



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto del tiempo de expresión y la concentración del metanol en la producción recombinante de la proteína M271 en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ RICARDO PANTALEÓN LEGORRETA

TUTOR: Dr. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Datos Sinodales

Presidente

Dr. José Luis Puente García
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Vocal

Dra. Adelaida Díaz Vilchis
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Secretario tutor

Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología, UNAM.

Sinodal 1

Dr. Jorge Antonio García Álvarez
Facultad de Ciencias, UNAM.

Sinodal 2

M. en C. Vanessa Vega García
Facultad de Ciencias, UNAM.

Dedicatoria

A todas las personas que a lo largo de mi vida me han apoyado directa o indirectamente en este camino, en cada una de sus etapas, rumbo a obtener este logro.

Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente a mi familia, empezando por mi madre Alicia, quien siempre estuvo, está y estará en cada etapa de mi vida, a mi padre José por el sustento a lo largo de mi vida académica, a mis hermanos Yazmin y Diego por acompañarme desde que éramos pequeños y crecer juntos, con todo cariño sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, gracias por todo y mucho más.

Agradezco mucho al Dr. Enrique Rudiño Piñera por abrirme las puertas de su laboratorio en esta aventura, por los conocimientos, consejos, aprendizajes y más, ha sido un placer ser parte de su equipo de laboratorio.

Gracias al Dr. José Luis Puente García por permitirme ser parte del taller de Biomoléculas y poder tener la experiencia de realizar mi tesis en el Instituto de Biotecnología de la UNAM el cual cambió las perspectivas de la investigación que se realiza en el país, cerca de grandes científicos.

A mis estimados sinodales por tomarse el tiempo para participar en la revisión de este trabajo con sus consejos y observaciones, muchas gracias.

Agradezco a todos los amigos que pude tener en este camino, Hugo, Erick, Isra, Victor, Jonas, Omar, May, Nava, Denisse, Jesus, Alejandro, R. Alejandro, Raziell, Mariana, Lupe, Angie, Alejandra, Ram, Armando y a todos los que estuvieron. ¡Ánimo!

Muchas gracias a los miembros del laboratorio 8 de Bioquímica estructural por apoyarme y orientarme en mi paso por el laboratorio, a Lyz, Aris, Alexis, Ade, Cristina, Ángela, Rive y a todos, un abrazo.

A la Facultad de Ciencias de la UNAM por permitirme hacer mi carrera en sus instalaciones, por todo el conocimiento que adquirí por medio de mis profesores, por las prácticas de laboratorio y campo, muchas gracias.

Gracias al Instituto de Biotecnología porque pude realizar mi trabajo experimental en sus bellas instalaciones y conocer gente fantástica.

Gracias Sofi, por acompañarme en la etapa final de este capítulo y darme apoyo siempre, vamos por más.

Gracias a la UNAM por abrigarme desde el bachillerato y hasta este momento, siempre azul y oro. ¡Goya, Universidad!

ÍNDICE

Datos Sinodales	2
<i>Dedicatoria</i>	3
<i>Agradecimientos</i>	4
ÍNDICE	5
I RESUMEN	7
ABSTRACT	8
II INTRODUCCIÓN	10
II.1 Sistemas de expresión heteróloga de proteínas recombinantes.	10
II.2 Sistemas heterólogos procariontes para la expresión de proteínas recombinantes.	12
II.3 Sistemas heterólogos eucariotas para la expresión de proteínas recombinantes.	15
II.4 <i>Escherichia coli</i> : Ventajas y desventajas como modelo de expresión.	17
II.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Ventajas y desventajas como modelo de expresión.	18
II.6 <i>Pichia pastoris</i> : Ventajas y desventajas como modelo de expresión.	20
II.7 Estrategias de optimización de la expresión recombinante.	21
II.8 Variación de las condiciones de cultivo.	22
III ANTECEDENTES	22
III.1 <i>Pichia pastoris</i> en la expresión de proteínas recombinantes.	22
III.2 Estrategias de fermentación para la producción de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i> .	24
III.3 La importancia de <i>Solanum tuberosum</i> .	26
III.4 El inhibidor de proteasas de la familia Kunitz-type STI: M271.	27
III.5 Purificación y análisis SDS-PAGE del inhibidor M271	29
IV JUSTIFICACIÓN	30
V HIPÓTESIS	30
VI OBJETIVOS	30
VI.1 Objetivo General	30
VI.2 Objetivos Específicos	30
VII MATERIALES Y MÉTODOS	31
VII.1 Precultivo para la expresión de M271.	31

VII.2 Expresión de la proteína M271.	32
VII.3 Purificación de la proteína M271.	33
VII.4 Concentración de la proteína M271.	33
VII.5 Análisis de los datos.	33
VIII RESULTADOS	34
VIII.1 Expresión y purificación de M271.	34
VIII.2 Efecto en el tiempo de espera entre la purificación y el análisis por SDS-PAGE.	37
VIII.3 Producción de la proteína M271.	38
VIII.4 Análisis estadístico de la cantidad de proteína total de la proteína M271.	40
VIII.5 Análisis comparativo entre las concentraciones de 1% v/v y de 2% v/v en la cantidad total de la proteína M271.	43
IX DISCUSIÓN	45
IX.1 Homogeneidad de la proteína M271 en los análisis por SDS-PAGE.	45
IX.2 Cantidad total de la proteína M271.	53
X CONCLUSIONES	56
XI PERSPECTIVAS	57
XII REFERENCIAS	58

I RESUMEN

La producción de proteínas recombinantes se ha vuelto un campo muy importante en el área de la biotecnología para diversos problemas que enfrenta esta rama de la investigación, tal como en el área médica, la biorremediación y en el campo industrial. Se han implementado varios organismos como modelo en la expresión de proteínas recombinantes en las ramas antes mencionadas, para así utilizar y aprovechar su maquinaria molecular con la finalidad de dar una aplicación final a esas proteínas de interés.

Las proteínas recombinantes son aquellas proteínas codificadas por DNA recombinante que se han clonado en un vector de expresión que codifica al gen expresado y sirve como templado para la traducción del RNA mensajero. Existen distintos sistemas de expresión recombinante que se emplean para la producción de proteínas de interés que se dividen en dos grupos: sistemas procarióticos y eucarióticos. El máximo exponente de los sistemas procarióticos es *Escherichia coli* por las ventajas que ofrece y el amplio conocimiento que se tiene de su fisiología celular y genética, sin embargo, presenta inconvenientes que no lo hacen adecuado para producir algunas proteínas, como las proteínas que presentan modificaciones post-traduccionales.

Varios sistemas de expresión eucarióticos suplen algunas de las desventajas que presentan los sistemas procariontes, entre los que destacan la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, sin embargo, también presentan inconvenientes para la producción de diversas proteínas. En este contexto, *P. pastoris* se ha posicionado en los tiempos recientes para trabajos de investigación de manera preferencial en la expresión de proteínas recombinantes. Las facilidades que ofrece este sistema de expresión son: la alta tasa de éxito de una proteína recombinante funcional activa, el crecimiento rápido que expresa proteínas con un alto rendimiento por

volumen de cultivo y que cuenta tanto con medios de cultivo definidos y accesibles, como con técnicas de manipulación genética bien estudiadas y con alta tasa de éxito.

En esta tesis, se utilizó el sistema de expresión de *P. pastoris* para la producción de un inhibidor de proteasas de la familia Kunitz-STI: M271, que anteriormente en nuestro grupo de investigación se había expresado y caracterizado con el fin de determinar su estructura por cristalografía de rayos X. Con el fin de encontrar la combinación de condiciones que permitieran alcanzar la expresión máxima de una proteína expresada en *P. pastoris*, optimizar la cantidad total de proteína obtenida en la producción de M271, en esta tesis se evaluó el efecto que tiene el tiempo de inducción en los cultivos y la adición en la concentración de metanol.

Esta tesis muestra las condiciones adecuadas para la producción recombinante de M271 utilizando la levadura metilotrófica *P. pastoris* para obtener la mayor cantidad de proteína en mg totales, muestra que con un tiempo de inducción de 72 h y una concentración de metanol 2% v/v se logra este objetivo. Además, mediante análisis por SDS-PAGE, se demuestra que el tiempo entre la purificación y el propio análisis por SDS-PAGE, es un factor importante para interpretar los geles de poliacrilamida, ya que, el análisis que propone este trabajo al comportamiento en la aparición de bandas que no corresponden a la masa molecular de M271 se debe a oligomerizaciones por el tiempo de espera y a las condiciones ambientales.

ABSTRACT

The production of recombinant proteins has become a very important field in the biotechnology area for various problems that this branch of research faces, such as in the medical area, bioremediation and in the industrial field. Several organisms have been implemented as a model to express recombinant proteins in the aforementioned

branches, in order to use and take advantage of their molecular machinery so that, later, it results in the final application of those proteins of interest.

Recombinant proteins are those proteins encoded by recombinant DNA that have been cloned into an expression vector that supports the expression of the gene and the translation of the messenger RNA. There are different recombinant expression systems that are used for the production of proteins of interest that are divided into two groups: prokaryotic and eukaryotic systems. The greatest exponent of prokaryotic systems is *Escherichia coli* due to the advantages it offers and the extensive knowledge of its cellular and genetic physiology, however, it has drawbacks that do not make it suitable for producing some proteins, such as post-translational modifications.

Several eukaryotic expression systems make up for some of the disadvantages that prokaryotic systems present, among which the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* stand out, it is clear that they also present their disadvantages for the production of various proteins. However, *P. pastoris* has positioned itself in recent times, for research work preferentially in the expression of recombinant proteins, due to the facilities it offers, such as the high success rate of an active functional recombinant protein, prolific rapid growth that expresses proteins in a high yield by volume and uses defined media and established handling techniques.

In this thesis, the *P. pastoris* expression system is used for the production of a protease inhibitor of the Kunitz-STI family: M271, which previously in our research group had been characterized for the purpose of determining its structure by X-ray crystallography. However, the main objective of this work was not to evaluate the factors that influence the expression stage of the inhibitor. In order to optimize the amount in the production of M271, in this thesis the effect of the induction time in the cultures and the addition on the methanol concentration was evaluated.

This thesis shows the appropriate conditions for the recombinant production of M271 using the methylotrophic yeast *P. pastoris* to obtain the highest protein yield in total mg, shows that with an induction time of 72 h and a methanol concentration of 2% v / v achieves this objective, in addition, by means of SDS-PAGE analysis, it is shown that the time between purification and the analysis by SDS-PAGE itself is an important factor in interpreting polyacrylamide gels, since the analysis proposed in this work the behavior in the appearance of bands that do not correspond to the molecular mass of M271 is due to oligomerizations due to the waiting time and environmental conditions.

II INTRODUCCIÓN

En la actualidad hay muchos métodos descritos con respecto a la tecnología del DNA recombinante, lo que ha permitido el desarrollo de una gran cantidad de estrategias para lograr mejores sistemas de expresión recombinante de proteínas y con mejores rendimientos. Dichas estrategias deben cumplir con la condición de que se tengan en cuenta, cultivos de crecimiento propios para el microorganismo huésped y cepas modificadas genéticamente que permitan la expresión de proteínas estables semejantes a las nativas en estructura y función. Esto con el fin de realizar estudios en diferentes campos de la biotecnología, siendo uno de ellos la bioquímica estructural.

II.1 Sistemas de expresión heteróloga de proteínas recombinantes.

Se define a las proteínas recombinantes como aquellas proteínas específicas obtenidas por métodos de DNA recombinante en sistemas celulares procariontes o eucariontes, empleando vectores que promueven la expresión de genes clonados. Un sistema de expresión, como se muestra esquemáticamente en la **Fig. 1**, lo conforma un organismo hospedero que contiene los elementos génicos necesarios para realizar los

procesos de transcripción y traducción del gen de interés y un vector de expresión (Schmidt, 2004).

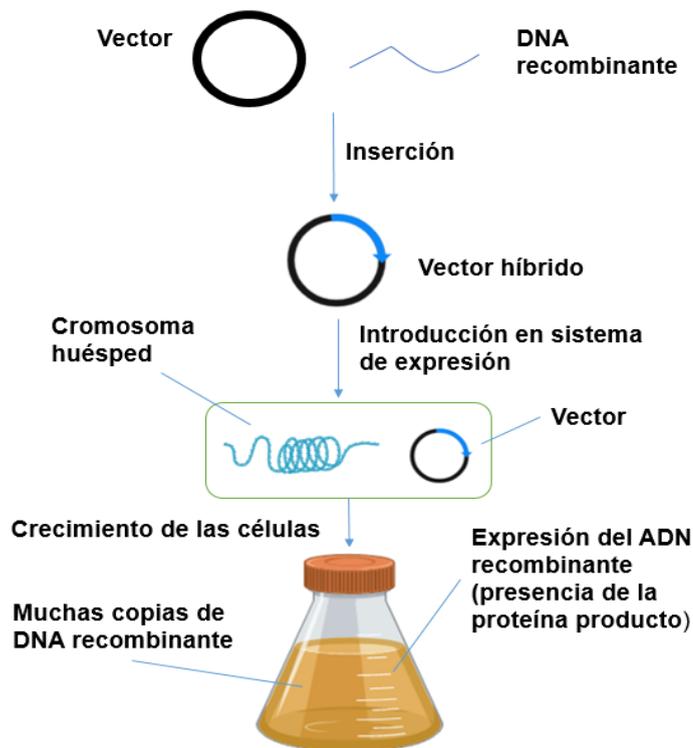


Figura 1. Componentes de un sistema de expresión. Se muestran, los pasos a seguir en la expresión de proteínas con ADN recombinante de la proteína de interés que se incluye en el vector para dar paso a la introducción del mismo en el interior del huésped para utilizar su maquinaria molecular y que pueda secretar el producto al medio, en el caso de un sistema de recombinación eucarionte, en este caso de levadura. Tomado y modificado de (Gómez *et al.*, 2016).

La elección del sistema de expresión óptimo dependerá de diversos factores, incluyendo el origen biológico y las propiedades de la proteína de interés, las características de crecimiento del hospedero, los niveles de expresión, la ubicación de la proteína para su posterior purificación (citoplásmica o secretada), la presencia de modificaciones post-traduccionales y su implicación en la actividad biológica de la proteína, los aspectos regulatorios derivados de su posterior aplicación, así como el costo económico de todo el proceso (Gómez *et al.*, 2016). En la actualidad existe una amplia variedad de sistemas de expresión disponibles para la producción de proteínas

recombinantes, los cuales se dividen en dos categorías generales de acuerdo al tipo de células que se utilizan para expresar la proteína: sistemas procarióticos y sistemas eucarióticos (Schmidt, 2004).

II.2 Sistemas heterólogos procariotas para la expresión de proteínas recombinantes.

Dentro de los sistemas procarióticos, *Escherichia coli* constituye sin lugar a dudas el hospedero más ampliamente utilizado a nivel de laboratorio y uno de los más importantes a escala industrial, dado el vasto conocimiento que se tiene de su fisiología y genética, lo cual facilita enormemente los trabajos de clonación, cultivo y expresión (Gómez *et al.*, 2016; Rosano & Ceccarelli, 2014). Su alta velocidad de crecimiento y rendimiento celular en medios de cultivo poco costosos, unido a la capacidad de expresar elevados niveles de proteínas recombinantes, hacen de esta enterobacteria una auténtica biofábrica. Las cepas de *E. coli* utilizadas para la producción recombinante han sido genéticamente manipuladas seleccionando los genes implicados en los mecanismos de patogenicidad para quitarlos, por lo cual son consideradas hospederos seguros para la fermentación a gran escala (Sørensen & Mortensen, 2005). Además de *E. coli*, han sido empleados con éxito otros hospederos bacterianos para la producción de proteínas recombinantes, incluidos *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces sp*, entre otros (Zerbs *et al.*, 2009).

Los sistemas procarióticos, por lo general son los de elección para la mayoría de los propósitos debido a su manipulación ya estandarizada y bajo costo relativo, aunque en ocasiones presentan serias limitaciones para la producción de proteínas provenientes de organismos eucariontes (Sahdev *et al.*, 2008). Muchas proteínas de origen eucarionte requieren una gran variedad de eventos post-traduccionales tales como la formación de

puentes disulfuro, glicosilaciones, fosforilaciones, entre otras, las cuales son necesarias para su correcto plegamiento, estabilidad y actividad biológica (Walsh *et al.*, 2005).

En hospederos procariotas en general no se llevan a cabo modificaciones post-traduccionales; los puentes disulfuro no se forman debido a que el ambiente intracelular es muy reductor, durante la síntesis no enlazan oligosacáridos a las proteínas ni modifican las tirosinas mediante sulfatación (Hunt, 2005; Demain & Vaishnav, 2009). Por otro lado, en bacterias no es posible la secreción al medio extracelular de grandes cantidades de la proteína expresada por vía recombinante, por tal motivo en presencia de altos niveles de expresión resulta frecuente la formación de agregados insolubles en el citoplasma denominados cuerpos de inclusión los cuales complican los procesos de purificación (Singh & Panda, 2005; Sørensen & Mortensen, 2005).

Las bacterias se dividen en bacterias gram-positivas y gram-negativas, de acuerdo a sus características de la pared celular. Las bacterias gram-positivas (como *Clostridium thermocellum*) utilizan mecanismos de secreción de proteínas, que incluyen el transportador gemelo de arginina (Tat) y las vías de secreción (Sec) que exportan proteínas a través de la membrana citoplasmática (Desvaux *et al.*, 2009; Lambertz *et al.*, 2014). Sin embargo, las bacterias gram-negativas (como *E. coli* y *Zymomonas mobilis*) poseen una membrana externa adicional que restringe el transporte extracelular de proteínas. Por lo tanto, las bacterias gram-negativas utilizan una variedad de vías secretoras para la secreción de proteínas recombinantes, p. ej. la celulasa (**Fig. 2**), lo que contribuye a los desafíos en la producción de la proteína modificada (Jung *et al.*, 2012; Lambertz *et al.*, 2014).

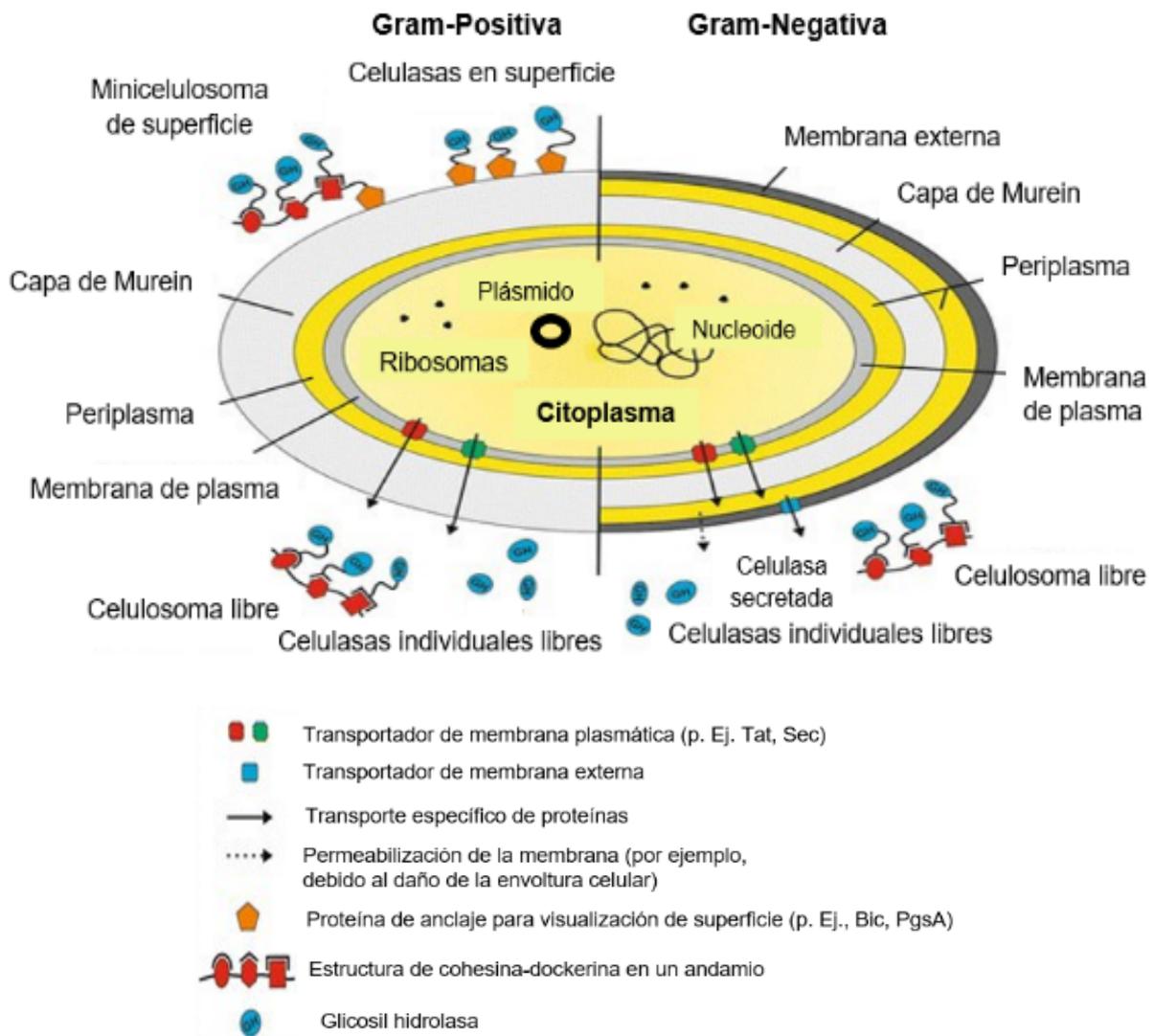


Figura 2. Esquema de una célula bacteriana que muestra un ejemplo de la producción y secreción de una proteína recombinante (celulasa). Las proteínas recombinantes se expresan y almacenan en el citoplasma o se dirigen al periplasma a través de transportadores de proteínas específicas (como las rutas Tat y Sec en celulastas). (*Derecha*) Las bacterias gram-negativas poseen una membrana externa gruesa que restringe el transporte de proteínas extracelulares, por lo tanto, la secreción de proteínas se produce a través de un transportador de proteínas específico o la permeabilización de la membrana (que ocurre, por ejemplo, debido al daño de la envoltura celular). (*Izquierda*) Las bacterias gram-positivas carecen de la membrana externa que conduce a una secreción más eficiente. Las proteínas recombinantes secretadas son libres en solución, ya sea como proteínas individuales o como parte de un complejo, o en ocasiones, se anclan en la superficie celular. En el caso de las celulastas: pueden anclarse a través de una proteína como Blic o PgsA, como celulastas simples o como mini-celulosomas. Modificado de Lambertz *et al.*, 2014.

II.3 Sistemas heterólogos eucariotas para la expresión de proteínas recombinantes.

Aunque muchas proteínas eucarióticas biológicamente activas han sido producidas con éxito en sistemas de expresión procarióticos, en ocasiones serán necesarios sistemas de expresión eucarióticos con vistas a obtener aquellas proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales para su actividad biológica. Entre los sistemas de expresión eucarióticos más frecuentemente usados en la industria destacan las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* y *Kluyveromyces lactis* (Martínez *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016), pero también son empleados baculovirus/células de insecto (Kost *et al.*, 2005), células de mamíferos (Lalonde & Durocher, 2017), protozoos (Niimi, 2012), hongos filamentosos (Gómez *et al.*, 2016) y células de plantas (Ahmad *et al.*, 2010). Para la producción recombinante de proteínas integrales de membrana, cuya expresión usualmente resulta altamente tóxica para los hospederos, se han desarrollado sistemas de expresión libres de células (*cell-free expression*), los cuales emplean la maquinaria metabólica de organismos procariotas o eucariotas (Thoring *et al.*, 2017).

A diferencia de las células procariotas, las células eucariotas se caracterizan por tener un núcleo y una variedad de organelos. Las células están rodeadas por una doble capa de lípidos con una composición variada dependiendo del organismo y su función individual. Las paredes celulares en organismos como la levadura, presentan una organización de tres capas: la membrana plasmática interna está cubierta por una capa transparente de glucanos, que presenta un componente menor de quitina, y una capa externa que consiste principalmente de manoproteínas, que están unidas covalentemente a la capa interna de glucano (Osumi, 1998). De manera similar a las células eucariotas superiores, en la levadura, la secreción de proteínas está dirigida por una secuencia de péptido señal amino-terminal que media la translocación co-traduccional en el retículo endoplásmico (RE), donde se elimina el péptido señal, así los oligosacáridos unidos a N pueden ser adicionados cuando la proteína se transporta

a través de vesículas desde el RE al Golgi, donde se produce una modificación adicional de estas estructuras de glicosilo, a partir de aquí, las proteínas se transfieren a la superficie celular dentro de las vesículas secretoras para su secreción, p. ej. la expresión de la proteína recombinante celulasa (**Fig. 3**) (Jamaluddin & Salleh, 2012; Lambertz *et al.*, 2014).

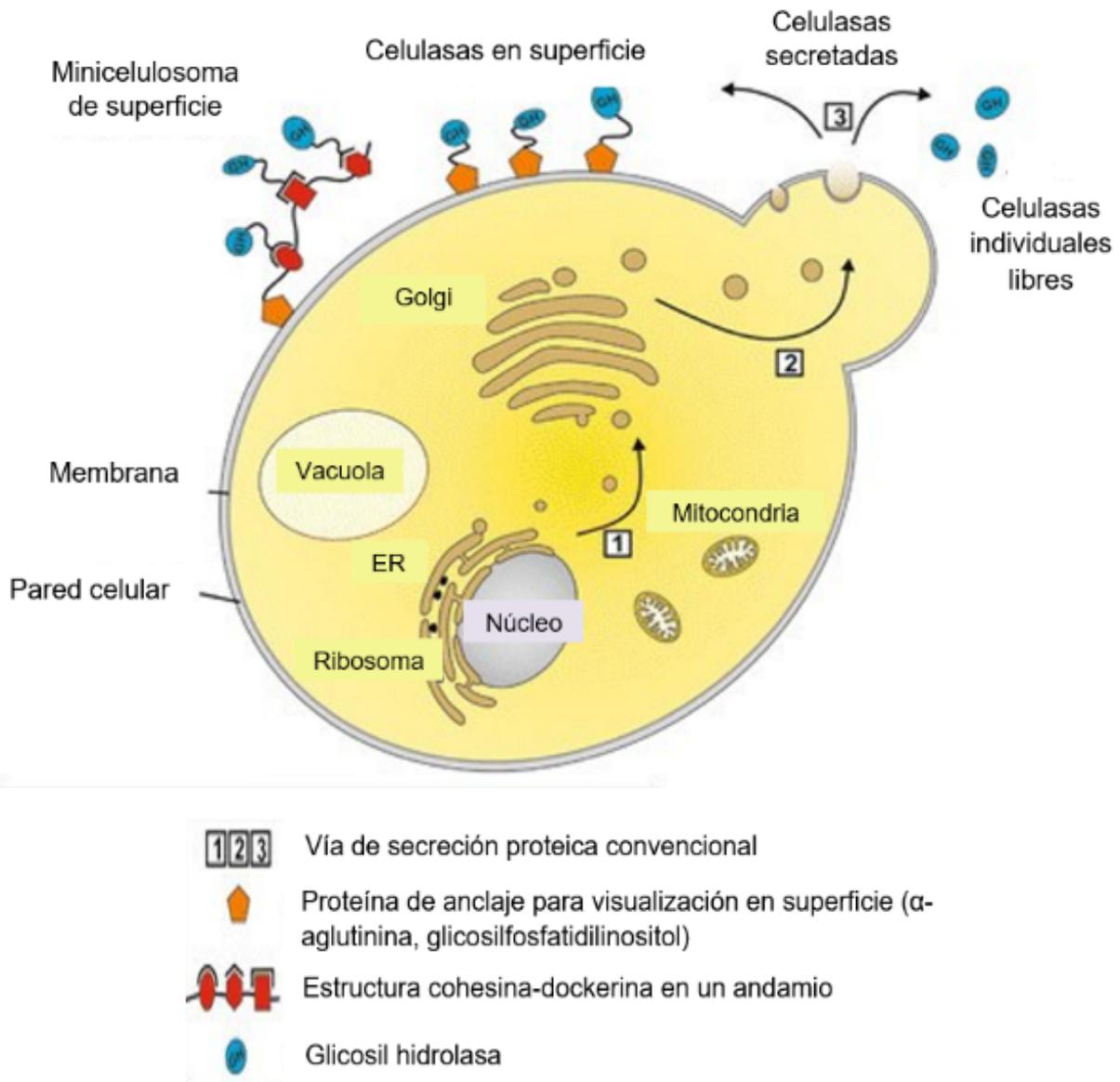


Figura 3. Célula de levadura que muestra los principales compartimentos celulares implicados en la expresión de proteínas recombinantes. Las flechas indican la vía secretora, mediante la cual algunas proteínas recombinantes se expresan en RE (1) y se transfieren a través del aparato de Golgi (2) al medio (3) en vesículas secretoras. Las proteínas recombinantes están libres en solución o se muestran en la superficie a través de una proteína de anclaje (como la aglutinina α), como proteínas individuales o formando complejos, como por ejemplo los mini celulosomas en el caso de las celulasas. Modificado de Lambertz *et al.*, 2014.

II.4 *Escherichia coli*: Ventajas y desventajas como modelo de expresión.

Las ventajas de usar *E. coli* como organismo huésped son bien conocidas. Tiene una cinética de crecimiento rápido sin paralelo, en medios óptimos para el crecimiento y dadas las condiciones ambientales óptimas, su tiempo de duplicación es de aproximadamente 20 minutos (Sezonov *et al.*, 2007). Esto significa que un cultivo inoculado con una dilución 1/100 de un cultivo iniciador saturado puede alcanzar la fase estacionaria en unas pocas horas. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la expresión de una proteína recombinante implica una carga metabólica en el microorganismo, causando una disminución considerable en el tiempo de generación (Bentley *et al.*, 2009). También se logran fácilmente cultivos de alta densidad celular. El límite de densidad teórico de una *E. coli* en cultivo líquido se estima en alrededor de 200 g de peso de células secas / L (Lee, 1996). Sin embargo, el crecimiento exponencial en medios complejos conduce a densidades que no se acercan a ese número. En la configuración de laboratorio más simple (es decir, el cultivo por lotes de *E. coli* a 37 ° C, utilizando medios LB), $<1 \times 10^{10}$ células / ml puede ser el límite superior (Sezonov *et al.*, 2007), que es inferior a 0.1% del límite teórico. Por esta razón, los métodos de cultivo de alta densidad celular se diseñaron para estimular el crecimiento de *E. coli*, incluso cuando se produce una proteína recombinante (Choi *et al.*, 2006). Al ser un organismo ampliamente utilizado, estas estrategias surgieron gracias a la gran cantidad de conocimiento sobre su fisiología, además, se pueden hacer medios ricos complejos a partir de componentes fácilmente disponibles y económicos, la transformación con DNA exógeno está estandarizado y la transformación del plásmido de *E. coli* se puede realizar en un tiempo relativamente rápido (Pope & Kent, 1996).

Sin embargo, el uso de *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes se ha enfrentado a una serie de problemas prácticos. Por ejemplo, *E. coli* no es adecuada para la producción de proteínas con enlaces disulfuro, o bien, para las proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales. Además, la estabilidad de las proteínas

recombinantes producidas en *E. coli* puede ser bajo debido a la degradación proteolítica, y las proteínas sobreexpresadas a menudo se producen en forma de cuerpos de inclusión, que luego requieren procesos de desnaturalización y replegamiento complicados y costosos para que sean funcionales (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004; Carrió & Villaverde, 2002). Además, se sabe que las proteasas producidas al interior del microorganismo tienen la capacidad de destruir las proteínas recombinantes obtenidas. Su empleo para producir proteínas útiles en la industria alimentaria no está permitido, ya que segrega toxinas y es un microorganismo cuyo hábitat original es el intestino grueso en mamíferos superiores por lo que se considera un patógeno moderado, no es un eficiente secretor de proteínas al medio de cultivo y es una fuente potencial de pirógenos (Choi & Lee, 2004). Las células de *E. coli* contienen membranas internas y externas que dividen el organismo en tres compartimentos: el citoplasma, el periplasma y el espacio extracelular. La decisión de dirigir las proteínas recombinantes al espacio citoplasmático, al espacio periplásmico o al medio de cultivo se fundamenta en los argumentos de utilidad final sobre la secreción de proteínas al medio usando *E. coli* (Terpe, 2006).

II.5 *Saccharomyces cerevisiae*: Ventajas y desventajas como modelo de expresión.

La mayoría de las proteínas recombinantes producidas en levaduras se han expresado utilizando *S. cerevisiae* como sistema huésped, debido a la sencillez con la que puede manipularse genéticamente y a la extraordinaria cantidad de información acumulada sobre su biología molecular, fisiología y el conocimiento de la totalidad de su genoma (Goffeau *et al.*, 1996). El rápido auge de *S. cerevisiae* en el campo de la expresión recombinante se justifica por una serie de ventajas, entre las que destacan que es un organismo reconocido como seguro por la FDA de tipo GRAS (*Generally Recognized As Safe*) y por su tradicional uso en la industria alimentaria (Schreuder *et al.*, 1996); esto contrasta con los problemas de *E. coli*, que presenta en su pared materiales

tóxicos de tipo pirogénico o los sistemas celulares de mamífero susceptibles de ser portadores de oncogenes o DNA viral, lo que obliga a que los productos obtenidos en estos sistemas tengan que ser controlados con más exigencia que los producidos en la levadura. También destaca por la facilidad de crecimiento y el bajo coste de los medios de cultivo, lo cual la aproxima a sistemas procariotas del tipo *E. coli*. Por último, al ser un organismo eucariota es capaz de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales más parecidas a los eucariotas superiores, de los que suelen proceder las proteínas que van a ser producidas (Xu *et al.*, 2005). Como microorganismos eucariotas, tienen la capacidad de realizar pasos de procesamiento eucariótico en polipéptidos expresados, tales como procesamiento y modificaciones post-traduccionales como formación de enlaces disulfuro, maduración proteolítica de pro hormonas y glicosilación ligada a N y O que son necesarios para el funcionamiento y la síntesis de muchas proteínas (Watanabe *et al.*, 1996).

A pesar de esto, se han detectado varias limitaciones en el sistema de *S. cerevisiae*. Los ejemplos son el rendimiento del producto, que generalmente es bajo en comparación con otras levaduras como *P. pastoris*, y la secreción posterior, ya que muchas proteínas de *S. cerevisiae* no se encuentran libres en el medio de cultivo, sino que se retienen en el espacio periplásmico o se asocian con la pared celular (Buckholz & Gleeson, 1991; Romanos *et al.*, 1992). Además, las proteínas producidas por *S. cerevisiae* son a menudo hiperglicosiladas y la retención de los productos dentro del espacio periplásmico se observa con una degradación parcial. Estas degradaciones en general, son difíciles de eliminar del producto deseado (Gellissen & Hollenberg, 1997). Las limitaciones de esta especie se han aliviado mediante el desarrollo de sistemas de expresión en otras especies de levadura conocidas como levaduras no *Saccharomyces* o levaduras no convencionales (Spencer *et al.*, 2002).

II.6 *Pichia pastoris*: Ventajas y desventajas como modelo de expresión.

Komagataella (*Pichia*) *pastoris* tiene muchas aplicaciones biotecnológicas, la transferencia de *P. pastoris* al género recientemente descrito *Komagataella*, fue propuesta por Yamada, *et al.*, 1995. El análisis de los dominios D1 / D2 de las secuencias del gen LSU rRNA para todas las levaduras *ascomycetes* conocidas actualmente corrobora la separación de *Komagataella*, *Ogataea* y *Pichia*, y la separación filogenética demostrada a partir de análisis de secuencia de un solo gen fue apoyada por el análisis de la secuencia multigene (Kurtzman, 2011). En consecuencia, *Komagataella*, *Ogataea* y *Pichia* representan géneros separados, circunscritos filogenéticamente.

Komagataella (*Pichia*) *pastoris*, tiene las herramientas necesarias para la adición de O- y N- oligosacáridos a las proteínas secretadas. En cuestión a los N-oligosacáridos, la ventaja de *P. pastoris* sobre *S. cerevisiae* radica en la glicosilación que realiza, ya que ésta es parecida a la que realizan las células humanas. A partir de técnicas para perfiles de oligosacáridos, se ha determinado que las cadenas típicas de proteínas secretadas por *P. pastoris* son Man₈ GlcNAc₂ y Man₉ GlcNAc₂ (GlcNAc₂ ó N-actilglucosamina). Los carbohidratos para las cadenas N-oligosacáridos tienden a ser de ocho residuos de manosa por cada cadena, esto significa que la glicosilación es semejante, por lo menos en tamaño, a los oligosacáridos de eucariontes superiores (Cereghino & Cregg, 2000). Este microorganismo es capaz de generar modificaciones postraduccionales muy similares a las modificaciones que ocurren en las células humanas. Además, en grandes fermentadores, *P. pastoris* crece en medios que contienen una fuente de carbono (glicerol, metanol y etanol), sales, biotina, agua, trazas de elementos y tiene la ventaja de que no secreta una alta cantidad de proteínas endógenas al medio; lo que significa que las proteínas recombinantes que si se secretan son relativamente puras, facilitando su separación (Cereghino *et al.*, 2002). Una de las ventajas en comparación con *S. cerevisiae* es que esta no tiene un promotor fuertemente inducible por metanol, el cual sí tiene *P. pastoris* ya que es una levadura metilotrófica.

P. pastoris tiene como desventajas ejemplos de bajo rendimiento o fallas de expresión. Sin embargo, probablemente el problema más común encontrado es la proteólisis de polipéptidos secretados, aunque se han puesto a disposición varias formas de superarlo (Mattanovich *et al.*, 2009). Otro problema común es la secreción deficiente de proteínas recombinantes complejas, a pesar de que hay muchos ejemplos de rendimientos en el rango de gramos por litro, la secreción recombinante es más exigente que la expresión intracelular y no se garantiza que funcione. Finalmente, la transformación de *Pichia* con algunos genes no producen ninguna proteína detectable, a menudo porque los terminadores transcripcionales de levadura resultan, en algunas ocasiones, en un RNAm truncado (Cereghino *et al.*, 2002).

II.7 Estrategias de optimización de la expresión recombinante.

Una vez elegido el sistema de expresión adecuado, es importante optimizar las condiciones de uso. Para definir estas condiciones óptimas de expresión, se realizan diversos ensayos, los cuales tienen el fin de evaluar el grado de expresión de la proteína recombinante, su solubilidad y estabilidad intracelular con aproximaciones rápidas y sencillas, como la electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Previo a la producción de cultivos de la cepa recombinante es recomendable evaluar diferentes condiciones de expresión, haciendo varias repeticiones de cultivos en pequeños volúmenes, tomando muestras del microorganismo crecido bajo estas condiciones y definiendo la cantidad requerida de la proteína de interés para cada condición de estudio (Brunelle & Green, 2014). La optimización de la expresión recombinante incluirá la definición de una estrategia de expresión, que garantice el máximo rendimiento y estabilidad de la proteína y que facilite en lo posible el posterior proceso de purificación (Jonasson *et al.*, 2002).

II.8 Variación de las condiciones de cultivo.

El medio de cultivo, las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, aireación, entre otras) o el sistema de fermentación, influyen fuertemente en la expresión recombinante. Los cultivos discontinuos o *batch* constituyen la forma más simple y generalizada de producción de proteínas recombinantes en el laboratorio, en ellos los nutrientes son suministrados sólo al inicio del cultivo y existe un limitado control de las condiciones de crecimiento durante el proceso (cultivos no continuos). A medida que se incrementa la densidad celular los nutrientes disminuyen, disminuye la concentración de oxígeno disuelto, se incrementa la concentración de residuos metabólicos secretados al medio y se pueden producir variaciones apreciables de pH que afectan en conjunto a la proliferación celular.

Las densidades celulares y los niveles de producción recombinante bajo estas condiciones de cultivo son moderadas, aunque suficientes para cubrir las necesidades de la mayoría de los trabajos de investigación (Sørensen & Mortensen, 2005). Bajo estas condiciones de fermentación se deberá prestar atención especial a la composición del medio de cultivo, la temperatura y al pH, pues todo lo anterior influirá de manera apreciable, no sólo en los niveles de biomasa sino también en los rendimientos de la proteína recombinante que se desea expresar (Makrides, 1996).

III ANTECEDENTES

III.1 *Pichia pastoris* en la expresión de proteínas recombinantes.

Como se mencionó anteriormente, *Pichia pastoris* puede crecer a partir de una fuente de carbono el cual normalmente es glicerol, sin embargo, también se utiliza metanol para inducir la expresión de la proteína recombinante. El primer paso metabólico en la utilización del metanol es su oxidación a formaldehído y peróxido de

hidrógeno. Este paso es catalizado por la enzima alcohol oxidasa, que en *Pichia* tiene dos versiones codificadas por los genes *AOX1* y *AOX2*. Estos sitios de clonación múltiple son empleados para insertar, en al menos uno de ellos, un plásmido de levadura por homología o por entrecruzamiento, por ejemplo, el pPICZ, que además contiene el gen recombinante que se desea expresar en *Pichia* (Fig. 4). Este plásmido contiene además al gen *AOX1*, que da lugar a la alcohol oxidasa mencionada arriba, adicionalmente, contiene un marcador de selección: el gen de histidina deshidrogenasa (*HIS4*), y la señal de secreción, factor α -MF de *S. cerevisiae*, los cuales en conjunto facilitan la expresión recombinante de la proteína de interés (Cereghino & Cregg, 2000; Cereghino *et al.*, 2002; Hollenberg & Gellissen, 1997).

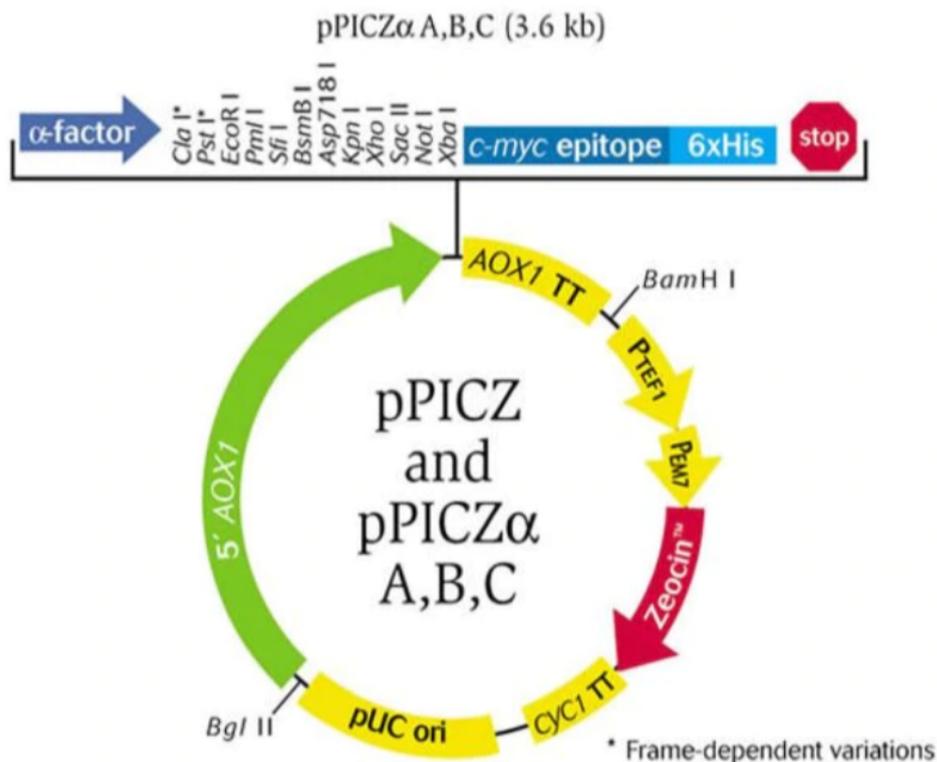


Figura 4. El vector pPICZ α . Es utilizado en levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris* para producir proteínas de interés por método de expresión recombinante, en este vector se encuentran el gen de *AOX1*, el cual contiene al gen que codifica la proteína de interés, un marcador de selección: el gen de histidina deshidrogenasa (*HIS4*) que favorece posteriormente la etapa de purificación de la proteína al medio de cultivo, y la señal de secreción, factor α -MF de *S. cerevisiae*

Como se dijo anteriormente, dentro del genoma de *P. pastoris* se encuentran dos genes que codifican para dos alcohol oxidasas que se describen como *AOX1* y *AOX2* y que son empleadas para insertar plásmidos en uno o ambos sitios. Gracias a esto es posible obtener por recombinación cepas con distintos fenotipos: MUT +, con rápido crecimiento usando metanol; MUTs, con crecimiento lento usando metanol y MUT- que no crecen en metanol. Es así que no se detecta a la alcohol oxidasa en la célula cuando la levadura crece en glucosa, glicerol o etanol, (Hélène *et al.*, 2001; Chauhan *et al.*, 1999; Chiruvolu *et al.*, 1997; Cereghino & Cregg, 2000; Cereghino *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando la levadura crece en metanol, esta enzima llega a ser el 35% del total de la proteína celular. El control de la cantidad de alcohol oxidasa es, en gran parte transcripcional, ya que ningún RNAm de los dos genes es detectable cuando la levadura crece en glicerol (Cereghino & Cregg, 2000). Excepto por la cantidad de RNAm presente, el cual es mucho más alto para *AOX1* que para *AOX2*, los dos genes parecen estar regulados de manera similar. La producción de proteínas recombinantes puede ser reprimida hasta cuando el cultivo esté saturado de células, y la producción de la proteína recombinante pueda iniciarse con la inducción del gen *AOX1* con metanol (Cereghino *et al.*, 2002).

III.2 Estrategias de fermentación para la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*.

Pichia (Komagataella) pastoris es conocida por el crecimiento óptimo que se obtiene al realizar cultivos tanto en medios líquidos como sólidos y con una amplia gama de fuentes de carbono. El tiempo de duplicación es dependiente de la fuente de carbono utilizada: en glucosa es 90 minutos y, aproximadamente, 6 horas en metanol (Wolf, 1996). La productividad de *P. pastoris* en matraces agitados es típicamente más baja y mejora bastante en cultivos efectuados en fermentador. La primera razón de este comportamiento se fundamenta en que sólo en el ambiente controlado de un

fermentador, es posible producir el microorganismo a altas densidades celulares. La segunda razón se soporta en que el nivel de transcripción iniciada por el promotor de *AOX1* es superior en células de *P. pastoris* alimentadas con metanol, a velocidades de crecimiento tales que el cultivo se desarrolle en condiciones controladas de alimentación (Wagner *et al.*, 1997; Crowley *et al.*, 2000; Almuzara *et al.*, 2002). El crecimiento a bajos pH, los cuales reducen el riesgo de contaminación microbiana, es considerado una de las ventajas de esta levadura para la producción de proteína celular, si bien, en estas condiciones, existe el riesgo de proteólisis del producto.

P. pastoris crece bien en un amplio rango de pH, desde 3 hasta 7, con un mínimo efecto sobre la velocidad de proliferación celular. Sin embargo, también se ha demostrado un efecto negativo sobre las proteínas recombinantes secretadas, en algunos valores de pH, debido a la expresión y actividad de ciertas proteasas en el caldo de fermentación (Cereghino & Cregg, 2000; Inan *et al.*, 1999; Files *et al.*, 2001).

Se han hecho estudios acerca de los efectos de la temperatura en la expresión de proteínas recombinantes, por ejemplo, la temperatura óptima para la producción de un péptido anticoagulante está entre 26 y 30°C (Inan *et al.*, 1999). Altas concentraciones de glicerol inhiben la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, disminuyendo su productividad o la actividad de estas (Hélène *et al.*, 2001; Files *et al.*, 2001). Por tanto, es muy importante evaluar las estrategias metodológicas para la fermentación de cada proteína a ser expresada. La fermentación en matraces agitados se emplea por lo general en medios mínimos o definidos, llevándose a cabo en dos fases. La primera fase consiste en cultivar al organismo en presencia de glucosa o glicerol con temperatura y agitación controladas. La segunda corresponde a la inducción de la *AOX1* y la producción de la proteína recombinante. El segundo modo de fermentación se puede efectuar en forma continua en un quimiostato, así como en lote o lote alimentado (Lange *et al.*, 2001; Kobayashi *et al.*, 2000; Sreekrishna *et al.*, 1989; Clare *et al.*, 1991; Chauhan *et al.*, 1999; Cereghino & Cregg, 2000).

Una vez expuestas las estrategias de fermentación, es de suma importancia mencionar el papel de *Solanum tuberosum* como objeto de estudio a partir de la cual se obtuvo la proteína M271 analizada en esta tesis.

III.3 La importancia de *Solanum tuberosum*.

La papa y sus parientes silvestres *Solanum* L. sect. *Petota* Dumort. se distribuyen a lo largo del continente americano, desde el suroeste de Estados Unidos hasta Chile, Argentina y Uruguay (Spooner & Hijmans, 2001). Actualmente, la papa cultivada es conocida colectivamente bajo el nombre de *S. tuberosum* L., posee una reserva genética amplia y engloba a más de 190 especies silvestres que forman tubérculos (Andre *et al.*, 2007). La papa es el único grupo de *Solanáceas* que posee poliploides, aproximadamente 70% de las especies son diploides, la mayoría de los restantes son tetraploides ($2n = 6x = 72$), con un número reducido de triploides y pentaploides (Hijmans *et al.*, 2007; Spooner *et al.*, 2008). La papa continúa siendo objeto de intensa colección e investigación taxonómica, con el fin de determinar un número real de especies, debido principalmente a que gran parte de estas se relacionan entre sí. Los límites entre diferentes series son menores y aparentemente artificiales, razón por la cual muchas especies son morfológicamente similares y usualmente se distinguen por diferencias menores como la pubescencia o la forma de la hoja. La hibridación ha contribuido en la formación de muchas especies tanto a nivel diploide como poliploide. La introgresión e hibridación interespecífica han sido sugeridas como algunas de las causas que dificultan la taxonomía en la sección *Petota*, debido a que la hibridación interespecífica natural es común para muchas especies de la sección *Petota* (Spooner, 2013).

III.4 El inhibidor de proteasas de la familia Kunitz-type STI: M271.

Los inhibidores de proteasas han sido ampliamente estudiados en plantas por su relación con la resistencia contra invertebrados (insectos, nematodos, etc.). En plantas, están generalmente concentrados en tejidos de almacenamiento, como semillas y tubérculos, particularmente en las gramíneas, leguminosas y solanáceas. El papel de los inhibidores en la regulación de las actividades proteolíticas es muy importante por la protección que proporcionan a tejidos y fluidos de la degradación no deseada. Los inhibidores de tripsina de la familia Kunitz están presentes en un amplio rango de especies de leguminosas, el mejor caracterizado es el de soya (SBTI). El inhibidor de soya tiene una masa molecular aproximada de 21000 Da, con un solo sitio reactivo para tripsina. Inhibidores menos relacionados, han sido identificados en papa (inhibidor de catepsina D) y cereales, éstos últimos son proteínas bifuncionales que también inhiben las α -amilasas endógenas. Los mismos contienen cuatro residuos de cisteína que forman dos puentes disulfuro y un sitio reactivo único (Richardson, 1991; Ritonja, *et al*, 1990).

La proteína M271, expresada en *Solanum tuberosum*, pertenece a la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz-STI, su estructura tridimensional fue determinada por nuestro grupo y se encuentra en el PDB con el código 6W76 (Campuzano, 2019), presenta un porcentaje de identidad de secuencia del 87.3% y una similitud del 94.7% respectivamente con el inhibidor de proteasa tipo Kunitz-STI E3Ad, también determinado estructuralmente por nuestro grupo (Guerra, 2016). La proteína M271 también presenta un porcentaje de identidad de secuencia del 44% y una similitud del 72.2% respectivamente con el inhibidor de la catepsina D, también llamado PDI (Guo *et al*, 2015) (Fig. 5).

Campuzano en 2019 describe el proceso de optimización mediante la modificación en el tiempo de expresión de 72 h a 120 h, utilizando concentraciones finales de metanol 1% v/v y 2% v/v para inducir la expresión del inhibidor de proteasas

M271. Reporta de igual forma que obtuvo una cantidad total de 4.5 mg de proteína pura, en cultivos con volumen de 300 mL.

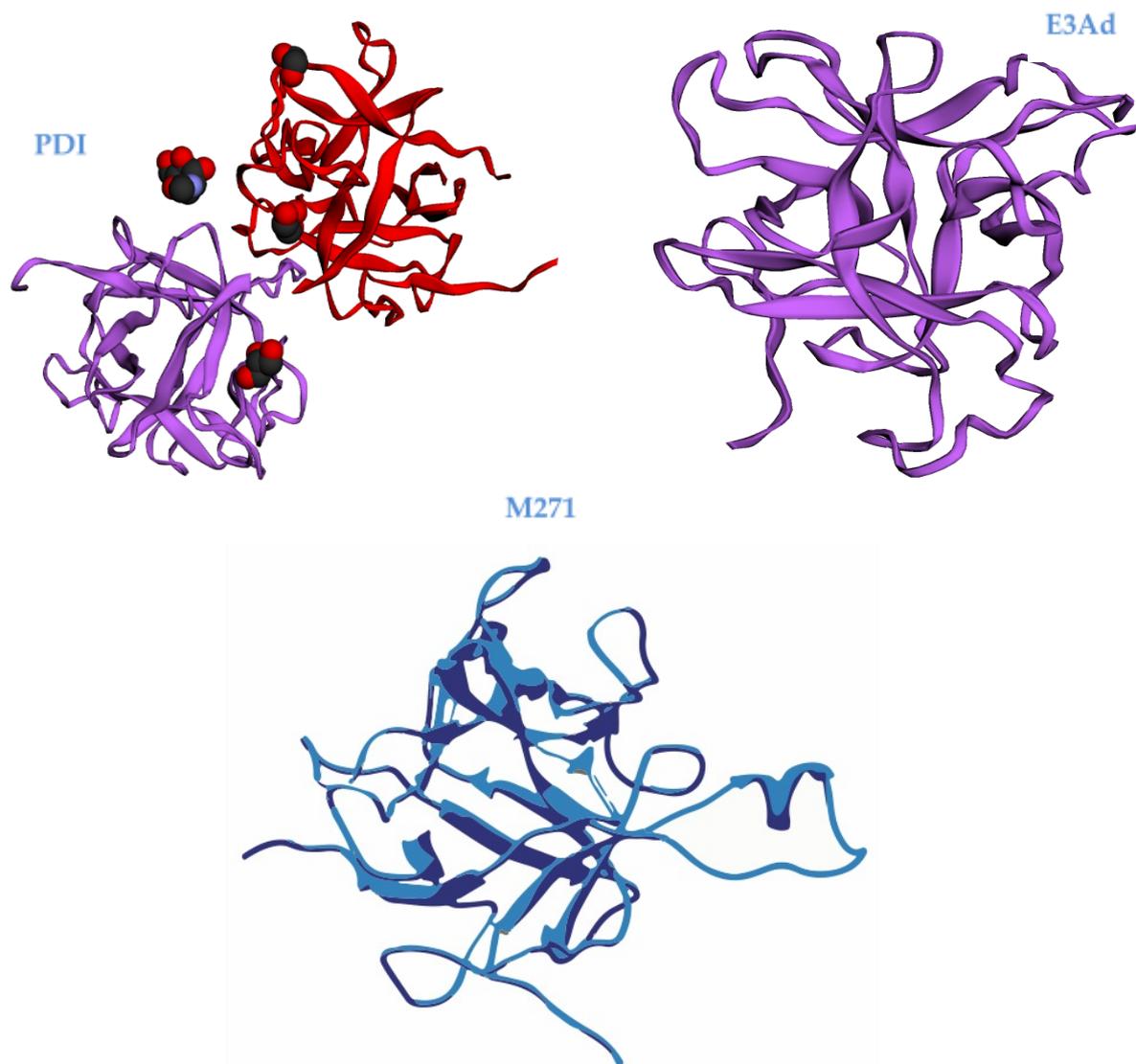


Figura 5. Estructura tridimensional de tres inhibidores de proteasas de la familia Kunitz STI, obtenidas por la técnica de difracción de rayos X. En la figura se muestra el dímico cristalográfico de la proteína PDI diferenciados por el color morado y el rojo, junto con sus metales en el sitio catalítico, el cual es una glicoproteína de 188 aminoácidos que puede inhibir tanto la proteasa aspártica de catepsina D como la serina proteasa tripsina. El monómero del inhibidor M271 se muestra resaltando en rojo, el asa L9 propuesta como el sitio de unión a las proteasas de tipo aspártico. El monómero del inhibidor bifuncional E3Ad se muestra en color morado. Tomado y modificado de Guo, *et al.*, 2015; Guerra, *et al.*, 2016 y Campuzano, 2019.

III.5 Purificación y análisis SDS-PAGE del inhibidor M271

Cabe destacar un aspecto muy importante que se encuentra reportado en el trabajo de Campuzano, 2019: él menciona que en el proceso de purificación de M271, aparecen cuatro bandas principales en el análisis por SDS-PAGE, siendo la primera la que correspondería a la masa molecular del inhibidor M271 que es de 21 kDa, propone que la segunda y la tercera banda, que se encuentran inmediatamente arriba y debajo de la banda correspondiente a la masa molecular de M271, son en realidad variantes glicosiladas que rondan entre los 23 kDa y 27 kDa, por último, que una cuarta banda corresponde a un producto de proteólisis de M271 con un peso molecular de 17 kDa (**Fig. 6**). Este antecedente fue considerado en el diseño de esta tesis como se muestra más adelante.

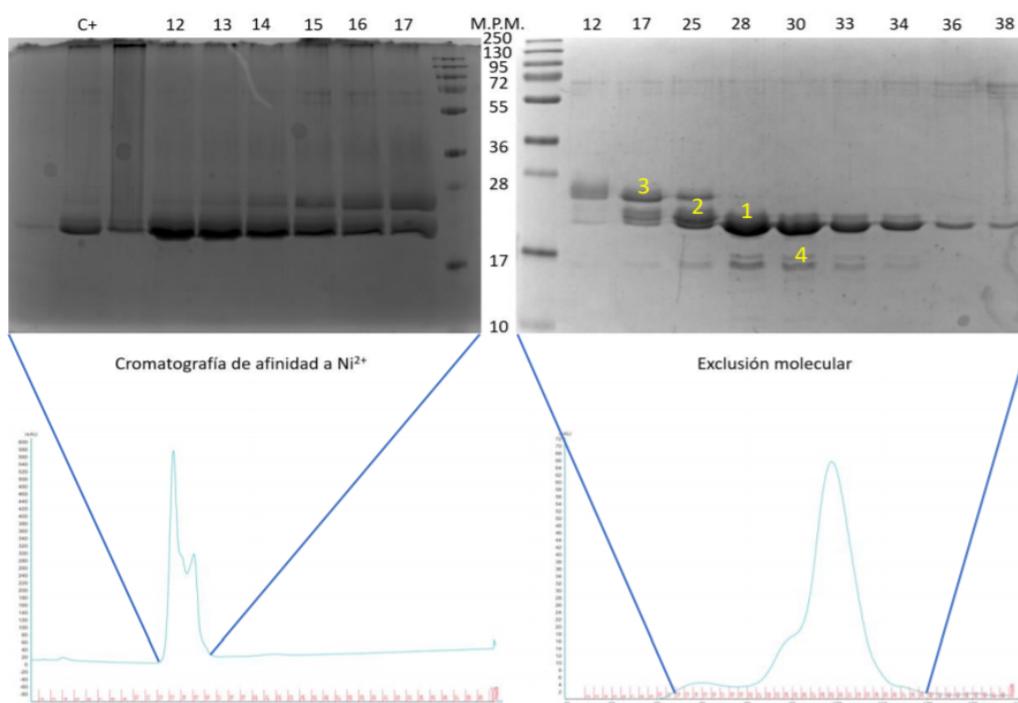


Figura 6. Análisis de SDS-PAGE de los perfiles de elución de la cromatografía de afinidad a níquel y la exclusión molecular de M271. En la figura se destacan las bandas que Campuzano propuso que corresponden a la masa molecular del inhibidor M271 (1), una variante glicosilada de M271 (2), una segunda variante glicosilada de M271 (3), y el efecto de la proteólisis celular sobre M271 (4). Tomado y modificado de Campuzano, 2019.

IV JUSTIFICACIÓN

Trabajos previos en nuestro laboratorio utilizaron *Pichia pastoris* para la expresión de la proteína M271 (Campuzano, 2019), para así determinar su estructura tridimensional por difracción de rayos X. En el presente trabajo se evaluó el efecto en la expresión de M271, modificando la adición de metanol y los tiempos de cultivo, y partiendo de las técnicas de expresión y purificación utilizadas por Guo, 2015; Guerra, 2016 y Campuzano, 2019, con el fin de mejorar la expresión y la homogeneidad de la proteína M271, con miras para utilizar más frecuentemente, en nuestro grupo de investigación, al sistema de *Pichia pastoris* en diversos proyectos donde la expresión de proteínas recombinantes en altas cantidades y con alta homogeneidad son fundamentales.

V HIPÓTESIS

La modificación de los tiempos de incubación del cultivo (desde las 24 horas hasta las 120 horas) y de las concentraciones de metanol de 1% v/v y de 2% v/v en cultivos de 100 ml, para producir la proteína M271 en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, aumentarán la cantidad y homogeneidad de esta proteína recombinante.

VI OBJETIVOS

VI.1 Objetivo General

Evaluar el efecto que tiene el tiempo de cultivo y la concentración de metanol en la fase de expresión de la proteína M271 utilizando el sistema recombinante de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

VI.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la expresión de M271 en cultivos crecidos en matraz desde 24 hasta 120 horas.

2. Evaluar el efecto de modificar la concentración de metanol durante la expresión de M271 (1% v/v y 2% v/v).
3. Purificar y cuantificar la cantidad total de M271 a partir de los cultivos producidos en los dos objetivos específicos anteriores.
4. Analizar la homogeneidad de M272 purificada a partir de los cultivos en las diferentes condiciones de expresión.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Precultivo para la expresión de M271.

Para introducir el precultivo de la expresión de M271, se explica la obtención de la cepa de *P. pastoris* empleada en esta tesis. Brevemente, el Dr. Yasel Guerra, aisló ADN genómico de *Solanum tuberosum* (papa) mediante el método CTAB de plantas (ABgene). Se usaron cebadores diseñados en base a la secuencia inhibidora API-8 (Strukelj *et al.*, 1992) para amplificar las secuencias inhibidoras y clonarlas en el vector pGEMT (Promega) y se secuenciaron los clones positivos. Entre las secuencias obtenidas, el clon M271, que no contiene intrones y se empareja con las entradas del GenBank XP_006362668.1 y XM_006362606.2, fue seleccionado para la expresión de proteínas y reamplificado para introducir sitios de restricción para XhoI y Sac II, para la subclonación en el vector pPICZaC, en marco con la señal de secreción del factor α . La construcción de plásmido se linealizó con la enzima de restricción Sac I y se transformó en la levadura *Pichia pastoris* (cepa GS115) utilizando el Pichia EasyComp Kit (Life Sciences). Los clones positivos se comprobaron mediante PCR de colonias con cebadores 50 AOX1 y 30AOX1 (Guerra, 2016).

El inóculo para la expresión de la proteína M271 en *Pichia pastoris* se realizó en matraces bafleados con 100 mL de medio BMGY (peptona 2%, extracto de levadura 1%,

fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.0, base nitrogenada de levadura 1.34%, biotina 40 μ M y glicerol 1%) y se incubó a 30 °C y 200 rpm por 24 horas. Posteriormente se realizó el lavado en un ambiente estéril (campana de flujo laminar) con medio BMMY (peptona 2%, extracto de levadura 1%, fosfato de potasio 0.1 M, pH 6.0, base nitrogenada de levadura 1.34%, biotina 40 μ M y metanol 1%, este último se modificó en distintas concentraciones). Se hicieron dos ciclos de centrifugación del cultivo pasadas las 24 horas para separar la biomasa del medio BMMY y quitar el exceso de glicerol antes de la fase de expresión. Se centrifugó a 4000 g por 15 minutos a 20 °C, primero el cultivo con BMMY y segundo el pellet recuperado del primer ciclo con 15 mL de la solución extracto de levadura y peptona (YP). Una vez terminado el lavado se utilizó el vórtex para resuspender con el medio BMMY y se incubó a 30 °C y 200 rpm. Este paso se realizó para todos los cultivos que se tomaron en cuenta en las combinaciones de tiempo de incubación del cultivo cada 24 horas, desde el tiempo 0 horas hasta las 120 horas y adición de la concentración de metanol del 1% v/v y 2% v/v.

VII.2 Expresión de la proteína M271.

Las combinaciones entre el tiempo de cultivo y concentración de metanol formaron una matriz de 35 experimentos (ver tabla A y B) y se realizaron por triplicado. En cada una de las expresiones de M271 cada vez que en el cultivo respectivo concluyó el tiempo de incubación en la expresión de la proteína M271, se realizó una etapa de centrifugación para separar la biomasa a 4000 g durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se ajustó la concentración del *buffer* de fosfatos de 0.1 M a 0.05 M. Terminado este paso se equilibró la solución con 200 mM de NaCl y 40 mM de Imidazol, posteriormente se dejó toda la noche entre 18- 20 °C, para precipitar las impurezas.

VII.3 Purificación de la proteína M271.

La purificación de los cultivos correspondientes en las combinaciones probadas en esta tesis (tiempo de cultivo y adición de concentración de metanol v/v), comenzó con la centrifugación del medio de la expresión a 10000 g's a 20 °C por 15 minutos. Se desechó el precipitado y se recuperó el sobrenadante, posteriormente se pasó por filtros con tamaño de poro de 0.45 µm y la solución filtrada se desgasificó. Se pasó el sobrenadante por una columna de afinidad a níquel, previamente equilibrada con un *buffer* de Imidazol 0.04 M correspondiente a las propiedades del sobrenadante, y se realizó un gradiente de elución que va de 0 a 100% de concentración de Imidazol 0.04 M hasta 0.5 M para separar la proteína M271 de la matriz y se recuperaron fracciones de 2 mL para ser analizadas por SDS-PAGE. El análisis SDS-PAGE se realizó al 12% a partir de las fracciones eluidas de la columna de afinidad a níquel (utilizando un equipo de purificación *BioLogic*), para evaluar la pureza de la proteína y su grado de homogeneidad en el que se encuentra.

VII.4 Concentración de la proteína M271.

Una vez localizadas las muestras que contenían la proteína M271, éstas se concentraron en un tubo Amicon con filtro de 10 kDa en ciclos de la centrífuga a 3000 g a 18 °C por 40 minutos hasta obtener 500 µL, midiendo la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro y manteniendo la temperatura a 4 °C.

VII.5 Análisis de los datos.

Los datos obtenidos se compararon con los trabajos realizados por Guo en 2015, Guerra en 2016 y Campuzano en 2019. Se realizó el análisis estadístico descriptivo para obtener el promedio de la cantidad en mg totales de la proteína M271 obtenida en cada cultivo, así como la desviación estándar de este valor para conocer la variación en cada

determinación de dicha cantidad y una gráfica representativa de su comportamiento utilizando la herramienta GraphPAD 8.

VIII RESULTADOS

VIII.1 Expresión y purificación de M271.

La optimización en la expresión de la proteína M271 en *Pichia pastoris* se realizó con las modificaciones en el tiempo de cultivo desde las 24 horas hasta las 120 horas (en intervalos aditivos de 24 horas cada uno) y en la adición de una concentración final de metanol de 1% v/v y de 2% v/v. Para el proceso de la purificación se utilizó una columna de afinidad a níquel HisTrap™ HP de 5 mL, debido a que la proteína recombinante producida cuenta con una etiqueta de histidinas (Campuzano, 2019). El análisis de SDS-PAGE se preparó con una concentración de poliacrilamida de 12% para la visualización de la proteína M271 en cada una de las combinaciones de la optimización en la expresión de la misma (**Figs. 7, 8**).

PERFILES DE ELUCIÓN CON 1% METANOL V/V

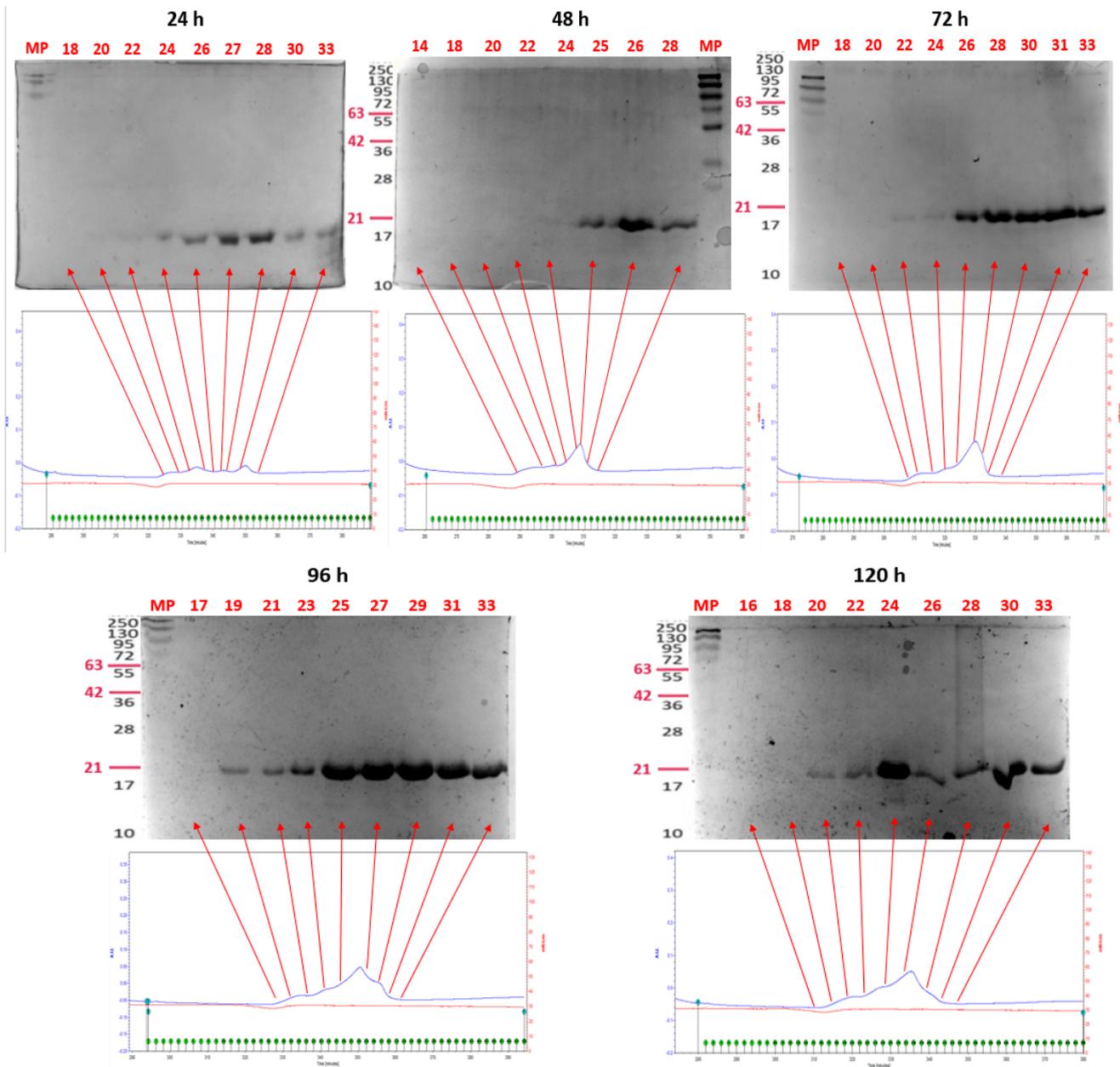


Figura 7. Perfiles de elución y análisis SDS-PAGE de la cromatografía de afinidad a níquel de la expresión de M271 desde las 24 h hasta las 120 h con una concentración final de metanol 1% v/v. Los carriles corresponden a las fracción eluidas. MP corresponde al marcador de peso molecular Thermo Scientific™.

PERFILES DE ELUCIÓN CON 2% METANOL V/V

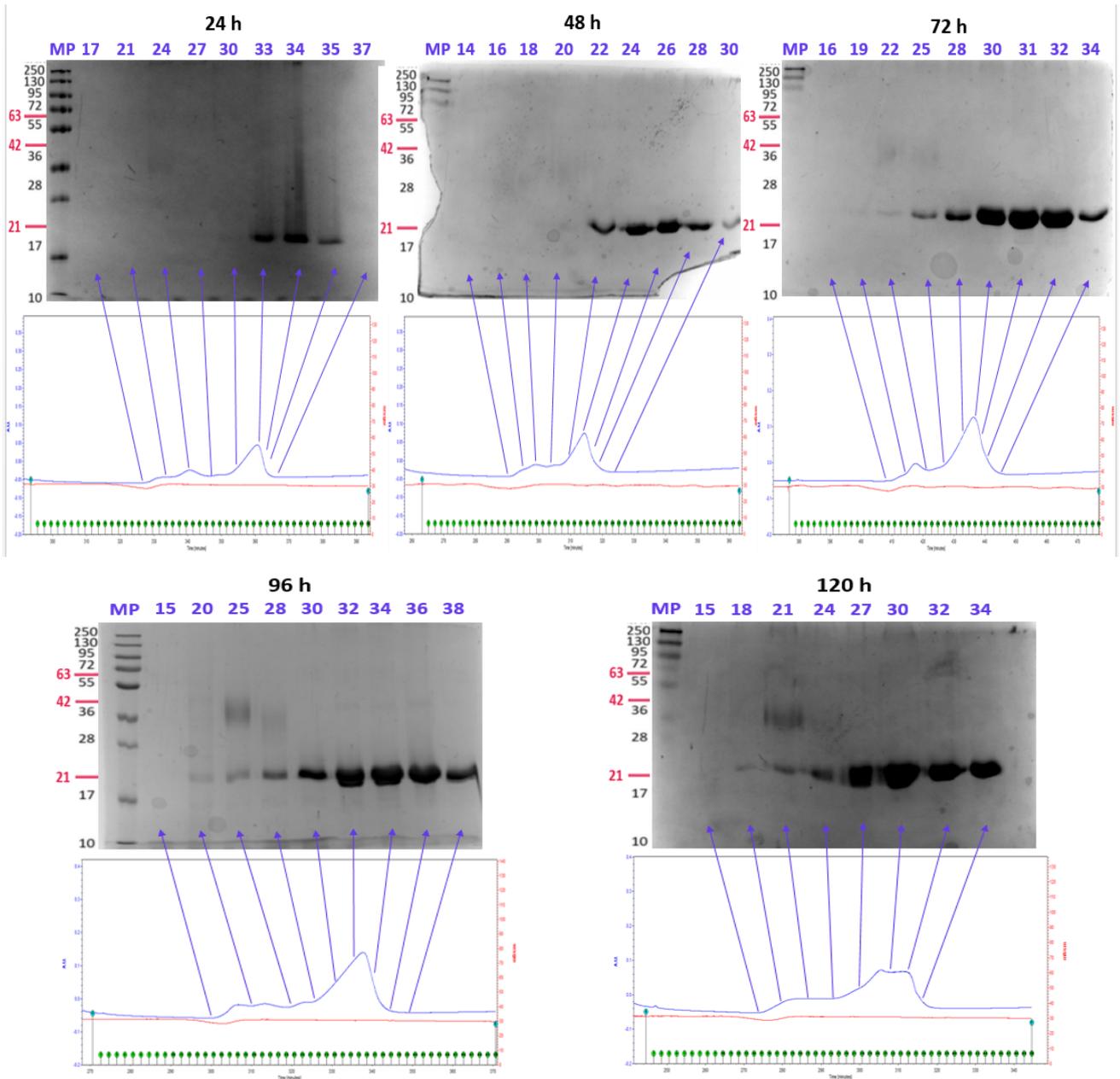


Figura 8. Perfiles de elución y análisis SDS-PAGE de la cromatografía de afinidad a níquel de la expresión de M271 desde las 24 h hasta las 120 h con una concentración final de metanol 2% v/v. Los carriles corresponden a las fracción eluidas. MP corresponde al marcador de peso molecular Thermo Scientific™.

VIII.2 Efecto en el tiempo de espera entre la purificación y el análisis por SDS-PAGE.

Tal como se había visto en el trabajo de Campuzano, 2019, en este trabajo se observaron de igual forma bandas que varían entre 23 kDa y 63 kDa, las cuales no corresponden a la masa molecular del inhibidor M271 que es de 21 kDa. Sin embargo, un factor importante, producto del análisis de los resultados de esta tesis, mostró que la causa de la aparición de estas bandas, fue el periodo de espera desde que finaliza el proceso de purificación y el análisis por SDS-PAGE. Si bien, Campuzano en 2019 sugirió que estas bandas podrían ser consecuencia de procesos de glicosilación (como se menciona en los antecedentes de este trabajo), varios de los geles descritos en esa tesis, fueron realizados 24 horas posteriores a la purificación. Adicionalmente, como se pueden ver en las figuras 7 y 8 de esta tesis, las bandas de 21 kDa mencionadas por Campuzano no aparecen en los análisis por SDS-PAGE, siendo una diferencia fundamental el que los SDS-PAGE descritos en las figuras mencionadas se realizaron inmediatamente después de concluir el proceso de purificación de M271. Con el fin de esclarecer el efecto del tiempo posterior a la purificación y previo a los análisis por SDS-PAGE, en la **Fig. 9** se presentan algunos ejemplos representativos del efecto del tiempo, que es observable tanto en los experimentos de este trabajo con la concentración de metanol de 1% v/v, como los de 2% v/v, a los diferentes tiempos de cultivo en los que se expresó la proteína M271.

PERFILES DE ELUCIÓN CON EL EFECTO DEL TIEMPO

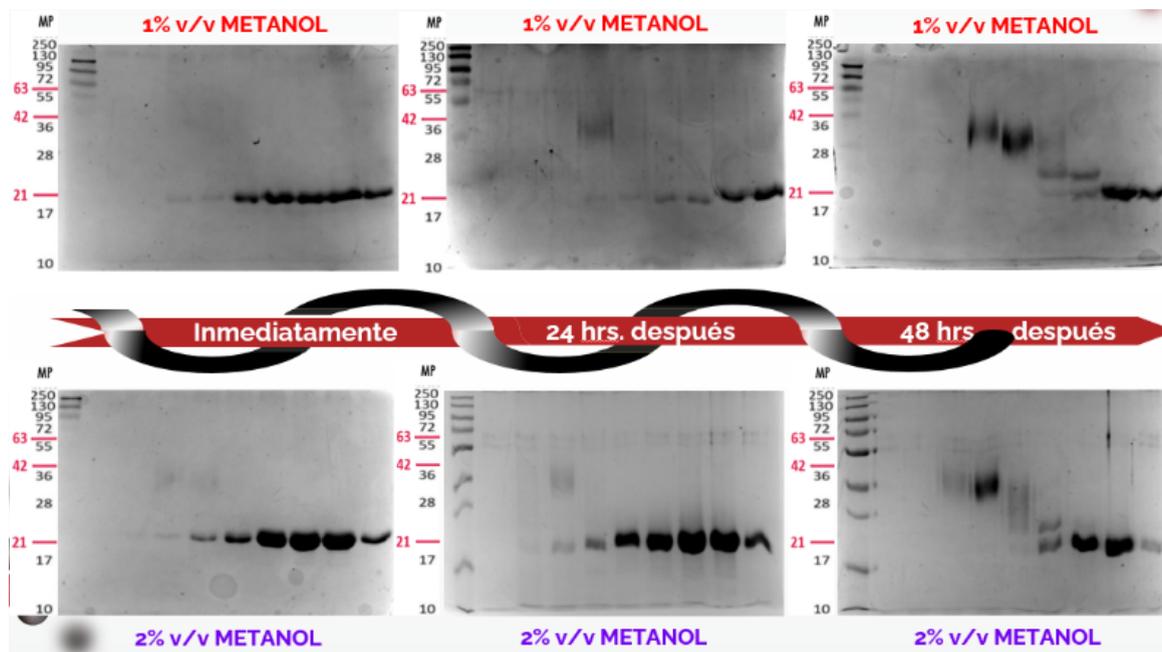


Figura 9. Ejemplos representativos del efecto que se observa en los análisis por SDS-PAGE cuando se toma como parámetros hacer el gel de poliacrilamida de forma inmediata después de la purificación y pasadas las 24 horas hasta las 48 horas con la concentración de metanol tanto de 1% v/v y de 2% v/v en los diferentes tiempos de cultivo que se dejó expresar la proteína M271.

VIII.3 Producción de la proteína M271.

Las concentraciones finales de proteína obtenidas en cada una de las pruebas de expresión, con su respectiva combinación entre el tiempo de cultivo y la adición de una concentración final de metanol de 1% v/v y 2% v/v, arrojó una matriz de datos que muestran los mg totales de M271 producidos en cada combinación. Como control negativo se toma en cuenta el tiempo a 0 horas en la expresión de la proteína (*Tabla A*, *Tabla B*).

TABLA A

N° PRUEBA	TIEMPO DE CULTIVO	VOLUMEN μ l	M271 mg/ml	M271 mg TOTALES
1	0 h	500	0.00	0.00
2	0 h	300	0.00	0.00
1	24 h	400	3.10	1.24
2	24 h	400	2.56	1.02
3	24 h	300	2.89	0.86
1	48 h	500	3.14	1.57
2	48 h	400	4.66	1.86
1	72 h	400	2.93	1.17
2	72 h	300	3.36	1.00
3	72 h	400	3.05	1.22
1	96 h	300	3.25	0.97
2	96 h	400	3.23	1.29
3	96 h	300	2.94	0.88
1	120 h	500	1.64	0.82
2	120 h	400	2.58	1.03
3	120 h	400	1.42	0.56

TABLA B

N° PRUEBA	TIEMPO DE CULTIVO	VOLUMEN μ l	M271 mg/ml	M271 mg TOTALES
1	0 h	300	0.00	0.00
2	0 h	500	0.00	0.00
1	24 h	400	3.95	1.58
2	24 h	400	2.52	1.00
3	24 h	500	2.55	1.27
1	48 h	500	5.53	2.76
2	48 h	400	4.07	1.62
3	48 h	500	3.46	1.73
1	72 h	500	7.77	3.88
2	72 h	500	8.02	4.01
3	72 h	500	7.01	3.50
1	96 h	500	5.41	2.70
2	96 h	500	4.51	2.25
1	120 h	400	3.60	1.44
2	120 h	500	3.94	1.97
3	120 h	500	4.47	2.23

Tablas A y B. En estas tablas se muestra la cantidad de proteína total obtenida a partir de las diferentes condiciones de expresión probadas en esta tesis: tiempo de cultivo y concentración de metanol. Tabla A muestra los resultados a los diferentes tiempos de expresión con 1% de metanol. Tabla B muestra los resultados a los diferentes tiempos de expresión con 2% de metanol. Nótese que en cada tabla en el control negativo a las 0 horas no hay proteína producida.

VIII.4 Análisis estadístico de la cantidad de proteína total de la proteína M271.

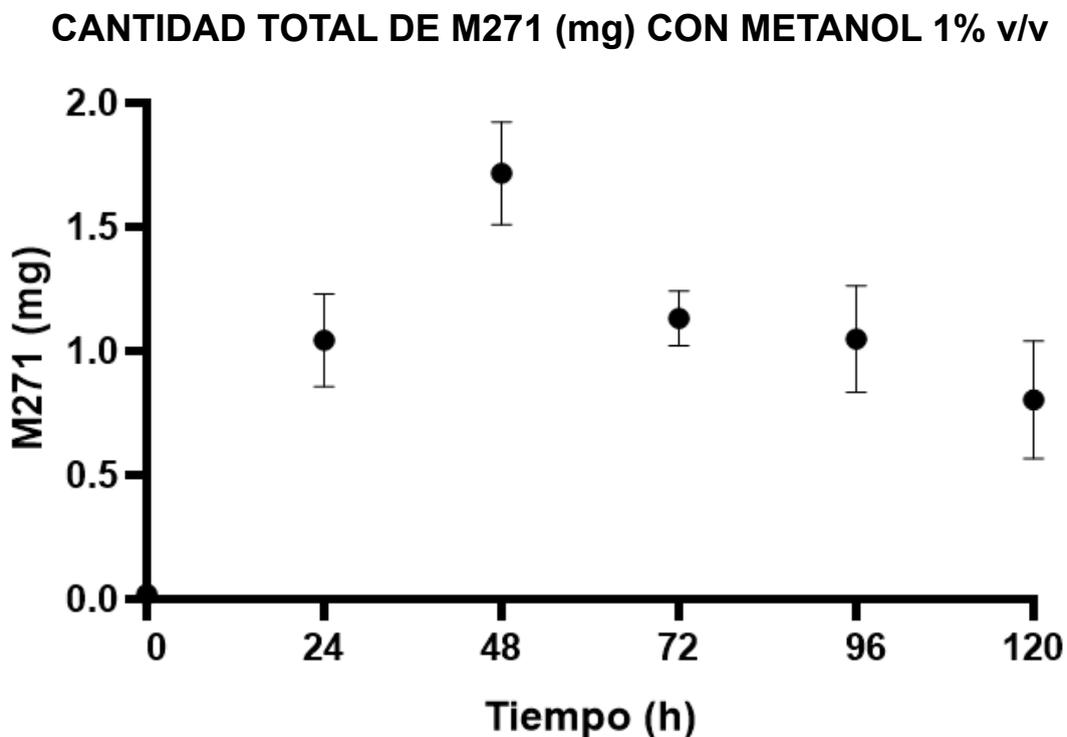
El análisis estadístico promedio del efecto de la adición al cultivo de metanol hasta alcanzar las concentraciones tanto con 1% v/v (*Tabla C, Gráfica 1*) como 2% v/v (*Tabla D, Gráfica 2*) se realizaron con el software GraphPAD 8. En este análisis se muestran los datos de la cantidad total en mg de la proteína M271 en los cultivos realizados, así como la desviación estándar en cada tiempo, producto de las distintas repeticiones realizadas, y su gráfica respectiva, que permite analizar el comportamiento de la cantidad de proteína total como consecuencia del tiempo de expresión.

TABLA C

Tiempo (h)	Promedio de proteína M271 (mg)	Desviación estándar	Número de repeticiones
0	0.00	0.00	2
24	1.04	0.18	3
48	1.71	0.20	2
72	1.13	0.11	3
96	1.05	0.21	3
120	0.80	0.23	3

Tabla C. Cantidad promedio de proteína M271 (mg). El análisis estadístico de los datos arroja el promedio de los mg totales obtenidos a partir de los cultivos de 100 ml con una concentración de metanol 1% v/v en los distintos tiempos que van de 0 horas a las 120 horas, y la desviación estándar de cada uno, se puede notar que, a mayor tiempo de expresión aumenta la cantidad de proteína hasta obtener un máximo y después de ese óptimo de tiempo disminuye, hasta que la producción ya no es efectiva.

GRÁFICA 1



Gráfica 1. La mayor cantidad total de proteína M271 para el cultivo con adición de metanol 1% v/v, se encuentra a las 48 horas. Adicionalmente se observa que, en los otros tiempos analizados, la cantidad de proteína obtenida es similar entre ellos, si bien el tiempo de cultivo de 120 horas es el que menor cantidad de proteína total produjo.

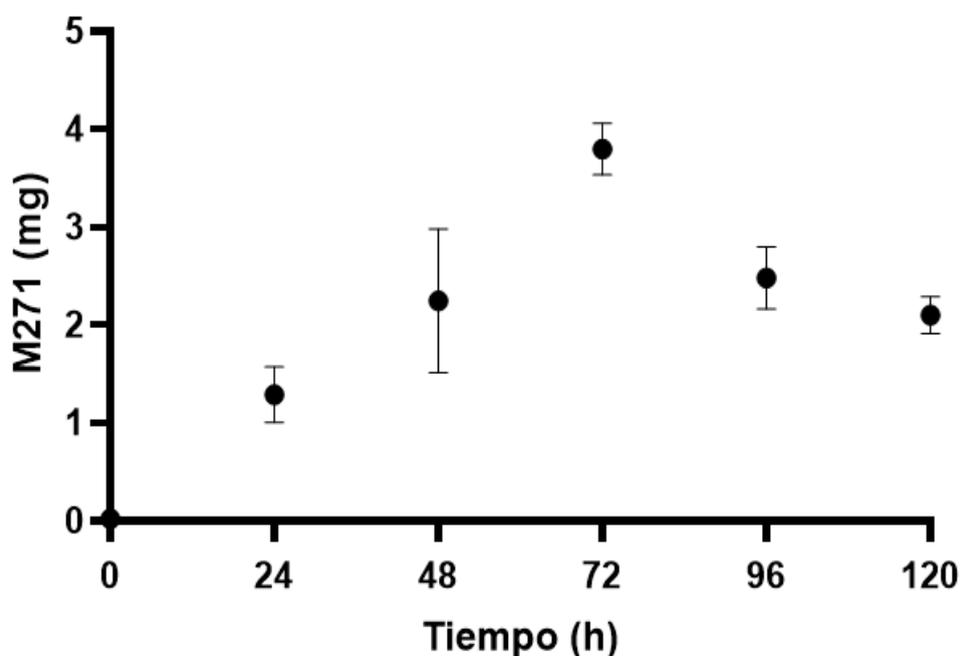
TABLA D

Tiempo (h)	Promedio de proteína M271 (mg)	Desviación estándar	Número de repeticiones
0	0.00	0.00	2
24	1.28	0.28	3
48	2.04	0.62	3
72	3.80	0.26	3
96	2.48	0.31	2
120	1.88	0.40	3

Tabla D. Cantidad promedio de proteína M271 (mg). El análisis estadístico de los datos arroja el promedio de los mg totales obtenidos a partir de los cultivos de 100 ml con una concentración de metanol 2% v/v en los distintos tiempos que van de 0 horas a las 120 horas, y la desviación estándar de cada uno. Se puede notar que a las 72 horas es en donde se encuentra la mayor cantidad total de la proteína M271 y que a las 24 horas es donde se observa la menor cantidad total de proteína.

GRÁFICA 2

CANTIDAD TOTAL DE M271 (mg) CON METANOL 2% v/v



Gráfica 2. De forma gráfica, la mayor cantidad total de proteína M271 promedio para la concentración de metanol 2% v/v se encuentra a las 72 horas y en el tiempo de las 24 horas se obtiene el menor cantidad. Cabe destacar que utilizando esta concentración de metanol, a diferencia de los cultivos con 1% v/v de metanol, se obtiene de manera general una mayor cantidad total de la proteína M271.

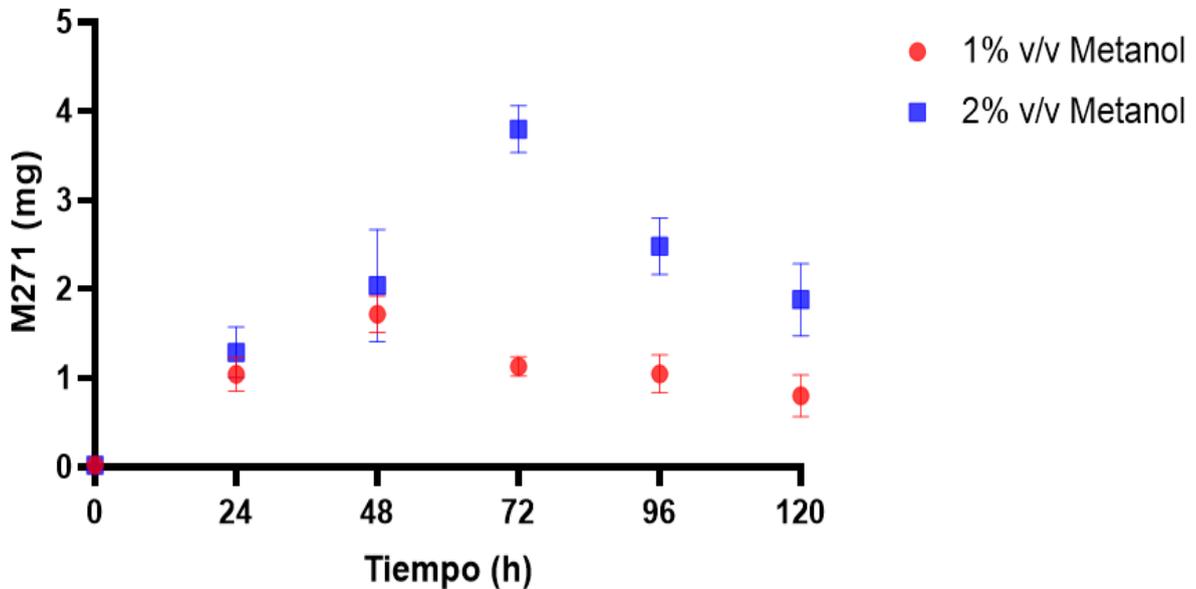
VIII.5 Análisis comparativo entre las concentraciones de 1% v/v y de 2% v/v en la cantidad total de la proteína M271.

A partir del análisis estadístico de los resultados obtenidos en la cantidad total de la proteína M271 que resultan de las concentraciones de metanol 1% v/v y de 2% v/v, es posible señalar de manera gráfica la diferencia que existe con el uso de metanol sobre la producción de M271 (*Gráfica 3*), donde se puede notar, cuando se superponen los promedios con su respectiva desviación estándar, que es claramente superior el rendimiento en la cantidad de proteína total de forma general con la concentración de 2% v/v de metanol.

De la misma forma al ordenar las cantidades de proteína total obtenidas se observa que, de las doce combinaciones posibles entre el tiempo de cultivo y la concentración de metanol, cuatro de 2% v/v son las de mayor cantidad total obtenida (*Gráfica 4*), siendo solamente, dentro de la concentración de metanol 1% v/v, la de 48 horas la que supera al rendimiento más bajo de cantidad total de proteína dentro de las que corresponden a la concentración de 2% v/v, la cual corresponde al tiempo de cultivo de 24 horas.

GRÁFICA 3

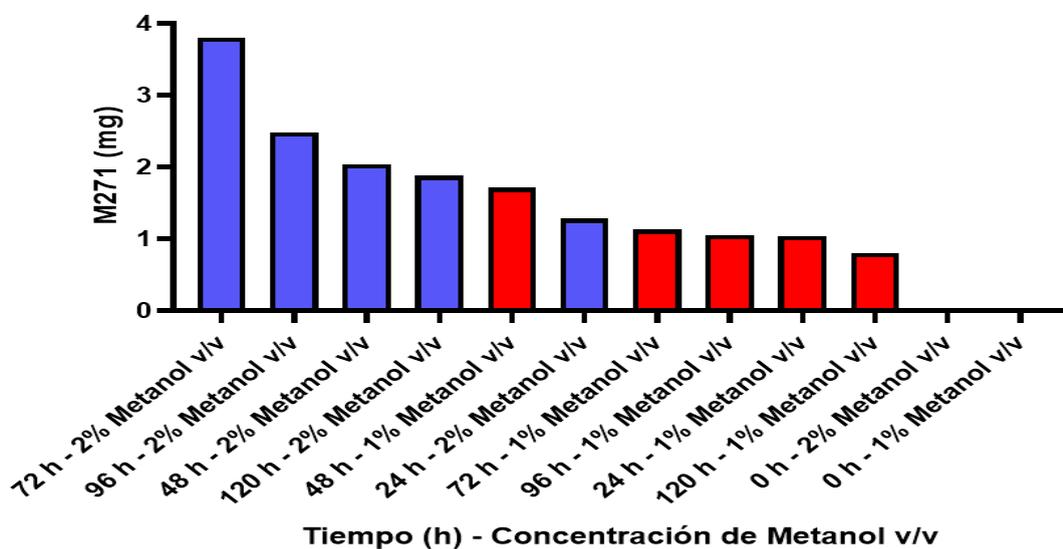
CANTIDAD TOTAL DE M271 (mg) CON METANOL 1 % Y 2% v/v



Gráfica 3. La comparación en los datos que se obtienen del análisis estadístico de los cultivos en *Pichia pastoris* para producir el inhibidor de proteasas M271, muestra de forma general que, al momento de superponer los promedios del rendimiento total de la proteína con las dos concentraciones de metanol para inducir la expresión (1% v/v, señalado en color rojo y 2% v/v, señalado en color azul), la inducción con 2% v/v de metanol es superior a la de 1% v/v, sobre todo después de las 72 horas de cultivo (tomando en cuenta la desviación estándar).

GRÁFICA 4

PROMEDIO DE LA CANTIDAD TOTAL DE LA PROTEÍNA M271 (mg)



Gráfica 4. En esta grafica se han ordenado de forma general los rendimientos totales en la cantidad de proteína obtenida con los cultivos desde las 0 horas hasta las 120 horas y con la concentración de metanol de 1% v/v y de 2% v/v, donde se muestra claramente que con la concentración de 2% v/v se obtienen los mayores rendimientos, solo el cultivo a las 48 horas utilizando 1% v/v de metanol es superior al de menor rendimiento que se obtiene a las 24 horas con 2% v/v de metanol, además tanto en 1% v/v como en 2% v/v de metanol, tal como se describe en los antecedentes de esta tesis, a las 0 horas no hay producción de la proteína M271 utilizando el sistema de expresión *Pichia pastoris*, ya que la expresión precisa la presencia de metanol.

IX DISCUSIÓN

IX.1 Homogeneidad de la proteína M271 en los análisis por SDS-PAGE.

De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos en el apartado 8.1, en cada uno de los geles de poliacrilamida, se puede observar la banda de la proteína M271 en el lugar esperado dado su masa molecular (21 kDa). Lo anterior, tanto en los experimentos realizados con una concentración de metanol 1% v/v como de 2% v/v, tal como se menciona en los antecedentes de esta tesis. Particularmente, se puede notar la presencia de las bandas que Campuzano, 2019 sugiere como especies de glicosilación de M271, en los tiempos de cultivo de 96 h y 120 h con metanol al 2% v/v. Sin embargo, tal como se menciona en el apartado 8.2 de los resultados, en este trabajo, se demostró que el periodo de espera entre que finaliza el proceso de purificación y la realización de los geles de poliacrilamida en el análisis por SDS-PAGE, es la razón por la que las bandas extras aparecen en los geles. Estas bandas, pueden atribuirse a oligomerizaciones de la proteína u otras modificaciones causadas por la labilidad de M271, a la concentración y a la temperatura a la que la muestra se almacenaba antes de realizar los SDS-PAGE, tal como lo menciona Ali & Imperiali, 2005 en una revisión sobre el tema. En el caso de M271, el efecto de reducir al mínimo el tiempo de espera entre el término de la purificación y la realización de los SDS-PAGE se puede observar en las **Figs. 7 y 8**,

donde las bandas reportadas por Campuzano y atribuidas a glicosilaciones no están presentes.

Es importante retomar una característica interesante en el trabajo de Guerra, 2016 con otro inhibidor de proteasas de la familia Kunitz STI: E3Ad, que también fue extraído de *Solanum tuberosum* y utiliza como modelo de expresión a *Pichia pastoris*. En su trabajo encuentra que la región de la N19 está glicosilada en el mapa de densidad electrónica al momento de determinar la estructura por cristalografía de rayos X. Además, como se menciona en los antecedentes de esta tesis, E3Ad y M271 son muy similares, sin embargo, Campuzano, 2019 no reporta glicosilación en la N19 en M271, tal como se muestra en la **Fig. 10**. Esto es un factor interesante a considerar, ya que apoya lo que se observó en esta tesis con los análisis por SDS-PAGE, en el efecto que tiene el tiempo entre que termina el proceso de purificación y en que se realiza la electroforesis. Una de las razones por la cual se apoya esta idea es que, partiendo entre la similitud que hay entre E3Ad y M271, hay una predicción mediante un alineamiento de estas dos proteínas donde en M271 debería aparecer esa N19 glicosilada, pero en lo reportado por Campuzano, 2019 no aparece en el mapa de densidad electrónica, por lo cual, la sugerencia que hace en ese mismo trabajo con el tema de las bandas que aparecen en sus análisis por SDS-PAGE que se debe a glicosilaciones, va más bien dirigida a los efectos que se observan en esta tesis. Con el fin de analizar con mayor cuidado la posibilidad de que M271 estuviese N- u O- glicosilada en alguno de estos residuos, utilizamos los servidores de glicosilación **NetOGlyc 1.0 Server**, **NetOGlyc 2.0 Server**, **NetOGlyc 3.1 Server**, **NetOGlyc 4.0 Server** y **N-GlyDE**. El resultado de cada uno de estos servidores se pueden ver en la *Tabla E*.

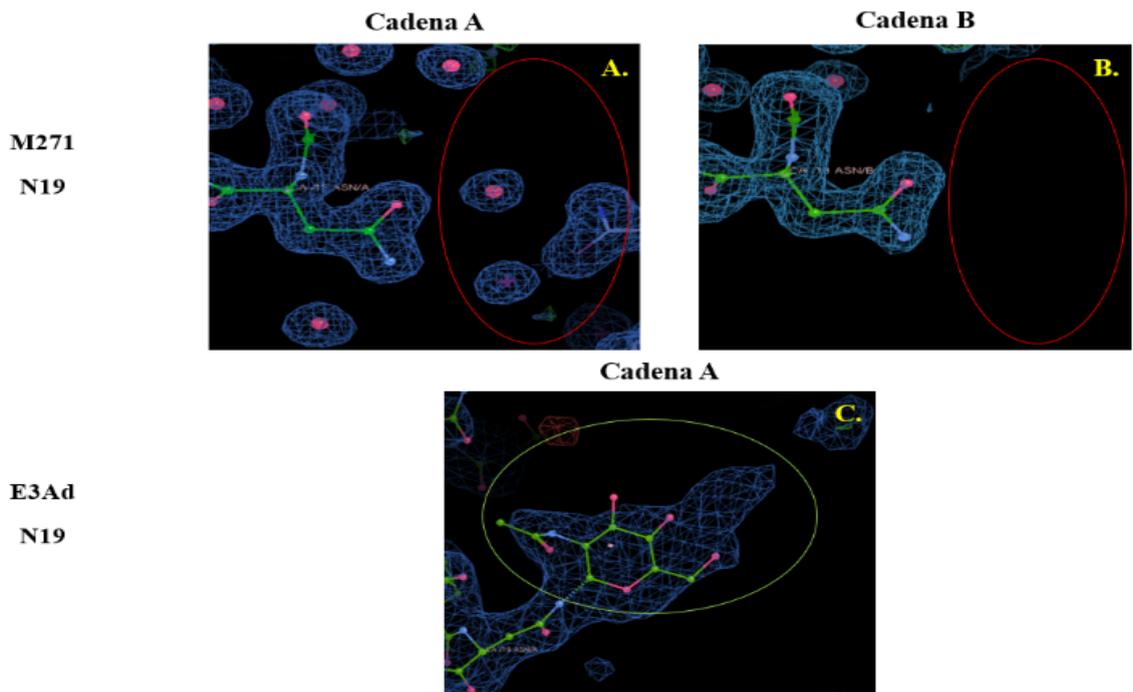
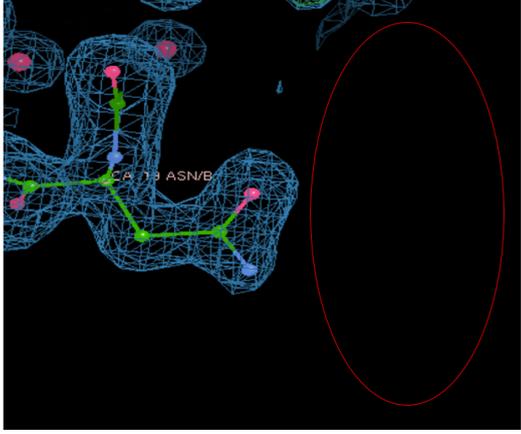
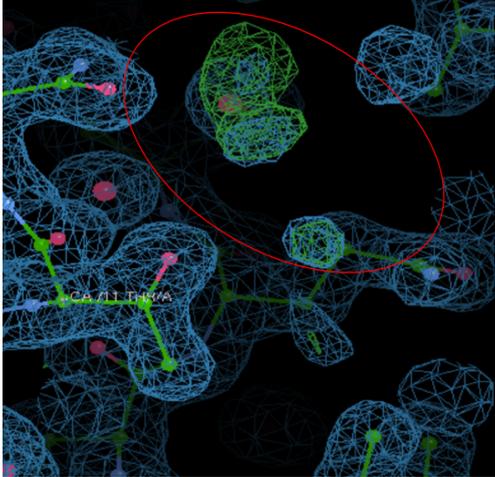
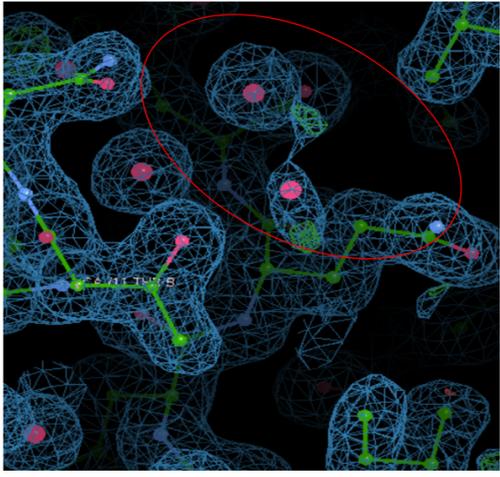
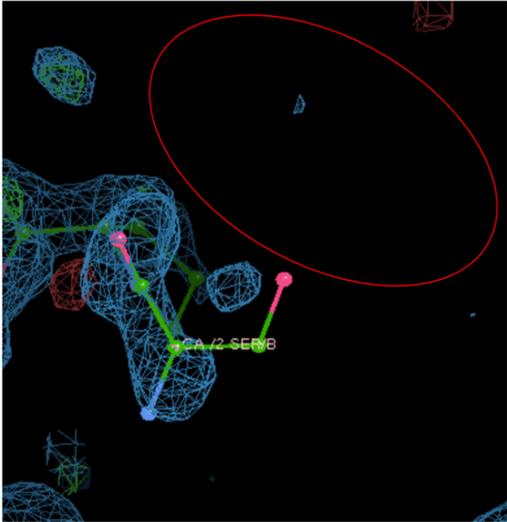
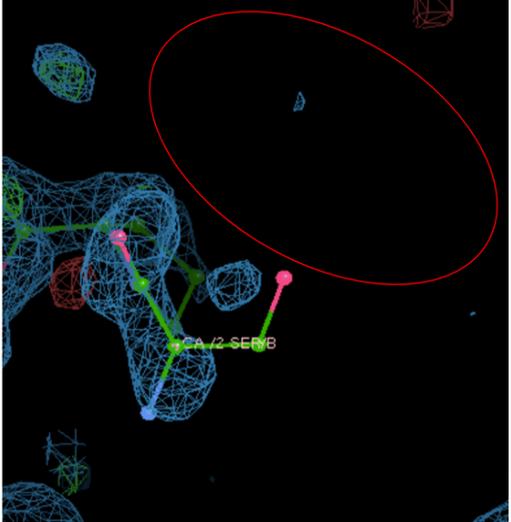
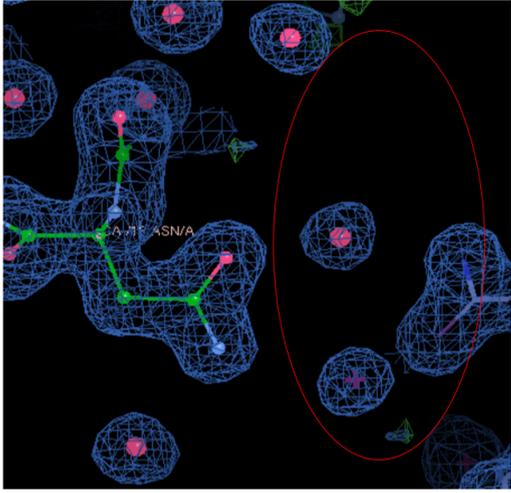
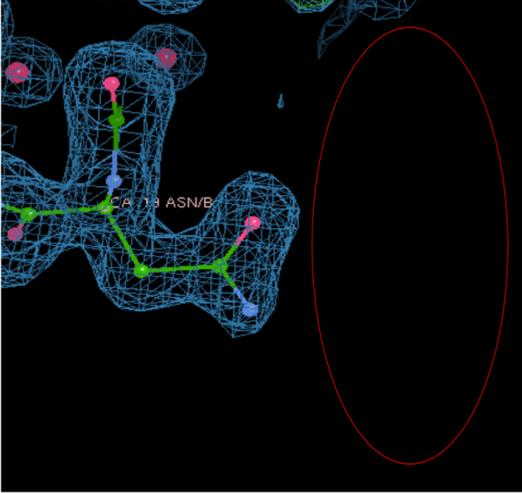


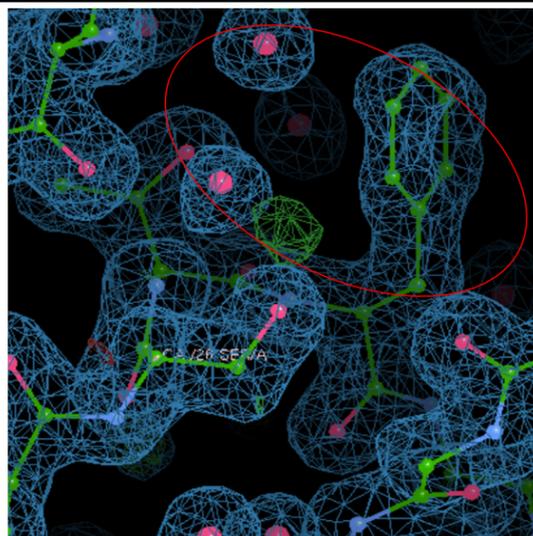
Figura 10. Región de la Asn 19 reportada por Campuzano, 2019, en el PDB con el código 6W76. En ese depósito del PDB, la Asn 19 no muestra densidad electrónica para construir una glicosilación (círculos rojos). Para ejemplificar una densidad electrónica de una glicosilación en una Asn, en el panel C se muestra la Asn 19 de E3Ad (código PDB 5G00); (círculo verde). Los mapas de densidad electrónica, 2FO-FC, están representados a 1 σ .

TABLA E

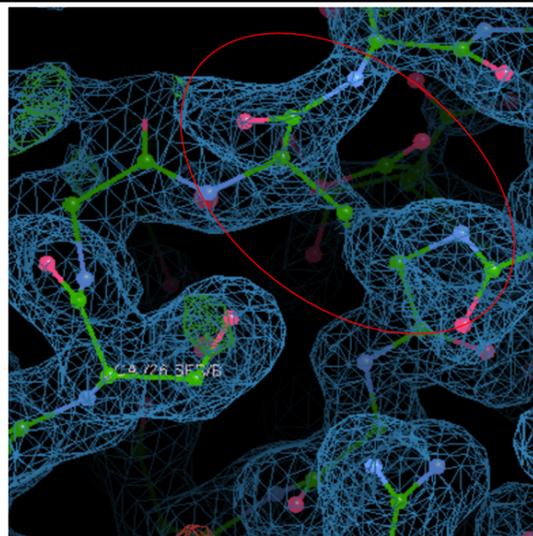
Predictor	Aminoácidos que podrían estar glicosilados	
	Cadena A	Cadena B
NetOGlyc 1.0 Server	N19 	N19 

<p>NetOGlyc 2.0 Server</p>	<p>No predice ningún aminoácido</p>	
<p>NetOGlyc 3.1 Server</p>	<p>T11</p> 	<p>T11</p> 
<p>NetOGlyc 4.0 Server</p>	<p>S2</p> <p>El mapa de densidad electrónica no presenta la región del aminoácido de la Serina 2</p>	<p>S2</p> 
<p>N-GlyDE</p>	<p>S2</p> <p>El mapa de densidad electrónica no presenta la región del aminoácido de la Serina 2</p>	<p>S2</p>

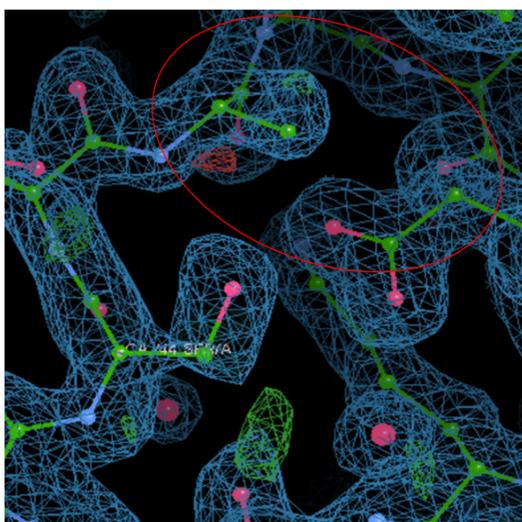
		
	<p data-bbox="619 757 689 792">N19</p> 	<p data-bbox="1187 757 1257 792">N19</p> 
	<p data-bbox="625 1355 683 1391">S26</p>	<p data-bbox="1193 1355 1251 1391">S26</p>



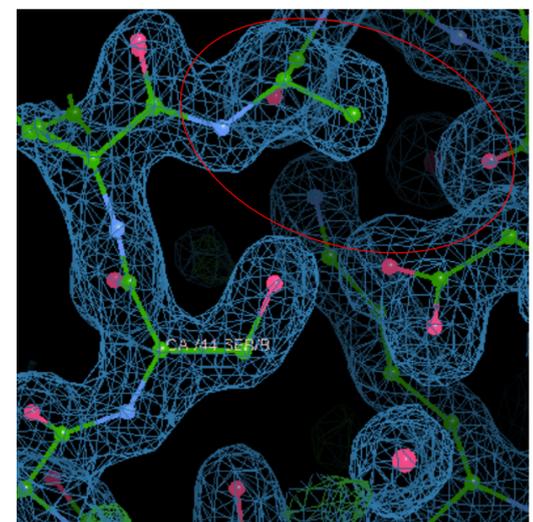
S44



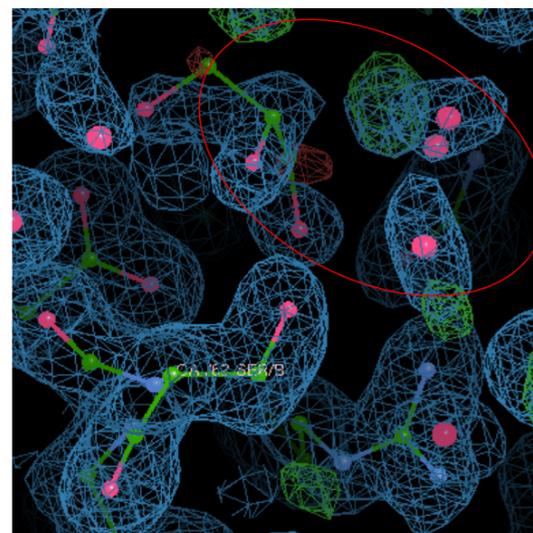
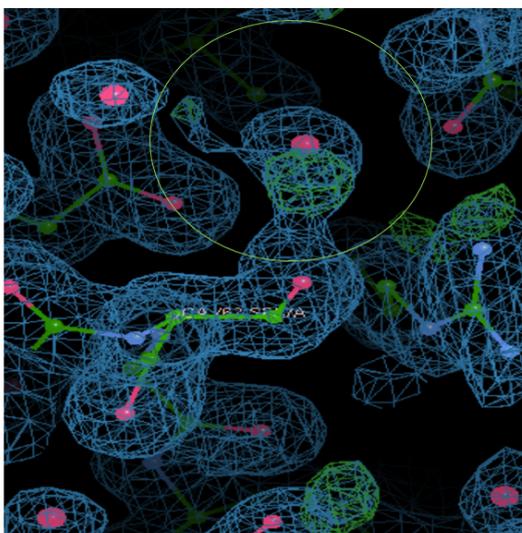
S44



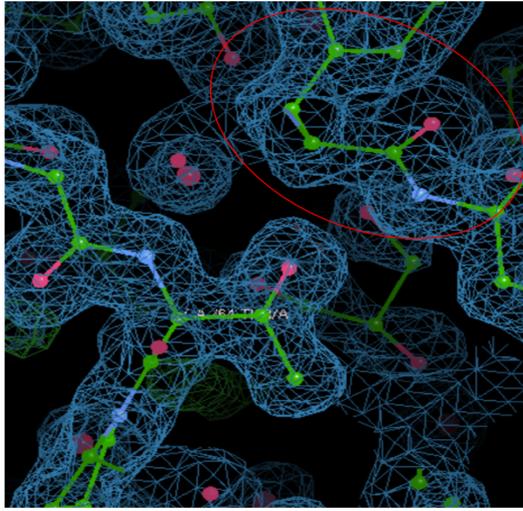
S62



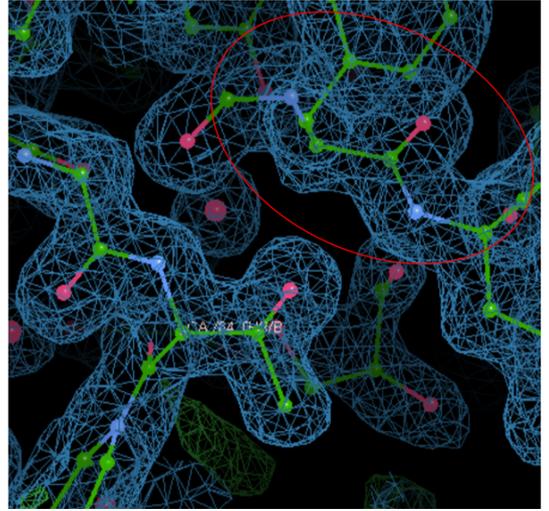
S62



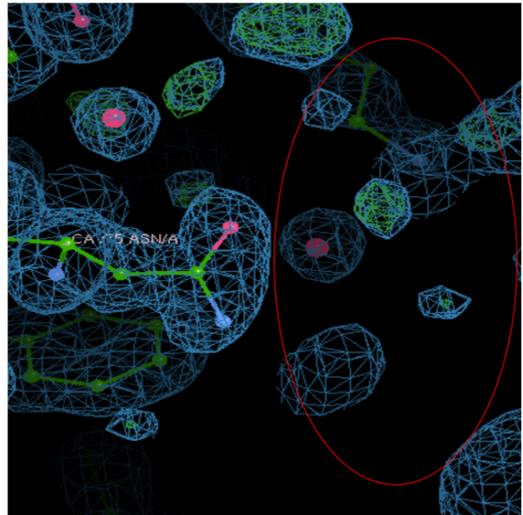
T64



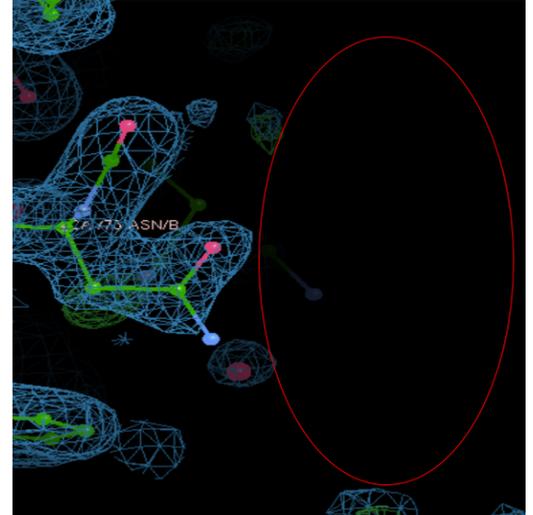
T64



N75



N75



N87

N87

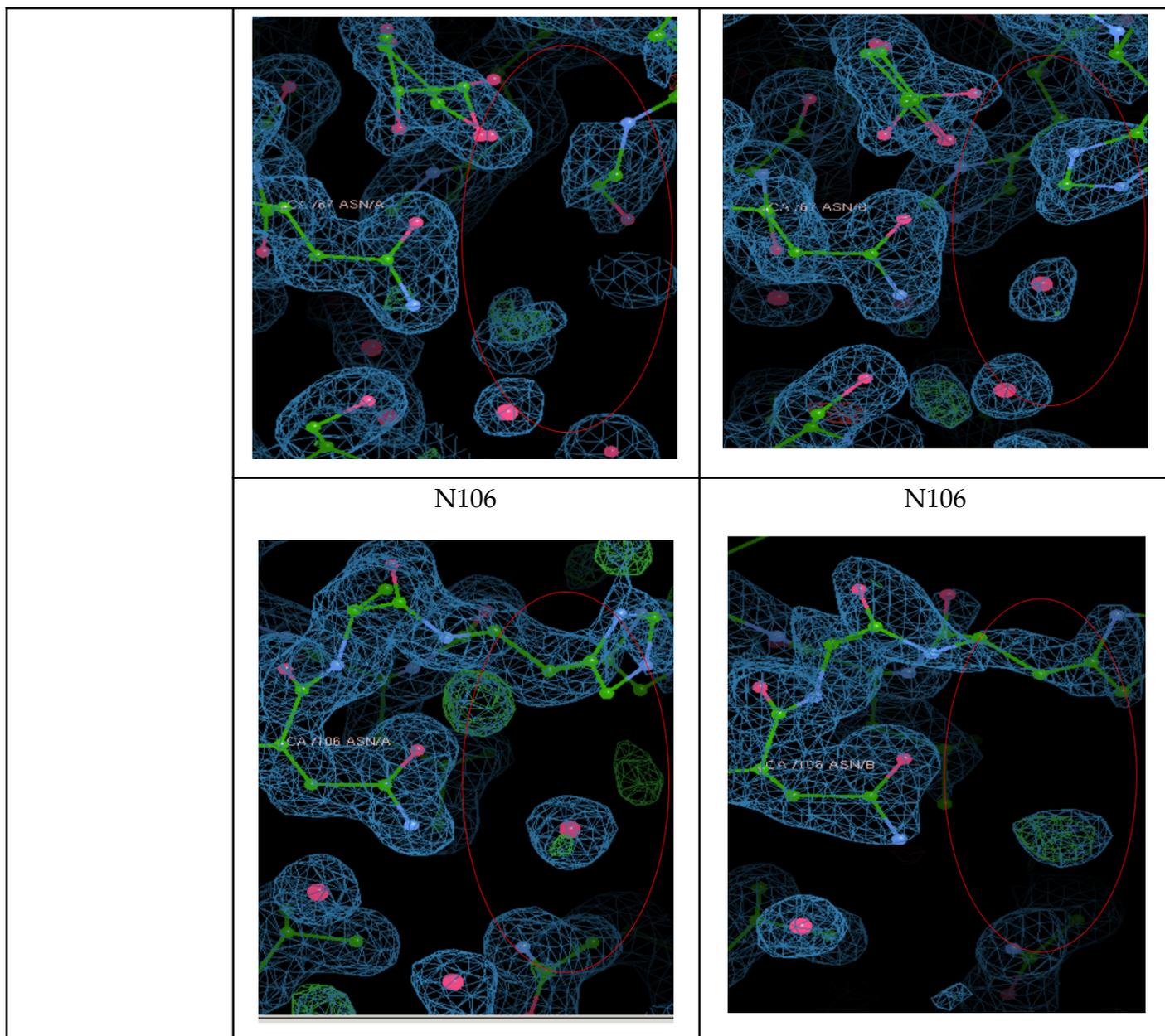


Tabla E. Posibles sitios de glicosilación en M271. En la tabla se muestran capturas del modelo cristalográfico y de los mapas de densidad electrónica de la proteína M271 (datos proporcionados por Campuzano; el mapa 2FO-FC, a 1 sigma, está representado en azul; el mapa FO-FC, a +/- 3.5 sigma, está representado en verde y rojo respectivamente). Se utilizaron los predictores de glicosilación NetOGlyc 1.0 Server, NetOGlyc 2.0 Server, NetOGlyc 3.1 Server, NetOGlyc 4.0 Server y N-GlyDE, sus resultados se contrastaron contra el modelo cristalográfico de M271. Solamente la serina 62 muestra mapas de densidad electrónica que podrían significar glicosilaciones. El círculo rojo indica la detección de zonas donde no se observan glicosilaciones, el círculo verde indica donde hay glicosilaciones o hay posibilidad de que hubiera glicosilaciones.

Cada uno de los aminoácidos predichos de estar glicosilados por los servidores empleados fue cuidadosamente analizado en la estructura cristalográfica determinada por Campuzano, 2019 (comunicación personal), resultando que los residuos 62 y 64 tienen densidades electrónicas vecinas que harían pensar que fueron O- glicosilados por *Pichia pastoris*. Lo anterior implica que M271 si fue glicosilada, pero a diferencia de E3Ad y a pesar de que el residuo 19 es común con M271, este aminoácido no está glicosilado. Esto abre algunas interrogantes que quedan pendientes para futuros trabajos.

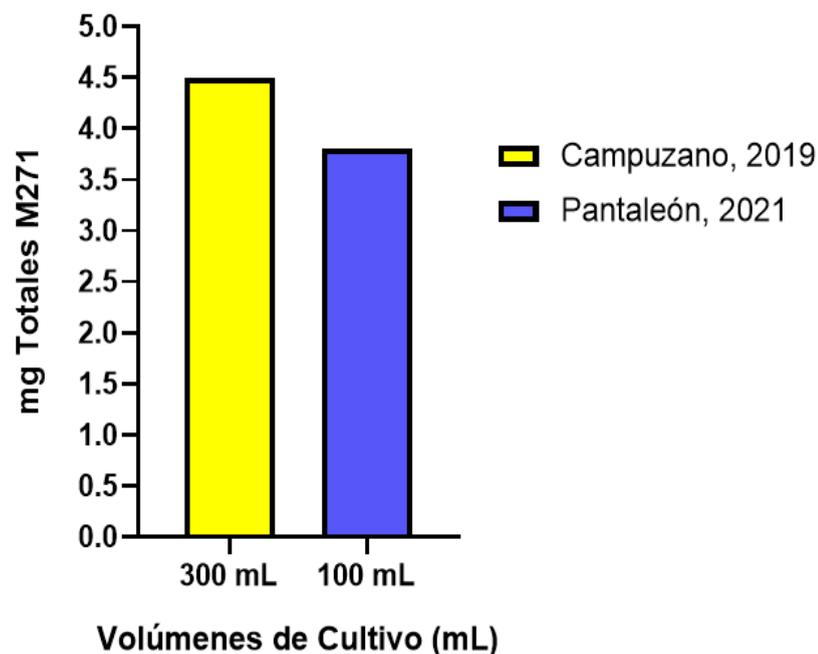
IX.2 Cantidad total de la proteína M271.

Para cada proteína de interés en distintos trabajos de investigación que han utilizado el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, se han optimizado las condiciones para lograr la mayor cantidad de proteína. En el caso de esta tesis, como se observa en las tablas y gráficas del apartado 8.3 de los resultados, se decidió estudiar el efecto precisamente del tiempo de inducción y la concentración de metanol, para lograr la mayor cantidad de proteína en mg totales de la proteína M271. Como resultado de lo anterior, con una concentración de metanol 1% v/v, se puede destacar como el mejor tiempo para producir el inhibidor de proteasas es un tiempo de cultivo de 48 h, con respecto a lo obtenido a las 24 h, 72 h, 96 h y 120 h, de hecho, en la *Gráfica 1* existe una tendencia de efecto de campana, desde la cual, a partir de la mayor producción de proteína a las 48 h, se observa un descenso en los tiempos posteriores. Existe la misma tendencia utilizando la concentración de metanol 2% v/v, donde a las 72 h se obtiene la mayor cantidad de proteína, y tiene el efecto de campana que se observa en la *Gráfica 2* similar al descrito con 1% v/v de metanol.

Campuzano, 2019 reporta las modificaciones que realiza para optimizar la mayor cantidad de proteína obtenida M271 en una gama de tiempos de inducción y la adición

en la concentración de metanol (con las concentraciones de metanol 1% v/v y 2% v/v y de 0 horas hasta 120 horas), comparado con el trabajo en esta tesis, se sugiere el uso en la concentración metanol de 2% v/v y el tiempo de inducción a las 72 h ya que resulta en una mayor cantidad de proteína obtenida, como se puede observar en las *Gráficas 3 y 4*. Cabe destacar que Campuzano, 2019 realiza cultivos de 300 mL y obtiene 4.5 mg de cantidad total de la proteína M271. En esta tesis se realizaron cultivos de 100 mL con una cantidad de proteína promedio total de 3.80 mg, lo cual es una observación interesante, ya que la variación de mg totales de M271 entre cultivos de 100 mL y 300 mL es significativa, probablemente la razón de esto tenga que ver con la aeración de una muestra con un volumen mayor, si bien el comprobar las causas de que el escalamiento reduzca la cantidad de proteína, es algo que tiene que probarse o estudiarse en el futuro. Con el fin de reducir los costos, esta tesis demostró que en el sistema empleado, los cultivos para expresar M271 deben realizarse a 100 mL de volumen total, tal como se muestra en la *Gráfica 5*.

CANTIDAD TOTAL DE PROTEÍNA M271



Gráfica 5. Comparación entre la máxima cantidad de proteína M271 obtenida en mg totales obtenido por Campuzano, 2019 (amarillo) y el reportado en esta tesis (azul), es interesante la diferencia no tan significativa entre la cantidad de proteína total en cultivos de 300 mL y cultivos de 100 mL. Ambos ejemplos representativos se obtuvieron con la combinación tiempo de inducción a las 72 h y con la concentración de metanol 2% v/v.

Unver *et al.*, 2018 proponen en su trabajo, como posibles causas del resultado final de la producción de su proteína de interés utilizando la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, el efecto que tienen factores como el tiempo de inducción y la concentración de metanol. También menciona que, la causa por la cual hay más cantidad de proteína resultante en cierto tiempo de inducción respecto a los otros que se probaron para optimizar la producción de esa proteína recombinante, se puede atribuir a la disminución de la viabilidad celular que puede conducir a una disminución en la producción de proteínas o alteración celular debido al estrés metabólico y ambiental. En el sistema de expresión *Pichia pastoris*, el metanol es tanto una fuente de carbono como un inductor de la producción de proteínas recombinantes. En cultivos de *Pichia pastoris* basados en la inducción del promotor pAOX1, la tasa de alimentación de metanol se conoce como un parámetro importante para optimizar la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, y pequeños cambios en esta tasa pueden tener efectos importantes (Sinha *et al.*, 2003). Si adicionalmente consideramos que en los experimentos realizados en esta tesis no se continúa manteniendo la concentración de metanol durante el cultivo, es claro que factores similares a los descritos por Sinha, así como otros atribuidos a la caída en la concentración de metanol afectarán los resultados de los experimentos de inducción. Por lo tanto, optimizar la concentración de metanol es un factor crucial. Se sabe que el alto nivel de metanol es tóxico, mientras que su bajo nivel no es suficiente para inducir la expresión de proteínas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Por otro lado, se sabe que el aumento de la concentración de metanol puede conducir a un aumento de la producción de proteínas (Fairlie *et al.*, 2000).

X CONCLUSIONES

- Si bien Campuzano, 2019 proponía como producto de la glicosilación las bandas que no concuerdan con la masa molecular de la proteína M271 de 21 kDa obtenidas en los análisis SDS-PAGE de cada cultivo posterior a la purificación. En esta tesis se sugiere que son el resultado de oligomerizaciones, ya que estas bandas no aparecen cuando los análisis SDS-PAGE se realizan inmediatamente después de concluir la purificación y si aparecen cuando la muestra se guarda a 4°C por al menos 24 horas.
- La mayor cantidad de proteína M271 total en cultivos en 100 mL, se logra cuando se hace una relación concentración-tiempo de cultivo de 72 horas con 2% de metanol.
- El realizar cultivos de 300 mL en matraz agitado con una concentración de 2% de metanol a 72 horas tal como lo realizó Campuzano, 2019; no es mejor que realizar cultivos de 100 mL en las mismas condiciones de expresión (metanol-tiempo). Por lo tanto, es mejor realizar varios cultivos de 100 mL que uno solo de 300 mL.
- El mapa de densidad electrónica permitió evidenciar que los servidores **NetOGlyc 1.0 Server**, **NetOGlyc 2.0 Server**, **NetOGlyc 3.1 Server**, **NetOGlyc 4.0 Server** y **N-GlyDE**, para el caso de esta tesis, fueron poco confiables para predecir glicosilaciones en la proteína M271.

XI PERSPECTIVAS

- Confirmar el comportamiento oligomérico de M271, por medio de estudios de DLS.
- Realizar estudios de espectrometría de masas para reconfirmar la ausencia de glicosilaciones en M271 producido en *Pichia pastoris*.
- Realizar pruebas de cristalización de M271 siguiendo el protocolo descrito por Campuzano, 2019, pero con la muestra producida en esta tesis.
- Confirmar que los cultivos de 100 ml producen más proteína que los cultivos de 300ml cuando M271 se expresa con el sistema de *Pichia pastoris* descrito en esta tesis.
- Evaluar el efecto de la temperatura del cultivo como una nueva métrica para encontrar la mayor cantidad total de proteína en la producción de M271.

XII REFERENCIAS

- Ahmad, A., O. Pereira, E., J. Conley, A., S. Richman, A., & Menassa, R. (2010). Green Biofactories: Recombinant Protein Production in Plants. *Recent Patents on Biotechnology*. 4: 242-259. <https://doi.org/10.2174/187220810793611464>
- Almuzara, C., Cos, O., Baeza, M., Gabriel, D., & Valero, F. (2002). Methanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis. *Biotechnology Letters*. 24, 413-417. <https://doi.org/10.1023/A:1014554324117>
- Andre, C. M., Ghislain, M., Bertin, P., Oufir, M., Herrera, M. D. R., Hoffmann, L., Hausman, J. F., Larondelle, Y., & Evers, D. (2007). Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) as a source of antioxidant and mineral micronutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 366-378. <https://doi.org/10.1021/jf062740i>
- Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H., Kompala, D. S., & William E. Bentley, I. by. (2009). Plasmid-encoded protein: The principal factor in the “metabolic burden” associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*. 35, 668-681. <https://doi.org/10.1002/bit.22292>
- Brunelle, J. L., & Green, R. (2014). One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). In *Methods in Enzymology*. 541, 151-159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00012-4>
- Buckholz, R. G., & Gleeson, M. A. G. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Bio/Technology*. 9,1067–1072. <https://doi.org/10.1038/nbt1191-1067>
- Burgess, R. R. (2009). Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. In *Methods in Enzymology*. 463, 259-282. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63017-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63017-2)
- Campuzano-González, A. (2019) Estudio estructural del asa L9 en la proteína M271 de *Solanum tuberosum*, un inhibidor de proteasas de la familia Kunitz-STI .
- Carrio M. M., Villaverde A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* 96, 3-12. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00032-9)
- Cereghino, G. P. L., Cereghino, J. L., Ilgen, C., & Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. In *Current Opinion in Biotechnology*. 13, 329-332. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00330-0](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00330-0)

- Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In *FEMS Microbiology Reviews*. 24, 45-66. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00029-7)
- Chauhan, A. K., Arora, D., & Khanna, N. (1999). A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*. 34, 139-145. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00080-6)
- Chiruvolu, V., Cregg, J. M., & Meagher, M. M. (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*. 21, 277-283. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00042-2)
- Choi, J. H., & Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64, 625-635. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1559-9>
- Choi, J. H., Keum, K. C., & Lee, S. Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. In *Chemical Engineering Science*. 61, 9. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.03.031>
- Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Sreekrishna, K., & Romanos, M. A. (1991). High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology*. 9, 445-460. <https://doi.org/10.1038/nbt0591-455>
- Crowley, J., Mccarthy, B., Nunn, N. S., Harvey, L. M., & McNeil, B. (2000). Monitoring a recombinant *Pichia pastoris* fed batch process using Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FT-MIRS). *Biotechnology Letters*. 22, 1907-1912. <https://doi.org/10.1023/A:1026784101162>
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. In *Biotechnology Advances*. 27, 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Dumon-Seignovert L., Cariot G., Vuillard L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein Expr. Purif*. 37, 203-206. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.04.025>

- Fairlie, W. D., Zhang, H. P., Brown, P. K., Russell, P. K., Bauskin, A. R., & Breit, S. N. (2000). Expression of a TGF- β superfamily protein, macrophage inhibitory cytokine-1, in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene*. 254, 67–76. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00295-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00295-X)
- Files, D., Ogawa, M., Scaman, C. H., & Baldwin, S. A. (2001). A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme and Microbial Technology*. 26, 335-340. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00395-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00395-7)
- Gellissen, G., & Hollenberg, C. P. (1997). Application of yeasts in gene expression studies: A comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - A review. *Gene*. 190, 87-97. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00020-6)
- Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*. 274, 546-567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Gómez, S., López-Esteva, M., Fernández, F. J., Suárez, T., & Vega, M. C. (2016). Alternative eukaryotic expression systems for the production of proteins and protein complexes. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 896, 167-184. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27216-0_11
- Guerra, Y., Valiente, P. A., Pons, T., Berry, C., & Rudiño-Piñera, E. (2016). Structures of a bi-functional Kunitz-type STI family inhibitor of serine and aspartic proteases: Could the aspartic protease inhibition have evolved from a canonical serine protease-binding loop? *Journal of Structural Biology*. 195, 259-271 <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.014>
- Guo, J., Erskine, P. T., Coker, A. R., Wood, S. P., & Cooper, J. B. (2015). Structure of a Kunitz-type potato cathepsin D inhibitor. *Journal of Structural Biology*. 192, 554- 560 <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.10.020>
- Hélène, B., Céline, L., Patrick, C., Fabien, R., Christine, V., Yves, C., & Guy, M. (2001). High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*. 36, 907-913. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00296-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00296-X)

- Hijmans, R. J., Gavrilenko, T., Stephenson, S., Bamberg, J., Salas, A., & Spooner, D. M. (2007). Geographical and environmental range expansion through polyploidy in wild potatoes (*Solanum* section *Petota*). *Global Ecology and Biogeography*. 16, 485-495. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2007.00308.x>
- Hollenberg, C. P., & Gellissen, G. (1997). Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*. 8, 554-560. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80028-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80028-6)
- Hunt, I. (2005). From gene to protein: A review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. In *Protein Expression and Purification*. 40, 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.018>
- Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K. M., Vlasuk, G. P., Dickerson, K., Brown, S., & Meagher, M. M. (1999). Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*. 24, 438-445. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00161-6)
- Jonasson, P., Liljeqvist, S., Nygren, P.-Å., & Ståhl, S. (2002). Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. <https://doi.org/10.1042/ba20010099>
- Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., & Ohmura, T. (2000). High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 89, 55-61. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)88050-0](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)88050-0)
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. In *Nature Biotechnology*. 23: 567-575. <https://doi.org/10.1038/nbt1095>
- Kurtzman, C. P. (1984). Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. *Antonie van Leeuwenhoek*. 50, 209-217. <https://doi.org/10.1007/BF02342132>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier. 273-352.

- Lalonde, M. E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. In *Journal of Biotechnology*. 251: 128-140. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>
- Lange, S., Schmitt, J., & Schmid, R. D. (2001). High-yield expression of the recombinant, atrazine-specific Fab fragment K411B by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Immunological Methods*. 255, 103-114. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00351-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00351-9)
- Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. In *Trends in Biotechnology*. 14, 98-105. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9)
- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. In *Yeast*. 22, 249–270. <https://doi.org/10.1002/yea.1208>
- Makrides, S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. In *Microbiological Reviews*. 60, 512-538. <https://doi.org/10.1128/mmbr.60.3.512-538.1996>
- Martínez, J. L., Liu, L., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2012). Pharmaceutical protein production by yeast: Towards production of human blood proteins by microbial fermentation. In *Current Opinion in Biotechnology*. 23: 965-971. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.011>
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M., ... & Gasser, B. (2009). Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories*,
- Mattanovich, D., Graf, A., Stadlmann, J., Dragosits, M., Redl, A., Maurer, M., Kleinheinz, M., Sauer, M., Altmann, F., & Gasser, B. (2009). Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*. 8, 29. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-29>
- Niimi, T. (2012). Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: A review. In *Methods in Molecular Biology*. 824, 307-315. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_15
- Pope B., Kent H. M. (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*. 24, 536-537. <https://doi.org/10.1093/nar/24.3.536>

- Richardson, M., 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry: Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*, vol. 5. Academic Press, New York. 259–305.
- Ritonja, A; Krizaj, I; Mesko, P; Kopitar, M; Lucovnik, P; Strukelj, B; Pungercar, J; Buttle, D; Barrett, A; Turk, V. 1990. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.* 267. 13-15.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A., & Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* 8, 423-488. <https://doi.org/10.1002/yea.320080602>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. In *Frontiers in Microbiology.* 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sahdev, S., Khattar, S. K., & Saini, K. S. (2008). Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. In *Molecular and Cellular Biochemistry.* 307, 249-264. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9603-6>
- Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. In *Applied Microbiology and Biotechnology.* 65, 363-372. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1656-9>
- Schreuder, M. P., Deen, C., Boersma, W. J. A., Pouwels, P. H., & Klis, F. M. (1996). Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: Implications for a possible oral vaccine. *Vaccine.* 14, 383- 388. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)00206-G](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)00206-G)
- Sezonov G., Joseleau-Petit D, D'Ari R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J. Bacteriol.* 189, 8746-8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 99, 303-310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- Sinha, J., Plantz, B. A., Zhang, W., Gouthro, M., Schlegel, V., Liu, C. P., & Meagher, M. M. (2003). Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile. *Biotechnology Progress.* , 19,

794–802. <https://doi.org/10.1021/bp025744q>

- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 115: 113-128. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.08.004>
- Sørensen, H. P., & Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. In *Microbial Cell Factories*. 4, 1. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-1>
- Spencer, J., Ragout de Spencer, A., & Laluce, C. (2002). Non-conventional yeasts. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0834-2>
- Spooner, D. M. (2013). *Solanum tuberosum* (Potatoes). In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*. . 68, 1-209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01442-X>
- Spooner, D. M., & Hijmans, R. J. (2001). Geographic distribution of wild potato species. *American Journal of Botany*. 88, 2101-2112.
- Spooner, D. M., Rodríguez, F., Polgár, Z., Ballard, H. E., & Jansky, S. H. (2008). Genomic origins of potato polyploids: GBSSI gene sequencing data. *Crop Science*. 48, S27-S36. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.09.0504tpg>
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., & Parker, K. (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*. 28, 4117-4125. <https://doi.org/10.1021/bi00435a074>
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72, 211-222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>
- Thoring, L., Dondapati, S. K., Stech, M., Wüstenhagen, D. A., & Kubick, S. (2017). High-yield production of “difficult-to-express” proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates. *Scientific Reports*. 7, 11710. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12188-8>
- Unver, Y., Yildiz, M., Kilic, D., Taskin, M., Firat, A., & Askin, H. (2018). Efficient expression of recombinant human telomerase inhibitor 1 (hPinX1) in *Pichia pastoris*.

<https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1466160>

- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Gatto, G. J. (2005). Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. In *Angewandte Chemie - International Edition.*, 44, 7342 – 7372. <https://doi.org/10.1002/anie.200501023>
- Wagner, L. W., Matheson, N. H., Heisey, R. F., & Schneider, K. (1997). Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Techniques.* 11, 791-795. <https://doi.org/10.1023/A:1018469007145>
- Wang, M., Jiang, S., & Wang, Y. (2016). Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. In *Bioengineered.* 7, 155-165. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1191707>
- Watanabe, K., Toyoda, M., Hashimoto, H., Nakagawa, K. I., Nakamura, K., Yabusaki, Y., Tanimura, A., & Saito, Y. (1996). Effects of hexpression of 135-kDa insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 18, 1483-1485. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.1483>
- Wolf, K. (1996). No conventional yeast in biotechnology. A Handbook. Berlin, Germany, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 203-253.
- Xu, P., Raden, D., Doyle, F. J., & Robinson, A. S. (2005). Analysis of unfolded protein response during single-chain antibody expression in *Saccharomyces cerevisiae* reveals different roles for BiP and PDI in folding. *Metabolic Engineering.* 7, 269-279. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.04.002>
- Yamada Y, Maeda K, Mikata K. (1994) The phylogenetic relationships of the hat-shaped ascospore-forming, nitrate-assimilating *Pichia species*, formerly classified in the genus *Hansenula* Sydow et Sydow, based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (Saccharomycetaceae): the proposals of three new genera, *Ogataea*, *Kuraishia*, and *Nakazawaea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 58, 1245–1257. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1245>
- Yamada, Y., Matsuda, M., Maeda, K., & Mikata, K. (1995). The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov. (Saccharomycetaceae). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* <https://doi.org/10.1271/bbb.59.439>

- Zerbs, S., Frank, A. M., & Collart, F. R. (2009). Chapter 12 Bacterial Systems for Production of Heterologous Proteins. In *Methods in Enzymology*. 463, 149-168. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63012-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63012-3)