (2003). Hypoxia inhibits expression of prolactin and secretion of cathepsin-D by the GH4C1 pituitary adenoma cell line. *Lab Invest* 83, 1627-1636.

Costantini, S., Colonna, G. y Facchiano, A.M. (2008). ESBRI: a web server for evaluating salt bridges in proteins. *Bioinformatics* 3, 137-138.

Cruz-Soto, M.E., Cosio, G., Jeziorski, M.C., Vargas-Barroso, V., Aguilar, M.B., Carabez, A., . . . Clapp, C. (2009). Cathepsin D is the primary protease for the generation of adenohipofyseal vasoinhibins: cleavage occurs within the prolactin secretory granules. *Endocrinology* 150, 5446-5454.

Chaiken, I.M. y Williams, W.V. (1996). Identifying structure-function relationships in four-helix bundle cytokines: towards de novo mimetics design. *Trends in biotechnology* 14, 369-375.

Chazotte, B. (2011). Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* 2011, pdb prot5557.

Chen, K., Stephanopoulos, G.N., Sinskey, A.J. y Lodish, H.F. (1995). Regulated secretion of prolactin by the mouse insulinoma cell line beta TC-3. *Biotechnology (N Y)* 13, 1191-1197.

Chung, A.S. y Ferrara, N. (2011). Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 563-584.

D'Angelo, G., Martini, J.F., Iiri, T., Fantl, W.J., Martial, J. y Weiner, R.I. (1999). 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Molecular endocrinology* 13, 692-704.

D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J. y Weiner, R.I. (1995). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6374-6378.

Daggett, V. y Fersht, A. (2003). The present view of the mechanism of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 497-502.

Dahl, A.C., Chavent, M. y Sansom, M.S. (2012). Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction. *Bioinformatics* 28, 2193-2194.

Darden, T., York, D. y Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics* 98, 10089-10092.

David, C.C. y Jacobs, D.J. (2014). Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins. *Methods in molecular biology* 1084, 193-226.

Diaz-Lezama, N., Wu, Z., Adan-Castro, E., Arnold, E., Vazquez-Membrillo, M., Arredondo-Zamarripa, D., . . . Clapp, C. (2016). Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1. *Lab Invest* 96, 283-295.

Dolinsky, T.J., Czodrowski, P., Li, H., Nielsen, J.E., Jensen, J.H., Klebe, G. y Baker, N.A. (2007). PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res* 35, W522-525.

Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A. y Baker, N.A. (2004). PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32, W665-667.

Doneen, B.A., Bewley, T.A. y Li, C.H. (1979). Studies on prolactin. Selective reduction of the disulfide bonds of the ovine hormone. *Biochemistry* 18, 4851-4860.

Duenas, Z., Rivera, J.C., Quiroz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., . . . Clapp, C. (2004). Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2049-2055.

Dueñas, Z., Torner, L., Corbacho, A.M., Ochoa, A., Gutiérrez-Ospina, G., López-Barrera, F., . . . Clapp, C. (1999). Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2498-2505.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. y Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology* 72, 8463-8471.

Elias, K.A. y Weiner, R.I. (1984). Direct arterial vascularization of estrogen-induced prolactin-secreting anterior pituitary tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 4549-4553.

Faupel-Badger, J.M., Ginsburg, E., Fleming, J.M., Susser, L., Doucet, T. y Vonderhaar, B.K. (2010). 16 kDa prolactin reduces angiogenesis, but not growth of human breast cancer tumors in vivo. *Hormones & cancer* 1, 71-79.

Ferrara, N., Clapp, C. y Weiner, R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129, 896-900.

Ferrara, N. y Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967-974.

Florio, T., Morini, M., Villa, V., Arena, S., Corsaro, A., Thellung, S., . . . Albini, A. (2003). Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology* 144, 1574-1584.

Folkman, J. (2000). Incipient angiogenesis. *Journal of the National Cancer Institute* 92, 94-95.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annual review of medicine* 57, 1-18.

- Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. y Hanahan, D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339, 58-61.
- Frauenfelder, H., Sligar, S.G. y Wolynes, P.G. (1991). The energy landscapes and motions of proteins. *Science* 254, 1598-1603.
- Fukuoka, H., Hamamoto, R. y Higurashi, M. (1991). Heterogeneity of serum and amniotic fluid prolactin in humans. *Horm Res* 35 *Suppl 1*, 58-63.
- Galfione, M., Luo, W., Kim, J., Hawke, D., Kobayashi, R., Clapp, C., . . . Lin, S.-H. (2003). Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expression and Purification* 28, 252-258.
- Garcia, C., Aranda, J., Arnold, E., Thebault, S., Macotela, Y., Lopez-Casillas, F., . . . Clapp, C. (2008). Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *The Journal of clinical investigation* 118, 2291-2300.
- Garcia, C., Nunez-Anita, R.E., Thebault, S., Arredondo Zamarripa, D., Jeziorsky, M.C., Martinez de la Escalera, G. y Clapp, C. (2014). Requirement of phosphorylatable endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 for vasoinhibin-mediated inhibition of endothelial cell migration and proliferation in vitro. *Endocrine* 45, 263-270.
- Ge, G., Fernandez, C.A., Moses, M.A. y Greenspan, D.S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 10010-10015.
- Gonzalez, C., Corbacho, A.M., Eiserich, J.P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., . . . Clapp, C. (2004). 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* 145, 5714-5722.
- Gonzalez, C., Parra, A., Ramirez-Peredo, J., Garcia, C., Rivera, J.C., Macotela, Y., . . . Clapp, C. (2007). Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* 87, 1009-1017.
- Hess, B. (2008). P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J chem Theory Comput* 4, 116-122.
- Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. y Lindahl, E. (2008). GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. *J Chem Theory Comput* 4, 435-447.
- Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Podewski, E., Bonda, T., Schaefer, A., Sliwa, K., . . . Drexler, H. (2007a). A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* 128, 589-600.

Hilfiker-Kleiner, D., Meyer, G.P., Schieffer, E., Goldmann, B., Podewski, E., Struman, I., . . . Drexler, H. (2007b). Recovery from postpartum cardiomyopathy in 2 patients by blocking prolactin release with bromocriptine. *Journal of the American College of Cardiology* 50, 2354-2355.

Hilfiker-Kleiner, D. y Sliwa, K. (2014). Pathophysiology and epidemiology of peripartum cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* 11, 364-370.

Hilfiker-Kleiner, D., Struman, I., Hoch, M., Podewski, E. y Sliwa, K. (2012). 16-kDa prolactin and bromocriptine in postpartum cardiomyopathy. *Curr Heart Fail Rep* 9, 174-182.

Honicke, U., Albrecht, S., Schrotter, H., Krug, S., Kolditz, M., Kuhlisch, E., . . . Halank, M. (2012). Prolactin and its 16-kDa N-terminal fragment: are higher in patients with precapillary pulmonary hypertension than in a healthy control group. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* 39, 44-50.

Huising, M.O., Kruiswijk, C.P. y Flik, G. (2006). Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *The Journal of endocrinology* 189, 1-25.

Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33-38, 27-38.

Jones, S. y Thornton, J.M. (1996). Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13-20.

Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W. y Klein, M.L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of chemical physics* 79, 926-935.

Kamentsky, L., Jones, T.R., Fraser, A., Bray, M.A., Logan, D.J., Madden, K.L., . . . Carpenter, A.E. (2011). Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* 27, 1179-1180.

Keeler, C., Dannies, P.S. y Hodsdon, M.E. (2003). The Tertiary Structure and Backbone Dynamics of Human Prolactin. *Journal of Molecular Biology* 328, 1105-1121.

Khurana, S., Liby, K., Buckley, A.R. y Ben-Jonathan, N. (1999). Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology* 140, 4127-4132.

Kim, J., Luo, W., Chen, D.T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L.Y. y Lin, S.H. (2003). Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer. *Cancer Res* 63, 386-393.

Kinet, V., Castermans, K., Herkenne, S., Maillard, C., Blacher, S., Lion, M., . . . Struman, I. (2011). The angiostatic protein 16K human prolactin significantly prevents tumor-induced lymphangiogenesis by affecting lymphatic endothelial cells. *Endocrinology* 152, 4062-4071.

- Kinet, V., Nguyen, N.Q., Sabatel, C., Blacher, S., Noel, A., Martial, J.A. y Struman, I. (2009). Antiangiogenic liposomal gene therapy with 16K human prolactin efficiently reduces tumor growth. *Cancer letters* 284, 222-228.
- Koromyslova, A.D., Chugunov, A.O. y Efremov, R.G. (2014). Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a Protein Surface Topography (PST) method. *J Chem Inf Model* 54, 1189-1199.
- Kumar, P. y Bansal, M. (2012). HELANAL-Plus: a web server for analysis of helix geometry in protein structures. *J Biomol Struct Dyn* 30, 773-783.
- Larsen, T.A., Olson, A.J. y Goodsell, D.S. (1998). Morphology of protein-protein interfaces. *Struct Fold Des* 6, 421-427.
- Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J. y Weiner, R.I. (1998). Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 139, 3696-3703.
- Lee, J., Majumder, S., Chatterjee, S. y Muralidhar, K. (2011). Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. *J Biosci* 36, 341-354.
- Lee, S.H., Kunz, J., Lin, S.H. y Yu-Lee, L.Y. (2007). 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res* 67, 11045-11053.
- Lee, S.H., Nishino, M., Mazumdar, T., Garcia, G.E., Galfione, M., Lee, F.L., . . . Yu-Lee, L.Y. (2005). 16-kDa prolactin down-regulates inducible nitric oxide synthase expression through inhibition of the signal transducer and activator of transcription 1/IFN regulatory factor-1 pathway. *Cancer Res* 65, 7984-7992.
- Liang, C.C., Park, A.Y. y Guan, J.L. (2007). In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols* 2, 329-333.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- MacKerell, A.D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R.L., Evanseck, J.D., Field, M.J., . . . Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B* 102, 3586-3616.
- Macotela, Y., Aguilar, M.B., Guzman-Morales, J., Rivera, J.C., Zermeno, C., Lopez-Barrera, F., . . . Clapp, C. (2006). Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of cell science* 119, 1790-1800.
- Macotela, Y., Mendoza, C., Corbacho, A.M., Cosio, G., Eiserich, J.P., Zentella, A., . . . Clapp, C. (2002). 16K prolactin induces NF-kappaB activation in pulmonary fibroblasts. *The Journal of endocrinology* 175, R13-18.

- Maeshima, K., Iino, H., Hihara, S. y Imamoto, N. (2011). Nuclear size, nuclear pore number and cell cycle. *Nucleus* 2, 113-118.
- Martini, J.F., Piot, C., Humeau, L.M., Struman, I., Martial, J.A. y Weiner, R.I. (2000). The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Molecular endocrinology* 14, 1536-1549.
- Mejia, S., Morales, M.A., Zetina, M.E., Martinez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1997). Immunoreactive prolactin forms colocalize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology* 66, 151-159.
- Mejia, S., Torner, L.M., Jeziorski, M.C., Gonzalez, C., Morales, M.A., de la Escalera, G.M. y Clapp, C. (2003). Prolactin and 16K prolactin stimulate release of vasopressin by a direct effect on hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrine* 20, 155-162.
- Mitra, I. (1980a). A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochemical and biophysical research communications* 95, 1750-1759.
- Mitra, I. (1980b). A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochemical and biophysical research communications* 95, 1760-1767.
- Miyamoto, S. y Kollman, P.A. (1992). Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. *Journal of Computational Chemistry* 13, 952-962.
- Morohoshi, K., Mochinaga, R., Watanabe, T., Nakajima, R. y Harigaya, T. (2018). 16kDa vasoinhibin binds to integrin alpha5 beta1 on endothelial cells to induce apoptosis. *Endocr Connect*.
- Nguyen, N.Q., Castermans, K., Berndt, S., Herkenne, S., Tabruyn, S.P., Blacher, S., . . . Struman, I. (2011). The antiangiogenic 16K prolactin impairs functional tumor neovascularization by inhibiting vessel maturation. *PloS one* 6, e27318.
- Nguyen, N.Q., Cornet, A., Blacher, S., Tabruyn, S.P., Foidart, J.M., Noel, A., . . . Struman, I. (2007). Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 15, 2094-2100.
- Nguyen, N.Q., Tabruyn, S.P., Lins, L., Lion, M., Cornet, A.M., Lair, F., . . . Struman, I. (2006). Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14319-14324.
- Nyberg, P., Xie, L. y Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 65, 3967-3979.

Páll, S., Abraham, M.J., Kutzner, C., Hess, B. y Lindahl, E. (2015). Tackling Exascale Software Challenges in Molecular Dynamics Simulations with GROMACS. In Solving Software Challenges for Exascale: International Conference on Exascale Applications and Software, EASC 2014, Stockholm, Sweden, April 2-3, 2014, Revised Selected Papers, S. Markidis, and E. Laure, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 3-27.

Pan, H., Nguyen, N.Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L.C., Rentier-Delrue, F., . . . Grant, M.B. (2004). Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2413-2419.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. y Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 25, 1605-1612.

Piwnica, D., Fernandez, I., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P.A. y Goffin, V. (2006). A new mechanism for prolactin processing into 16K PRL by secreted cathepsin D. *Molecular endocrinology* 20, 3263-3278.

Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., . . . Goffin, V. (2004). Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Molecular endocrinology* 18, 2522-2542.

Pronk, S., Pall, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., . . . Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* 29, 845-854.

Pyrkov, T.V., Chugunov, A.O., Krylov, N.A., Nolde, D.E. y Efremov, R.G. (2009). PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. *Bioinformatics* 25, 1201-1202.

Ramírez, M., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., Jeziorski, M.C., Arnold, E., Díaz-Lezama, N., . . . Clapp, C. (2011). Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 8944-8950.

Robles-Osorio, M.L., Garcia-Franco, R., Nunez-Amaro, C.D., Mira-Lorenzo, X., Ramirez-Neria, P., Hernandez, W., . . . Clapp, C. (2018). Basis and Design of a Randomized Clinical Trial to Evaluate the Effect of Levosulpiride on Retinal Alterations in Patients With Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 242.

Sabatel, C., Cornet, A.M., Tabruyn, S.P., Malvaux, L., Castermans, K., Martial, J.A. y Struman, I. (2010). Sproutyl, a new target of the angiostatic agent 16K prolactin, negatively regulates angiogenesis. *Molecular cancer* 9, 231.

Sadaie, M., Dillon, C., Narita, M., Young, A.R., Cairney, C.J., Godwin, L.S., . . . Narita, M. (2015). Cell-based screen for altered nuclear phenotypes reveals senescence progression in polyploid cells after Aurora kinase B inhibition. *Molecular biology of the cell* 26, 2971-2985.

Salic, A. y Mitchison, T.J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 2415-2420.

Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* *1*, 16-22.

Schneider, C.A., Rasband, W.S. y Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* *9*, 671-675.

Schneider, J.P., Lombardi, A. y DeGrado, W.F. (1998). Analysis and design of three-stranded coiled coils and three-helix bundles. *Fold Des* *3*, R29-40.

Sinha, Y.N. y Gilligan, T.A. (1984). A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology* *114*, 2046-2053.

Sinha, Y.N., Gilligan, T.A., Lee, D.W., Hollingsworth, D. y Markoff, E. (1985). Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *60*, 239-243.

Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., . . . Martial, J.A. (1999). 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 1246-1251.

Tabruyn, S.P., Nguyen, N.Q., Cornet, A.M., Martial, J.A. y Struman, I. (2005). The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases. *Molecular endocrinology* *19*, 1932-1942.

Tabruyn, S.P., Sabatel, C., Nguyen, N.Q., Verhaeghe, C., Castermans, K., Malvaux, L., . . . Struman, I. (2007). The angiostatic 16K human prolactin overcomes endothelial cell anergy and promotes leukocyte infiltration via nuclear factor-kappaB activation. *Molecular endocrinology* *21*, 1422-1429.

Tabruyn, S.P., Sorlet, C.M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R.I., Martial, J.A. y Struman, I. (2003). The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Molecular endocrinology* *17*, 1815-1823.

Teilum, K., Hoch, J.C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J.A. y Kragelund, B.B. (2005). Solution structure of human prolactin. *J Mol Biol* *351*, 810-823.

Thebault, S., González, C., García, C., Zamarripa, D.A., Nava, G., Vaca, L., . . . Clapp, C. (2011). Vasoinhibins Prevent Bradykinin-Stimulated Endothelial Cell Proliferation by Inactivating eNOS via Reduction of both Intracellular Ca²⁺ Levels and eNOS Phosphorylation at Ser1179. *Pharmaceuticals* *4*, 1052-1069.

Torner, L., Mejia, S., Lopez-Gomez, F.J., Quintanar, A., Martinez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1995). A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136, 5454-5460.

Tournier, A.L. y Smith, J.C. (2003). Principal components of the protein dynamical transition. *Physical review letters* 91, 208106.

Triebel, J., Bertsch, T., Bollheimer, C., Rios-Barrera, D., Pearce, C.F., Hufner, M., . . . Clapp, C. (2015a). Principles of the Prolactin/Vasoinhibin Axis. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*, ajpgu 00256 02015.

Triebel, J., Bertsch, T., Martinez de la Escalera, G. y Clapp, C. (2015b). On the Path toward Classifying Hormones of the Vasoinhibin-Family. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 16.

Triebel, J., Macotela, Y., de la Escalera, G.M. y Clapp, C. (2011). Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB life* 63, 806-810.

Triebel, J., Robles-Osorio, M.L., Garcia-Franco, R., Martinez de la Escalera, G., Clapp, C. y Bertsch, T. (2017). From Bench to Bedside: Translating the Prolactin/Vasoinhibin Axis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 8, 342.

Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. y Berendsen, H.J. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26, 1701-1718.

van Eck, N.J. y Waltman, L. (2010). Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. *Scientometrics* 84, 523-538.

Vick, R.S., Wong, V.L. y Witorsch, R.J. (1987). Biological, immunological and biochemical characterization of cleaved prolactin generated by lactating mammary gland. *Biochimica et biophysica acta* 931, 196-204.

Walia, A., Yang, J.F., Huang, Y.H., Rosenblatt, M.I., Chang, J.H. y Azar, D.T. (2015). Endostatin's emerging roles in angiogenesis, lymphangiogenesis, disease, and clinical applications. *Biochimica et biophysica acta* 1850, 2422-2438.

Warner, M.D., Sinha, Y.N. y Peabody, C.A. (1993). Growth hormone and prolactin variants in normal subjects. Relative proportions in morning and afternoon samples. *Horm Metab Res* 25, 425-429.

Wong, V.L., Compton, M.M. y Witorsch, R.J. (1986). Proteolytic modification of rat prolactin by subcellular fractions of the lactating rat mammary gland. *Biochimica et biophysica acta* 881, 167-174.

Zamorano, M., Ledesma-Colunga, M.G., Adan, N., Vera-Massieu, C., Lemini, M., Mendez, I., . . . Clapp, C. (2014). Prolactin-derived vasoinhibins increase anxiety- and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology* 44, 123-132.

Zepeda-Romero, L.C., Vazquez-Membrillo, M., Adan-Castro, E., Gomez-Aguayo, F., Gutierrez-Padilla, J.A., Angulo-Castellanos, E., . . . Clapp, C. (2017). Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 81, 473-479.

11. Índice de Figuras

Figura 1.1. Historia de la Vasoinhibina.....	1
Figura 1.2. Acoplamiento bibliográfico de los artículos de vasoinhibina en base a las citas comunes.....	3
Figura 1.3. Mapa de co-ocurrencia para el análisis de términos relacionados con vasoinhibina en títulos y resúmenes de los trabajos a través del tiempo.....	5
Figura 2.1. Estructura Soluble de la prolactina humana (hPRL).....	8
Figura 2.2. Diagrama secuencial de la generación de la vasoinhibina (Vi) a partir de la PRL.....	12
Figura 8.1.1. Exposición del núcleo hidrofóbico de la PRL después de la remoción de la H4.	30
Figura 8.1.2. Compresión y estabilización de una isoforma de vasoinhibina de 150 aminoácidos (Vi).	32
Figura 8.1.3. Regiones de mayor movimiento en la vasoinhibina (.....)	33
Figura 8.1.4. Visualización de la trayectoria de la vasoinhibina (Vi) desde PRL.....	34
Figura 8.1.5. Análisis de trayectoria de vasoinhibina (Vi) con campo de fuerza AMBER99SB-ILDN o GROMOS96 54A7.	35
Figura 8.1.6. Análisis de componentes principales de la trayectoria de la vasoinhibina (Vi).	36
Figura 8.1.7. Proyecciones de los vectores eigen de la trayectoria de la vasoinhibina (Vi).	37
Figura 8.2.1. Análisis de estructura secundaria por residuo de la vasoinhibina (Vi).	39
Figura 8.2.2. Porcentaje de helicidad de los aminoácidos de la vasoinhibina (Vi).	40
Figura 8.2.3. Identificación de la estructura nativa de vasoinhibina (Vi) mediante el análisis del perfil de energía libre.....	40
Figura 8.2.4. Análisis de la geometría de la H2 de la vasoinhibina (Vi).....	41
Figura 8.2.5. Análisis de los ángulos inter-hélice de la vasoinhibina (Vi).....	42

Figura 8.3.1. Área de superficie accesible al solvente (SASA) de la vasoinhibina (Vi).....	44
Figura 8.4.1. Potencial electrostático de superficie de la vasoinhibina (Vi).	46
Figura 8.4.2. Análisis de los puentes de sal intermoleculares de la vasoinhibina (Vi).	47
Figura 8.5.1. Superficie hidrofóbica de la vasoinhibina (Vi).	48
Figura 8.5.2. Potencial hidrofóbico de superficie de la vasoinhibina (Vi).	49
Figura 8.6.1. Análisis de trayectoria de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi).	51
Figura 8.6.2. Fluctuación de la media cuadrática (RMSF) de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi).	52
Figura 8.6.3. Análisis de la estructura secundaria de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi).	53
Figura 8.6.4. Porcentaje de helicidad de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi).....	54
Figura 8.6.5. Área de superficie accesible al solvente (SASA) de distintas isoformas de vasoinhibina (Vi).	55
Figura 8.7.1. Generación de una isoforma recombinante de vasoinhibina de 79 aminoácidos.	58
Figura 8.7.2. Análisis de la agregación por puentes disulfuro de la isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos.	58
Figura 8.7.3. Concentración de isoformas de vasoinhibina de 79 y de 123 aminoácidos en medio condicionado.	59
Figura 8.7.4. Inhibición de la proliferación de células endoteliales por una proteína que comprende los aminoácidos 1 a 79 de la PRL.	60
Figura 8.7.5. Potencia biológica de una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos.	61
Figura 8.7.6. Una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos inhibe la migración de células endoteliales.	62
Figura 8.7.7. Inhibición de los genes blanco de vasoinhibina por una isoforma de 79 aminoácidos.	63

Figura 8.7.8. Proliferación de células endoteliales productoras de una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos (Vi79).	64
Figura 8.7.9. Área nuclear de células endoteliales productoras de una isoforma de vasoinhibina de 79 aminoácidos (Vi79).	65
Figura 8.8.1. Comparación de DM de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos.	66
Figura 8.8.2. Comparación de estructura secundaria de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos.	67
Figura 8.8.3. Comparación de estructura terciaria de isoformas de vasoinhibina de 150, 123 y 79 aminoácidos.	68
Figura 8.8.4. Análisis de la simulación de DM de isoformas de vasoinhibina de 123 y 79 aminoácidos extendida a 200 ns.	69
Figura 12.1.1. Acoplamiento bibliográfico de los artículos de vasoinhibina en base a la revista científica donde fueron publicados.	94
Figura 12.1.2. Acoplamiento bibliográfico de los artículos de vasoinhibina en base al país donde se llevó a cabo el trabajo.	95
Figura 12.2.1. Primera evidencia de fragmentos de PRL.	96
Figura 12.2.2. Comparación de la proteólisis de la PRL de rata con distintos tejidos de rata macho adulta.	97
Figura 12.2.4. Primera evidencia de que la isoforma de 16 kDa podría tener otra función distinta a la de la PRL.	99

12. Anexos

12.1. Análisis de Acoplamiento Bibliográfico

La vasoinhibina proviene de la hormona PRL y fue en la revista científica de endocrinología “Endocrinology” en la cual se publicaron muchos de los trabajos que aún hoy son referencia en el campo (Figura 12.1.1). Revistas como “PNAS,USA” y “Molecular Endocrinology” también figuran y más recientemente la revista “Frontiers of Endocrinology” ha sido muy usada para las publicaciones de este tema. La mayoría de las publicaciones de este tema se publicaron en Estados Unidos, México y Bélgica. Recientemente, Alemania ha contribuido importantemente a estas publicaciones (Figura 12.1.2).

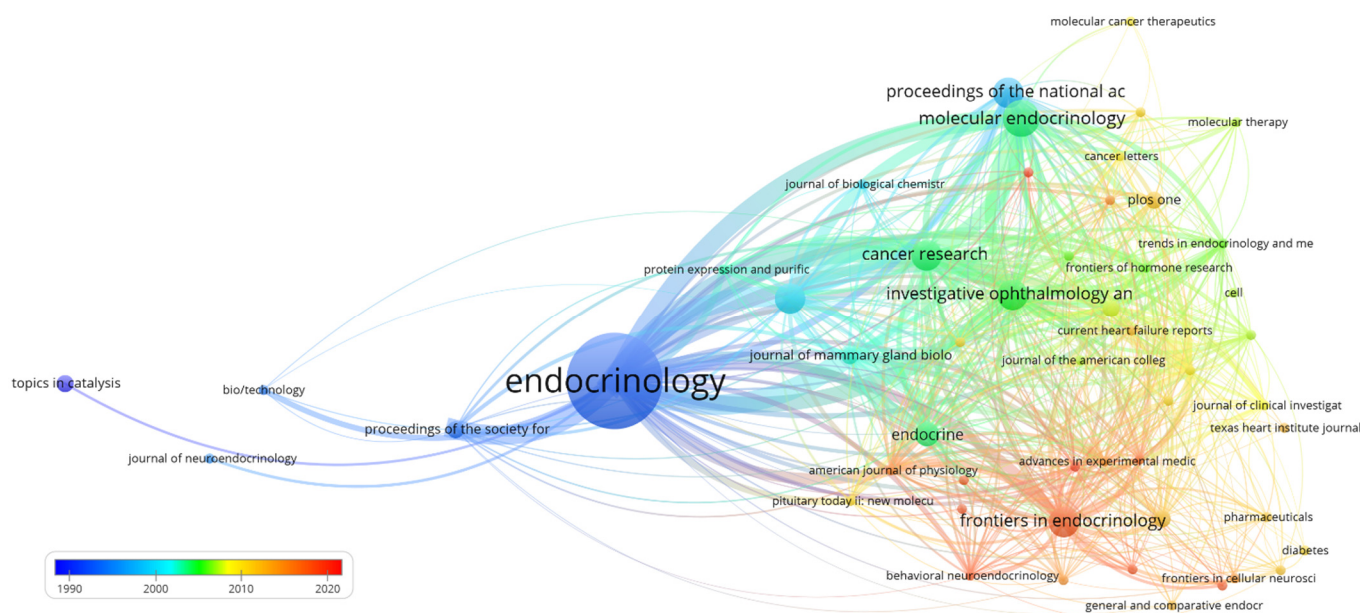


Figura 12.1.1. Acoplamiento bibliográfico de los artículos de vasoinhibina en base a la revista científica donde fueron publicados. La mayoría de los artículos de la vasoinhibina fueron publicados en la revista de endocrinología “Endocrinology”, sin embargo después del año 2000 parece haber una diversificación en las revistas en las que se publicaron los trabajos. El tamaño del nodo indica el número de citas de esa revista, las líneas representan las relaciones, la distancia entre los nodos implica una mayor asociación. El color indica el año en que se publicaron esos trabajos. El mapa fue creado y visualizado con VOSviewer (van Eck y Waltman, 2010), usando las 100 publicaciones.

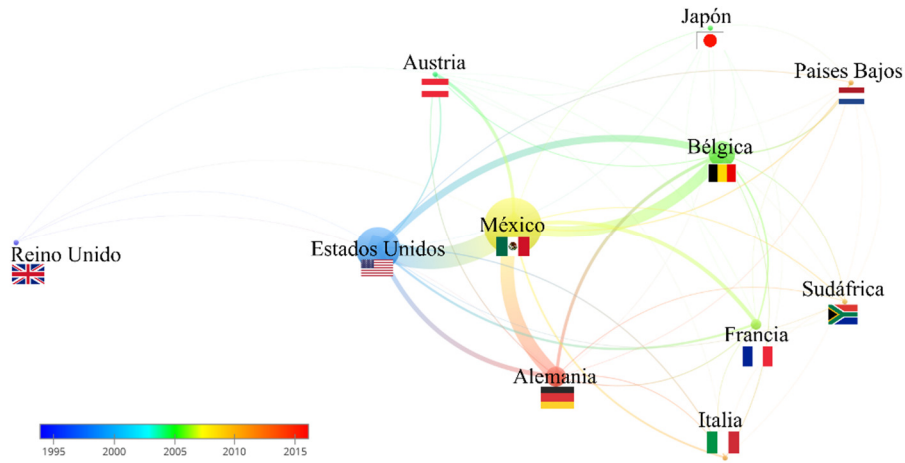


Figura 12.1.2. Acoplamiento bibliográfico de los artículos de vasoinhibina en base al país donde se llevó a cabo el trabajo. Inicialmente Reino Unido y Estados Unidos. México se ha mantenido vigente, pero otros países como Bélgica y Alemania han colaborado de manera importante al campo.

12.2. Descubrimiento de la vasoinhibina

Los fragmentos de 16 y de 8 kDa derivados de la PRL fueron observados por primera vez por Indraneel Mittra en 1980, mediante la separación por electroforesis en poliacrilamida de un extracto de pituitaria de rata marcado con [^{14}C] en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Figura 12.2.1a) (Mittra, 1980a). En contraste, en condiciones no reductoras, no se observaron esos fragmentos, lo que llevó a proponer que algunas moléculas de la PRL en la pituitaria se cortaban antes de ser secretadas, y que el corte ocurría en una asa unida por disulfuros, lo que convertía a la PRL en 2 cadenas de aminoácidos unidas por un puente disulfuro (Figura 12.2.1b). Además, se determinó que el fragmento de 16 kDa correspondía al extremo N-terminal debido a que el marcaje con [^{35}S]-metionina no evidenciaba el fragmento de 8 kDa, indicando que no tenía metionina (Figura 12.2.1b) (Mittra, 1980a).

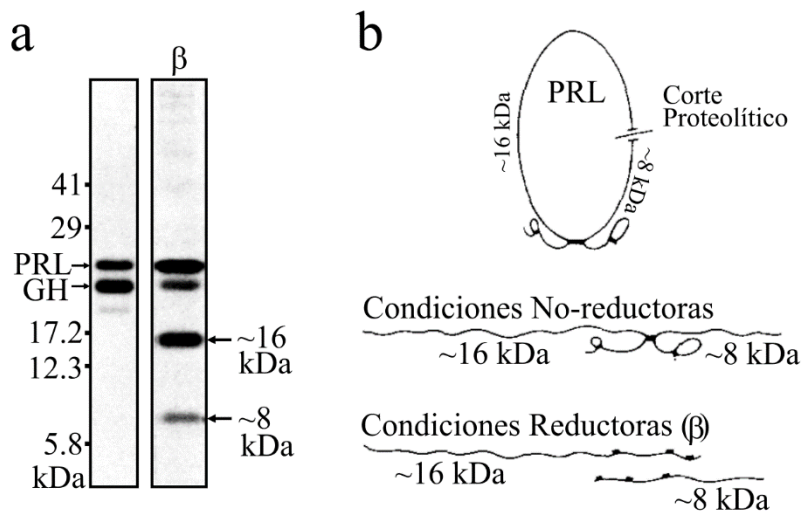


Figura 12.2.1. Primera evidencia de fragmentos de PRL. a. Fluorografía de SDS-PAGE de medio condicionado de pituitaria en cultivo, marcada con [^{14}C], en condiciones no-reductoras o reductoras (β). b. Representación esquemática de la PRL de rata indicando el sitio probable de corte y la estructura de la molécula en condiciones no reductoras y reductoras. Figura Modificada de Mittra, 1980.

Indraneel Mitra también llevó a cabo la demostración de que la presencia y concentración de la isoforma de 16 kDa de la PRL de rata variaba entre las glándulas pituitarias de animales en distintos estados fisiológicos y farmacológicos (Mitra, 1980a). Asimismo, se observaron efectos mitogénicos sobre las células epiteliales del tejido mamario de ratas vírgenes adultas cuando una fracción que contenía la isoforma de PRL de 16 kDa fue inyectada subcutáneamente en una sola dosis (Mitra, 1980b).

La capacidad de la pituitaria de procesar a la PRL llevó a preguntar si otros tejidos eran capaces de procesar a la PRL hacia fragmentos de menor peso molecular. Entonces, Mark M. Compton y Raphael J. Witorsch demostraron que la PRL de rata podría ser procesada a su fragmento de 16 kDa con extracto de próstata ventral (Compton y Witorsch, 1983), tejido que es blanco de la PRL, particularmente con una fracción subcelular enriquecida en lisosomas y a pH ácido (Compton y Witorsch, 1984). Además, probaron que el riñón, el bazo, y el pulmón, entre otros, también tenían la capacidad de procesar a la PRL de manera activa, y el hígado y la próstata dorsolateral, aunque procesaban a la PRL eran mucho menos activos (Figura 12.2.2) (Compton y Witorsch, 1984).

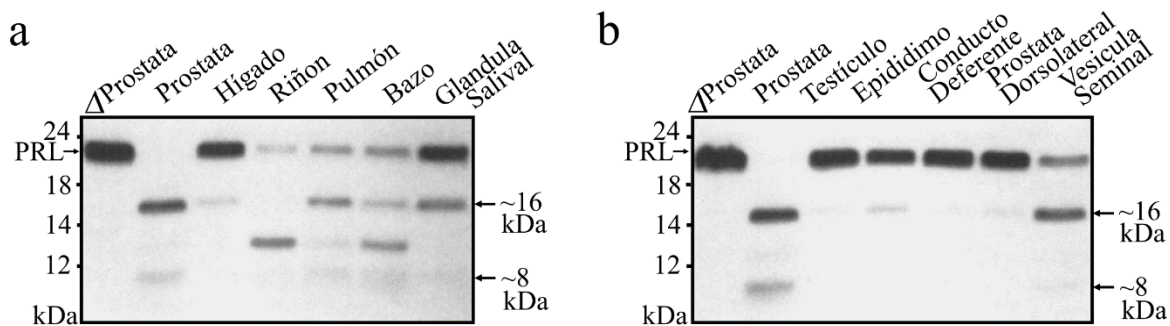


Figura 12.2.2. Comparación de la proteólisis de la PRL de rata con distintos tejidos de rata macho adulta. 50 μ g de distintos tejidos se incubaron con [125 I]-PRL a pH 4.5 por 9 horas antes de la radiografía para comparar el corte con próstata con distintos tejidos no reproductivos (a) o reproductivos (b). Figura modificada de Compton y Witorsch, 1984.

Por su parte, Y. N. Sinha en el mismo año demostró que la isoforma de 16 y de 8 kDa de PRL de ratón ocurría también en la glándula pituitaria del ratón (Sinha y Gilligan, 1984) y, al año siguiente, mostró evidencia de la presencia de la isoforma de 16 kDa de la PRL en la pituitaria humana, en el plasma mujeres en la semana 35 de gestación y en el suero de un paciente con prolactinoma (Sinha et al., 1985).

La actividad mitogénica de la isoforma de 16 kDa de la PRL de rata sobre la glándula mamaria reportada por Mitra en 1980, hizo surgir la cuestión de si la glándula mamaria podría procesar a la PRL para generar estos fragmentos. En 1986, Vicky L.Y. Wong mostró que distintas fracciones subcelulares de la glándula mamaria procesaban a la PRL a pH ácido y que una glándula mamaria lactante tenía más actividad (Wong et al., 1986). Estos hallazgos se confirmaron al año siguiente por Carmen Clapp, quien determinó que el corte óptimo se daba a pH 3.4. Asimismo, mostró que el hígado mostraba una potencia de corte similar, así como que en la leche estaba presente la actividad de corte de la PRL. Además, se observó que mientras la PRL de rata únicamente derivaba en los fragmentos de 16 y de 8 kDa, la PRL ovina y humana eran procesadas en isoformas de distintos tamaños que van de ~18 a ~8 kDa (Figura 12.2.3) (Clapp, 1987).

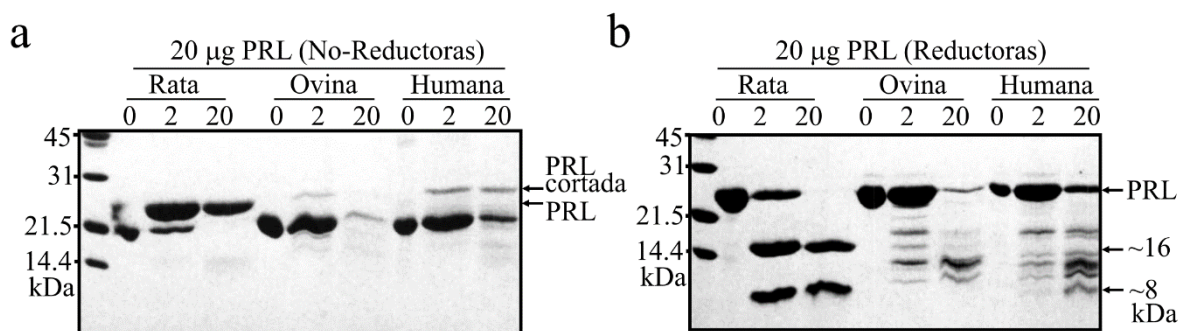


Figura 12.2.3. Distintas isoformas derivadas de PRL de rata, ovina y humana cortada con glándula mamaria. Corte con 0, 2 o 20 µg de fracción enriquecida de glándula mamaria de PRL de distintas especies con SDS-PAGE en condiciones no reductoras (a) y reductoras (b). Figura modificada de Clapp, 1987.

Hasta ese momento se pensaba que la isoforma de 16 kDa de la PRL tenía un efecto mitogénico en la glándula mamaria (Mitra, 1980b). La primera evidencia de que la isoforma de PRL de 16 kDa pudiera tener otros efectos que no estuvieran mediados por el receptor de PRL los reportó Clapp en 1987 mediante un ensayo de desplazamiento de [¹²⁵I]-PRL ovina unida a membrana de hígado de rata preñada, con distintas concentraciones de PRL ovina y de rata y la isoforma de 16 kDa (Figura 12.2.4). En este ensayo observó que mientras la PRL de rata se unía con una afinidad 27% menor que la PRL ovina, la fracción de 16 kDa solo tenía 9.5% de la actividad de unión de la PRL de rata intacta. La preparación de la isoforma 16 kDa carbamidometilada (CM), para evitar la agregación por la formación de puentes disulfuro intermoleculares, tuvo una potencia de unión aún menor (<1%) que la intacta (Figura 12.2.4). Este resultado llevó a considerar la posibilidad de que existiera un receptor distinto a la de la PRL, particular para la isoforma de 16 kDa.

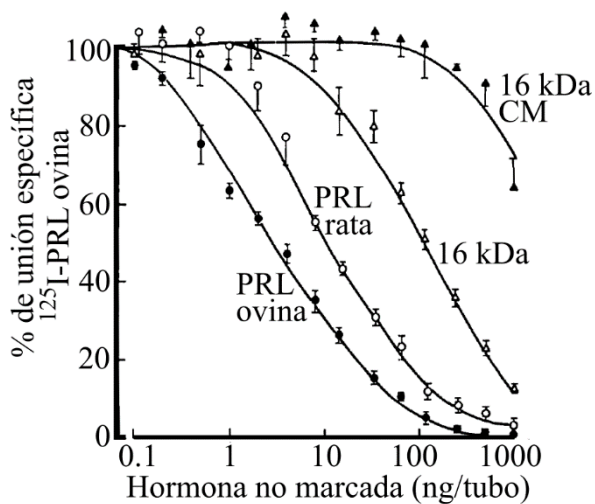


Figura 12.2.4. Primera evidencia de que la isoforma de 16 kDa podría tener otra función distinta a la de la PRL. Desplazamiento de [¹²⁵I]-PRL ovina de membranas de hígado de rata preñada con PRL ovina, PRL de rata, isoforma de 16 kDa de la PRL de rata intacta y carbamidometilada (CM).

Una caracterización inmunológica y química de la isoforma de 16 kDa de la PRL de rata se reportó ese mismo año por Robert S. Vick. Quien mediante un radioinmunoensayo, determinó que la fracción de 16 kDa reducía su capacidad de ser detectada por anticuerpos

alrededor de 50%. Asimismo determinó con degradación de Edman que el fragmento de 8 kDa derivado del corte comenzaba en el residuo 149, lo cual sugería que el corte ocurría antes este aminoácido (Vick et al., 1987), siendo el primer reporte del sitio de corte de la PRL de rata para generar ese fragmento. Un año después, se caracterizaron mejor las acciones biológicas de la isoforma de 16 kDa de la PRL de rata mediante ensayos mitogénicos, lactogénicos e inmunológicos, en los cuales se observó que la potencia mitogénica y lactogénica se redujeron 35 y 90%, respectivamente, pero la inmunoreactividad se redujo hasta 2% con respecto a la PRL intacta (Clapp et al., 1988). Esto llevó a preguntarse qué otros efectos podrían tener estos fragmentos.

En el siguiente año se reportaron los primeros hallazgos de la existencia de un receptor distinto al de la PRL para el fragmento de 16 kDa, esto mediante su evaluación en curvas de desplazamiento de la PRL con el fragmento de 16 kDa de PRL de rata en membranas de distintos tejidos (Clapp et al., 1989). En este estudio se pudo observar una preferencia de unión del fragmento de 16 kDa a tejidos como el riñón, cerebro, hígado y músculo esquelético, preferencia que no pudo ser desplazada por PRL.

En 1989, se propuso que la vasoinhibina era un artefacto debido al procesamiento de las muestras durante su preparación (Casabiell et al., 1989). En dicho trabajo se mostraba que una proteasa ácida era responsable de la generación del fragmento, y que su actividad ocurría durante el procesamiento de la muestra, pues en ese trabajo no se pudieron ver fragmentos en la pituitaria cuando se evitaba la acidificación del tejido (Casabiell et al., 1989). Este trabajo no consideró reportes anteriores que mostraron la presencia de vasoinhibina en la pituitaria (Sinha y Gilligan, 1984; Sinha et al., 1985) cuando la glándula era directamente lisada en buffer de Laemli bajo condiciones desnaturizantes y, por ende, bajo inactivación

de toda actividad enzimática. Asimismo, ya se tenían reportes sobre la presencia de vasoinhibina en el plasma de mujeres (Sinha 1985) y en 1991, Fukuoka H. analizó la heterogeneidad de las isoformas de PRL en el suero y en el líquido amniótico de humanos y demostró la presencia de una isoforma de ~14 kDa en el líquido amniótico en condiciones no-reductoras y reductoras. Y que era posible observarlas en sangre materna en condiciones no reductoras cuando se precipitaban con concavalina A, lo que sugería que podrían estar glicosiladas (Fukuoka et al., 1991). El hallazgo de observar a estos fragmentos in vivo, en condiciones fisiológicas en el suero y líquido amniótico, rechazaba la hipótesis de Casabiell, de que los fragmentos de PRL eran artefactos.

Sin embargo, la evidencia principal en contra de la naturaleza artefactual de la vasoinhibina fue la demostración de su actividad biológica sobre células endoteliales. El primer trabajo se publicó por Napoleone Ferrara como primer autor en 1991, quien mostró que el fragmento de 16 kDa de la PRL de rata inhibía el crecimiento estimulado por el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) de células endoteliales de capilares del cerebro y de la corteza adrenal (Ferrara et al., 1991).

No debemos olvidar cual fue la racional de buscar efecto de estas isoformas de PRL en células endoteliales. En 1984, Kathleen A. Elias y Richard I. Weiner reportaron que los prolactinomas inducidos por estradiol desarrollaban una vascularización directa a partir de la arteria carótida que no irrigaba al hipotálamo, lo que permitiría escapar del control negativo vía dopamina que ejerce el hipotálamo sobre la proliferación de la células productoras de PRL y, por ende, promover la generación de prolactinomas (Elias y Weiner, 1984). En la búsqueda de factores proangiogénicos hipofisarios, se analizó a la PRL y a sus isoformas incluida la vasoinhibina a través de un esfuerzo colaborativo entre Richard Weiner,

Napoleone Ferrara y Carmen Clapp. Fue entonces que se descubrieron los efectos antiangiogénicos de la vasoinhibina recientemente purificada por Clapp (Clapp et al 1987). En este trabajo (Ferrara et al., 1991) se propuso uno de los dogmas, que posteriormente se derribó, que indica que el efecto de la vasoinhibina es específico sobre las células endoteliales. Se mostró que en una línea celular de riñón de hámster, que expresa el receptor del FGF, la vasoinhibina no modifica el efecto proliferativo del FGF y se concluyó, por ende, que el efecto de la vasoinhibina era específico del endotelio vascular (Ferrara et al., 1991). Este trabajo mostró que la vasoinhibina es un factor antiangiogénico y, debido a la coyuntura que indica que el crecimiento de vasos sanguíneos determinan la progresión del cáncer (Folkman et al., 1989; Folkman, 2000), Ferrara et al. propone usar a este fragmento en el tratamiento de esta enfermedad por primera vez.

Una vez identificado un blanco del fragmento de 16 kDa de la PRL de rata, la célula endotelial capilar, se optó por buscar a qué entidades se unía este fragmento. Un sitio específico, de alta afinidad y saturable se observó en células endoteliales capilares de cerebro bovino, y se relacionó con la presencia de 2 proteínas de ~48 y ~68 kDa que se unían a esta proteína, si bien no se caracterizaron químicamente (Clapp y Weiner, 1992). Esta fue la primera evidencia de que la vasoinhibina tiene un receptor membranal en estas células.

No obstante, el trabajo que se podría considerar la piedra angular en el área de la vasoinhibina por su relevancia fue publicado por Carmen Clapp y colaboradores en 1993, en el cual se determinó que una vasoinhibina recombinante inhibía la angiogénesis tanto in vivo como in vitro (Clapp et al., 1993). Este trabajo innovó de distinta manera el campo, en primer lugar se usó por primera vez la generación recombinante de la vasoinhibina, en segundo lugar fueron los primeros 123 aminoácidos de la PRL humana, siendo la primera vez que se

probaban los efectos de los fragmentos de PRL humana. También comenzaron los estudios in vivo con modelos de angiogénesis como el de la membrana corioalantoidea del pollo. Asimismo, el fragmento de los primeros 123 aminoácidos, era de alrededor de 14 kDa, lo cual sugería que no era la masa molecular 16 kDa determinante para la función, sino que otros fragmentos similares podrían tener acciones biológicas. Adicionalmente, y fortaleciendo los datos obtenidos con la isoforma humana, las isoformas de PRL de ~16 y ~14 kDa se observaron en condiciones no reductoras en el suero de sujetos normales (Warner et al., 1993).

12.3. Proteasas generadoras de vasoinhibina

En la carrera por identificar las enzimas que fisiológicamente podrían estar generando a la vasoinhibina Russel A. Baldocchi en 1993, usando una aproximación de espectrometría de masas para analizar los fragmentos de la PRL de rata, concluyó que la enzima catepsina D podría ser la principal proteasa generadora de ese fragmento en la PRL (Baldocchi et al., 1993). No obstante, un año después se observó que la PRL de rata generada en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario podía procesarse a un fragmento activo de ~14 kDa, observarse en condiciones no reductoras (Clapp et al., 1994) y secretarse (Torner et al., 1995), lo cual apoyaba la idea de que la masa de 16 kDa no era algo determinante para la actividad. Otra evidencia de la presencia endógena de esta isoforma fue a partir de un insulinoma de ratón, en el cual se observaron isoformas de ~16 kDa, y esta fue la primera vez que se analizaban estas isoformas en ratón (Chen et al., 1995). Por lo cual se podría pensar que existen otras proteasas, u otros sitios susceptibles al corte por catepsina D.

Un análisis posterior sobre las proteasas generadoras de vasoinhibina lo llevó a cabo Sudha Khurana y colaboradores en 1999, en el cual reportó que la PRL humana era resistente al corte por catepsina D, y en lugar de esa proteasa, la trombina era capaz de procesar la PRL humana hacia un fragmento de 16 kDa, el cual resultó ser el extremo C-terminal y no tener actividad antiangiogénica (Khurana et al., 1999). Este trabajo sentó las bases de que la vasoinhibina corresponde al extremo N-terminal de la PRL y se descartó a la trombina como proteasa generadora de vasoinhibina a pesar de que nunca se evaluó el extremo N-terminal derivado del corte con trombina.

Hoy se sabe que la catepsina D es una proteasa capaz de procesar a la PRL humana hacia varias isoformas de vasoinhibina, esto se demostró en el 2004 por David Piwnica y

colaboradores (Piwnica et al., 2004). El hecho de que la catepsina D es una proteasa ácida llevó a indagar sobre la posible acción fisiológica de la catepsina en la generación de vasoinhibina (Piwnica et al., 2006). Con el trabajo de Martha Cruz-Soto en el 2009, se mostró que la catepsina D se localiza en los gránulos de secreción de PRL en los lactotrofos hipofisarios, donde el ambiente ácido (pH 5.5) permite su acción generadora de vasoinhibina y la consecuente secreción de esta proteína a la circulación (Cruz-Soto et al., 2009).

Sin embargo, uno de los hallazgos que complementó la construcción del concepto del eje PRL/vasoinhibina (Triebel et al., 2015a) fue la evidencia de que proteasas como las metaloproteinasas de matriz, MMP's podían procesar a la PRL humana en vasoinhibina a pH fisiológico en el microambiente de órganos blanco (Macotela et al., 2006). Y por último, en el año 2007, la proteasa morfogenética de hueso-1 se reportó que podría procesar a la PRL en un fragmento activo de 17 kDa (Ge et al., 2007). Desde ese año no se han encontrado otras proteasas que tengan como sustrato a la PRL para generar vasoinhibina.

12.3.1. Isoformas de vasoinhibina recombinantes

Las enzimas que generan a la vasoinhibina y los sitios de corte donde estas proteasas cortan a la PRL, fueron determinados mucho después de que se evaluaran los efectos antiangiogénicos de la vasoinhibina con isoformas generadas de manera recombinante (Clapp et al., 1993). La isoforma que se generó primero fue la isoforma de 14 kDa que contenía los primeros 123 residuos de la PRL, se produjo en bacteria y el tamaño se diseñó debido a que la unión entre aminoácidos básicos R-K (R123-K124) es frecuentemente procesada para producir péptidos activos a partir de una proteína precursora (Clapp et al., 1993). Tiempo después se generó otra isoforma de vasoinhibina, pero de 139 aminoácidos

que se asemejaba más a la isoforma de 16 kDa que se había caracterizado en los trabajos iniciales (Struman et al., 1999).

Las preparaciones de isoformas de vasoinhibina de 123 y 139 residuos generadas en bacteria frecuentemente estaban contaminadas por endotoxinas, por lo que se optó por buscar un sistema de expresión donde la endotoxina no es un factor, y se comenzaron a producir estas isoformas en células de insecto (Galfione et al., 2003). Más recientemente una isoforma que contenía los primeros 142 residuos de la PRL se produjo mediante vectores virales adenoasociados (Ramírez et al., 2011), siendo esta última estrategia de transducción viral la más usada en los trabajos posteriores.

12.4. Mecanismos de acción de la vasoinhibina

En paralelo al análisis del efecto antiangiogénico de la vasoinhibina y de las proteasas generadoras, se investigó su mecanismo de acción. En 1995, Gisela D'Angelo y colaboradores demostraron que la vasoinhibina impedía la proliferación de las células endoteliales a través de inhibir la activación de las MAPK por VEGF y bFGF (D'Angelo et al., 1995), específicamente a nivel de Ras (D'Angelo et al., 1999).

En 1998 se publicó la evidencia de que la vasoinhibina podría estar relacionada también con inhibir la migración endotelial, pues esta molécula inhibía la actividad de la enzima urokinasa, esencial para este proceso, mediante un mecanismo indirecto, la expresión aumentada de PAI-1, el inhibidor de la urokinasa (Lee et al., 1998). Adicionalmente, en el 2007, se reportó que la vía de señalización Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 estaba involucrada en el efecto inhibitorio de la vasoinhibina sobre la migración endotelial (Lee et al., 2007).

El concepto de la vasoinhibina como un agente pro-apoptótico específico para las células endoteliales, surgió en el 2000 de las observaciones de Jean-François Martini y colaboradores que mostraron un efecto dosis-respuesta y dependiente de tiempo de la vasoinhibina induciendo la fragmentación del DNA y esto se correlacionaba con la activación de la caspasa 3 y la Bcl-X en su forma apoptótica (Martini et al., 2000).

Encontrar y caracterizar respuestas de célula endotelial al tratamiento con la vasoinhibina, fue el objetivo de la mayoría de los trabajos una vez conocidos los efectos, aunque algunos de ellos mostraron acciones en otras células, estos abrieron la puerta a entender los mecanismos de la vasoinhibina a nivel de la vasculatura (inhibición de vasopermeabilidad y vasodilatación). Un ejemplo, fue el hallazgo de Ana Corbacho y colaboradores en el año 2000, en el cual mostró que la vasoinhibina incrementaba la expresión de la sintasa de óxido

nítrico inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico en fibroblastos de pulmón que son células importantes para las reacciones inflamatorias de las vías respiratorias (Corbacho et al., 2000b). Este hallazgo permitió cuatro años más tarde mostrar que estos efectos eran contrarios en células endoteliales, donde la vasoinhibina inhibía la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), la movilización de calcio y la vasorelajación (Gonzalez et al., 2004). Hallazgo que fue parcialmente confirmado por Sok-hyong Lee un año después cuando mostró que el fragmento de 16 kDa de PRL regulaba a la baja la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible en el endotelio a través de inhibir la vía de IRF-1 pero no la de la NF- κ B (Lee et al., 2005).

El hallazgo de Corbacho en el año 2000 sobre el efecto estimulador de la vasoinhibina sobre los niveles de iNOS en fibroblastos (Corbacho et al., 2000b), llevó a buscar el mecanismo y se encontró que el NF- κ B se activaba en los fibroblastos luego de ser tratados con vasoinhibina (Macotela et al., 2002). En las células endoteliales se probó que la activación del factor NF- κ B era requerida para la apoptosis dependiente de caspasa (Tabruyn et al., 2003).

El efecto de inhibir la vasopermeabilidad que tiene la vasoinhibina se demostró en el trabajo de Celina García y colaboradores del 2008, en el cual se observó que la vasopermeabilidad asociada a la retinopatía diabética o por la inyección intravítrea de VEGF, era prevenida con la vasoinhibina (García et al., 2008) y este mecanismo de acción de la vasoinhibina bloquea la activación de la sintasa de óxido nítrico inducida por el VEGF. A estos resultados se les sumó el trabajo de Stephanie Thebault y colaboradores sobre la prevención de la proliferación inducida por bradicinina, a través de la reducción de los niveles de calcio y la reducción de la fosforilación de la eNOS en la Ser1179 (Thebault et al., 2011). Observación que en el

2014, la misma Celina García, detallo un poco más. Se reportó que a través de activar la proteína fosfatasa P2A, se bloqueaba la fosforilación del residuo Serina1177 inducida con agentes como VEGF y Bradikinina (Garcia et al., 2014).

En un intento por identificar genes relacionados con la neovascularización de tumores, se obtuvo el perfil de expresión de células endoteliales tratadas con la vasoinhibina, a través de un microarreglo (Tabruyn et al., 2007). En el 2010, se observó que el gen *Sprouty1*, que había sido seleccionado en el perfil de expresión del microarreglo, era un inhibidor de la vía de las MAP kinasas que era sobrerregulado con la vasoinhibina a través de NF- κ B (Sabatel et al., 2010).

12.4.1. Proteínas de unión/Receptores de la vasoinhibina

Como se reportó en el capítulo del descubrimiento de la vasoinhibina, Carmen Clapp en el año 1992 demostró que la vasoinhibina tenía receptores distintos a la PRL en la membrana de células endoteliales, sin embargo, no se identificó la naturaleza química de estos posibles receptores (Clapp y Weiner, 1992).

En el año 2014, Khalid Bajou et al. en un trabajo publicado en la revista *Nature Medicine*, reportaron que la vasoinhibina se unía al inhibidor de plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) y al complejo de PAI-1 con el activador de plasminógeno de tipo urokinasa (uPA), y mostró que la unión vasoinhibina-PAI-1-uPA- receptor de uPA en la membrana endotelial media los efectos antiangiogénicos de la vasoinhibina (Bajou et al., 2014). Adicionalmente, debido al hecho de que el PAI-1 está relacionado con la hemostasia, se mostró por primera vez que la vasoinhibina tiene efectos profibrinolíticos (Bajou et al., 2014).

Sin embargo, otras proteínas están también involucradas en la señalización de la vasoinhibina, como las integrinas, las cuales se demostraron recientemente, específicamente la $\alpha 5\beta 1$, que interaccionan con la vasoinhibina para promover la apoptosis celular (Morohoshi et al., 2018).

12.5. Efectos de la vasoinhibina

La vasoinhibina tiene efectos antiangiogénicos (Clapp et al., 1993), a través de inhibir la proliferación (D'Angelo et al., 1995; D'Angelo et al., 1999; Tabruyn et al., 2005; Garcia et al., 2014), migración (Lee et al., 1998; Lee et al., 2007; Garcia et al., 2014) y supervivencia de las células endoteliales (Martini et al., 2000; Tabruyn et al., 2003). Los mecanismos moleculares que subyacen los efectos antiangiogénicos de la vasoinhibina fueron los primeros en ser parcialmente develados, debido a que este fue el primer efecto descrito. Asimismo, en 1999, Ingrid Struman contrastó conceptualmente los efectos de la vasoinhibina con los de su molécula madre, la PRL y reportó que sus efectos eran opuestos (Struman et al., 1999).

No obstante, otros hallazgos, como el de Ana Corbacho en el 2002 donde se observó que la vasoinhibina tenía una actividad similar a las citocinas pro-inflamatorias al inducir la actividad de la sintasa de óxido nítrico (Corbacho et al., 2002), evidenciaron posibles efectos en la inflamación. Estos efectos eran mediados por la activación del NF- κ B, lo cual se observó en fibroblastos de pulmón tratados con vasoinhibinas (Macotella et al., 2002), esta activación, que también se observó en el endotelio, permitía la infiltración de leucocitos a tumores de melanoma (Tabruyn et al., 2007).

Pero la vasoinhibina no ejerce sus efectos únicamente a nivel celular, también tiene efectos regulatorios en la homeostasis vascular disminuyendo la vasodilatación a través de inhibir la eNOS (Gonzalez et al., 2004; Garcia et al., 2014), y disminuyendo la vasopermeabilidad inducida por VEGF (Ramírez et al., 2011) y regulando la permeabilidad de la barrera hematoretiniana (Arredondo Zamarripa et al., 2014).

La vasoinhibina también ha demostrado tener efectos profibrinolíticos debido a que interacciona con el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y al secuestrarlo ocurre una mayor fibrinólisis (Bajou et al., 2014). Sin embargo, los efectos de la vasoinhibina pueden incrementar en los próximos años mientras más intermediarios protéicos que interaccionen con ella sean descubiertos.

12.6. Implicaciones de la vasoinhibina en la fisiología y la patología

La presencia endógena de la vasoinhibina en líquido amniótico y suero humano (Fukuoka et al., 1991; Warner et al., 1993) fue la primera evidencia de la implicación de la vasoinhibina en la fisiología. Más tarde Bollengier reportó la presencia de esta isoforma derivada de PRL en la vida postnatal (Bollengier et al., 1996). Y Mejía en 1997 demostró la localización de la vasoinhibina con la vasopresina en neuronas de los núcleos supra-óptico y paraventricular (Mejia et al., 1997). Y más aún, estas isoformas se producían en la células endoteliales, su blanco, para ejercer efectos autócrinos (Clapp et al., 1998; Corbacho et al., 2000a).

Una de las evidencias más clara de los efectos fisiológicos de la vasoinhibina es que participa en el mantenimiento de la avascularidad de la córnea y de la retina. El bloqueo de las vasoinhibina endógena con anticuerpos anti-PRL, incrementó la vasculatura en la córnea (Dueñas et al., 1999) y de la retina (Aranda et al., 2005).

Los roles en la patología de la vasoinhibina se investigaron por primera vez en el 2004 en los ojos de pacientes con retinopatía del prematuro, en los cuales los niveles de PRL estaban elevados en la retina, y la vasoinhibina derivada podría estimular la apoptosis de las células endoteliales e inducir la regresión vascular, promoviendo el desarrollo de la retinopatía (Duenas et al., 2004). Este trabajo se continuó y en el 2017 se presentó evidencia más sólida sobre los niveles de vasoinhibina séricos en pacientes con retinopatía del prematuro y su correlación con el desarrollo de esta patología (Zepeda-Romero et al., 2017).

En el año 2007, la presencia elevada de vasoinhibina se relacionó con la preclamsia (Gonzalez et al., 2007) y con la cardiomiopatía del postparto (Hilfiker-Kleiner et al., 2007a). Esto llevó a disminuir los niveles de PRL con bromocriptina, como estrategia terapéutica para la cardiomiopatía del postparto (Hilfiker-Kleiner et al., 2007b; Hilfiker-Kleiner et al.,

2012). Los niveles altos de PRL y de vasoinhíbina también se correlacionaron con la hipertensión pulmonar (Honicke et al., 2012).

Estas evidencias implican a la vasoinhíbina tanto en la fisiología participando en la avascularidad de algunos tejidos, como en la patología cuando sus niveles son elevados. Y las estrategias terapéuticas desarrolladas a partir de este conocimiento están enfocadas a disminuir los niveles de PRL con el objetivo de que la vasoinhíbina se disminuya. Un antagonista de la vasoinhíbina sería un excelente candidato para inhibir sus efectos directamente sin alterar los de la PRL.

12.7. La vasoinhibina como agente terapéutico.

La dependencia de la progresión tumoral a la irrigación sanguínea implica que la supresión de esta puede interrumpir el crecimiento de neoplasias (Folkman, 2006). Muchos agentes antiangiogénicos similares a la vasoinhibina se han encontrado y muchos de ellos se han evaluado en diversos modelos de cáncer (Cao, 2001; Nyberg et al., 2005). Y algunos llegaron a fases clínicas (Walia et al., 2015).

La vasoinhibina, debido a su propiedad de inhibir la angiogénesis, disminuyó el crecimiento tumoral de cáncer de colon (Bentzien et al., 2001) y de próstata (Kim et al., 2003). Redujo la angiogénesis, aunque no el crecimiento tumoral de cáncer de mama (Faupel-Badger et al., 2010). También inhibió el crecimiento tumoral en un modelo subcutáneo de melanoma B16-F10 en ratón (Kinet et al., 2009), e incluso tuvo efectos disminuyendo la implantación de la metástasis de estas mismas células en un modelo de metástasis pulmonar (Nguyen et al., 2007), lo cual sugiere efectos no mediados por angiogénesis de la vasoinhibina en la metástasis.

La inhibición del crecimiento tumoral por la vasoinhibina se da por múltiples vías, no solo por la inhibición del crecimiento de los vasos sanguíneos. Kinet en el 2011 demostró que la vasoinhibina también prevenía la linfangiogénesis, proceso importante para el desarrollo tumoral (Kinet et al., 2011). Asimismo, en el mismo año Ngoc-Quynh-Nhu Nguyen demostró que la vasoinhibina impedía la maduración de los vasos y el reclutamiento de pericitos en los tumores y que esa era una causa del efecto antitumoral (Nguyen et al., 2011).

En el año 2010, a raíz del trabajo de Edith Arnold, surgió un nuevo propósito terapéutico que involucraba a la vasoinhibina. En ese trabajo se demostró que incrementando los niveles de vasoinhibina oculares, a través de incrementar la PRL sérica, se podía disminuir la

vasopermeabilidad inducida por la diabetes (Arnold et al., 2010). Enseguida en el 2011 Ramírez usando virus adenoasociados para transducir a la vasoinhibina demostró que la vasoinhibina reducía la vasopermeabilidad inducida por VEGF y por diabetes (Ramírez et al., 2011), confirmando lo que Hao Pan había encontrado en 2004, en un modelo de retinopatía inducida por oxígeno (Pan et al., 2004). Incluso, estos vectores virales eran más efectivos transduciendo la retina diabética (Diaz-Lezama et al., 2016). Estos hallazgos de esta nueva estrategia terapéutica que involucra a la vasoinhibina se trasladaron a la clínica recientemente (Robles-Osorio et al., 2018), sin embargo, esta estrategia manipula indirectamente los niveles de vasoinhibina a través de incrementar los niveles de PRL. El desarrollo de un fármaco agonista podría representar una mejor estrategia para el tratamiento de estas enfermedades sin los efectos secundarios que pudiera traer la hiperprolactinemia.

12.8. Artículo de investigación derivado de esta tesis.

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues

Juan Pablo Robles¹, Magdalena Zamora¹, José Luis Velasco-Bolom², Miriam Tovar¹, Ramón Garduño-Juárez¹, Thomas Bertsch³, Gonzalo Martínez de la Escalera¹, Jakob Triebel³ & Carmen Clapp¹

Vasoinhibin belongs to a family of angiogenesis inhibitors generated when the fourth α -helix (H4) of the hormone prolactin (PRL) is removed by specific proteolytic cleavage. The antiangiogenic properties are absent in uncleaved PRL, indicating that conformational changes create a new bioactive domain. However, the solution structure of vasoinhibin and the location of its bioactive domain are unknown. Molecular dynamic simulation (MD) showed that the loss of H4 exposes the hydrophobic nucleus of PRL and leads to the compression of the molecule into a three-helix bundle that buries the hydrophobic nucleus again. Compression occurs by the movement of loop 1 (L1) and its interaction with α -helix 1 (H1) generating a new L1 conformation with electrostatic and hydrophobic surfaces distinct from those of PRL, that may correspond to a bioactive domain. Consistent with this model, a recombinant protein containing the first 79 amino acids comprising H1 and L1 of human PRL inhibited the proliferation and migration of endothelial cells and upregulated the vasoinhibin target genes, IL1A and ICAM1. This bioactivity was comparable to that of a conventional vasoinhibin having the 123 residues encompassing H1, L1, H2, L2, and H3 of human PRL. These findings extend the vasoinhibin family to smaller proteins and provide important structural information, which will aid in antiangiogenic drug development.

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing vasculature, regulates the growth of tissues during development and in adult life, and abnormal angiogenesis underlies the progression of multiple diseases including cancer, arthritis, diabetic retinopathy, neurodegeneration, pre-eclampsia, and peripartum cardiomyopathy^{1,2}. Therefore, drugs that target the growing vasculature are promising therapeutics³. Many inhibitors of angiogenesis are cleaved derivatives of endogenous proteins with no antiangiogenic activity, including extracellular matrix and basement membrane proteins, growth factors, cytokines, circulating proteins, and hormones^{4,5}.

Prolactin (PRL), the pituitary hormone essential for lactation, is proteolytically converted to vasoinhibin, which belongs to a protein family, including 16 K PRL, that inhibits the proliferation, survival, permeability, and dilation of blood vessels^{6,7}. Inhibition of endothelial cell proliferation, migration, and survival involve the binding of vasoinhibin to a multicomponent complex conformed by plasminogen activator inhibitor-1, urokinase plasminogen activator, and the urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cell membranes⁸. These, but also other unidentified binding partners/receptors^{7,9}, mediate vasoinhibin inhibition of the signalling pathways (Ras-Raf-MAPK; Ras-Tiam1-Rac1-Pak1; PI3K-Akt and PLC γ -IP3-eNOS) activated by several proangiogenic factors (VEGF, bFGF, bradykinin, IL-1 β)⁶⁻⁸. The generation of vasoinhibin is regulated at the hypothalamus, the pituitary, and the target tissue levels defining the PRL/vasoinhibin axis⁷. Disruption of this axis contributes to the pathogenesis and progression of diabetic retinopathy¹⁰, retinopathy of prematurity¹¹, peripartum cardiomyopathy¹², and pre-eclampsia¹³.

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, Mexico. ²Biofísica y Ciencia de Materiales, Instituto de Ciencias Físicas, UNAM, Cuernavaca, Mexico. ³Institute for Clinical Chemistry, Laboratory Medicine and Transfusion Medicine, Nuremberg General Hospital & Paracelsus Medical University, Nuremberg, Germany. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.C. (email: clapp@unam.mx)

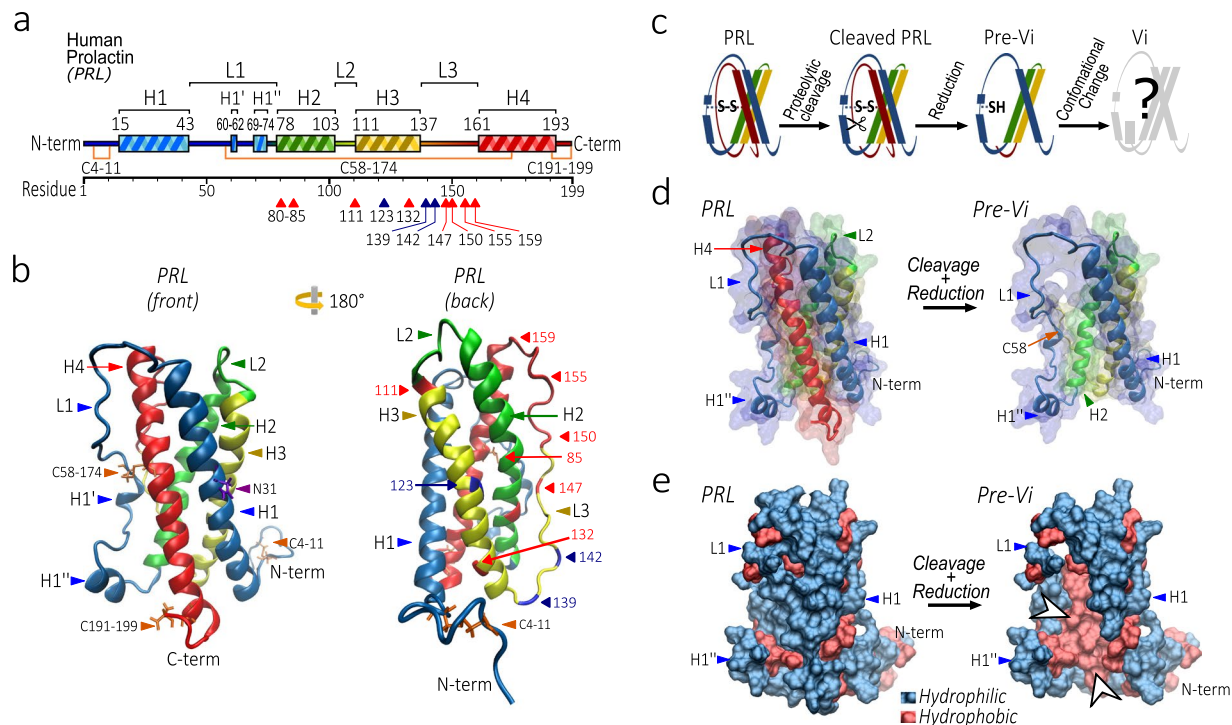


Figure 1. Structural description of prolactin (PRL). **(a)** Linear representation of human PRL secondary structure. The number of amino acids comprising the α -helix structures (H1-4), the loops (L1-3), and the three disulphide bonds are indicated. The vasoinhibin (Vi) generated by protease cleavage at different sites is indicated by red arrows and corresponding cleavage residue numbers. Vi produced by recombinant technology are indicated by blue arrows and the number of the terminal residue. **(b)** 3D Ribbon representation of soluble human PRL (PDB entry 1RW5). After a 180° turn of the structure, sites of protease cleavage in L3, in H3, and in H2 are indicated (red arrows and numbers). Terminal residues of recombinant vasoinhibins are also indicated (blue arrows and numbers). **(c)** Steps required for the generation of vasoinhibin from PRL. **(d)** The PRL and a pre-vasoinhibin (Pre-Vi) of 150 residues are shown in a ribbon representation superimposed on a translucent surface model. **(e)** Surface representation of hydrophilic (blue) and hydrophobic (red) residues in PRL and Vi showing the hydrophobic nuclei (white arrows) exposed after removal of H4.

The fact that full-length PRL is devoid of antiangiogenic properties indicates that an antiangiogenic domain encrypted within PRL becomes exposed by proteolytic cleavage. The functional consequences of such processing highlight the need to understand the structural transition of PRL to vasoinhibin and the location of the newly exposed biological determinant. The solution structure of vasoinhibin is unknown, but that of PRL has been defined¹⁴. Human PRL comprises 199 residues that adopt an “up-up-down-down” four α -helical (H1-4) bundle topology connected by three loops (L1-3) and flanked by small N-terminal and C-terminal loops (Fig. 1a,b). L1 contains two small helices, 3_{10} -helix (H1’) and α -helix (H1’”), and the whole molecule is stabilized by three disulphide bonds forming two small loops (C4-11 and C191-199) in the terminal regions and a long loop (C58-174) that links L1 with H4 (Fig. 1a,b). Cathepsin D¹⁵, matrix metalloproteinases (MMP)¹⁶, and bone morphogenetic protein-1¹⁷ cleave at various sites of human PRL to generate peptides that range from the first 80 to the first 159 residues (Fig. 1a,b). PRL fragments having 123 or more amino acids have been tested for vasoinhibin activity^{6,7}. The bioactive fragments have in common the loss of the H4 and the C-terminal loop due to both the proteolytic cleavage and the reduction of the C58-174 disulphide bond (Fig. 1c)^{6,7}. This observation implies that the loss of these regions creates a new bioactive conformation.

Here, we used molecular dynamic (MD) simulation to study the structural changes induced by the loss of H4 in human PRL and the putative location of the vasoinhibin bioactive domain. The work revealed that after removal of H4, PRL compresses into a three-helix bundle by the movement of L1 and its interaction with H1 that lead to a new L1 structure with different regional electrostatic and hydrophobic surfaces, in comparison to PRL, that may contain the bioactive domain. Recombinant technology verified the proposed location of the bioactive domain by showing that a small protein comprising the H1 and L1 regions of human PRL is antiangiogenic.

Results

Tertiary structure of the vasoinhibin. The four-helix bundle conformation of PRL is maintained by non-covalent intermolecular interactions and by the central disulphide bond (C58-174) that covalently links L1 with H4 (Fig. 1a,b). Cathepsin D cleaves L3 connecting H3 with H4, which, after the reduction of the C58-174 disulphide bond, yields a 150 residue vasoinhibin¹⁵ (Fig. 1c). Cleavage and reduction removes H4 (Fig. 1d) and exposes the hydrophobic core of PRL (Fig. 1e), thereby suggesting an unstable, partially unfolded, pre-vasoinhibin conformation.

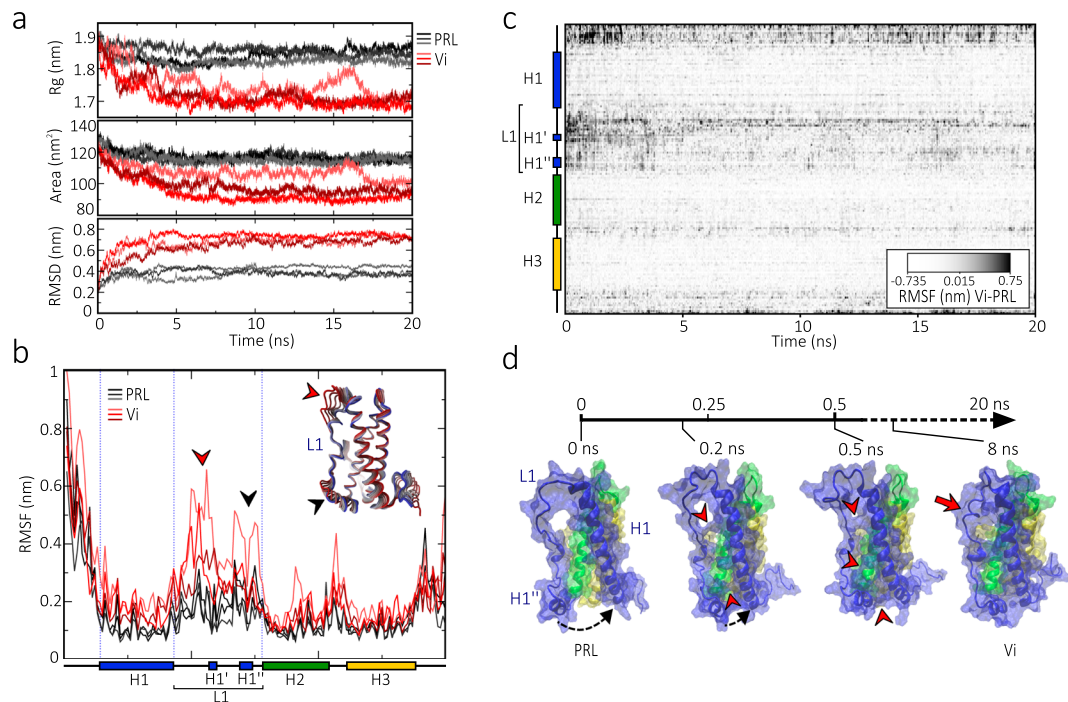


Figure 2. Tertiary structure of a 150 residue vasoinhibin (Vi). **(a)** Trajectory analysis of PRL and a Vi of 150 amino acids during 20 ns of molecular dynamic simulation (MD). Radius of gyration (Rg), surface area, and root mean square deviation (RMSD) of three MD simulations of PRL (dark lines) and Vi (red lines). **(b)** Total root mean square fluctuation (RMSF) per residue of Vi relative to PRL. The two major RMSF discrepancies, in first half (red arrowhead) and in the last half (black arrowhead) of the L1 are also illustrated in a sequentially superimposed tube model of the Vi trajectory indicating the regions of major movement in Vi compared to PRL. Red and blue colours represent changes from minimum (0 ns) and maximum (20 ns) MD, respectively. **(c)** Average RMSF per residue per time from triplicates obtained throughout the 20 ns MD of Vi relative to the respective average values of PRL. **(d)** Snapshots of the PRL to Vi transition through the MD simulation. The H1' movement towards H1 during first 0.2 ns (black arrow) and the interaction between residues in L1 and H1 starting at 0.2 ns (red arrowhead) are indicated. A helix-type structure in L1 is observed at ~8 ns and maintained until the end of the simulation (20 ns) (red arrow).

To investigate the structural changes leading to the stable vasoinhibin conformation, we performed a 20 ns MD simulation of a vasoinhibin comprising the first 150 residues of human PRL under physiological conditions of salt, temperature, and pH. Three different simulation runs were performed for vasoinhibin and for the full-length PRL under the same conditions. The trajectory analysis showed that removal of H4 causes the molecule to compress into a more compact structure than that of intact PRL (Fig. 2a). The radius of gyration (Rg) decreased in vasoinhibin and reached its minimal value at around 5 ns but was minimally altered in PRL. At 5 ns, the surface area of vasoinhibin was reduced relative to that of PRL and remained stable thereafter. The root-mean square deviation (RMSD) analysis showed that, while PRL was basically stable throughout the whole simulation, the RMSD of vasoinhibin increased dramatically during the first 5 ns and then remained without further change (Fig. 2a). The vasoinhibin instability essentially laid within the L1. The mobility of the protein residues analysed by the root-mean square fluctuation (RMSF) showed that the major discrepancies between vasoinhibin and PRL occurred precisely in the L1 region (Fig. 2b) and during the first 5 ns of the simulation, as indicated by the RMSF for each vasoinhibin residue per time normalized against the respective value in PRL (Fig. 2c). In addition, the N-terminal loop of vasoinhibin displayed strong normalized RMSF values in the first 2.5 ns of simulation (Fig. 2c).

Trajectory visualization showed that the compression of the molecule was driven by the immediate (<0.2 ns) movement of L1 towards H1, and that the contacts between both regions started from H1' up to the second half of L1 to eventually close the gap left by the removal of H4 (Fig. 2d). Hence, the rapid compression appears to be driven by hydrophobic forces from the exposed hydrophobic nuclei in vasoinhibin (Fig. 1e). Contacts with H1 were then extended to the first half of L1, which acquired new helix-like characteristics at ~8 ns (Fig. 2d). These conformational changes persisted at the end of the simulation, suggesting that vasoinhibin folds into a stable final structure at ~8 ns. This behaviour was observed at different force fields: CHARMM27 (Fig. 2), GROMOS96 54A7, and AMBER (Supplementary Fig. 1).

Principal component analysis (PCA) was then applied to the MD simulation trajectories in order to evaluate the global motions governing vasoinhibin conformational transition. PCA analysis confirmed that L1 is a highly fluctuating region and a major contributor to the collective motions of vasoinhibin. In contrast to PRL, the average backbone covariance matrix showed major correlated motions within vasoinhibin L1 and a low correlation

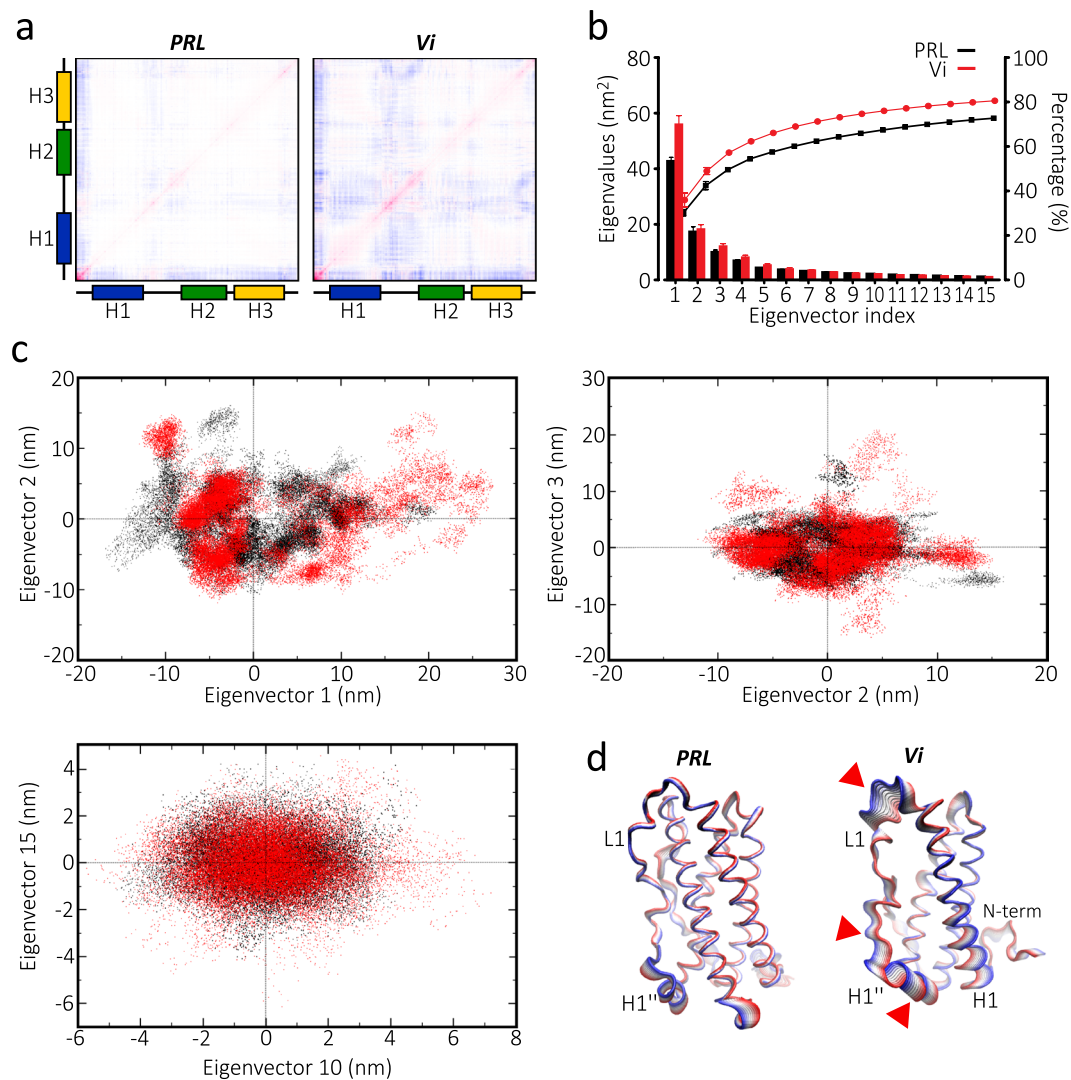


Figure 3. Principal component analysis (PCA) of trajectory of a 150 residue vasoinhibin (Vi). **(a)** Average backbone covariance matrix from PCA analysis of PRL and Vi. Highly correlated motions are in red and low correlation motions are in blue. Red intensity in the diagonal indicates the amplitude of fluctuations. **(b)** Bars show the first 15 eigenvectors of the covariance matrix of PRL and Vi (bars), whereas lines indicate the cumulative sum of the contribution to the total fluctuation percentage of the respective eigenvectors to each molecule. **(c)** The 2D eigenvector projections of the trajectory of PRL (black) and Vi (red). **(d)** Principal motion projected along the eigenvector 1 of PRL and Vi superimposed sequentially in 10 frames. Red and blue colours represent changes from minimum (0 ns) to maximum (20 ns) MD, respectively.

with the rest of the molecule (Fig. 3a) implying the highly fluctuating independent movement of L1. Analysis of the first 15 eigenvectors with cumulative indexes indicated that the first eigenvector is responsible for most of the distinct molecular motion of vasoinhibin vs. PRL (Fig. 3b). The 2D projection of eigenvectors 1 and 2, 2 and 3, and 10 and 15 from each MD trajectory of vasoinhibin and PRL allowed visualization onto the essential space (Fig. 3c). As expected, global motions depicted by the two first components were greater and exhibited larger subspace dimensions in vasoinhibin compared to PRL. Finally, the subdomain motions within vasoinhibin and PRL were analysed by the corresponding motion mode of only the first eigenvector (Fig. 3d). The superimposed snapshots of the structures through 20 ns of simulation illustrate the dominant motions taking place along L1 of vasoinhibin relative to PRL (arrows).

Secondary structure of the vasoinhibin. Secondary structure analysis indicated that the α -helices of both PRL and vasoinhibin, maintained their stability throughout the 20 ns of MD simulation (Fig. 4a). However, early (~5 ns) in the simulation, the first region of the L1 in vasoinhibin organized into a new helix structure that fluctuated between a 3_{10} -helix and α -helix (Fig. 4a). This helix was generated from a turn region and was defined as H1_{Vi} due to its exclusive presence in vasoinhibin and not in PRL (Fig. 4a). In addition, the H1' in vasoinhibin, not in PRL, alternated with an α -helix conformation, which predominated at the end of the simulation. To better understand helical propensity, we compared the percentage of time in secondary structure for each amino acid

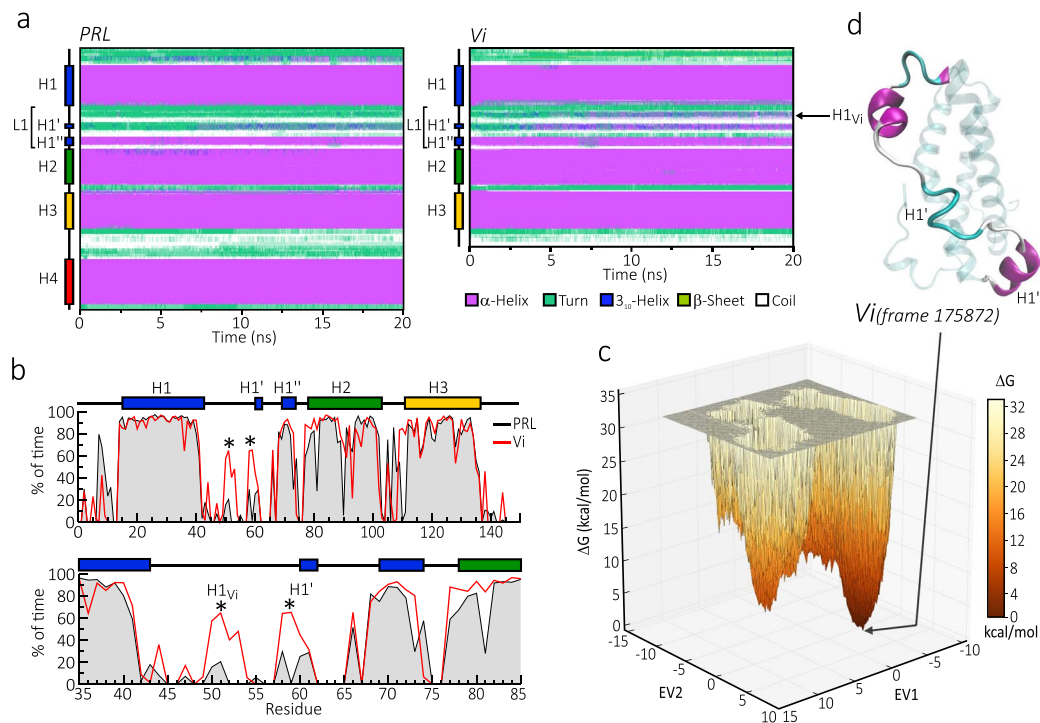


Figure 4. Dynamic changes of the secondary structure of a 150 residue vasoinhibin (Vi). **(a)** Changes of the secondary structure along the residue sequence of PRL (left) and the Vi (right) during 20 ns of molecular dynamic simulation (MD). The colours represent different secondary structures averaged from 3 independent MD. **(b)** Time percentage in helix conformation (helicity) per residue of PRL (black line) and Vi (red line) during a 200 ns MD simulation. Major discrepancies between PRL and Vi are indicated (*). **(c)** Free energy (DG) landscape (FEL) analysis of the Vi sampled throughout 200 ns of MD simulation. **(d)** Lowest energy structure obtained from FEL analysis.

between vasoinhibin and PRL in a simulation extended to 200 ns (Fig. 4b). As expected, the main differences occurred in the L1 residues 50 to 53 and 58 to 61 comprising H1_{Vi} and H1', respectively. These helices were only present or better preserved in vasoinhibin relative to PRL.

Finally, we used free energy landscape analysis to identify the natively folded vasoinhibin structure, which is defined as the conformation requiring minimal energy (Fig. 4c,d). The free energy landscape representation was achieved by projecting the trajectories of the first two principal components of motion, eigenvectors 1 and 2 (EV1 and EV2) (Fig. 3), as reaction-coordinates (Fig. 4c). From this analysis, the structure in frame 175872 corresponded to the overall minimal-energy vasoinhibin conformation in the whole 200 ns simulation (Fig. 4d). It contained a well-formed H1_{Vi} but an unfolded H1'.

Both PRL and vasoinhibin show a kink in H2 due to a proline in position 94 (P94) which disrupts and bends H2 between a serine at position 90 (S90) and P94 (Supplementary Fig. 2). The kink in PRL (pdb 1RW5) is less evident, it has an angle of ~14° with a maximal bending point at S90; while in vasoinhibin the angle is ~33° C with maximal bending point at P94 (Supplementary Fig. 2a,b). The larger angle in vasoinhibin may result from the reduced constraint imposed by the absence of H4. Despite a larger H2 kink, the H2 intercrossing angle with H1 does not change in vasoinhibin (40.2°) relative to PRL (37.3°) (Supplementary Fig. 2c), but the intercrossing angle between H2 and H3 does increase in vasoinhibin (35.5° and 20.6° for vasoinhibin and PRL, respectively) (Supplementary Fig. 2d).

Solvent accessible surface area of the vasoinhibin. Solvent exposure of active residues is important for peptide activity¹⁸ and regional differences in solvent exposure between vasoinhibin and PRL may help localize the active domain of vasoinhibin. Solvent accessible surface area (SASA) analysis of each protein residue throughout a 200 ns simulation showed major discrepancies between vasoinhibin and PRL in the L1, H3, and L3 regions (Fig. 5a). Because the differing residues in H3 and L3 are absent in a bioactive vasoinhibin comprising the first 123 amino acids of human PRL, we focused on SASA differences located in the L1, a major determinant of the stable conformation of vasoinhibin (Fig. 5b). Residues I51, I55, T60, S61, T65, Q71, and M75 were more exposed to solvent, whereas residues K53, N56, K69, Q73, N76, and Q77 were less exposed throughout the whole simulation of vasoinhibin relative to PRL (Fig. 5b). The differential SASA coefficient (ΔQ-SASA) obtained by subtracting the SASA values of PRL (PDB 1RW5) from those of the minimal energy conformation of vasoinhibin (frame 175872, Fig. 5d) indicated that in the H1 and L1 regions, the amino acids D41, H46, I51, I55, T65, Q71, and M75 were more solvent exposed, whereas the amino acids K53, K69 and Q73 were less solvent exposed in vasoinhibin than in PRL (Fig. 5c).

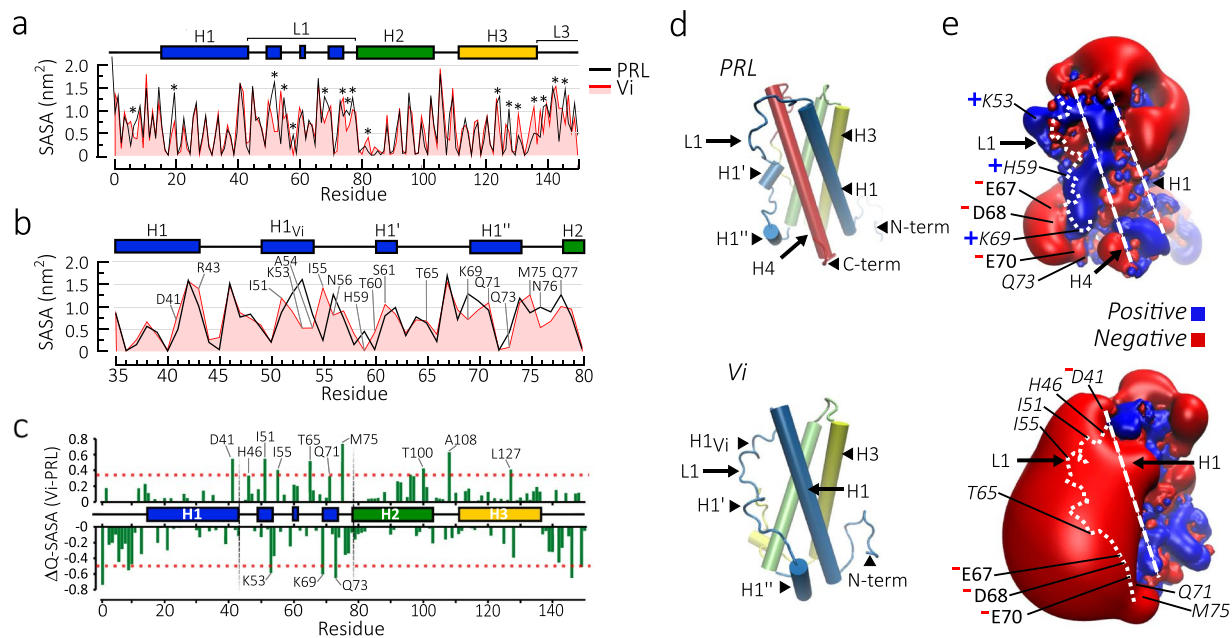


Figure 5. Solvent accessible surface area (SASA) and electrostatic surface potential of a 159 residue vasoinhibin (Vi). **(a)** Average SASA (nm^2) per residue of PRL and Vi in a 200 ns molecular dynamic simulation (MD). SASA discrepancies between PRL and Vi are indicated (*). **(b)** Average SASA values in the L1 region. Residues with major SASA differences are indicated. **(c)** Differential SASA coefficient (ΔQ -SASA) of the minimal-energy Vi vs. PRL. Positive and negative values indicate residues that are more or less exposed, respectively, in Vi compared to PRL. Residues above or below the 90th percentile of ΔQ -SASA (pointed red line) are considered significantly more exposed or buried, respectively. **(d)** Representation of the lowest energy structure of PRL and Vi. **(e)** Positive and negative electrostatic potential isosurface (contour level of $\pm 2 \text{KT } e^{-1}$) depicted in blue and red colours, respectively, of the PRL and Vi shown in **(d)**. Position of H1, L1 and H4 are indicated by white dashed lines. Residues with major SASA discrepancies and their positive (+) and negative (−) charges are indicated.

Some residues in the N-terminal loop of vasoinhibin were less exposed to solvent than in PRL (Fig. 5c), suggesting a more stable region. This is consistent with the strong normalized RMSF values observed in the N-terminal loop of vasoinhibin during the first 2.5 ns of simulation, which was followed by a more stable RMSF (Fig. 2c). Also, residues in the second half of H2 progressively increased their relative SASA values (Fig. 5c), indicating that removal of H4 in vasoinhibin increases their solvent exposure.

Electrostatic surface potential of the vasoinhibin. The differentially exposed residues of vasoinhibin modified the electrostatic properties of its surface relative to PRL. Figure 5e shows the color-coded computer graphic representation of the electrostatic potential throughout the surface of both proteins in their native conformation. Loss of H4 led to a dominant negative potential at the L1 and H1 regions of vasoinhibin. The stronger negative surface covered almost half of vasoinhibin and had its centre located at the L1 region, whereas the rest of the molecule showed little change (Fig. 5e). This highly negative surface potential region appears to be largely influenced by the burial of the basic residues (K53 and K69), since the acidic residues within the L1 (D41, E67, D68, and E70) remained solvent exposed. Because charged residues buried within the protein must make specific ‘salt-bridge’ charge pairs, we performed a computational analysis of salt-bridges in PRL and vasoinhibin using the ESBRI web server¹⁹ (Supplementary Fig. 3). PRL contained intramolecular salt-bridges most of which were located within lateral structures (loops and α -helices), except for R164-E101 found in the core of the molecule. Residues K53 and K69, buried in vasoinhibin, were located in L1 and formed salt-bridges with E93 in H2 and D20 in H1, respectively (Supplementary Fig. 3a). Analysis of the minimal distance between paired residues showed that K53-E93 is less stable than K69-D20 (Supplementary Fig. 3b).

Molecular hydrophobic potential of the vasoinhibin surface. Hydrophobicity is a relevant force influencing the propensity and strength of protein-protein interactions¹⁸. At the H1-L1 region, more hydrophobic residues were exposed on the surface of vasoinhibin than of PRL (Fig. 6a,b). Therefore, the H1-L1 region may be an active spot for the formation of vasoinhibin-protein complex driving its biological activity. Hydrophobic spots include H1_{Vi} and a region near H1” where hydrophobic residues I51, A54, and I55, and L63, A64, P66, and A72 are exposed, respectively (Fig. 6b).

For a more descriptive assessment of the hydrophobic properties of vasoinhibin relative to PRL, we calculated the molecular hydrophobic potential²⁰ of both proteins and projected them into a 2-dimension spherical map using the protein surface topography method²¹ (Fig. 6c). In PRL, the surface of H4 shares borders with H1 and L1, but H1 and L1 do not contact each other, except at the level of the H1 transition into L1. In contrast, in

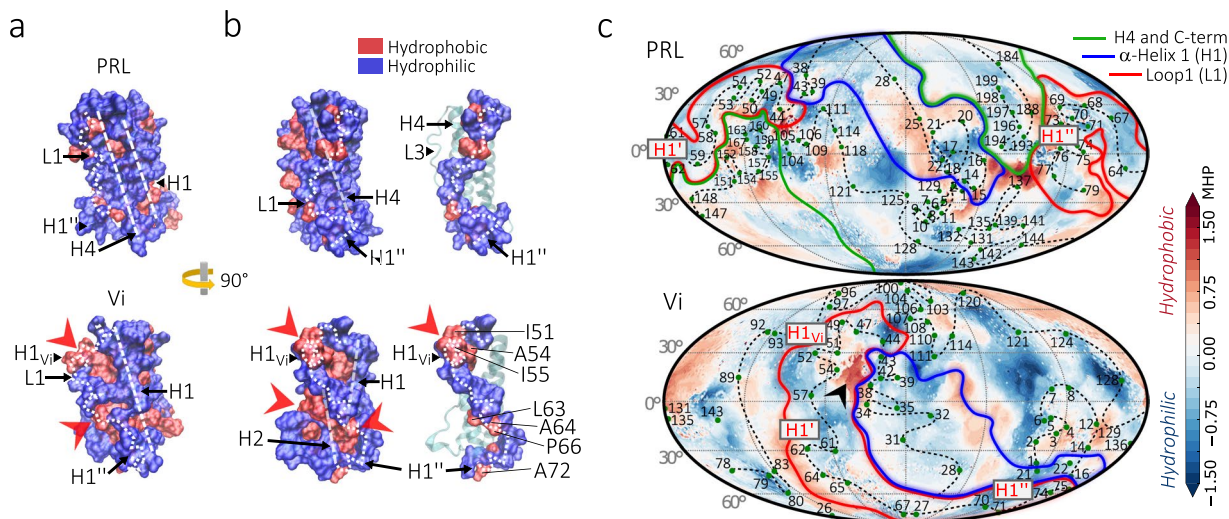


Figure 6. Hydrophobic surface potential of a 150 residue vasoinhibin (Vi). **(a)** Hydrophilic (blue) and hydrophobic (red) residues of PRL and Vi shown in a surface representation model. Changes in the exposure of hydrophobic residues in Vi relative to PRL are indicated (red arrowheads). The localization of secondary structures (H1, L1, and H4) is indicated with white dashed lines. **(b)** Lateral view of the whole molecule (left) or the L1 region (right) using the surface. **(c)** Protein surface topography representation of molecular hydrophobic potential of PRL and Vi. Some exposed amino acids are indicated (green dots) and connected sequentially (black dotted line). Colour surface patches represent secondary-structure regions of PRL and Vi. Secondary structures within L1 (H1_{Vi}, H1' and H1'') are indicated (boxes). A highly hydrophobic patch in Vi is indicated (black arrowhead).

vasoinhibin, the H1 and L1 regions have a long region of contact throughout their surfaces. This long border is the major distinct structural feature between vasoinhibin and PRL and may thereby contribute to the putative bioactive domain of vasoinhibin. Consistent with this possibility, a highly hydrophobic spot was observed precisely in the border between H1 and L1 at the level of H1_{Vi} (Fig. 6c).

Altogether, MD simulation identified the L1 region as the distinctive structural feature in vasoinhibin, which may correspond to the bioactive domain. To help validate this possibility, we investigated the antiangiogenic properties of a recombinant protein containing the first 79 amino acids of human PRL comprising only the H1 and L1 regions.

A protein comprising residues 1 to 79 of human PRL is antiangiogenic. HEK 293 T/17 cells were stably transfected with one of three lentiviral vectors: an empty vector (negative control), a vector encoding the first 123 residues of human PRL (control vasoinhibin), or a vector encoding the first 79 residues of PRL. The conditioned media of the transfected cells showed immunoreactive bands with the expected molecular weights of 9 and 14 kDa for the 79- and 123-amino acid proteins, respectively (Fig. 7a). In addition, there were higher molecular weight immunoreactive PRL-like proteins of 14 and 18 kDa in the conditioned media containing the 79- and the 123-residue proteins, respectively, which correspond to glycosylated isoforms of the recombinant proteins. PRL has a N-glycosylation site at asparagine 31 (N31) and only the expected 9 and 14 kDa proteins remained upon digestion of the respective conditioned medium with peptidyl N-glycosidase F (PNGase F), which cleaves N-linked oligosaccharides (Fig. 7b). No immunoreactive proteins were detected in the conditioned medium of cells transfected with the empty lentiviral vector (Fig. 7a,b). Also, there was no PRL-like immunoreactive material in the upper section of the Western blots that could reflect the presence of PRL fragment aggregates (Supplementary Fig. 4). However, non-reducing Western blots showed that the 79- and 123-PRL fragments in the conditioned media formed disulfide bond dimers of ~18 kDa and ~28 kDa of the 79- and 123-residue PRLs, respectively (Supplementary Fig. 6). The 79-amino acid fragment was only detected as a dimer, whereas equivalent amounts of dimer and monomer occurred for the 123-residue PRL (Supplementary Fig. 6b). Disulfide bond aggregates were expected due to the presence of a free SH group (from C58) created by the cleavage of PRL.

Vasoinhibin, including the one comprising the first 123 residues of human PRL, inhibits the proliferation²² and migration²³ of endothelial cells. To determine whether the 79-amino acid PRL is antiangiogenic, the conditioned media containing equivalent amounts of the 79- or the 123-amino acid proteins were added to bovine pulmonary artery endothelial cells (CPAE) in culture and their effect on DNA synthesis was measured by the incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) and the click reaction (Fig. 7c). The conditioned media containing the 79- or the 123-residue proteins inhibited basic fibroblast growth factor-induced CPAE proliferation compared to the conditioned medium from the negative group or to cells not treated with conditioned medium (control) (Fig. 7d). In support of these findings, the negative control using the conditioned medium of HEK293T/17 stably transfected with lentiviral vectors encoding full-length PRL was inactive, in spite of containing over 20-times more PRL protein than the amount of PRL fragments produced from 79- and 123-residue encoding lentiviral vectors (Supplementary Fig. 7a,b). Also, the total protein level and pattern revealed by Coomassie blue- and Silver-stained

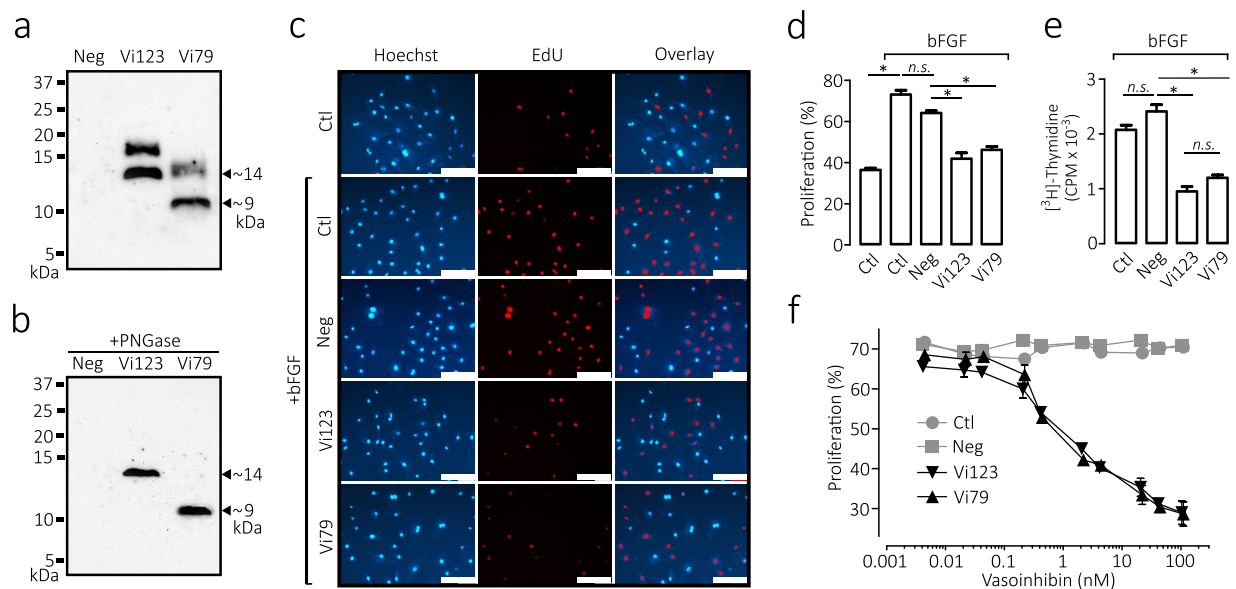


Figure 7. A recombinant protein comprising amino acids 1 to 79 of human PRL inhibits the proliferation of endothelial cells. **(a)** Western blot analysis of the conditioned media (CM) obtained from HEK293T/17 cells stably transduced with lentiviral vectors encoding the first 79 residues (~9 kDa) or the first 123 residues (~14 kDa, a control vasoinhibin) of human PRL. The conditioned media of HEK293T/17 cells transduced with the empty lentiviral vector was the negative control (Neg). **(b)** Western blot of the same conditioned media shown in **(a)** after treatment with Peptide N-glycosidase F (PNGase). Numbers on left indicate the molecular weight of marker proteins. **(c)** Representative fields of bovine pulmonary artery endothelial cells (CPAE) stained for DNA (Hoechst), DNA synthesis (EdU), and the overlay of both reactions. Cells were incubated for 24 h with or without basic fibroblast growth factor (bFGF) in combination or not (Ctl) with conditioned media without (Neg) or with the 79- (Vi79) or the 123- (Vi123) residue vasoinhibins. Scale bar, 100 μ m. **(d)** Cell proliferation was quantified by the Edu-click reaction and expressed relative to the total number of cells in the field. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments ($*p < 0.001$). **(e)** Cell proliferation was evaluated by the [³H]-thymidine incorporation to DNA in CPAE incubated for 24 h with bFGF together or not (Ctl) with conditioned media lacking (Neg) or containing with the Vi79 or the Vi123 residue vasoinhibins. Values are means \pm SEM of triplicate determinations ($*p < 0.001$). **(f)** Dose-dependent inhibition of bFGF-induced proliferation of bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) incubated for 24 h with bFGF in combination or not (Ctl) with conditioned media without (Neg) or with the Vi79 or the Vi123. Cell proliferation was quantified by the Edu-click reaction and expressed relative to the total number of cells in the field. Values are means \pm SEM of triplicate determinations.

gels were similar among the different conditioned media (Supplementary Fig. 7c,d), indicating that an excess of a non-angiogenic protein (PRL) and total protein differences did not influence the results. Similar effects on CPAE proliferation were also observed by measuring ³H-thymidine incorporation (Fig. 7e). Likewise, the 79- and the 123-residue proteins inhibited the proliferation of bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC), assayed by the click reaction, in a concentration-dependent manner and with similar potency (Fig. 7f).

To evaluate actions on endothelial cell migration, we employed the well-established wound-healing assay²⁴, in which a wound scratch is introduced in a confluent CPAE monolayer to stimulate migration. The CPAE in the negative and control groups sealed $\approx 80\%$ of the wound 24 h after wound scratch, whereas the cells treated with the 79- and 123-residue proteins only showed $\approx 50\%$ sealing at this time (Fig. 8a,b). Finally, IL1A and ICAM1 are target genes of vasoinhibin in endothelial cells²⁵, and both genes were upregulated in CPAE treated with the conditioned media containing the recombinant proteins, but not in the cells under the negative and control conditions (Fig. 8c).

To further document the antiangiogenic effect of the 79 residue vasoinhibin, we compared the proliferation of non-transduced BUVEC with that of BUVEC transduced with the lentiviral vectors coding for the 79- and 123-residue vasoinhibins or with the empty vector (Fig. 9). BUVEC transduced with the 79- and 123-residue vasoinhibin vectors showed a significant reduction in their proliferation rate at 48 and 72 h after transduction (Fig. 9a–c), which correlates with the accumulation of the respective vasoinhibin isoform in the BUVEC conditioned medium (Fig. 9d, Supplementary Fig. 5). No vasoinhibin-like immunoreactivity was detected in the negative control transduced with the empty vector (Fig. 9d, Supplementary Fig. 5). Moreover, increased proliferation, indicated by the higher number of small and brilliant Hoechst-stained nuclei was evident in the control groups compared with BUVEC expressing the 79- and 123-residue vasoinhibins (Fig. 9b).

MD simulation of vasoinhibins of 79 and 123 residues. In search of the functional structural denominator, we performed MD simulation of the vasoinhibins comprising amino acids 1 to 79 and 1 to 123 of PRL and compared them to that of the 150 residues vasoinhibin. MD results were very similar between the vasoinhibins

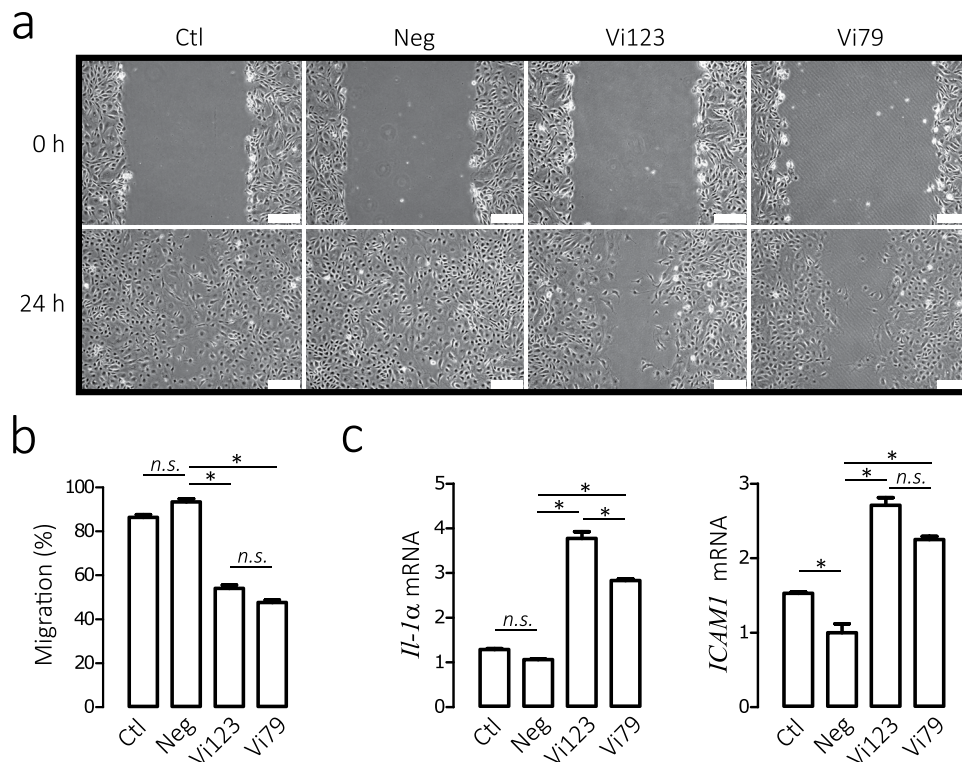


Figure 8. A recombinant protein comprising amino acids 1 to 79 of human PRL inhibits the migration of endothelial cells and the endothelial cell expression of vasoinhibin target genes. **(a)** Bovine pulmonary artery endothelial cell (CPAE) monolayers were scratched and treated for 24 h with medium alone (Ctl) or containing transduced HEK293T/17 conditioned media without (Neg) or with the Vi79 or the Vi123 residue vasoinhibins. Representative images of wound sealing at 0 and 24 h. Scale bar, 100 μ m. **(b)** The level of migration into the wound scratch was quantified as the percentage of wound sealing at 24 h relative to respective group value at onset (0 h). Values are means \pm SEM of 3 independent experiments (* p < 0.001). **(c)** Expression of vasoinhibin target genes interleukin-1 α (*IL1A*) and intercellular adhesion molecule 1 (*ICAMI*) measured by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) normalized against cyclophilin A (*PPIA*). CPAE were treated for 4 h with medium alone (Ctl) or containing conditioned media without (Neg) or with Vi79 or Vi123. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments (* p < 0.001).

of 123 and 150 residues. Both vasoinhibins showed an immediate (5 ns) molecular compression, surface area reduction, and enhanced RMSD values, which stabilized thereafter (Fig. 10a, Supplementary Fig. 8). Also, similar to the 150 amino acid vasoinhibin, the 123 residues vasoinhibin showed major discrepancies in mobility of protein residues (RMSF) relative to PRL in the first part of L1 (Fig. 10b); the three α -helices maintained their stability throughout the simulation, and L1 exhibited increased helix propensity (with H1_{Vi} being smaller and less stable and H1' more constant) (Fig. 10d,e, Supplementary Fig. 8). In contrast, the structure of the 79 amino acid vasoinhibin was less compacted and highly mobile. Its Rg, RMSD, and RMSF values were higher and had larger fluctuations, reached a more compact state after the first 20 ns simulation, and then a less compressed, unstable structure at \sim 150 ns (Fig. 10a, Supplementary Fig. 8). Nevertheless, in the first part of L1 (residues 47 to 60) the RMSF values of all three vasoinhibins (79, 123, and 150 residues) were similar to each other and different from PRL (Fig. 10b,c). Also, in spite of its high mobility and disorganized state, L1 maintained helix propensity and a stable H1_{Vi} overtime (Fig. 10d,e; Supplementary Fig. 8).

Discussion

The PRL/vasoinhibin axis is a defined endocrine axis in which the generation of vasoinhibin is regulated by the hypothalamo, the pituitary, and the target tissue levels⁷. This axis regulates the angiogenesis required for the growth and function of reproductive and non-reproductive organs and contributes to the pathogenesis of angiogenesis-related retinal and cardiac diseases and diseases occurring during and after pregnancy^{10,26,27}. Moreover, the conversion of PRL to vasoinhibin is the basis of two clinical trials in which vasoinhibin is the target of therapeutic interventions²⁸. However, the molecular transition of PRL to vasoinhibin is poorly understood and there is no information regarding the solution structure of vasoinhibin. Improving this understanding could lead to quantitative assays specific for vasoinhibin and to the generation of agonists and antagonists for the treatment of disease. Here, we have modeled the structure of vasoinhibin by MD simulation and show that it can acquire a stable three-helix bundle conformation due to the movement of L1 and its interaction with H1. The newly created H1 and L1 molecular surfaces display solvent accessible, electrostatic, and hydrophobic properties that are distinct from uncleaved PRL and may correspond to the vasoinhibin antiangiogenic domain. Consistent with

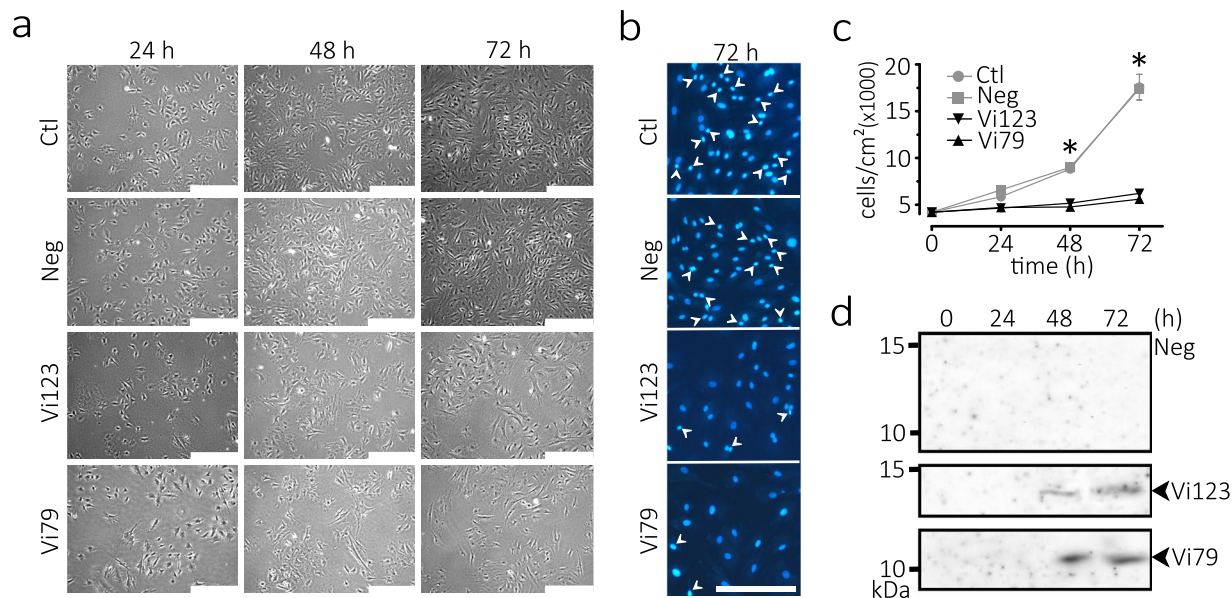


Figure 9. Proliferation of endothelial cells producing a 79 amino acid vasoinhibin. **(a)** Representative fields of bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) transduced or not (Ctl) for 24, 48, or 72 h with lentiviral vectors coding for the 79- and 123-residue vasoinhibins (Vi) or with the empty vector (Neg). Scale bar, 500 μm . **(b)** Proliferation is further illustrated by the number of small and brilliant Hoechst-stained nuclei (arrowheads) characteristic of dividing cells at 72 h post-lentiviral transduction. Scale bar, 250 μm . **(c)** BUVEC density following 24, 48 and 72 h of lentiviral transduction. Values are means \pm SEM of 3 independent experiments (* $p < 0.001$ vs. Ctl and Neg). **(d)** Western blot analysis of BUVEC conditioned media at 0, 24, 48, and 72 h after transduction with lentiviral vectors coding for Vi79 (~9 kDa) and Vi123 (~14 kDa) or the empty vector (Neg).

this hypothesis, we show that a recombinant protein comprising only the H1 and L1 regions of PRL has antiangiogenic properties.

A three-helix bundle conformation occurs ubiquitously in proteins with high-affinity interactions such as enzymes, enzyme inhibitors, and transcription factors²⁹. The three-helix bundle conformation in a 150 residue vasoinhibin is led by an immediate molecular compression observed at all MD simulations and under different force fields (GROMOS96 54A7, AMBER and CHARMM27). This suggests that a robust physical property, such as hydrophobicity³⁰, influences the transition and stabilization of vasoinhibin. Indeed, removal of H4 exposes the hydrophobic nuclei of PRL, which is immediately buried again by the movement of L1 and the contacts of L1 with H1. In addition, L1 displays a higher α -helix propensity and generates a new α -helix (H1_{Vi}). These structural changes govern the vasoinhibin conformational transition and persist in the minimal energy native vasoinhibin.

Residues within the H1 and L1 regions of vasoinhibin show major discrepancies in their solvent accessible surface relative to PRL. Also, a dominant negative surface area prevails at the L1 and H1 regions of vasoinhibin that is largely influenced by the burial of basic residues not occurring in PRL. Finally, more hydrophobic residues are exposed in vasoinhibin and create hydrophobic spots in the border between H1 and L1 and at the level of H1_{Vi}. Because solvent exposure of active residues, polar interactions, and hydrophobicity influence protein-protein interactions required for bioactivity³¹, we reasoned that the altered H1 and L1 regions generated upon PRL cleavage corresponds to the vasoinhibin antiangiogenic domain. Supporting this possibility, the first 79 residues comprising the H1 and L1 regions of human PRL are sufficient to exert antiangiogenic effects.

Antiangiogenesis is demonstrated by the inhibition of the proliferation and migration of endothelial cells in culture. The antiangiogenic activity of the 79 residue recombinant protein is of similar potency ($EC_{50} = 1$ nM) to that of a conventional 123 residue vasoinhibin encompassing the H1, L1, H2, L2, and part of H3 regions of human PRL and consistent with the vasoinhibin potency reported previously²². Glycosylation and disulfide bond dimerization of the PRL fragments may not influence their bioactivity. The antiangiogenic activity of the 79- and 123-residue vasoinhibins, containing the glycosylated isoforms and the disulfide dimers, is of similar potency ($EC_{50} = 1$ nM) to that of a non-glycosylated 123-residue vasoinhibin produced in *E. coli* where C58 was mutated to serine to avoid incorrect intra-molecular and inter-molecular disulfide bond formation leading to aggregation²².

The antiangiogenic action of the 79-residue protein verifies that the vasoinhibin active domain lies within the L1 and H1 regions of PRL. The fact that the 79-amino acid vasoinhibin is in a dimeric form implies that the active domains continue to be functional in spite of dimerization. The structural basis of vasoinhibin dimer formation is unclear. While the intermolecular disulfide bond linking the two cysteines at position 58 is a key component, other interactions are likely involved. Aggrecan3D³² and Tango³³ software predict a “hot spot” for aggregation within residues 18 to 29 of H1 (Supplementary Fig. 6c) that may enforce the hydrophobic forces pairing two H1. Also, in PRL, histidine 27 forms a salt-bridge with asparagine 183 in H4 (Supplementary Fig. 3a) and, in the absence of H4, the unpaired histidine 27 may form salt-bridges across the vasoinhibin dimer. Moreover, metal ion-dependent motifs involving histidine 127 create a metal binding site in PRL that is responsible for

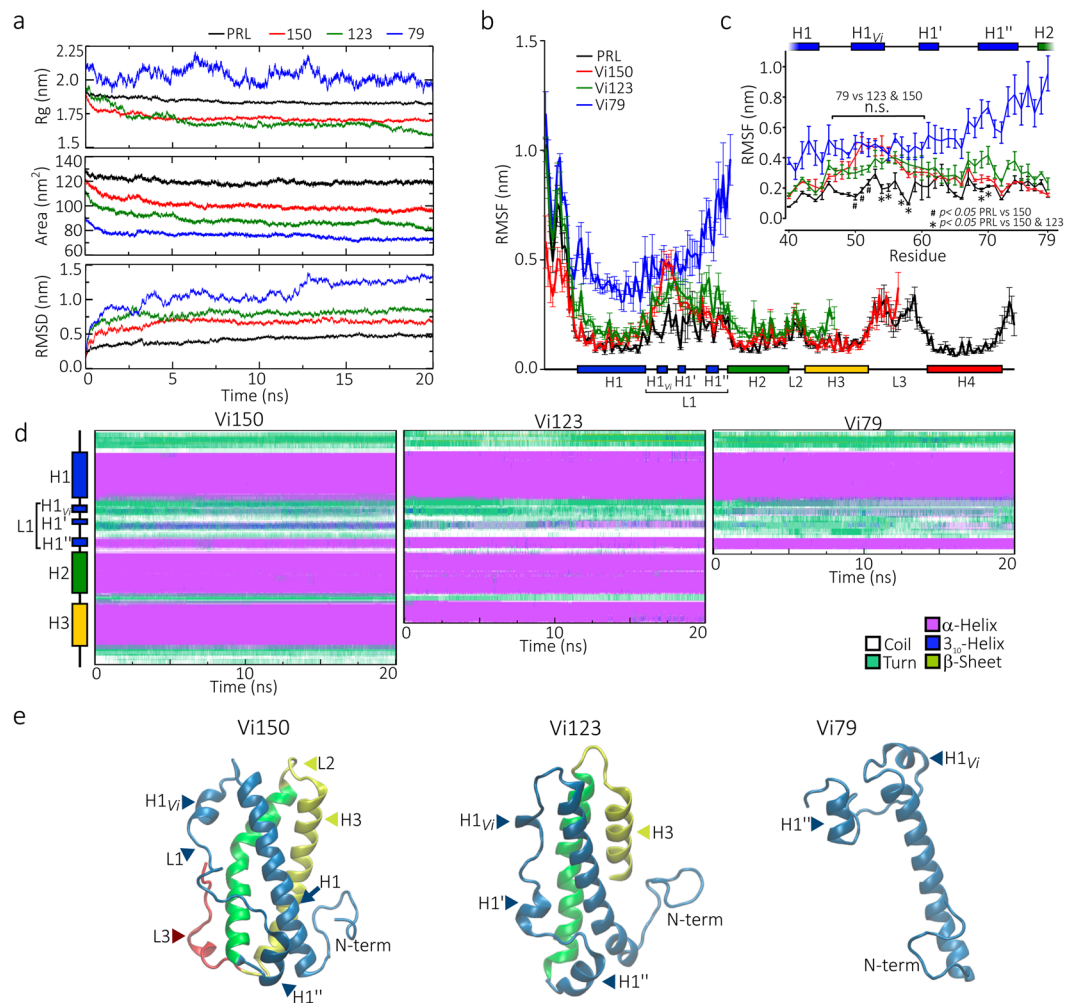


Figure 10. Comparison of the molecular dynamic simulation (MD) of the 150, 123, and 79 amino acid vasoinhibins. **(a)** Trajectory analysis of PRL and vasoinhibins of 150, 123 and 79 amino acids (Vi150, Vi123, and Vi79, respectively) during 20 ns of MD simulation. Average radius of gyration (Rg), surface area, and root mean square deviation (RMSD) of three MD simulations per molecule. **(b)** Mean \pm SEM root mean square fluctuation (RMSF) per residue of three independent MD simulations. **(c)** RMSF values in the L1 region. Values of each PRL residue are statistically different ($p < 0.05$) from both Vi150 and Vi123 (*), or only from Vi150 (#) as indicated. The horizontal bracket indicates the region of L1 in which all three vasoinhibins display similar RMSF values (residues 47 to 60). **(d)** Dynamic changes of the secondary structure profile per residue of Vi150, Vi123, and Vi79 throughout 20 ns of MD simulation. Average composition of at least 3 independent MD simulations. **(e)** Representative structures of Vi150, Vi123, and Vi79 at the end of the 20 ns MD simulation. Structural motifs are indicated.

Zn-dependent PRL aggregation^{34,35}. We propose a model of dimer assembly in which two H1 are paired in a parallel manner and both L1 are linked by the cysteine 58 intermolecular disulfide bond (Supplementary Fig. 6d). This model is consistent with the interactions proposed above and with the exposure and functionality of the two bioactive domains within the vasoinhibin dimer, but should be tested experimentally.

Our findings are consistent with previous observations showing that all PRL fragments with vasoinhibin properties share the N-terminal end of PRL, whereas C-terminal PRL fragments are devoid of antiangiogenic effects^{7,36}. However, the H1 and L1 primary structure by itself is not responsible for vasoinhibin activity, since this sequence is present in uncleaved PRL lacking antiangiogenic action. Rather, a structural conformation within the H1 and L1 regions emerges upon proteolytic cleavage and accounts for antiangiogenesis.

To gain insights into the vasoinhibin bioactive structural domain, we performed MD simulation in the 123- and 79-residue vasoinhibins. A comparative analysis revealed structural similarities between the vasoinhibins of 123 and 150 amino acids. Both compress into a three-helix bundle by the movement of L1 and its interaction with H1 and share a similar secondary structure. L1 helical propensity relative to PRL is also higher in the 123-residue vasoinhibin, which displays a smaller and unstable H1_{vi} and a more constant H1' than the 150 amino acid vasoinhibin. In contrast, and as expected, the molecular conformation of the vasoinhibin of 79 residues is different. It has a less compacted unfolded structure and an elevated global motion largely due to the high mobility and

disorganized state of L1. Nevertheless, the mobility of the protein residues in the first part of L1 (residues 47 to 60) is similar among the three vasoinhibin isoforms with 79, 123 and 150 residues and distinct from PRL. Also, L1 shows increased helical propensity and forms a new H1_{v1} helix in the three vasoinhibins. In PRL, the C58-174 disulfide bond between L1 and H4 restricts the mobility of L1 holding it against the four α -helix bundle and conferring a more compact and stable configuration¹⁴. Cleavage of PRL without removal of the C58-174 bond does not result in the acquisition of vasoinhibin properties³⁷. Loss of H4 in the vasoinhibin must occur for L1 to acquire the mobile configuration and high helical propensity. We conclude that these L1 conformational changes are major structural denominators of vasoinhibin determining its biological properties.

Consistent with this notion, a peptide sequence of 14 amino acids (residues 45 to 58) located in the early part of L1 of buffalo PRL exhibits antiangiogenic effects³⁸. This sequence was unveiled due to its 35.7% homology with human somatostatin, a known antiangiogenic factor³⁹. However, it has also been claimed that the vasoinhibin active domain is located at H2, specifically in a 14 amino acid sequence (residues 80 to 93) with “tilted peptide” characteristics⁴⁰. Tilted peptides are short peptides with an asymmetric distribution of their hydrophobic residues when helical. When synthesized in fusion with maltose-binding protein to improve solubility, the tilted sequence of human PRL inhibits angiogenesis. However, its potency is low (4- and 32-fold less than that of a vasoinhibin) and a vasoinhibin mutated to abolish the structural characteristics of the tilted sequence only shows a partial reduction of bioactivity⁴⁰. In PRL, the tilted peptide in H2 is buried by the three other α -helices and the third loop and it is unclear whether proteolytic cleavage uncovers such sequence. In this regard, MD simulation of the 150 residue vasoinhibin revealed that only the residues in the second half of H2, which do not contain the tilted sequence, are more solvent exposed than in PRL. While it is possible that the antiangiogenic action of vasoinhibin involves several functional epitopes, the fact that the 79-residue protein has effects similar to those of larger vasoinhibins indicates that the main vasoactive domain lies within H1 and L1 and that domains beyond these regions are not essential for antiangiogenesis.

Besides angiogenesis, vasoinhibin acts on endothelial cells to regulate other important aspects of vascular physiology. It promotes the expression of various chemokines and endothelial cell adhesion molecules including ICAM1 and IL1A to increase leukocyte extravasation²⁵. The fact that the 79 kDa vasoinhibin induces the expression of ICAM1 and IL1A in endothelial cells implies that the antiangiogenic domain may also be responsible for this action. Other vascular-related effects of vasoinhibin include the inhibition of the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation to reduce vasodilation and vasopermeability^{41,42} and the binding to plasminogen activator inhibitor 1 to promote fibrinolysis⁸. Furthermore, vasoinhibin has non-vascular actions. It acts on retinal pigment epithelial cells to inhibit outer blood retinal barrier permeability⁴³, binds to lung fibroblasts to stimulate inflammatory reactions⁴⁴; and affects the nervous system by triggering neuroendocrine responses⁴⁵, promoting behaviors associated with anxiety and depression⁴⁶, and acting directly on neurons to inhibit neurite outgrowth⁴⁷. It remains to be determined whether all vascular and non-vascular effects involve the same antiangiogenic domain of the molecule. Unveiling the residues conforming the active site(s) of vasoinhibin should be useful to identify functional interactions with known and new binding partners and receptors, thereby assisting in understanding the molecular mechanisms mediating its biological actions.

The molecular heterogeneity of vasoinhibin depends on the various proteases that cleave the PRL molecule at different sites and at several cellular and tissue contexts. Cathepsin D, matrix metalloproteases (MMP), and bone morphogenetic protein 1 generate PRL fragments ranging from the first 80 to the first 159 residues⁷. Endogenous PRL fragments of similar sizes have been detected in several rodent and human tissues and body fluids⁷, but only the biological activity of PRL fragments containing the first 123 to 159 residues (14 to 18 kDa) have been investigated and identified as vasoinhibins^{6,7}. Here, we extend the vasoinhibin properties to a 79 residue PRL having a 9 kDa molecular mass. A similar PRL fragment is generated by matrix metalloproteases¹⁶ and is present in the amniotic fluid of pre-eclamptic women¹³ implying that it corresponds to an active member of the vasoinhibin family.

In summary, our findings extend the vasoinhibin family to smaller proteins and provide important structural information for the development of more potent agonists and antagonists. The MD results locate a potential similar structure to that of the bioactive domain of vasoinhibin within the first half of L1. The structure and folding properties of vasoinhibin warrant further investigation using a variety of experimental techniques (circular dichroism, size-exclusion chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, and X-ray crystallography). Studies in progress are identifying key surface residues within the putative bioactive region that when mutated alter the formation of binding complexes and biological properties. This information will impact the generation of potent vasoinhibin agonists and antagonists and the development of specific immunoassays for quantifying the levels of the proteins in the clinic.

Methods

Molecular Dynamic (MD) simulation. The coordinates of soluble human PRL were downloaded from the Protein Data Bank (PDB entry 1RW5) were as reported¹⁴. The C-terminal fragment of PRL was removed in order to generate the pre-vasoinhibins comprising residues 1 to 150, 1 to 123, and 1 to 79. Classical MD simulation was performed for PRL and the vasoinhibins using the GROMACS 5.1 package^{48,49}. The CHARMM27 all-atom force field was used to generate the topology⁵⁰. Simulations were carried out at neutral pH, in which protonation states and tautomerization of histidines were determined by the H⁺⁺⁵¹ (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>) and the PROTOSS⁵² (<http://proteinsplus.zbh.uni-hamburg.de/>) web servers, respectively. Proteins were solvated using the TIP3P water model^{53,54} in a cubic box under the periodic boundary conditions and a distance of 1.0 nm from the protein to the surface of the box. The system was neutralized by the addition of counter ions. A salt concentration of 120 mM was maintained by 50 Na⁺ and 50 Cl⁻ ions added into a 700.53 nm³ box. The energy of the system was minimized using the steep descent integrator with no constraints for 1000 steps and equilibrated for 100 ps at a temperature of 310 K generated by the canonical ensemble NVT. Pressure and density were maintained using the isobaric-isothermal ensemble NPT. Equilibrium steps were performed applying position restraints to the molecule.

Finally, MD simulations were carried out with NPT conditions and removing position restraints. Coordinates, velocities, and energies were saved every 2 ps. The particle mesh Ewald (PME) algorithm⁵⁵ was used for the long electrostatic interactions and a Verlet scheme for the short range electrostatic and Vander walls interactions with a cut-off for the real space term of 1 nm. The temperature and pressure of the system were maintained constant by the modified Berendsen thermostat and the Parrinello-Rahman barostat, respectively. The constrain of all bond lengths was done using the LINCS algorithm⁵⁶. Runs were performed in a High-Performance-Computing Linux Cluster (HorUS) with a total of 170-cores (4-8 logical cores per node), connected by an HP Procurve 48G-2900 1000T-48 Port switch (Centre of Geosciences, UNAM Campus Juriquilla) and in a High-Performance-Computing Linux Cluster (ADA) with a total of 292 cores connected by a Mellanox Infiniband at 40 Gbps (National Laboratory of Advance Scientific Visualization, UNAM Campus Juriquilla). All runs were performed in a message passing interface (MPI) environment with a total of 135 cores or 6 cores in Horus or ADA, respectively^{48,57}. The GROMACS and VMD 1.9.1⁵⁸ softwares were utilized to analyse trajectories and visualize simulations. The GROMOS96 54A7 (united-atom) and AMBER (all-atom) force fields were also used under the same conditions.

Analysis of MD simulations. The GROMACS software tools, *gmx_gyrate* and *gmx_sasa*, determined the radius of gyration (compression) and the total molecular area, respectively. The GROMACS tools *gmx_rmsf* and *gmx_rms* evaluated the RMSF and total RMSD, respectively. RMSF and velocity per residue over time and secondary structure were evaluated using the timeline plugin of VMD 1.9.1⁵⁸. The principal component analysis⁵⁹ used the GROMACS inbuilt tool *gmx_covar* to yield the eigenvalues and eigenvectors, whereas the *gmx_anaig* tool analysed and plotted the eigenvectors. The secondary structure was analysed with the *gmx_helix* GROMACS tool. The free energy landscape analysis⁶⁰ was obtained by estimating the joint probability distribution from essential plane made by the top two eigenvectors⁶¹. For the SASA analysis, GROMACS *gmx_sasa* tool per residue and the POPS⁶² software version 1.8.0, were utilized. The graphs of the trajectory analysis were generated using Xmgrace (Paul J. Turner, Centre for Coastal and Land-Margin Research Oregon Graduate Institute of Science and Technology Beaverton, OR). The automated Poisson-Boltzmann electrostatic calculation was performed using the APBS⁶³-PDB2PQR⁶⁴ software. The molecules and trajectories were visualized using VMD 1.9.1⁵⁸ software into the high performance CAVE immersive 3D visualization system VisCube C4 (Visbox, IL). The molecular hydrophobicity potential (MHP) and the solvent accessible surface were projected and scored with PLATINUM software²⁰. The protein surface topography (PST) method was performed in combination with the analysis of the Conolly surface as described previously²¹. The inkscape 0.92 software (Inkscape Project. URL <https://inkscape.org>) was used to generate the graphical artwork. HELANAL⁶⁵ software and Bendix VMD-plugin⁶⁶ were used to analyse the geometry and kink of helices, and the inter-helix angle analysis was performed with the UCSF Chimera package⁶⁷ with the Axes/Planes/Centroids tool. For the evaluation of salt bridges the web server ESBRI¹⁹ was utilized. For calculation of minimal distance the GROMACS *gmx_mindist* tool was used. Aggrescan3D³² and the Tango³³ software were used for the prediction of sequence-dependent aggregation properties.

Construction of lentiviral vectors coding for recombinant vasoinhibins. Vasoinhibin cDNA was generated by PCR from human PRL cDNA including its corresponding signal peptide cloned in the pcDNA3 vector downstream of the CMV promoter, a BamHI restriction site (5'-G'GATCC-3'), and a Kozak sequence (5'-GCCACC-3'). A pCMV forward primer 5'-CCCACCTGGCAGTACATCA-3', and reverse primers Sall 5'-TTTTTTGTCGACTTAGTCTTTTTGATTCATCTGTTGGGC-3' or Sall 5'-TTTTTTGTCGACTTAGGTTTGCTCCTCAATCTCTACAGC-3' were used to construct the cDNAs corresponding to the vasoinhibin of 79 residues or the vasoinhibin of 123 residues, respectively. A stop codon (TTA) and a Sall restriction site (GTCGAC) were created at the Phe-80 codon for the vasoinhibin of 79 residues or at the Lys-124 codon for the vasoinhibin of 123 residues. For the empty vector, a random non-coding sequence of 20 bp, with sticky ends for BamHI and Sall was designed, and built-in by pairing the empty vector forward 5'-GATCCTAACGAGCAAAACACGTATAAG-3' and reverse 5'-TCGACTTATACGTGTTTTGCTCGTTAG-3' primers. The PCR products and the non-coding fragment were cloned into the pLenti CMV-GFP-Puro (AddGene # 658-5) plasmid conferring puromycin resistance (a gift from Eric Campeau and Paul Kaufman⁶⁸) via enzymatic digestion and ligation using restriction enzymes BamHI (Jena Biosciences, Jena, Germany) and Sall (New England Biolabs, Ipswich, MA) and T4 DNA ligase (Fermentas, Waltham, MA). The ligated plasmids (pLenti CMV-Vi79-Puro, CMV-Vi123-Puro, and pLenti CMV-non-coding-Puro) were transformed in *E. coli* competent cells by heat shock and the colony forming units selected with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The plasmids were grown and purified (Plasmid *Plus* Maxi Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) and their correct construction confirmed by restriction analysis and DNA sequencing. The lentiviral particles were produced by co-transfecting the human embryonic kidney cell line (HEK293 T/17 obtained from ATCC Manassas, VA) with the pLenti CMV-Vi79-Puro, CMV-Vi123-Puro or the CMV-non-coding-Puro together with the packaging plasmids: pMDLg/pRRE (Addgene # 12251), pRSV-Rev (Addgene # 12253), and pMD2.G (Addgene # 12259) (gifts from Didier Trono⁶⁹). Conditioned medium containing lentiviral vectors was harvested every 12 h for 2 days, pooled, and titrated through a puromycin kill curve in 293T/17 cells.

Recombinant vasoinhibin production by stably transduced HEK293T/17 cells. HEK293T/17 cells were cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% of foetal bovine serum (FBS) and antibiotics (100 U ml^{-1} of penicillin-streptomycin/100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ normosin). HEK293T/17 cells were stably transduced with recombinant lentiviral vectors coding for the vasoinhibins of 79 and 123 residues or with the empty vector (pLenti-CMV-non-coding-Puro), selected with 3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ puromycin (Sigma) for 24 h and expanded. Conditioned medium containing vasoinhibins was harvested every 48 h for 2 weeks, pooled, and stored at -70°C .

Tricine SDS-PAGE Western Blot. Tricine SDS-PAGE on a 16% acrylamide gel, followed by immunoblotting with polyclonal anti-human PRL antiserum (CL-1)⁷⁰ or monoclonal anti PRL N-terminal antibody 5602¹⁵ were used for evaluation and quantitation, respectively, the presence of vasoinhibins in the conditioned medium of transduced cells. Tricine-SDS-PAGE is the preferred electrophoretic system for the resolution of proteins smaller than 30 kDa⁷¹. Detection was by chemiluminescence using the peroxidase affiniPure donkey anti-rabbit or anti-mouse IgG (H&L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and the SuperSignal West Pico PLUS Substrate kit and the Protein simple fluorchem imager and gel documenter system (both from ThermoFisher Scientific, Waltham MA). Following the method described previously^{37,72}, the vasoinhibin concentration was quantified by interpolating from a PRL standard curve (run within the same blot) the combined densitometric values of the two vasoinhibin isoforms in each conditioned media (Supplementary Fig. 7e,f). The removal of N-linked oligosaccharides with Peptide N-glycosidase F (New England Biolabs) was done according to manufacturer instructions to evaluate the presence of glycosylated vasoinhibins in the conditioned media of the transduced cells. The Quantity One 1-D Analysis Software (BioRad) evaluated optical density values.

Endothelial cell proliferation. Bovine pulmonary artery endothelial cells (CPAE) acquired from the ATCC (Manassas, VA) and bovine umbilical vein endothelial cells (BUVEC) obtained as described⁷³ were maintained in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 20% of FBS and in F12K medium with 10% FBS, respectively, supplemented with antibiotics (100 U ml⁻¹ of penicillin-streptomycin/100 µg ml⁻¹ normosin). To test the proliferative effect of the recombinant vasoinhibins of 79 and 123 residues, CPAE or BUVEC were seeded at 6000 cells cm⁻² in a 96-well plate, starved with 0.5% FBS for 24 h, and treated with basic fibroblast growth factor (10 ng ml⁻¹) in the absence or presence of 50 µl (for CPAE) or different volumes (for BUVEC) of the conditioned medium of HEK293T/17 cells transduced with empty lentiviral vectors, lentiviral vectors coding vasoinhibins of 79 or 123 residues, or of non-transduced cells. CPAE or BUVEC were allowed to proliferate for 24 h and the number of cells with newly synthesized DNA were evaluated by the click reaction⁷⁴. Briefly, cells were treated with 10 µM of the thymidine analogue 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (Sigma-Aldrich) during the 24 h treatment with the different conditioned media. Cells were then fixed with paraformaldehyde 4% (20 min) and permeabilized with 0.5% TritonX-100 in 1X TBS (1 h). Between each step, cells were washed with 1X TBS for 2 min in an orbital shaker. The EdU present in the nuclei was detected by fluorescent-azide labelling in a 20 min click reaction performed using a fresh mix of 100 mM Tris, 0.5 mM CuSO₄, 50 mM ascorbic acid, and 20 µM Azide Fluor 545 (Sigma-Aldrich); followed by a 2 and a 30 minutes wash step with 0.5% TritonX-100 in 1X TBS. Nuclear DNA was counterstained with 5 µg ml⁻¹ bisBenzimide Hoechst 33342 trihydrochloride (Sigma-Aldrich) as reported⁷⁵. Images were digitalized in a fluorescence inverted microscope (Olympus IX51, Japan), analysed using the CellProfiler software⁷⁶, and merged with ImageJ 1.X software⁷⁷. In other experiments DNA synthesis was quantified by [³H]-thymidine incorporation. Briefly, CPAE were seeded at a density of 500 cells cm⁻² in a 48 well-plate, cultured with 0.5% of FBS for 24 h together with 20 µl of the different conditioned media with or without vasoinhibins. During the treatment, cells were pulsed with 0.5 µCi ml⁻¹ of [³H]-thymidine (Perkin Elmer, Boston, MA) and the measurement of [³H]-thymidine incorporation was performed as described³⁷.

Cell Migration Assay. Cell Migration was assessed by the scratch wound healing assay²⁴. CPAE were seeded at confluence in a 6-well plate in medium containing 0.5% serum for 24 h and scratched using the edge of a cell scraper. The medium was then replaced by one with 10% of serum and diluted 50% with conditioned medium of HEK293T/17 cells transduced with the empty lentiviral vector, lentiviral vectors coding vasoinhibins of 79 and 123 residues, or of non-transduced cells. After 24 h, migration was recorded using an Olympus IX51 microscope (Olympus instrument) and analysed with the CellProfiler⁷⁶ software and the wound healing pipeline.

Proliferation of endothelial cells transduced with recombinant lentiviral vectors coding for the vasoinhibins of 79 and 123 residues. BUVEC cells seeded in a 6 well plate at a density of 10,000 cells cm⁻² were stably transduced with lentiviral vectors coding for the vasoinhibins of 79 and 123 residues or with the empty vector in the presence of 5 µg ml⁻¹ polybrene (Sigma-Aldrich). Culture medium was changed at 24 h post-transduction and cells were counted every 24 hours for 3 days. At 72 h post-transduction nuclear DNA was stained with 2.5 µg ml⁻¹ bisBenzimide Hoechst 33342 trihydrochloride. Photographs were obtained in an Inverted Basic Microscope IX51 (Olympus, Tokyo, JP), with reflected fluorescence system dichroic mirror DM400. Nuclei number was automatically determined using Image J software.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR). CPAE cells were seeded in a 12-well plate until reaching 90% confluency. Cells were then placed in 0.5% of FBS for 24 h followed by changing the medium to one diluted 50% with conditioned media of HEK293T/17 cells transduced with empty lentiviral vectors, lentiviral vectors coding vasoinhibins of 79 and 123 residues, or of non-transduced cells. After 4 h total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and reverse transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products were detected and quantified using Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) in a final reaction of 10 µl containing template and 0.25 µM of each primer. Amplification was performed in the CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad) and included a 10 min denaturation step at 95 °C, followed by 35 cycles of amplification (10 sec at 95 °C, 30 sec at the primer pair-specific annealing temperature, and 30 sec at 72 °C). The following bovine primers were used: IL1A forward (5'-TCAAGGAGAATGTGGTGATG-3') and reverse (5'-CTGGAAGCTGTAATGTGCTG-3'); ICAM1 forward (5'-CGTTAAGCTACACCCACCTT-3') and reverse (5'-AGGTAAGGGTCTCCATCACA-3'). The PCR data were analysed by the 2^{-ΔΔCT} method, and cycle thresholds (CT) normalized to the housekeeping gene cyclophilin A (PPIA) calculated the mRNA levels. PPIA forward (5'-GGTCCCAGTTTTTCATTTG-3') and reverse (5'-ATGGTGATCTTCTTGCTGGT-3') primers were used.

Statistical analysis. The GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used. One-way ANOVA followed by Bonferroni's correction test compared differences between more than three groups. The significance threshold was set at $p < 0.05$.

Data Availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information file).

References

- Chung, A. S. & Ferrara, N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* **27**, 563–584, <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154002> (2011).
- Folkman, J. Angiogenesis. *Annual review of medicine* **57**, 1–18, <https://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131306> (2006).
- Ferrara, N. & Kerbel, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**, 967–974, <https://doi.org/10.1038/nature04483> (2005).
- Nyberg, P., Xie, L. & Kalluri, R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* **65**, 3967–3979, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2427> (2005).
- Cao, Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *The international journal of biochemistry & cell biology* **33**, 357–369 (2001).
- Clapp, C. *et al.* Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv Exp Med Biol* **846**, 83–95, https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_4 (2015).
- Triebel, J. *et al.* Principles of the Prolactin/Vasoinhibin Axis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, ajpregu00256 02015, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00256.2015> (2015).
- Bajou, K. *et al.* PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nature medicine* **20**, 741–747, <https://doi.org/10.1038/nm.3552> (2014).
- Clapp, C. & Weiner, R. A Specific, High Affinity, Saturable Binding Site for the 16-Kilodalton Fragment of Prolactin on Capillary Endothelial Cells. *Endocrinology* **130**, 1380–1386 (1992).
- Triebel, J., Macotela, Y., de la Escalera, G. M. & Clapp, C. Prolactin and vasoinhibins: Endogenous players in diabetic retinopathy. *IUBMB life* **63**, 806–810, <https://doi.org/10.1002/iub.518> (2011).
- Zepeda-Romero, L. C. *et al.* Higher prolactin and vasoinhibin serum levels associated with incidence and progression of retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* **81**, 473–479, <https://doi.org/10.1038/pr.2016.241> (2017).
- Hilfiker-Kleiner, D. *et al.* A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy. *Cell* **128**, 589–600, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.036> (2007).
- Gonzalez, C. *et al.* Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia. *Lab Invest* **87**, 1009–1017, <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700662> (2007).
- Teilum, K. *et al.* Solution structure of human prolactin. *J Mol Biol* **351**, 810–823, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.042> (2005).
- Piwnic, D. *et al.* Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance. *Molecular endocrinology* **18**, 2522–2542, <https://doi.org/10.1210/me.2004-0200> (2004).
- Macotela, Y. *et al.* Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of cell science* **119**, 1790–1800, <https://doi.org/10.1242/jcs.02887> (2006).
- Ge, G., Fernandez, C. A., Moses, M. A. & Greenspan, D. S. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10010–10015, <https://doi.org/10.1073/pnas.0704179104> (2007).
- Larsen, T. A., Olson, A. J. & Goodsell, D. S. Morphology of protein-protein interfaces. *Struct Fold Des* **6**, 421–427, [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00044-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00044-6) (1998).
- Costantini, S., Colonna, G. & Facchiano, A. M. ESBRI: a web server for evaluating salt bridges in proteins. *Bioinformatics* **3**, 137–138 (2008).
- Pyrkov, T. V., Chugunov, A. O., Krylov, N. A., Nolde, D. E. & Efremov, R. G. PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. *Bioinformatics* **25**, 1201–1202, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp111> (2009).
- Koromyslova, A. D., Chugunov, A. O. & Efremov, R. G. Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a Protein Surface Topography (PST) method. *J Chem Inf Model* **54**, 1189–1199, <https://doi.org/10.1021/ci500158y> (2014).
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delure, F. & Weiner, R. I. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**, 1292–1299, <https://doi.org/10.1210/endo.133.3.7689950> (1993).
- Lee, S. H., Kunz, J., Lin, S. H. & Yu-Lee, L. Y. 16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway. *Cancer Res* **67**, 11045–11053, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0986> (2007).
- Liang, C. C., Park, A. Y. & Guan, J. L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature protocols* **2**, 329–333, <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30> (2007).
- Tabruyn, S. P. *et al.* The angiostatic 16K human prolactin overcomes endothelial cell energy and promotes leukocyte infiltration via nuclear factor-kappaB activation. *Molecular endocrinology* **21**, 1422–1429, <https://doi.org/10.1210/me.2007-0021> (2007).
- Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C. & Martinez De La Escalera, G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological reviews* **89**, 1177–1215, <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2009> (2009).
- Hilfiker-Kleiner, D. & Sliwa, K. Pathophysiology and epidemiology of peripartum cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol* **11**, 364–370, <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.37> (2014).
- Triebel, J. *et al.* From Bench to Bedside: Translating the Prolactin/Vasoinhibin Axis. *Front Endocrinol (Lausanne)* **8**, 342, <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00342> (2017).
- Schneider, J. P., Lombardi, A. & DeGrado, W. F. Analysis and design of three-stranded coiled coils and three-helix bundles. *Fold Des* **3**, R29–40, [https://doi.org/10.1016/S1359-0278\(98\)00011-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(98)00011-X) (1998).
- Daggett, V. & Fersht, A. The present view of the mechanism of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 497–502, <https://doi.org/10.1038/nrm1126> (2003).
- Jones, S. & Thornton, J. M. Principles of protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13–20 (1996).
- Zambrano, R. *et al.* AGGRESAN3D (A3D): server for prediction of aggregation properties of protein structures. *Nucleic Acids Res* **43**, W306–313, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv359> (2015).
- Fernandez-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature biotechnology* **22**, 1302–1306, <https://doi.org/10.1038/nbt1012> (2004).
- Christensen, L. F., Malmos, K. G., Christiansen, G. & Otzen, D. E. A Complex Dance: The Importance of Glycosaminoglycans and Zinc in the Aggregation of Human Prolactin. *Biochemistry* **55**, 3674–3684, <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00153> (2016).
- Dannies, P. S. Prolactin and growth hormone aggregates in secretory granules: the need to understand the structure of the aggregate. *Endocrine reviews* **33**, 254–270, <https://doi.org/10.1210/er.2011-1002> (2012).

36. Khurana, S., Liby, K., Buckley, A. R. & Ben-Jonathan, N. Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology* **140**, 4127–4132, <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.6955> (1999).
37. Ferrara, N., Clapp, C. & Weiner, R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* **129**, 896–900, <https://doi.org/10.1210/endo-129-2-896> (1991).
38. Lee, J., Majumder, S., Chatterjee, S. & Muralidhar, K. Inhibitory activity of the peptides derived from buffalo prolactin on angiogenesis. *J Biosci* **36**, 341–354 (2011).
39. Florio, T. *et al.* Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology* **144**, 1574–1584, <https://doi.org/10.1210/en.2002-220949> (2003).
40. Nguyen, N. Q. *et al.* Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14319–14324, <https://doi.org/10.1073/pnas.0606638103> (2006).
41. Gonzalez, C. *et al.* 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology* **145**, 5714–5722, <https://doi.org/10.1210/en.2004-0647> (2004).
42. Garcia, C. *et al.* Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *The Journal of clinical investigation* **118**, 2291–2300, <https://doi.org/10.1172/JCI34508> (2008).
43. Arredondo Zamarripa, D. *et al.* Vasoinhibins regulate the inner and outer blood-retinal barrier and limit retinal oxidative stress. *Front Cell Neurosci* **8**, 333, <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00333> (2014).
44. Corbacho, A. M. *et al.* Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *The Journal of biological chemistry* **275**, 13183–13186 (2000).
45. Mejia, S. *et al.* Prolactin and 16K prolactin stimulate release of vasopressin by a direct effect on hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrine* **20**, 155–162, <https://doi.org/10.1385/ENDO:20:1-2:155> (2003).
46. Zamorano, M. *et al.* Prolactin-derived vasoinhibins increase anxiety- and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology* **44**, 123–132, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.03.006> (2014).
47. Castillo, X. *et al.* Vasoinhibin Suppresses the Neurotrophic Effects of VEGF and NGF in Newborn Rat Primary Sensory Neurons. *Neuroendocrinology*, <https://doi.org/10.1159/000477768> (2017).
48. Pronk, S. *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **29**, 845–854, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt055> (2013).
49. Van Der Spoel, D. *et al.* GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* **26**, 1701–1718, <https://doi.org/10.1002/jcc.20291> (2005).
50. MacKerell, A. D. *et al.* All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B* **102**, 3586–3616, <https://doi.org/10.1021/jp973084f> (1998).
51. Anandakrishnan, R., Aguilar, B. & Onufriev, A. V. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Res* **40**, W537–541, <https://doi.org/10.1093/nar/gks375> (2012).
52. Bietz, S., Urbaczek, S., Schulz, B. & Rarey, M. Protoss: a holistic approach to predict tautomers and protonation states in protein-ligand complexes. *J Cheminform* **6**, 12, <https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-12> (2014).
53. Bondi, A. van der waals volumes and radii. *J Phys Chem* **68**, 441–451 (1964).
54. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of chemical physics* **79**, 926–935, <https://doi.org/10.1063/1.445869> (1983).
55. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics* **98**, 10089–10092, <https://doi.org/10.1063/1.464397> (1993).
56. Hess, B. P-LINCS: a parallel linear constraint solver for molecular simulation. *J chem Theory Comput* **4**, 116–122 (2008).
57. Páll, S., Abraham, M. J., Kutzner, C., Hess, B. & Lindahl, E. In *Solving Software Challenges for Exascale: International Conference on Exascale Applications and Software, EASC 2014, Stockholm, Sweden, April 2-3, 2014, Revised Selected Papers* (eds Markidis, S. & Laure, E.) 3–27 (Springer International Publishing, 2015).
58. Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**(33-38), 27–38 (1996).
59. David, C. C. & Jacobs, D. J. Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins. *Methods in molecular biology* **1084**, 193–226, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-658-0_11 (2014).
60. Frauenfelder, H., Sligar, S. G. & Wolynes, P. G. The energy landscapes and motions of proteins. *Science* **254**, 1598–1603 (1991).
61. Tournier, A. L. & Smith, J. C. Principal components of the protein dynamical transition. *Physical review letters* **91**, 208106, <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.91.208106> (2003).
62. Cavallo, L., Kleinjung, J. & Fraternali, F. POPS: A fast algorithm for solvent accessible surface areas at atomic and residue level. *Nucleic Acids Res* **31**, 3364–3366 (2003).
63. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10037–10041, <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398> (2001).
64. Dolinsky, T. J. *et al.* PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res* **35**, W522–525, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm276> (2007).
65. Kumar, P. & Bansal, M. HELANAL-Plus: a web server for analysis of helix geometry in protein structures. *J Biomol Struct Dyn* **30**, 773–783, <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.689705> (2012).
66. Dahl, A. C., Chavent, M. & Sansom, M. S. Bendix: intuitive helix geometry analysis and abstraction. *Bioinformatics* **28**, 2193–2194, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts357> (2012).
67. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612, <https://doi.org/10.1002/jcc.20084> (2004).
68. Campeau, E. *et al.* A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS one* **4**, e6529, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006529> (2009).
69. Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology* **72**, 8463–8471 (1998).
70. Duenas, Z. *et al.* Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 2049–2055 (2004).
71. Schagger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nature protocols* **1**, 16–22, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4> (2006).
72. Clapp, C. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* **121**, 2055–2064, <https://doi.org/10.1210/endo-121-6-2055> (1987).
73. Cajero-Juarez, M. *et al.* Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium. *European journal of cell biology* **81**, 1–8, <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00213> (2002).
74. Salic, A. & Mitchison, T. J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 2415–2420, <https://doi.org/10.1073/pnas.0712168105> (2008).
75. Chazotte, B. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, pdbprot5557, <https://doi.org/10.1101/pdbprot5557> (2011).
76. Carpenter, A. E. *et al.* CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* **7**, R100, <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-10-r100> (2006).
77. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9**, 671–675 (2012).

Acknowledgements

This work was supported by the National Council of Science and Technology of Mexico ('*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*' - CONACYT) grant 220574 and UNAM grant UR405-PC to C.C. Juan Pablo Robles is a doctoral student from "*Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*" and received fellowship 394345 from CONACYT. We thank Luis Alberto Aguilar, Alejandro De León Cuevas, Adriana Gonzalez Gallardo, Michael Jeziorski, Anaid Antaramian, Fernando López Barrera, and Xarubet Ruiz-Herrera for excellent technical assistance. MD simulations and data analyses were conducted at the *Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada, UNAM*. We thank Jessica Gonzalez Norris for critically editing the manuscript.

Author Contributions

J.P.R. and C.C. conceived, designed research, supervised the study, and wrote the manuscript; J.P.R. performed MD simulation and analyzed data; M.Z. performed the biological studies. J.P.R. and M.T. generated the lentiviral vectors. J.L.V.-B. and R.G.-J. supervised MD simulation and analysis; J.T., T.B., and G.M. de la E. critically supervised and revised the study. All authors reviewed and approved the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35383-7>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

12.9. Material Suplementario de artículo de investigación.

Supplementary Information

Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues

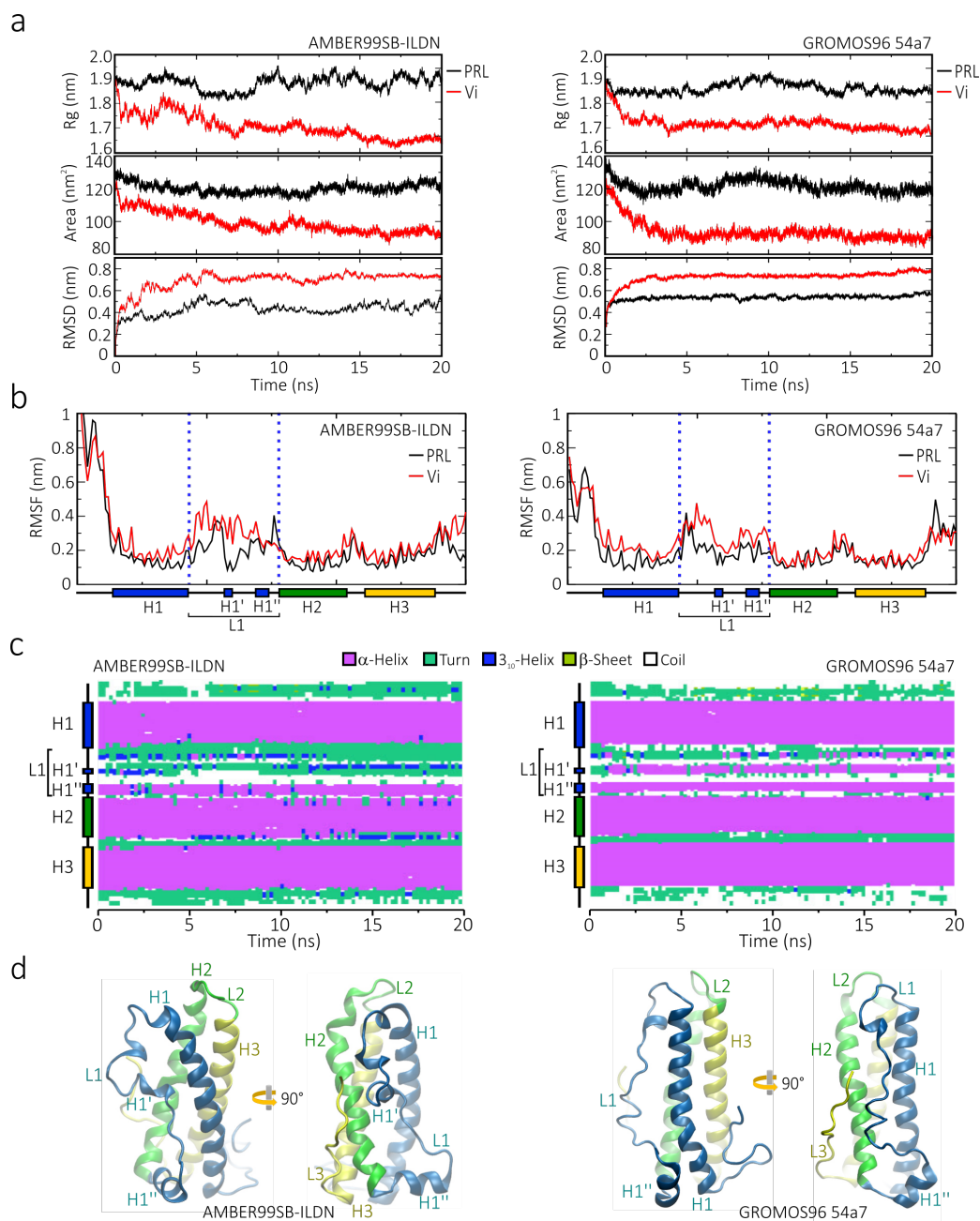
Juan Pablo Robles¹, Magdalena Zamora¹, José Luis Velasco-Bolom², Miriam Tovar¹, Ramón Garduño-Juarez², Thomas Bertsch³, Gonzalo Martínez de la Escalera¹, Jakob Triebel³, and Carmen Clapp^{1,*}

¹Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Querétaro, México.

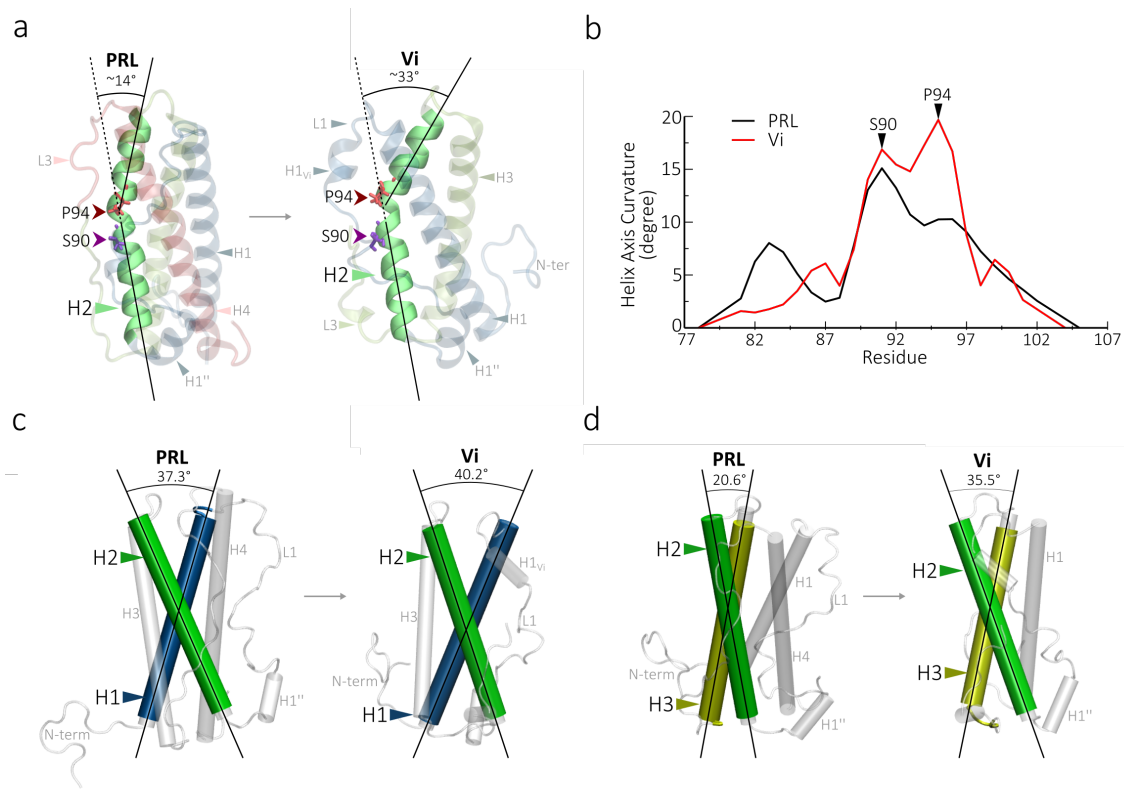
²Biofísica y Ciencia de Materiales, Instituto de Ciencias Físicas, UNAM, Cuernavaca, México

³Institute for Clinical Chemistry, Laboratory Medicine and Transfusion Medicine, Nuremberg General Hospital & Paracelsus Medical University, Nuremberg, Germany;

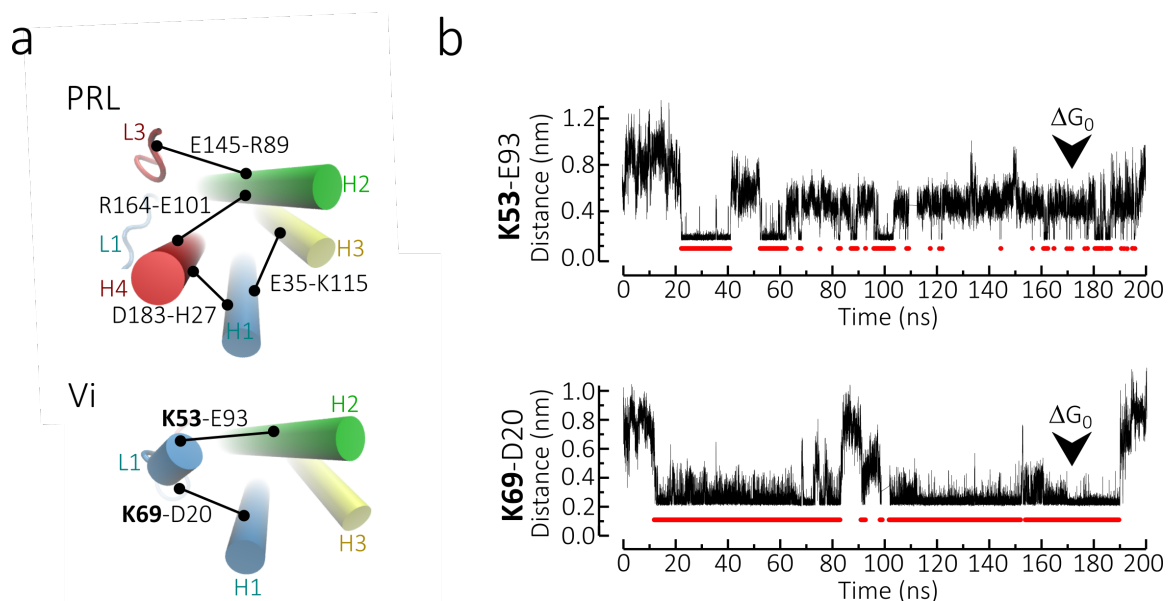
***Correspondence should be addressed to C.C. (clapp@unam.mx)**



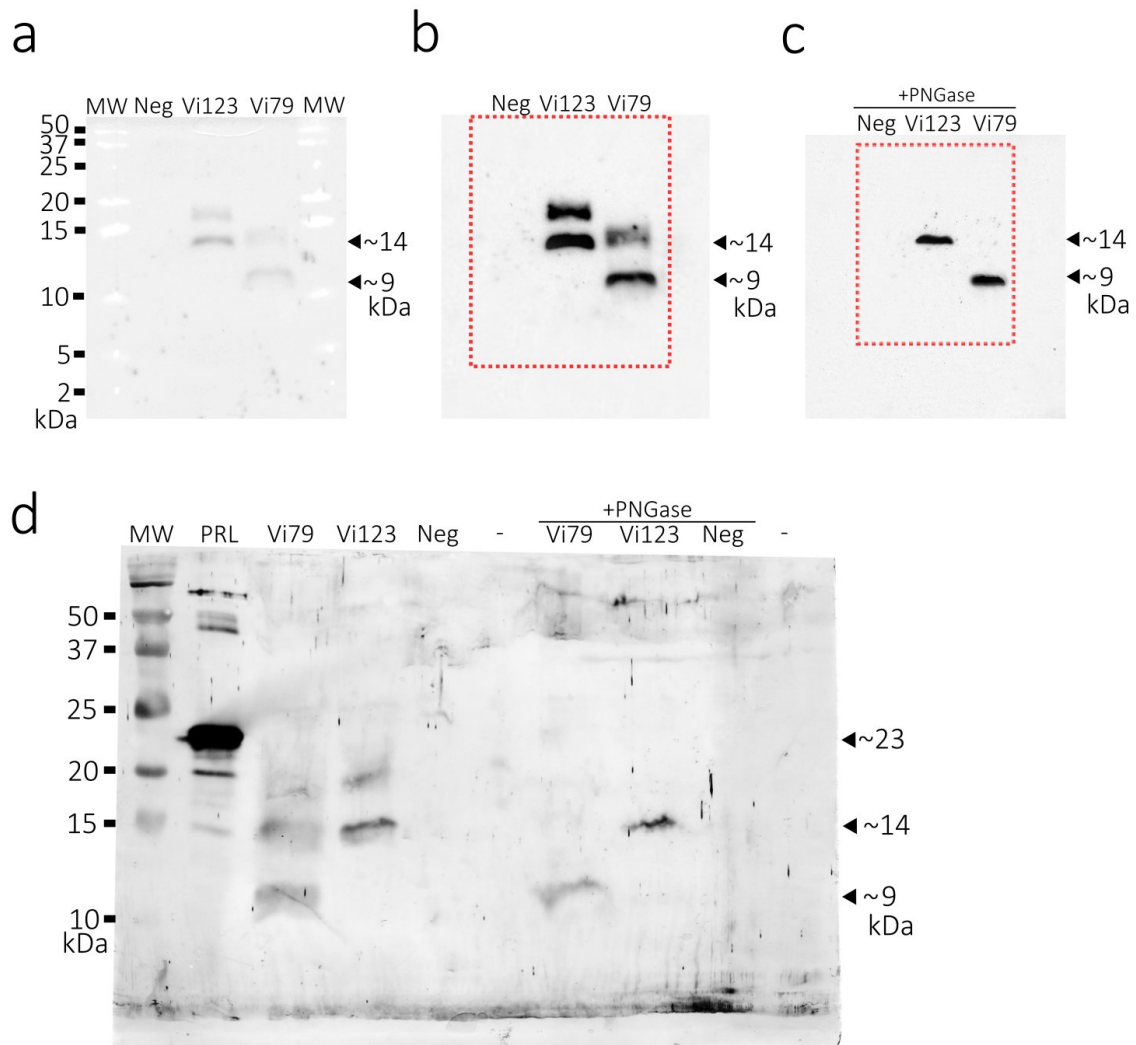
Supplementary Figure 1. Trajectory analysis and secondary structure of PRL and a vasoinhibin of 150 amino acids (Vi) with AMBER99SB-ILDN and GROMOS96 54a7 force fields. a. Radius of gyration (Rg), surface area, and root mean square deviation (RMSD) during 20 ns of molecular dynamic simulation (MD). **b.** Total root mean square fluctuation (RMSF) per residue of Vi relative to PRL. Loop 1 (L1) is flanked by blue pointed lines. **c.** Secondary structure along the residue sequence of Vi. **d.** Representative snapshot of vasoinhibin structure in a front and a lateral view.



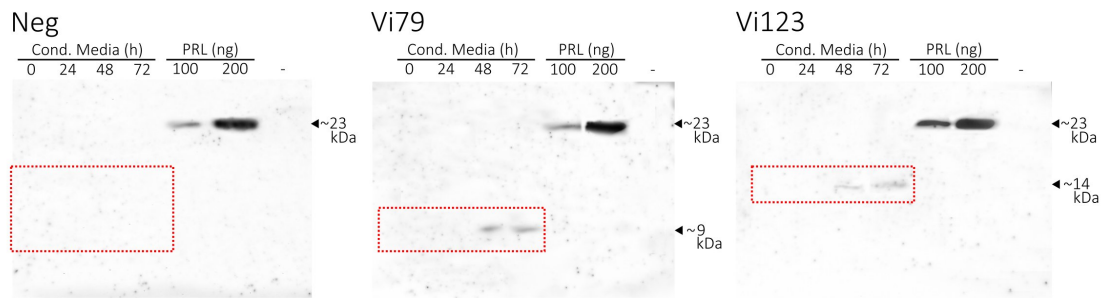
Supplementary Figure 2. Analysis of α -helices geometry and crossing angles in PRL and a vasoinhibin of 150 amino acids (Vi). **a.** Cartoon representation showing the α -helix 2 (H2) kink and bending angles in PRL and Vi. The residues P94 and S90 are indicated in each molecule (arrows). **b.** Quantitation of the curvature along the H2 axis in PRL and Vi. Maximal bending points occur at S90 and P94 in PRL and Vi, respectively. Crossing angle analysis between H1-H2 (**c**) and H2-H3 (**d**) in PRL and Vi.



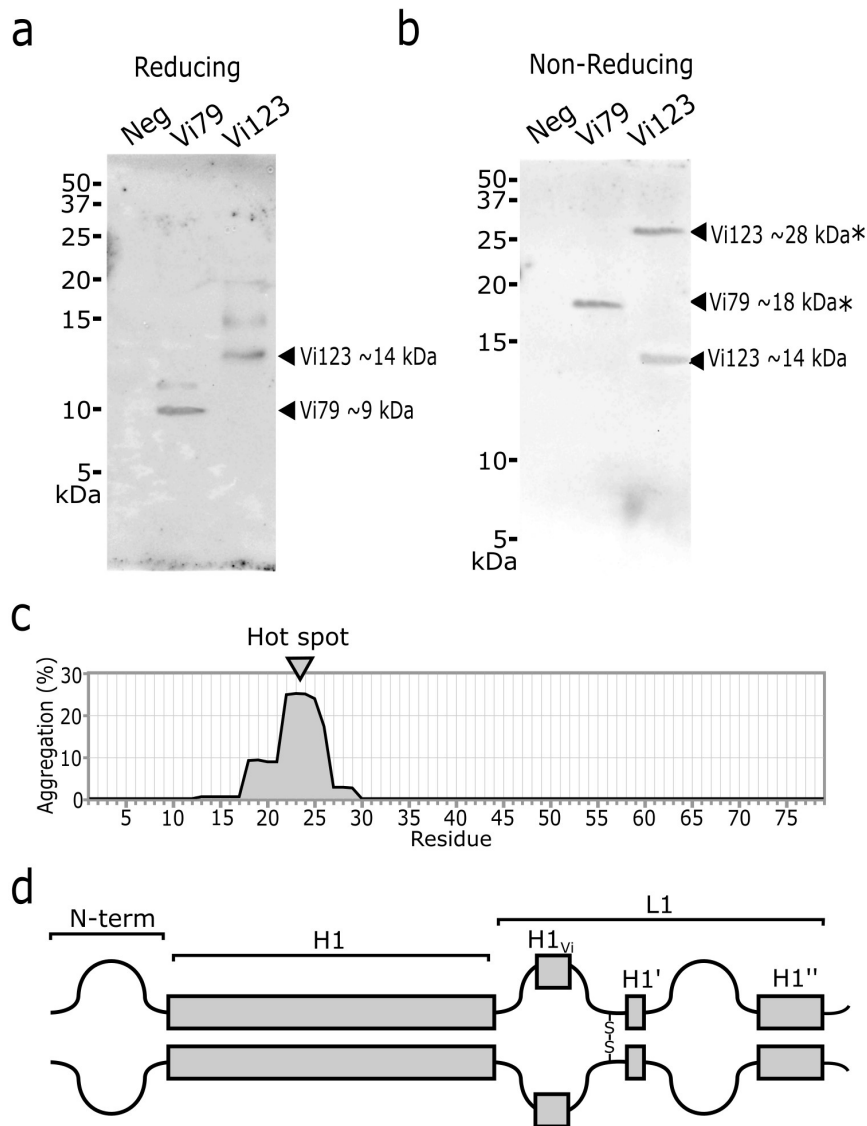
Supplementary Figure 3. Analysis of salt-bridge pairs formed by buried basic residues K53 and K69 in a 150 residue vasoinhibin (Vi). **a.** Schematic representation of α -helices (H1-4) and loops (L1, L3) in PRL (pdb 1RW5) and Vi (frame 175872) visualized from the top to illustrate the inter-helical salt-bridges. No salt-bridge is found between L1 and other part of the molecule in PRL, where most salt-bridges occur within lateral structures, except for R164-E101 present in the core of the molecule. Residues K53 and K69, buried in Vi, are located in L1 and form salt-bridges with E93 in H2 and N20 in H1, respectively. **b.** Analysis of the minimum distance between the residues in salt-bridges K53-E93 and K69-D20 during 200 ns of molecular dynamic simulation. The red line indicates the minimum distance reached by the residue pairs qualifying as forming a salt-bridge. Head-arrow indicates the frame with the lowest Vi energy structure (ΔG_0).



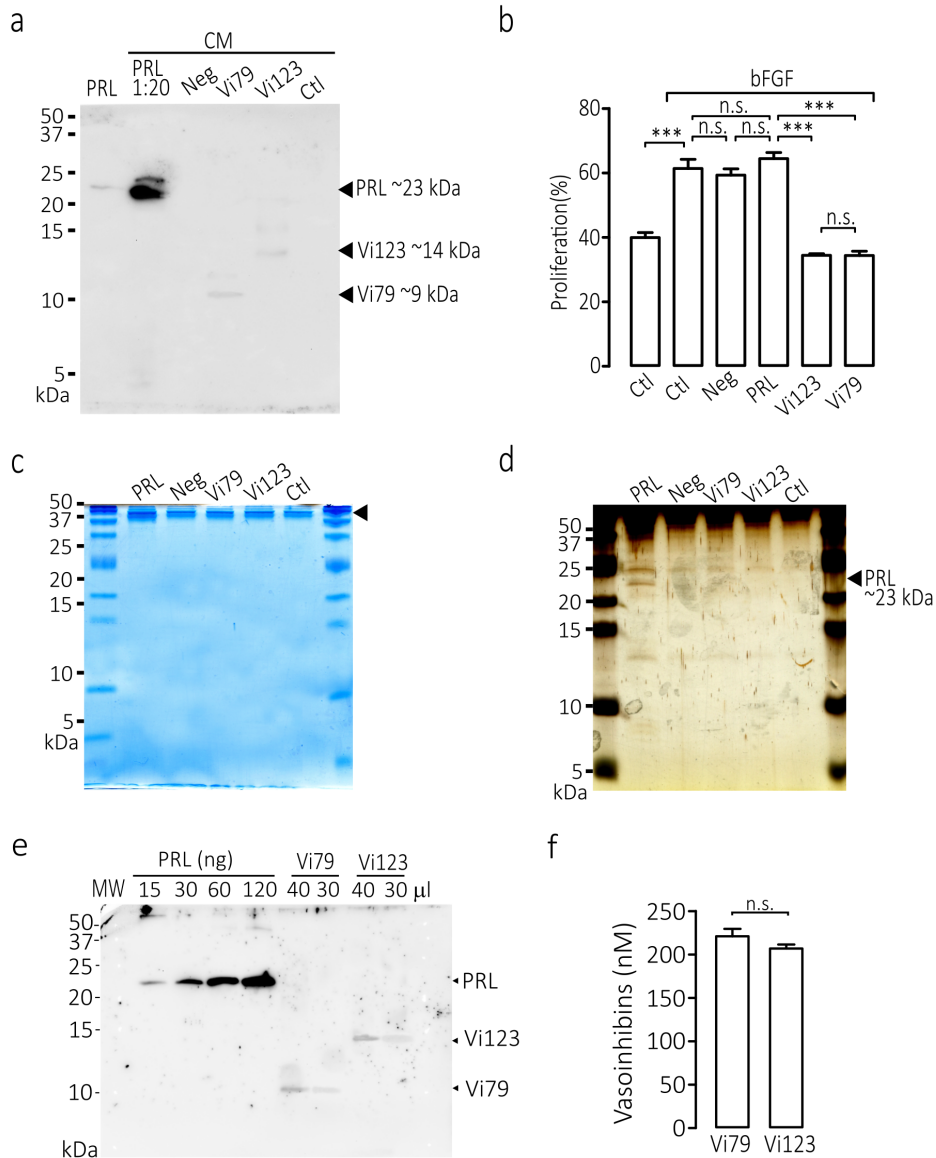
Supplementary Figure 4. Analysis of the production of recombinant vasoinhibin comprising 1 to 79 amino acids (Vi79) of PRL **a.** Full unedited Western blot of conditioned media (CM) obtained from HEK293T/17 cells stably transduced with lentiviral vectors encoding the first 79 residues (calculated molecular weight ~9 kDa) or the first 123 residues (~14 kDa). CM of cells transduced with empty lentiviral vector as negative control (Neg), molecular weight marker (MW) bands are superimposed automatically. **b.** and **c.** Full unedited gel for figure 7a and b, respectively, pointed line red rectangles correspond to cropped images within the manuscript. **d.** Full unedited Western blot analysis of conditioned media (CM) of figure 7 a and b, without or with PNGase treatment, developed with alkaline phosphatase method. Full length PRL was used as positive control.



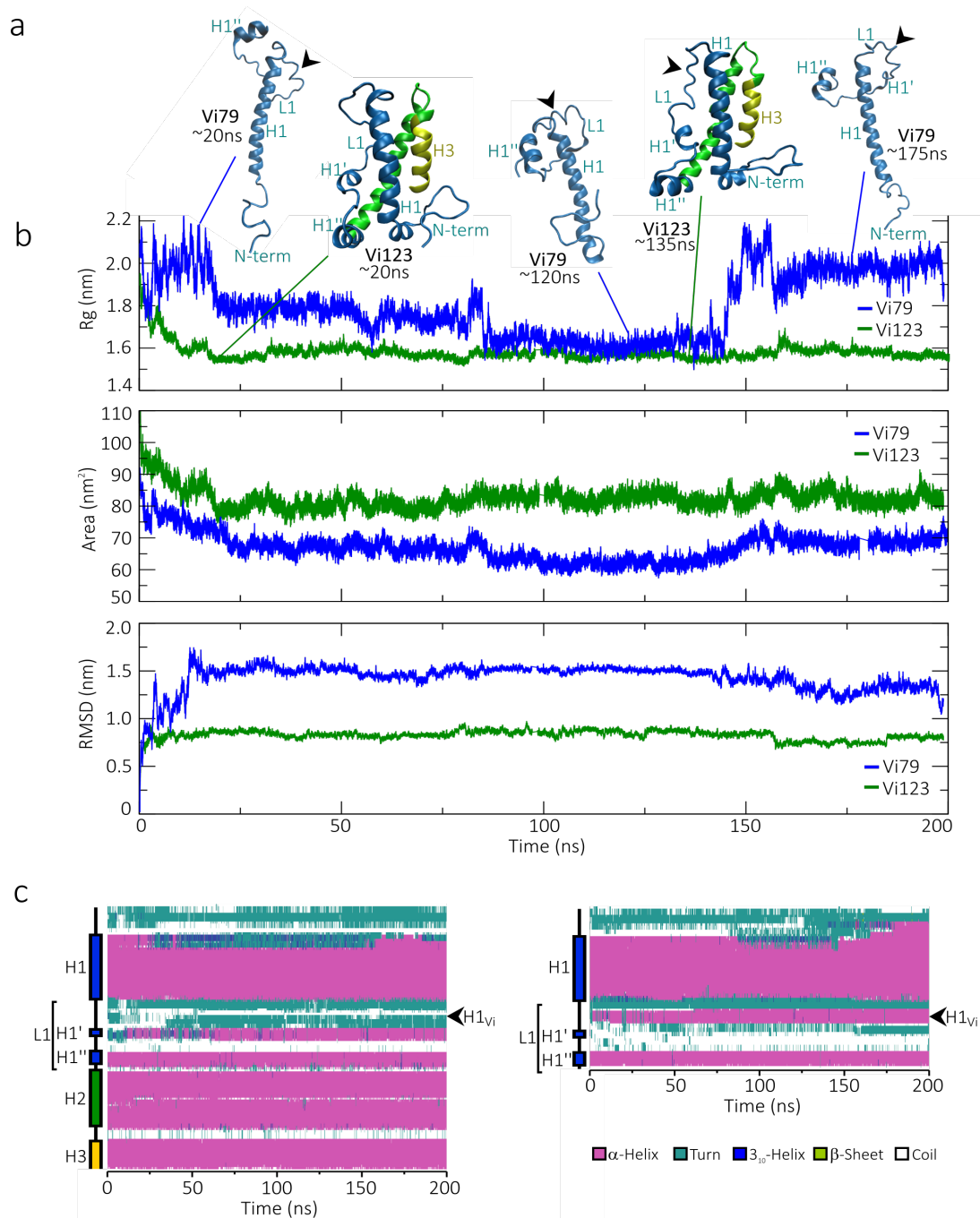
Supplementary Figure 5. Unedited blots of figure 9d. Full unedited gels from figure 9d pointed line red rectangles correspond to cropped images within the manuscript.



Supplementary Figure 6. Analysis of the disulphide bond dimerization of 79- and 123-residue vasoinhibins. Reducing (a) and non-reducing (b) Tricine SDS-PAGE Western blot analysis of conditioned media (CM) from HEK293T/17 cells stably transduced with lentiviral vectors encoding the first 79 residues (Vi79) or the first 123 residues (Vi123) of human PRL. CM of cells transduced with empty lentiviral vector was the negative control (Neg). Monomers of Vi79 and Vi123 have ~9 kDa and ~14 kDa, respectively. **Dimers** of Vi79 (~18 kDa) and Vi123 (~28 kDa) are indicated (*). Numbers on left indicate the molecular weight of marker proteins. **c. Aggregation per residue of Vi79 as predicted by the Aggrescan3D and Tango plot software analyses.** The major aggregation hot spot is indicated (arrow). **d. Proposed model for the Vi79 dimer conformation.** Disulfide bridge C58-C58 is indicated (-S-S-).



Supplementary Figure 7. Bioactivity of PRL and PRL fragments of 79 and 123 residues. **a.** Western blot analysis of the conditioned media (CM) obtained from HEK293T/17 cells stably transduced with lentiviral vectors encoding full-length PRL, the first 79 residues of PRL (Vi79), the first 123 residues of PRL (Vi123) or with an empty vector (Neg). The PRL CM was diluted 20 times. A PRL standard (PRL, 20 ng) was run as reference. Numbers on left indicate the molecular weight of marker proteins. **b.** Proliferation of bovine pulmonary artery endothelial cells (CPAE) quantified by the Edu-click reaction and expressed relative to the total number of cells in the field. Cells were incubated for 24 h with or without basic fibroblast growth factor (bFGF) in combination or not with the same volume of CM without (Neg) or with full-length PRL (undiluted CM), Vi79 or Vi123. *** $p < 0.001$. n.s., non-significant. Total protein level in the different CM assessed by Coomassie blue (**c**) and silver stain (**d**). **e.** Western blot of a PRL standard curve and two different volumes of CM containing Vi79 or Vi123. **f.** The concentration of Vi79 and Vi123 in CM were obtained by interpolating from the PRL standard curve the densitometric values of the vasoinhibin isoforms in each CM. Values are means \pm S.E.M. from 3 independent determinations.



Supplementary Figure 8. Analysis of the 123- and 79-residue vasoinhibins (Vi) during 200 ns of molecular dynamic simulation (MD). **a.** Representative snapshots of Vi123 and Vi79 at the indicated times (lines) throughout the MD. The $H1_{Vi}$ region in each structure is indicated (arrow). **b.** Radius of gyration (Rg), surface area, and root mean square deviation (RMSD). **c.** Changes in the secondary structure along the residue sequence of Vi123 (left) and 79 (right) during the 200 ns MD. The colours represent different secondary structures according to the code.