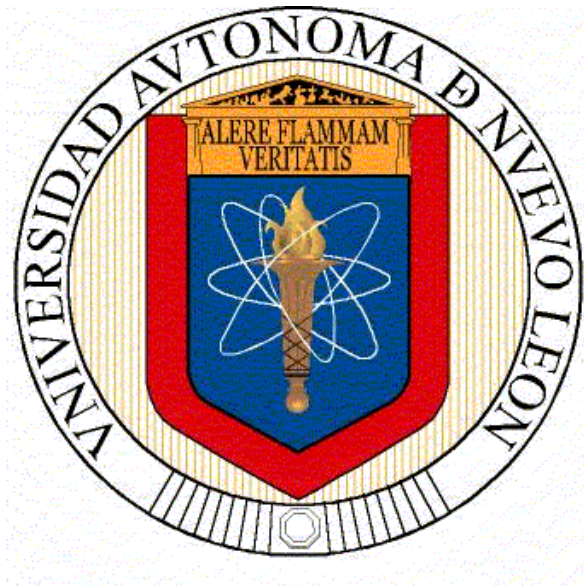


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS**

**PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA E2 DEL VIRUS DEL PAPILOMA  
HUMANO TIPO 16 EN LA LEVADURA *Pichia pastoris***

**POR**

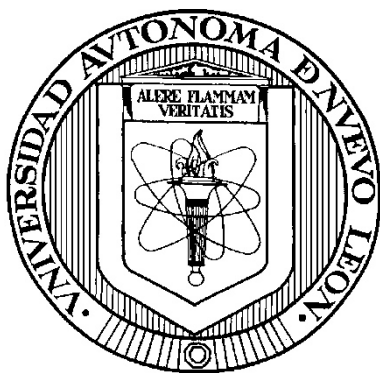
**GUILLERMO ISAAC GUERRERO RAMÍREZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**DICIEMBRE 2014**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**Producción de la Proteína E2 del virus del papiloma humano tipo 16  
en la levadura *Pichia pastoris***

**Por**

**Q.F.B. GUILLERMO ISAAC GUERRERO RAMÍREZ**

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA  
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

**MONTERREY, N.L.**

**DICIEMBRE 2014**



**Título: “Producción de la Proteína E2 del virus del papiloma humano tipo  
16 en la levadura *Pichia pastoris*”**

Aprobación de la tesis:

**DR. C. JORGE ÁNGEL ISIDRO ASCACIO MARTÍNEZ**

Director de Tesis

**DR. C. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA**

Co-Director de Tesis

**DR. C. ANTONIO ALÍ PÉREZ MAYA**

Miembro de la Comisión

**DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO**

Subdirector de Estudios de Posgrado



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE MEDICINA

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Jorge Ángel Isidro Ascacio Martínez y la co-dirección del Dr. C. Hugo Alberto Barrera Saldaña, contando además con la asesoría del Dr. C. Antonio Alí Pérez Maya.



## **AGRADECIMIENTOS**

*Primero que todo, a Dios por el milagro de la vida, al permitirme despertar cada día y dejarme continuar con esta aventura.*

*A mis padres por apoyarme en cada nueva desafío que me propongo, por nunca dejarme solo y siempre darme fuerzas para seguir adelante a pesar de las adversidades. A mi hermano y toda su familia, que con sus risas y ocurrencias me motivan a seguir siendo mejor, para que algún día sea un digno ejemplo a seguir. Los amo.*

*Al Dr. Ascacio, por su paciencia a lo largo de este proyecto y por toda la ayuda y apoyo en esas noches y madrugadas intensas en el laboratorio. Gracias por enseñarme con su ejemplo que antes de ser un buen investigador, se debe ser una buena persona.*

*Al Dr. Barrera y al Dr. Alí, por todos sus valiosos y constructivos consejos a lo largo del proyecto,*

*A mi hermano Muza, gracias por no “recordarmela” en la maestría por haberte traído a tierra de regios que no saben manejar, jajaja, gracias por todo carnal, lo logramos, regresamos a la sociedad xD*

*A mi hermano Ulrich y su esposa Grecia, y Sofy porque ya llegó =), gracias por abrirme las puertas de su casa y de su familia, y por apoyarme en esas desveladas en el lab, un honor y un placer haberlos conocido y espero me sigan aguantando porque Sofy necesitará un tío no blanco del cual reírse jajaja*

*A todos mis compañeros de generación (pa que los nombres si ya saben quiénes son! Jajaaja) Esta aventura que comenzó en los calabozos ... perdón cubículos está llegando a su fin y cada uno de ustedes me ha hecho aprender y crecer como persona. Buenas historias que recordaré siempre*



*A mis "labmates" Vanessa, Sandra, Mily, Abraham y Hector, que compartieron y sufrieron la alegría y la frustración de la ciencia. También a ustedes Ale, Aldape, Arturo, Candy, Yare, Sama, Primo, Cuerna y Edna, por toda su ayuda en mis experimentos y porque me dieron el privilegio y la confianza de enseñarles lo poco o mucho que sé. Hubiera terminado esquizofrénico sin todos ustedes. Biotec uh ah ha!*

*A mis hermanos de la chocobanda, a mis amigos de Quifalandia, a Felix y su familia, Mandro, Montalvo, Nidia, familia Alfonsín, familia Lima, familia Hendrich, y toda las personas que desde lejos estuvieron al pendiente de mi durante toda esta etapa. Gracias*

*A la gente de bioca, en especial a Normita, Juanis y Ary, que nunca se les escapa recordarme que les debo algo de papelería ajajaja pero que sin ustedes esto no mas no hubiera salido bien =).*

*Y por último a ti Mariel, porque con esa ocasión en el starbucks de saltillo (el único jaja) me convenciste de entrar a la maestría, porque con esos ratos de vicio en la plazita de bioca me ayudaste a superar cada día de estrés, y porque con cada momento que compartimos juntos me recuerdas que fue la mejor decisión. Te quiero.*



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xi
<b>ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>1. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1. Biotecnología</b> .....	1
<b>1.1.1. Ventajas y desventajas de usar un sistema de expresión eucariota</b> .....	2
<b>1.1.2. Diseño del sistema heterólogo</b> .....	5
<b>1.1.3. Aplicaciones industriales</b> .....	8
<b>1.2. Virus del Papiloma Humano</b> .....	9
<b>1.3. Antecedentes</b> .....	14
<b>2. CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>3. CAPÍTULO III: OBJETIVOS Y ESTRATEGÍA GENERAL</b> .....	19
<b>3.1. Objetivo general</b> .....	19
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	19
<b>3.3. Estrategia General Parte I</b> .....	20
<b>3.4. Estrategia General Parte II</b> .....	21
<b>4. CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA</b> .....	22
<b>4.1. Objetivo I</b> .....	22
<b>4.1.1. Extracción plasmídica por el método de lisis alcalina (Miniprep's)</b> .....	22
<b>4.1.2. Preparación de bacterias calcio competentes</b> .....	23
<b>4.1.3. Transformación de bacterias calciocompetentes</b> .....	24
<b>4.2. Objetivo II</b> .....	24
<b>4.2.1. Preparación de levaduras electrocompetentes</b> .....	24
<b>4.2.2. Transformación de levaduras electrocompetentes</b> .....	25
<b>4.2.3. Inducción de proteínas</b> .....	26



4.2.4. **Precipitación de proteínas** ..... 27

4.2.5. **Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)** ..... 27

4.2.6. **Western-blot** ..... 30

4.3. **Objetivo III** ..... 32

4.3.1. **Escalamiento a biorreactor** ..... 32

4.4. **Objetivo IV** ..... 34

4.4.1. **Purificación de proteínas** ..... 34

5. **CAPÍTULO V: RESULTADOS** ..... 35

5.1. **Objetivo I** ..... 35

5.1.1. **Diseño del casete de expresión del gen E2-VPH16 wild type** . 35

5.1.2. **Optimización del marco de lectura de lectura del gen E2-VPH16**  
38

5.1.3. **Construcción de los plásmidos de expresión de los genes E2WT  
y E2OPT**..... 45

5.2. **Objetivo II** ..... 53

5.2.1. **Transformación y genotipificación de clonas de *P. pastoris*.** 53

5.2.2. **Ensayos de expresión** ..... 57

5.3. **Objetivo III** ..... 60

5.3.1. **Escalamiento de la producción**..... 60

5.4. **Objetivo IV** ..... 65

5.4.1. **Ensayo de purificación** ..... 65

6. **CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN**..... 67

7. **CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES**..... 71

8. **CAPÍTULO VIII: ANEXOS** ..... 72

8.1. **Medios de cultivo**..... 72

8.1.1. **Medio LB (Luria-Bertani)** ..... 72

8.1.2. **Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)** ..... 73

8.1.3. **Medio MD (Minimal Dextrose)** ..... 73

8.1.4. **Medio BMMY (Buffered Methanol-complex Medium)** ..... 74

8.1.5. **Soluciones stock**..... 75





8.1.5.1. 10X YNB (13.4% yeast nitrogen base con sulfato de amonio sin aminoácidos).....	75
8.1.5.2. 500x Biotina (0.02% Biotina) .....	75
8.1.5.3. Buffer de fosfatos 1M, pH 6.0.....	75
8.2. Material biológico .....	75
i. CAPÍTULO IX: REFERENCIAS.....	76



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Plásmido pPIC9.....	6
Figura 2: Organización del genoma circular del VPH18..	11
Figura 3: LCR (Long Control Region) del VPH..	12
Figura 4: Ciclo viral del VPH en modelos celulares..	14
Figura 5: Riesgo de la persistencia y progresión del VPH.....	16
Figura 6: Esquema Western-blot..	31
Figura 7: Interacción inter primers .....	37
Figura 8: Interacción intra primers .....	37
Figura 9: Interacción inter primers .....	37
Figura 10: Estructura del casete de expresión del gen E2WT con la amplificación de los primers diseñados. ....	38
Figura 11: Alineamiento entre secuencias E2WT y E2OPT.....	41
Figura 12: Sitios desestabilizantes encontrados a lo largo del marco de lectura abierto y sus posiciones.....	42
Figura 13: Comparación de CAI.....	43
Figura 14: Comparación de contenido de GC.....	43
Figura 15: Comparación de FOP.....	44
Figura 16: Estructura del casete de expresión del gen E2OPT con la adición de los elementos génicos que se incluyeron en el diseño de los primers.....	45
Figura 17: Estandarización de PCR.....	46
Figura 18: Miniprep's plásmido pPIC9..	47



Figura 19: Digestión del plásmido de expresión pPIC9 y los amplificadores de los genes E2..... 48

Figura 20: Verificación de la ligación.. ..... 51

Figura 21: Caracterización enzimática de las construcciones pPIC9-E2WT y pPIC9-E2OPT..... 52

Figura 22: Fenotipificación de las clonas resultantes de la transformación de *P. pastoris* con los casetes recombinantes.. ..... 55

Figura 23: Fenotipificación de segunda ronda de clonas para el gen E2OPT.. 56

Figura 24: Fenotipificación de segunda ronda de clonas para el gen E2WT... 57

Figura 25: SDS-PAGE para el análisis de la inducción de las colonias 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 8 de la primera ronda de construcción. .... 58

Figura 26: Western-blot del gel de poliacrilamida anterior.. ..... 59

Figura 27: SDS-PAGE del segundo ensayo de expresión de las proteínas E2OPT y E2WT. .... 60

Figura 28: Monitoreo de los parámetros en biorreactor.. ..... 62

Figura 29: Monitoreo de los parámetros en biorreactor. .... 63

Figura 30: SDS-PAGE de las muestras tomadas durante la fermentación..... 64

Figura 31: SDS-PAGE de la purificación de E2OPT por cromatografía de afinidad con resina de níquel..... 65



## ÍNICE DE TABLAS

Tabla 1: Gel de poliacrilamida separador al 12%.....	28
Tabla 2: Gel de poliacrilamida concentrador al 4%.....	28
Tabla 3: Sitios desestabilizantes del ARN mensajero dentro del marco de lectura abierto.....	42
Tabla 4: Resultados de la transformación en <i>Escherichia coli</i> /TOP10F de los productos de ligación.....	50
Tabla 5: Resultados de la transformación en <i>P. pastoris</i> /GS115 de las construcciones linearizadas con <i>Bgl</i> III.....	53
Tabla 6: Monitoreo de los parámetros en biorreactor de la producción de E2OPT. .....	61



## ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µF	Microfaraday
µL	Microlitro
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AOX1	Gen alcohol oxidasa 1
<i>AOX1</i>	Promotor alcohol oxidasa 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CAI	Índice de adaptación de codones
cols.	Colaboradores
DO	Densidad óptica
EK	Sitio de reconocimiento a enterocinasa
FOP	Frecuencia de codones óptimos
H6	Etiqueta de 6 histidinas
IMAC	Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
L	Litro
Min	Minuto
mL	Mililitro
MPB	Marcador de pares de bases
MPM	Marcador de peso molecular



ng	Nanogramo
ORF	Marco de lectura abierto
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Proteína recombinante
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidad formadora de colonias
V	Volts
VLP	Virus like particles
VPH	Virus del Papiloma Humano

**RESUMEN****Estudiante: QFB. Guillermo Isaac Guerrero Ramírez Fecha de graduación: Diciembre 2014****Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina****Facultad de Medicina. Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular****Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Área de estudio:**  
**Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética Biotecnología****Título del Estudio: “Producción de la Proteína E2 del virus del Papiloma humano tipo 16 en la levadura *Pichia pastoris*” Número de páginas: 82**

**Introducción:** Los inicios de la ingeniería genética en la década de 1970 resultaron en el establecimiento de una poderosa industria biotecnológica que durante 40 años ha abordado problemáticas en infinidad de campos. Uno de los enfoques, es la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico e industrial. La producción de aquellas de alto valor agregado es de gran interés, porque su concentración en tejidos u organismos es tan baja que la purificación de miligramos de proteína es prácticamente imposible. Existen más de 150 tipos de VPH, dentro de los cuales los más estudiados son el 16 y 18, se han asociado con cerca del 70% de cánceres genitales. La proteína E2 expresada por VPH16 en fases tempranas de la infección, es crítica en el control de la replicación y expresión del genoma viral, lo que supone un punto de potencial diagnóstico oportuno o intervención de la infección. Por lo cual es deseable la producción biotecnológica de la proteína E2 recombinante para el desarrollo de posibles nuevas terapias, métodos de diagnóstico o de prevención. **Objetivo:** Producir la proteína E2 recombinante del Virus del Papiloma Humano tipo 16 en *Pichia pastoris*. **Metodología:** La síntesis del gen E2 optimizado (E2OPT) con codones preferenciales fue a cargo de la compañía GenScript®. La clonación del gen E2 wild type (E2WT) y del gen E2 optimizado fue a partir del amplicón de PCR punto final. La subclonación de los genes en el vector pPIC9/Invitrogen® y su transformación por electroporación se llevó a cabo en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Se fenotipificaron las colonias resultantes por PCR y se realizaron ensayos de expresión a nivel matraz, identificando las proteínas por SDS-PAGE y western-blot con anticuerpos anti etiqueta de histidinas. Se escaló el bioproceso en un biorreactor de 1L de la clona con mayor producción. Y por último se realizó un ensayo de purificación por cromatografía de afinidad con resina de níquel. **Resultados:** Se aumentó el CAI del gen E2OPT de 0.71 a 0.75 y disminuyó el porcentaje de GC de 44.32 a 37.58. Además se eliminaron 10 sitios desestabilizantes del ARNm a lo largo del marco de lectura abierto. Se logró fenotipificar la integración al genoma de *P. pastoris* de 26 y 17 clonas con los genes recombinantes E2OPT y E2WT, respectivamente y posteriormente, se ensayó la producción con 7 clonas de E2OPT y 4 clonas de E2WT. El análisis por SDS-PAGE y western-blot reveló bandas de 49kDa, correspondientes al tamaño esperado de la proteína E2. Se ensayó la purificación y se escaló la producción a biorreactor de 1 litro de la clona con mayor eficiencia de producción de E2OPT, que correspondió a un fenotipo Mut<sup>+</sup>. **Conclusiones:** Se produjo la proteína E2 wild type del VPH tipo 16 a pequeña escala (E2WT), así como también se logró la producción, ensayo de purificación y escalamiento de la versión optimizada con codones preferenciales (E2OPT), en el sistema de expresión de *Pichia. pastoris*.

---

**DR. C. JORGE ÁNGEL ISIDRO ASCACIO MARTÍNEZ**

Director de Tesis



## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Biotecnología

Los inicios de la ingeniería genética en la década de 1970 resultaron en el establecimiento de una poderosa industria biotecnológica que durante 40 años ha abordado problemáticas en infinidad de campos. Uno de los enfoques, es la producción de proteínas recombinantes (en adelante como PR's) para uso terapéutico e industrial. Más de 300 proteínas farmacéuticas y anticuerpos han sido producidos usando tecnologías recombinantes, con ventas en los Estados Unidos por más de \$100 mil millones de dólares [1-4]. En busca de satisfacer la demanda de proteínas recombinantes, existe una necesidad de contar con sistemas de expresión eficientes con alta productividad. Sin embargo, la limitación frecuentemente radica en obtener una cantidad considerable de PR's a un costo suficientemente bajo que permita su comercialización [2].

Un ejemplo clásico del éxito de esta nueva biotecnología moderna, lo constituye la insulina humana para fines terapéuticos. Entre 1922 y 1972, la insulina, estaba comercialmente disponible solo a través de su extracción de páncreas de bovinos y porcinos. La cantidad purificada de un animal, satisfacía los requerimientos de un paciente con diabetes por tan solo tres días [5]. Esto condujo al desarrollo de sistemas de expresión heterólogos para la insulina en distintos hospederos biotecnológicos, siendo el primero donde se logró en *Escherichia coli*. Tottrup y cols. (1990), reportaron haber producido 1500mg/L de





la proteínas superóxido dismutasa humana pro-insulina en *Saccharomyces cerevisiae*. Esto representa que cada litro de cultivo, es mejor que la producción de insulina de 60 animales. Además el hecho de que la insulina recombinante resultó funcional e inmunológicamente idéntica a la insulina humana, garantizaba un uso seguro en pacientes [6].

La producción de PR'S de alto valor terapéutico e industrial es de gran interés, porque su concentración en tejidos u organismos es tan baja que la purificación de miligramos de proteína necesarios para la cristalización y posterior caracterización, es una tarea formidable. Además, son de interés por ser blancos de alto valor en el desarrollo de fármacos contra patógenos, como virus o bacterias [7-11]. Desafortunadamente la expresión de estas proteínas frecuentemente tienen bajo rendimiento y la escasa proteína que se logra producir, es inestable y/o degradada por parte de la maquinaria proteolítica del huésped [11, 12]. Especies de levaduras, particularmente, *Pichia pastoris* y *S. cerevisiae*, ya han sido ampliamente descritas como vectores eficientes para la producción de proteínas recombinantes.

### **1.1.1. Ventajas y desventajas de usar un sistema de expresión eucariota**

La elección del hospedador para la producción de PR's depende principalmente de las propiedades y el uso final de la misma.



*E. coli* aún encabeza la lista de sistemas de expresión para proteínas solubles y proteínas de membrana, tanto de origen procariota como eucariota. [13, 14]. Sin embargo, las rutas de plegamientos procarióticas están lejos de ser las óptimas. Diferencias en la maquinaria de ensamblaje impiden su correcto procesamiento, mientras que la translocación de las proteínas para su plegamiento en el retículo endoplásmico es dirigida por una secuencia de aminoácidos con carga, en los sistemas procarióticos nada de esto ocurre [15]. Además de éstas incompatibilidades, diferencias en la tasa de alargamiento y plegamiento durante la traducción, obstaculizan la expresión de proteínas heterólogas eucarióticas de membrana en hospederos procarióticos [16]. Así pues, si la proteína consiste de múltiples subunidades o requiere substanciales modificaciones post-traduccionales, el hospedador comúnmente es de origen eucariota [17].

Las levaduras son organismos eucarióticos unicelulares usados para producir PR's que no pueden ser expresados en organismos más sencillos como *E. coli*, debido a problemas con el plegamiento y falta de glicosilación adecuada entre otras desventajas. Las levaduras ofrecen ventajas como cepas estables, durabilidad, costo-efectividad, alta densidad de crecimiento, alta productividad, adecuadas para la producción de proteínas etiquetadas y rápido crecimiento en medios químicamente definidos (minerales). Además, presentan un



procesamiento del producto similar a células de mamíferos. Al ser organismos eucarióticos, el retículo endoplásmico cumple un papel importante en el procesamiento post-traducciona l de las proteínas, aunque al mismo tiempo resulta ser un paso limitante en la secreción de éstas [18]. Algunas de las modificaciones post-traduccionales son: formación de puentes disulfuro, acilación, prenilación, fosforilación y ciertos tipos de O- y N-glicosilaciones. [19, 20]

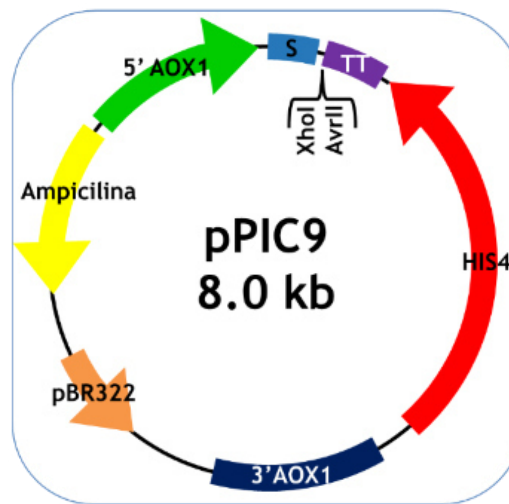
Durante la traducción, el plegamiento y su paso a través de la membrana de la proteína recién sintetizada, requieren estar balanceados para permitir a la proteína encontrar su conformación nativa. La utilización de fuertes promotores nativos del hospedador conduce a altas tasas de transcripción y a potenciar la traducción de la proteína heteróloga, que pueden conducir a la exposición de segmentos hidrofóbicos y así promover su agregación en cuerpos de inclusión [10, 21-23]. Por otro lado, la formación de cuerpos de inclusión reduce la toxicidad al hospedero causada por la expresión de una proteína heteróloga, además de proteger a la proteína contra la degradación por el proteosoma. Sin embargo, la formación de cuerpos de inclusión conlleva la renaturalización de la proteína para poder lograr su correcta conformación tridimensional, un proceso que requiere tiempo, dinero y esfuerzo.



En *P. pastoris* es usado el promotor *AOX1* de la enzima alcohol oxidasa, cuyo promotor es uno muy fuerte que, activado en concentraciones entorno al 0.1% de metanol, eleva su producción hasta el 60% de la proteína total; además está estrechamente regulado por la presencia de glucosa en el medio.

### 1.1.2. Diseño del sistema heterólogo

Los plásmidos son moléculas de ADN de doble hebra que contienen la información del origen de replicación y para varias proteínas. En las bacterias, estas proteínas a menudo están asociadas con la resistencia a los antibióticos. Los fragmentos de ADN de interés se manipulan en plásmidos o en virus. La mayor parte de las manipulaciones del ADN requieren de la bacteria *E. coli*, para la transferencia hacia otros organismos huésped después de la amplificación y análisis. En algunos casos, se han creado vectores especiales que pueden funcionar en dos tipos de huésped. Un ejemplo se encuentra en *P. pastoris*, en la cual una parte del plásmido pPIC9 contiene un gen de selección para *E. coli*, que le confiere resistencia a un antibiótico y en otra parte se encuentra el gen que codifica para la enzima histidonol deshidrogenasa, necesaria para las levaduras recombinantes para sintetizar el aminoácido histidina. (Figura 1) [24, 25].



**Figura 1: Plásmido pPIC9.** Contiene genes de selección que lo dotan de la capacidad de transformar a bacterias y a levaduras.

Cuando se elige un hospedero con capacidad de secretar la PR, es necesario guiarla por medio de la ruta secretora usando un péptidos señal N-terminal, por ejemplo en *S. cerevisiae*, la señal del factor de apareamiento  $\alpha$  o la señal de la proteína fosfatasa ácida [10, 26].

Las proteínas recombinantes sintetizadas en huéspedes heterólogos pueden acumularse en uno de tres compartimientos: en el citoplasma, en el sistema retículo endoplásmico-golgi o en el medio extracelular. Posteriormente deben de ser purificadas de dichos compartimientos. Mientras sea posible, la secreción es la estrategia preferida, ya que permite una purificación eficiente y más sencilla del medio extracelular. Los métodos más comunes para la



purificación de proteínas recombinantes son la adición de residuos de histidina al final de la secuencia aminoacídica o la fusión de la proteína con glutatión-s-transferasa [27, 28], para posteriormente realizar una cromatografía de afinidad en ambos casos. Sin embargo a la fecha, cada sistema de expresión necesita una construcción específica para cumplir los rigurosos requerimientos de cada proteína para asegurar su correcto plegamiento, actividad y rendimiento deseado [29].

Se ha reportado que el mejoramiento de la secreción de proteínas recombinantes puede lograrse por la combinación de tres factores: (i) modificar la cepa hospedera, por ejemplo sobre expresando los genes de las chaperonas, los genes de las proteínas de tráfico y reduciendo la proteólisis intra y extracelulares; (ii) modificando las secuencias de ADN y los sistemas de expresión, por ejemplo las secuencias codificantes de proteínas y las secuencias señal, optimizando los sistemas de expresión (incrementando el número de copias de plásmidos); (iii) optimizando las condiciones ambientales y de cultivo [1, 30]. Por otro lado, la expresión de proteínas recombinantes es mejor, si la proteína de interés tiene alguna proteína homóloga relacionada que sea expresada naturalmente en el hospedero [31].

La pre-inducción celular de biomasa es útil para mejorar la producción de proteínas solubles, sin embargo se ha demostrado que la acumulación de



biomasa no necesariamente conduce al incremento en la producción de proteínas de membrana, debido a que una gran densidad celular durante el cultivo, puede generar estrés celular conduciendo a modificaciones en la composición de la membrana celular [8].

### 1.1.3. Aplicaciones industriales

Sea para fines terapéuticos o industriales, gran parte de la producción de proteínas recombinantes tiene como objeto el comercializarse, por lo que hacer más eficiente la producción y tener un mayor rendimiento es primordial para lograr esto. Batista y cols. (2013) demostraron que el medio enriquecido con extracto de frijol es un sustituto perfecto para los medios ricos en peptona como fuente de nitrógeno. Su estudio muestra un incremento del 43% en el crecimiento de *S. cerevisiae* y un aumento del 85% en la expresión de una PR en *P. pastoris* [32].

No sólo la biotecnología ayuda a obtener un mayor rendimiento en la producción de algún producto, en ocasiones es importante para la prevención de agentes patológicos que afectan a animales de granja o de consumo humano. Un ejemplo es el *betanodavirus* conocido como virus de necrosis nerviosa (NNV, por sus siglas en inglés) y que infecta más de 20 especies de peces a lo largo de Asia, Europa y Australia, causando epidemias con altas tasas de mortalidad. Su genoma a base de ARN, codifica para una replicasa viral y una proteína de la



cápside, que es de interés para el desarrollo de fármacos o vacunas. Sistemas de expresión en células de insectos y células procariotas como *E. coli*, han sido desarrollados para la producción de partículas semejantes a virus (VLP's, por sus siglas en inglés), representando los candidatos idóneos para el desarrollo de vacunas, debido a que en pequeñas cantidades pueden conducir a una respuesta inmune. Sin embargo, los métodos de purificación de laboratorio desarrollados junto con el sistema de expresión, ultracentrifugación en sacarosa o cloruro de cesio, no son adecuados para una producción a escala industrial. Métodos cromatográficos de purificación son necesarios, para hacer posible el escalamiento de vacunas. [33]

## 1.2. Virus del Papiloma Humano

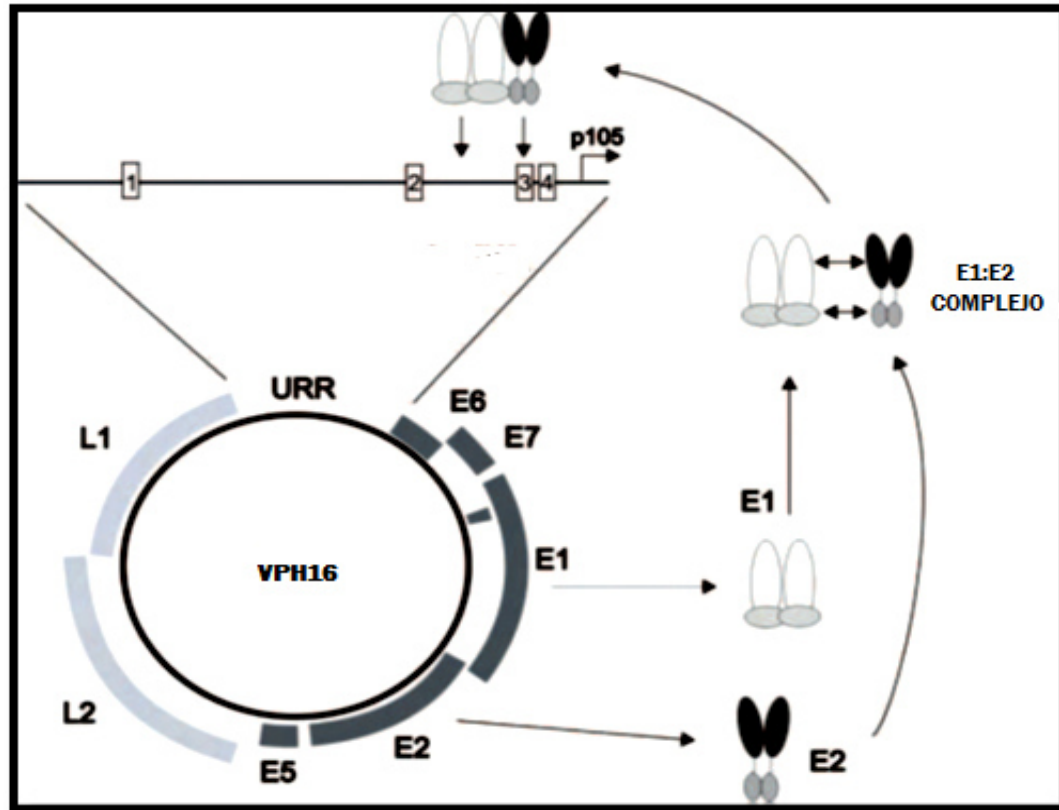
Existen cerca de 150 tipos diferentes del Papilomavirus, clasificados de acuerdo a la similitud de sus secuencias nucleotídicas. [34] Los Virus del Papiloma Humano (VPH) que infectan el epitelio genital pertenecen al subgrupo A (alphapapillomaviruses) y se subclasifican en tipos de bajo y alto riesgo, dependiendo a su potencial oncogénico. Los tipos de VPH más estudiados son el 16 y 18, los cuales se han asociado con cerca del 70% de cánceres genitales [35, 36].

El VPH es un virus pequeño, no envuelto, con un genoma a base de ADN de doble cadena, que infecta a una variedad amplia de especies de vertebrados





e induce lesiones proliferativas en sus huéspedes. El genoma del VPH es de aproximadamente 8000 pares de bases. Contiene una región de 600 a 900pb llamada URR (upstream regulatory region) o LCR (long control region) debido a que contiene sitios de unión a factores de transcripción, potenciadores y el origen de replicación (Figura 2). También consta de una región que contiene los genes tempranos (Early región o E) y una región con los genes tardíos (Late región o L). El genoma circular del VPH, contiene ocho marcos abiertos de lectura (Open Reading Frames, ORFs) y un sitio de poli adenilación que es encontrado río abajo de cada región codificantes, E y L. [37]

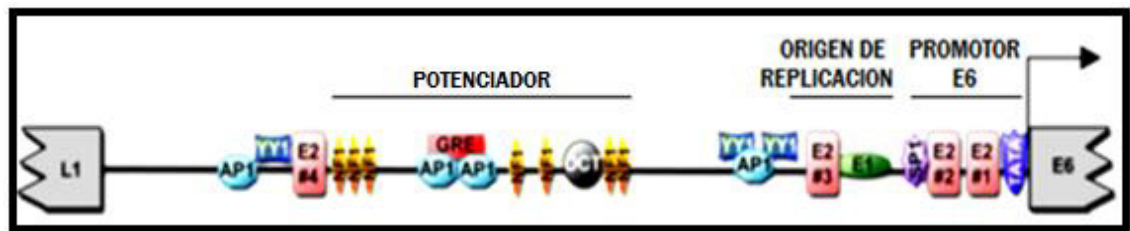


**Figura 2: Organización del genoma circular del VP18.** El complejo formado por E1 y E1 reconoce el origen de replicación, sitios de unión a factores de transcripción y enhancers, en su región URR, controlando así la replicación del VPH.

La proteína E2 consta de 350 a 500 aminoácidos conformando dos dominios moleculares conservados y uno no conservado. El dominio N-terminal de aproximadamente 200 aminoácidos es referido como dominio TAD (Trans-Activation Domain) y el dominio C-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos es referido como dominio DBD (DNA Binding Domain). Ambos

dominios se encuentran separados por una región “bisagra” no conservada y de una longitud variable de acuerdo al tipo de VPH’s [35].

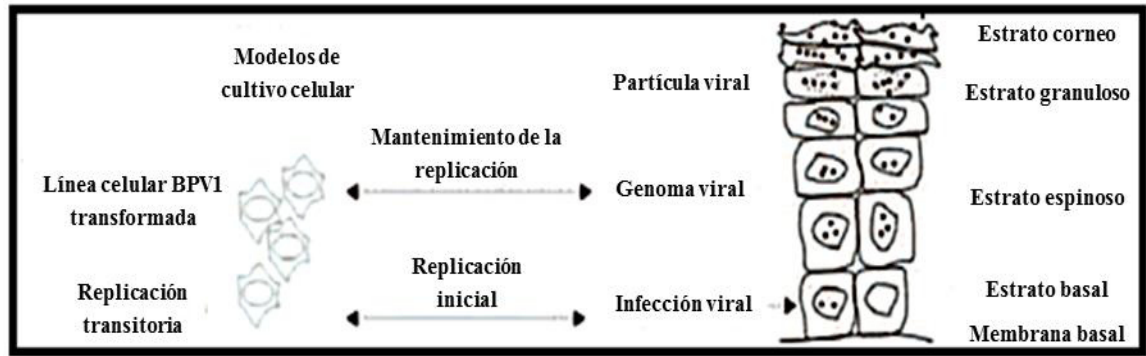
La transcripción del VPH es compleja e involucra el uso de diferentes promotores, perfiles de múltiples splicing y producción de distintas especies de ARNm en diferentes células. Los virus de alto riesgo como el VPH 16 contienen un solo promotor temprano que es activado tras la unión de factores de transcripción celulares. Además de sitios de unión a factores de transcripción celulares, la región URR/LCR contiene sitios de unión a las proteínas virales E1 y E2 [38]. E2 en su sitio DBS reconoce secuencias de ADN palindrómicas (ACCGN<sub>4</sub>CGGT), designadas como E2BS (E2 binding sites). Al menos cuatro E2BS están localizados dentro de la región URR/LCR de todos los VPH (Figura 3). [35]



**Figura 3: LCR (Long Control Region) del VPH.** En la región LCR se encuentran sitios de reconocimiento para factores de transcripción (óvalos) y sitios de reconocimiento para el complejo dimérico E2 (cajas).



El VPH completa su ciclo de replicación en los queratinocitos epiteliales. Los viriones entran al tejido epitelial a través de microlesiones e infectan las células basales, probablemente células madre, en un número bajo de copias. Posteriormente, los viriones del VPH migran a los núcleos celulares y establecen sus genomas como episomas. El promotor temprano es activado y las proteínas tempranas E1 y E2 son traducidas, iniciando así la síntesis de ADN viral e incrementar el número de copias de episomas virales 100 genomas por célula. La expresión de genes tardíos inicia la traducción de proteínas de la cápside y el ensamblaje es estrechamente acoplado al proceso de diferenciación del tejido epitelial. [39] Al entrar los queratinocitos a diferenciación, la amplificación del genoma viral es iniciada, alcanzando al menos 1000 copias por célula, a la par de la expresión de los genes tardíos que codifican las proteínas de la cápside viral. El ADN viral es ensamblado dentro de los viriones, los cuales son liberados al medio extracelular con la muerte de las células infectadas después de haber alcanzado la superficie del epitelio (Figura 4) [40].



**Figura 4: Ciclo viral del VPH en modelos celulares.** Representación esquemática del proceso de replicación del VPH en modelos celulares a través de las estructuras del epitelio.

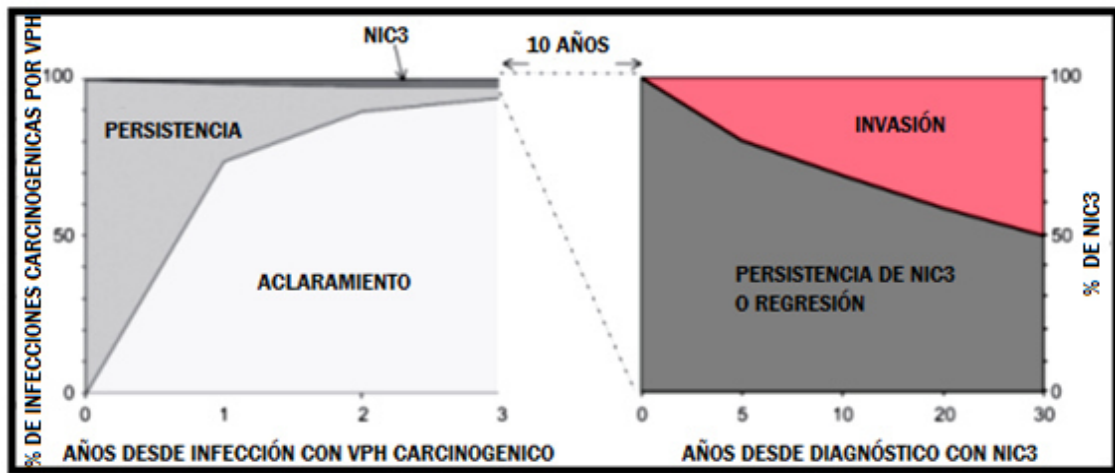
### 1.3. Antecedentes

El cáncer de cérvix ocurre en dos formas predominantes: carcinoma escamoso y adenocarcinoma. El tipo histológico más comúnmente encontrado en las mujeres es el carcinoma escamoso (80% de los casos) y está más frecuentemente asociado al VPH 16. El adenocarcinoma es el segundo tipo histológico más común y aunque el VPH 16 también es el más frecuente, la proporción de los genotipos 18 y 45 aumenta significativamente en este tipo de tumores. [41] El adenocarcinoma es más difícil de detectar por Papanicolau que el carcinoma escamoso. [42]

Muchos tipos de VPH inducen solamente lesiones benignas y no se asocian a cáncer humano. En dichas lesiones, la expresión de los productos de



los genes virales se encuentra cuidadosamente regulada, de modo que las proteínas virales se expresan en momentos definidos y en cantidades controladas a medida que la célula infectada migra hacia la superficie epitelial. Los eventos que dan lugar a la producción de partículas virales en las capas superiores del epitelio, parecen ser comunes tanto en virus de alto como de bajo riesgo oncogénico. De esta manera, el cáncer es una consecuencia poco frecuente de la infección por VPH y los eventos iniciales que conducen a la transformación maligna por virus oncogénicos no están del todo esclarecidos. Una posibilidad es que la zona de transformación del cérvix es un sitio del epitelio donde los VPH de alto riesgo no logran regular apropiadamente su ciclo productivo; por lo tanto, la variación tanto en el nivel de expresión de las proteínas virales, como del momento en que esta expresión ocurre, puede repercutir en el desarrollo de cánceres en estos sitios. El cáncer cervical es comúnmente la culminación de un proceso de décadas que comienza con la infección por un VPH carcinogénico (Figura 5). [43, 44]



**Figura 5: Riesgo de la persistencia y progresión del VPH.** Gráfico Izquierdo: Proporción de infecciones por VPH que son aclaradas o que persisten en los primeros años inmediatos a la infección por un VPH carcinogénico. Gráfico derecho: Proporción de lesiones persistentes que desarrollan metástasis aproximadamente 10 años después de la infección por un VPH carcinogénico.

Los estudios de citología, que incluyen a la prueba Papanicolau convencional, se utilizan para detectar lesiones precancerosas. Estas pruebas han conducido a una reducción considerable de la mortalidad de cáncer cervical. Sin embargo, debido al criterio subjetivo de las pruebas, a la alta tasa de falsos negativos (hasta 50%) y falsos positivos, existe la incapacidad de identificar el 100% de personas infectadas con VPH.



Métodos basados en ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) o la captura de ADN híbrido, han sido desarrollados, pero no son primordialmente ideales debido a su alto costo, procedimientos de operación y requerimientos de equipo y material, así como de personal capacitado; además de que la presencia de material genético de los virus no es concluyente para el diagnóstico de lesiones neoplásicas. [43] Por ello se siguen desarrollando métodos que sean sencillos, sensibles, específicos, de bajo costo y que puedan realizarse por el propio médico especialista durante una consulta médica.





## CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN

La proteína E2, expresada en fases tempranas de la infección por VPH16, además de su papel en el control de la expresión del genoma viral, supone un punto de potencial diagnóstico oportuno o intervención de la infección. Por lo cual es deseable la producción biotecnológica de la proteína E2 para el desarrollo de posibles nuevas terapias, métodos de diagnóstico o de prevención.



## CAPÍTULO III: OBJETIVOS Y ESTRATEGÍA GENERAL

### 3.1. Objetivo general

Producir la proteína E2 recombinante del Virus del Papiloma Humano tipo 16 en *Pichia pastoris*

### 3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Diseñar y construir el plásmido pPIC9-E2.

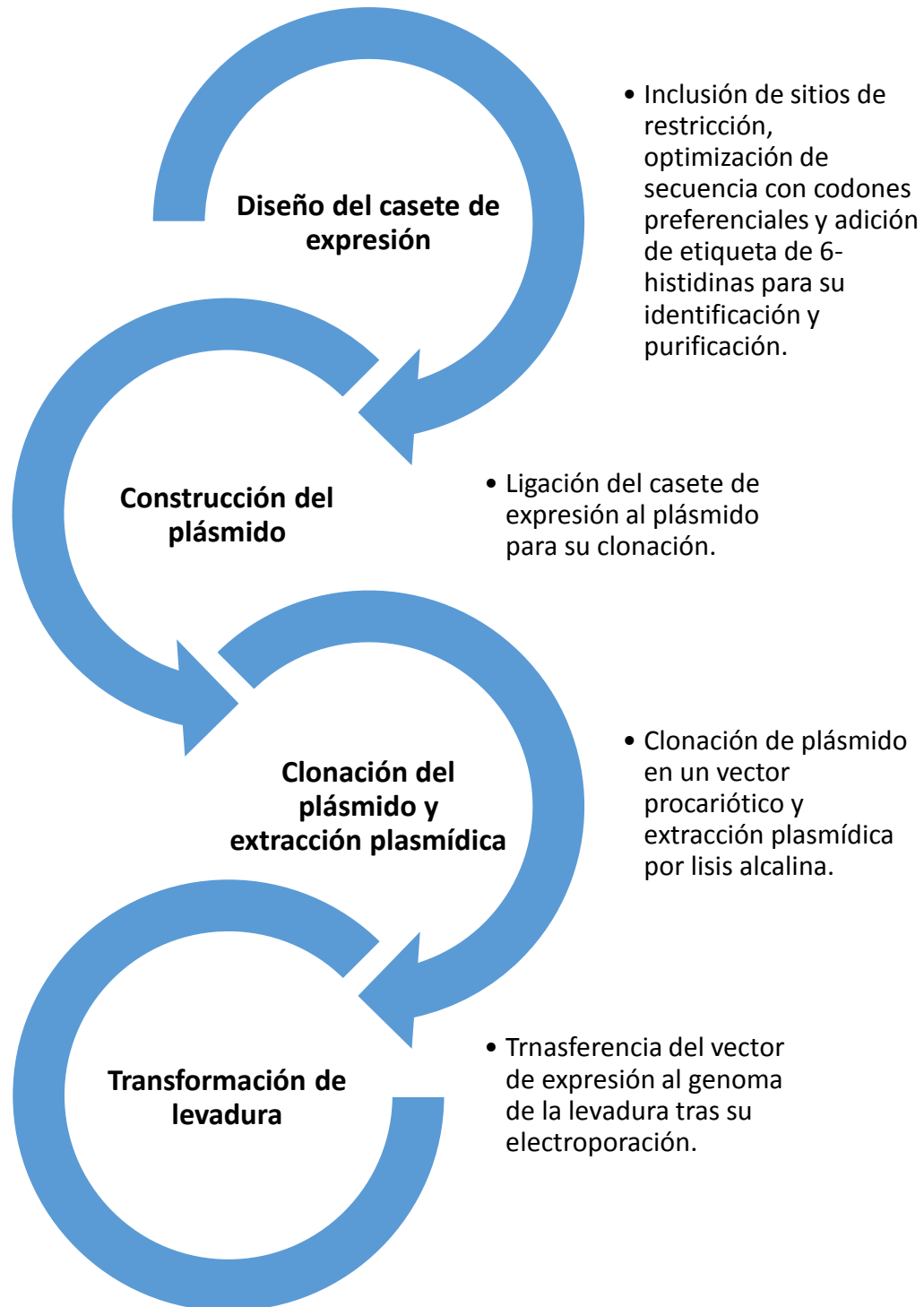
3.2.2. Generar clonas productoras de la proteína E2 en *Pichia pastoris* a pequeña escala.

3.2.3. Escalar de la producción la mejores clonas de E2 recombinante en biorreactor.

3.2.4. Desarrollar el protocolo de purificación de E2 por cromatografía de afinidad.

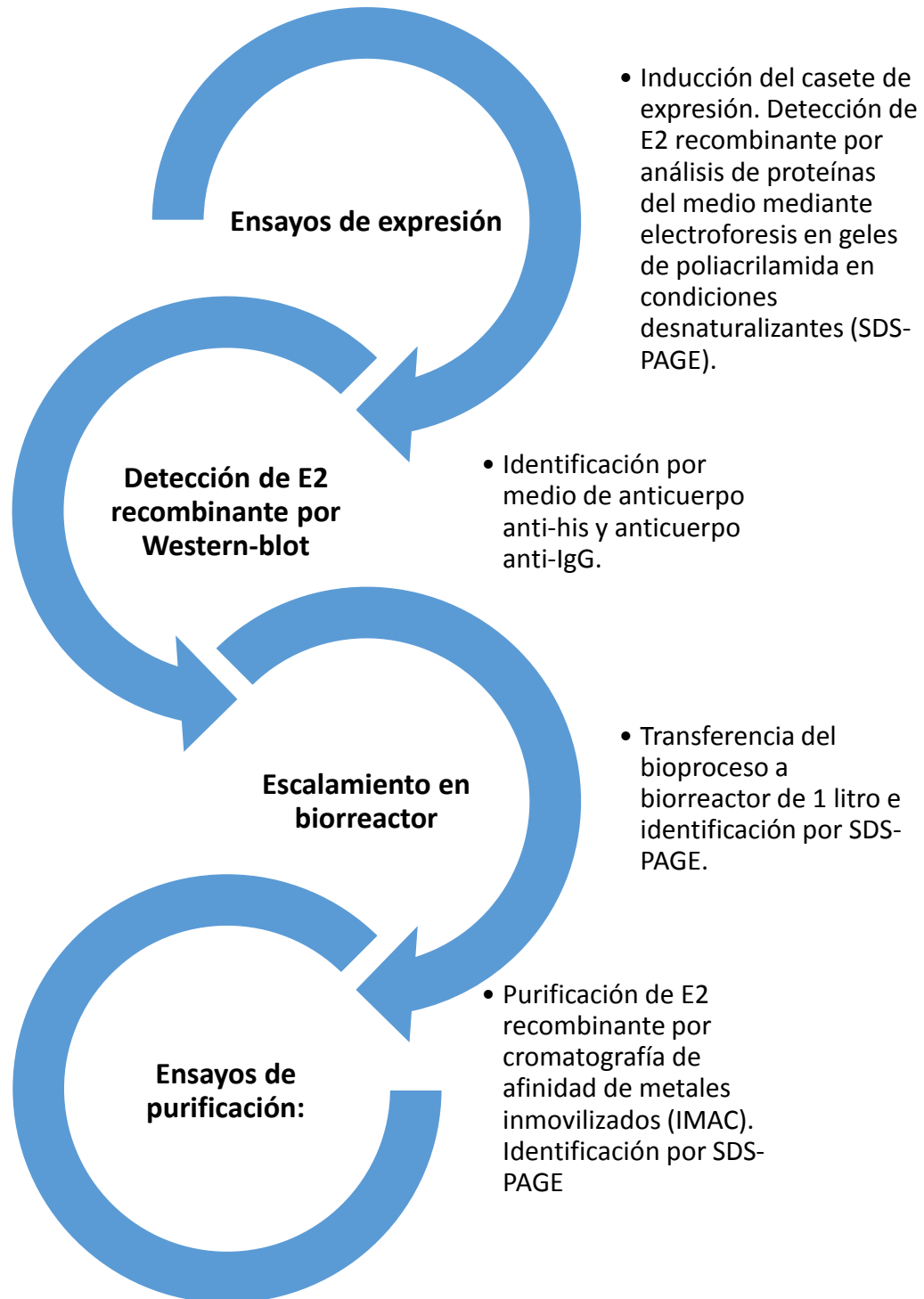


### 3.3. Estrategia General Parte I





### 3.4. Estrategia General Parte II





## CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA

### 4.1. Objetivo I

#### 4.1.1. Extracción plasmídica por el método de lisis alcalina (Miniprep's)

- i. Inocular colonias de bacterias transformadas en 4 mL medio LB con antibiótico. Incubar por 16 horas / 37°C con agitación.
- ii. Tomar 2mL del medio incubado y transferir a tubo Eppendorf de 2mL. Centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.
- iii. Decantar el medio y añadir 100µL de solución I (50mM glucosa, 10mM EDTA, 25mM Trisi-HCl pH 8). Resuspender e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
- iv. Agregar 200µL de solución II (1M NaOH, 1% SDS) preparada en el momento; mezclar por inversión e incubar por 5 minutos en hielo.
- v. Agregar 150µL de solución III (Acetato de sodio 3M) y mezclar por inversión; incubar 10 minutos en hielo.
- vi. Centrifugar por 6 minutos a 13,000 rpm y transferir el sobrenadante a tubos de 2mL.
- vii. Añadir ½ volumen de fenol y ½ volumen de cloroformo. Mezclar con vortex por 30 segundos.
- viii. Centrifugar 4 minutos a 13,000 rpm y transferir la fase acuosa a tubos de 1.5mL.



- ix. Añadir 0.6 volúmenes de isopropanol (100%) frío, mezclar por inversión e incubar por 30 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- x. Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm y decantar sin perder la pastilla de ADN.
- xi. Realizar un lavado con 600 $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. Secar la pastilla a  $50^{\circ}\text{C}$  o en evaporador centrífugo durante 10min.
- xii. Resuspender en 50-100 $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas con RNAsa (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

#### **4.1.2. Preparación de bacterias calcio competentes**

- i. Inocular una colonia de bacteria en 4mL de medio LB. Crecer durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Tomar un inóculo de una proporción de 1:100 de la cantidad de medio a crecer e inocular matraz con medio. Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación hasta  $\text{DO}=0.4-0.6$ .
- ii. Enfriar células en un baño de hielo por 10min. Transferir células a tubos falcon de 50mL estériles pre-enfriados.
- iii. Centrifugar por 5min a 5,000rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Decantar sobrenadante y agregar 20mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1M frío e incubar en hielo por 40min.
- iv. Centrifugar por 5min a 5,000rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ . Decantar sobrenadante y resuspender en 2mL de  $\text{CaCl}_2$  0.1M con 15% de glicerol.
- v. Alicuotar 100 $\mu\text{L}$  de bacterias en microtubos de 1.5mL. Almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



### 4.1.3. Transformación de bacterias calciocompetentes

- i. Tomar una alícuota de células calciocompetentes (100µL) y agregar de 5 a 20ng de ADN plasmídico.
- ii. Mezclar e incubar en hielo por 40 minutos, mezclando cada 10 minutos.
- iii. Dar un choque térmico a 42°C por 2 minutos. Después agregar 400µL de medio LB e incubar a 37°C por 30 minutos con agitación moderada (250rpm).
- iv. Tomar 250µL y sembrar por extensión en placas de LB con antibiótico.
- v. Incubar a 37°C por 24 horas.
- vi. Revisar crecimiento de colonias y analizar por PCR y miniprep's.

## 4.2. Objetivo II

### 4.2.1. Preparación de levaduras electrocompetentes

- i. Inocular una colonia de levaduras en 4mL de medio YPD. Crecer durante toda la noche a 30°C. Tomar un inóculo de una proporción de 1:100 de la cantidad de medio a crecer e inocular matraz con medio YPD. Incubar a 30°C con agitación hasta DO=0.7-1.0.
- ii. Enfriar las levaduras en un baño de hielo por 10min. Transferir las levaduras a tubos falcon de 50mL estériles pre-enfriados.
- iii. Centrifugar por 10min a 5,000rpm a 4°C. Decantar sobrenadante y resuspender pellet al vortex en 10mL de agua destilada estéril fría.



- iv. Centrifugar por 10min a 5,000 rpm a 4°C. Decantar y repetir lavado anterior.
- v. Después de dos lavados con agua estéril fría, lavar dos veces con 10mL de sorbitol 1M frío estéril.
- vi. Centrifugar por 10min a 5,000 rpm a 4°C y resuspender pellet al vortex en 2mL de sorbitol 1M frío estéril. Alicuotar en tubos de 0.6mL 100µL de células. Congelar a -80°C.

#### **4.2.2. Transformación de levaduras electrocompetentes**

- i. Ajustar electroporador a 2.5kV, 25µF y 200Ω
- ii. Añadir 1 a 10µg de ADN plasmídico linearizado a una alícuota de levaduras electrocompetentes. Mezclar con pipeta para homogenizar.
- iii. Colocar cubeta de electroporación (pre-enfriada durante 10min) en la cámara del electroporador. Aplicar pulso y anotar la deriva del pulso. Inmediatamente agregar 400µL de medio sorbitol 1M, homogenizar con la pipeta y transferir a un microtubo de 1.5mL estéril.
- iv. Plaquear 250µL de células transformadas en una laca de MD. Incubar la placa a 30°C durante 3 a 4 días.
- v. Observar crecimiento de colonias y revisar integración por PCR.





### 4.2.3. Inducción de proteínas

- i. Inocular una asada en tubos falcon de 50mL con 10mL de medio YPD, las colonias elegidas para inducir.
- ii. Dejar creciendo a 30°C hasta alcanzar una DO entre 5 unidades.
- iii. Centrifugar por 10min a 5,000 rpm. Decantar sobrenadante y resuspender pellet al vortex en 10mL de agua destilada estéril fría.
- iv. Centrifugar por 10min a 5,000 rpm. Decantar y repetir lavado anterior dos veces más.
- v. Agregar 10mL de medio inductor BMMY y resuspender pellet.
- vi. Incubar con agitación vigorosa a 30°C durante 3 o 4 días.
- vii. Agregar 1% de metanol cada 24 horas  $\pm$  1 hora durante el tiempo de inducción.
- viii. Terminado el tiempo de inducción, centrifugar por 10min a 5,000 rpm a 4°C. Pasar sobrenadante a membranas de diálisis.
- ix. Sellar membranas con pinzas en cada extremo, teniendo cuidado de dejar libre al menos 1cm de membrana, ya que durante la diálisis, la muestra incrementara su volumen. Colocarlas en un vaso de precipitado de 5L.
- x. Agregar agua destilada fría y colocar en plancha de agitación con un magneto a velocidad moderada.
- xi. Realizar cambios de agua a las 2, 4 y 12 horas.
- xii. Transferir el dializado a un tubo falcon de 15mL. Tomar 500 $\mu$ L de muestra, precipitar proteínas por metanol-cloroformo y analizar por SDS-PAGE.



#### 4.2.4. Precipitación de proteínas

- i. Agregar 500µL de muestra (medio de cultivo sin células), a un microtubo de 2mL. Adicionar 600µL de metanol y 450µL de cloroformo.
- ii. Mezclar por inversión durante 1 minuto. Centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos.
- iii. Retirar la fase superior teniendo cuidado de no tocar la fase intermedia (fase turbia entre la inferior y superior, pero verla depende la concentración de proteína). Conservar fase inferior e intermedia.
- iv. Agregar 600µL de metanol y mezclar por inversión durante 1 minuto.
- v. Centrifugar a 12,000 rpm por 7 minutos. Retirar sobrenadante y dejar secar la pastilla a 50 grados o en un evaporador centrifugo durante 10 minutos. Se pueden volver a agregar 500µL de muestra y comenzar el protocolo para precipitar mayor cantidad de proteína.

Nota: Usar reactivos fríos aumenta la eficiencia de precipitación.

#### 4.2.5. Geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

- i. Lavar vidrios con alcohol al 70% y secar sin dejar ninguna fibra. Ensamblar el sándwich con los vidrios en las pinzas y montarlo sobre las gomas en el contenedor portavidrios. Asegurarse de que este bien sellado. Puede usarse etanol al 100% para verificar si hay fuga.
- ii. En dos tubos falcon de 15mL limpios, preparar las soluciones del gel separador y concentrador como se indica en las Tabla 1 y 2. No agregar



el persulfato de amonio (PSA) ni el TEMED hasta que se vaya a vaciar la solución dentro de los cristales.

**Tabla 1:** Gel de poliacrilamida separador al 12%

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Agua destilada	1.7 mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	1.25 mL
SDS 10%	0.025 mL
Acrilamida-bisacrilamida (30%:0-8%)	2 mL
Persulfato de amonio 10%	0.1 mL
TEMED	0.007 mL

**Tabla 2:** Gel de poliacrilamida concentrador al 4%

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Agua destilada	1.845 mL
Tris-HCl 1.5M pH 8.8	0.75 mL
SDS 10%	0.015 mL
Acrilamida-bisacrilamida (30%:0-8%)	0.402 mL
Persulfato de amonio 10%	0.05 mL
TEMED	0.005 mL



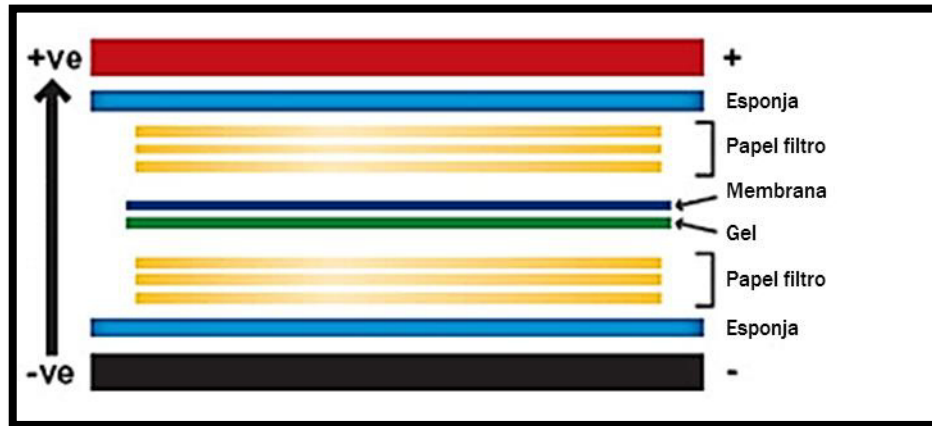
- iii. Agregar el PSA al 10% y el TEMED a la solución del gel separador y homogenizar con la micropipeta. Vaciar solución con la micropipeta en el espacio entre los dos vidrios, por una esquina y llenar hasta dejar entre 1 y 1.5cm. Agregar isoporpanol o etanol al 100% hasta llenar para eliminar burbujas y aplanar la frontera del gel.
- iv. Dejar polimerizar de 10 a 15 minutos. Retirar el isopropanol invirtiendo el contenedor portavidrios.
- v. Agregar el PSA al 10% y el TEMED a la solución del gel concentrador y homogenizar con la micropipeta. Vaciar la solución con la micropipeta en encima del gel separador hasta el borde de los cristales. Colocar el peine cuidando de no dejar burbujas. Rellenar con más solución si es necesario.
- vi. Dejar polimerizar de 15 a 30mins.
- vii. Una vez polimerizado el gel, remover cuidadosamente los peines y retirar los cristales del portavidrios y de las pinzas teniendo cuidado de no despegar los vidrios. Montarlos en la base para la cámara de electroforesis y llenar tanto el espacio interno entre los geles, como el resto de la cámara con buffer de corrida.
- viii. Preparar las muestras biológicas agregando buffer de carga 1x en muestras sólidas y 2x en muestras líquidas en una relación 1:1. La cantidad varía dependiendo la concentración de proteínas. Para muestras de expresión de proteínas recombinantes, previamente dializadas y



- precipitadas, se adicionan aproximadamente 20 $\mu$ L y se resuspenden las muestras al vortex.
- ix. Calentar hasta 95°C durante 10 minutos. Centrifugar 13,000 rpm por 4 minutos y cargar el sobrenadante a los carriles del gel.
  - x. Conectar los electrodos de la cámara de electroforesis a una fuente de poder y correr a 80V durante hasta que las muestras se apilen en la frontera entre el gel concentrador y el gel separador. Aumentar a 100 o 120V hasta que se consiga la separación deseada de las proteínas.
  - xi. Una vez terminada la corrida, desensamblar la cámara y recuperar los geles. Situarlos en contenedores que permiten la oscilación de la solución azul de Coomassie durante 4 horas o durante toda la noche.
  - xii. Retirar la solución de azul de Coomassie y agregar solución de desteñimiento. Si se cambia la solución de desteñidora varias ocasiones, el tiempo de destinción de disminuye rápidamente.
  - xiii. Tomar foto en fotodocumentador.

#### 4.2.6. Western-blot

- i. Realizar un SDS-AGE por duplicado, cargando muestras en mismo orden.
- ii. Terminado el SDS-PAGE, teñir uno de los geles con azul de Coomassie. El otro gel será transferido a la membrana de nitrocelulosa.
- iii. Cortar 4 papeles filtro Whatman y la membrana de nitrocelulosa al tamaño del gel. Ensamblar el sándwich como se indica en la figura 6:



**Figura 6: Esquema Western-blot.** Ensamblaje del sándwich para la transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa. Nota: Todo el ensamblaje debe hacerse en húmedo con buffer de transferencia.

- iv. Montar cámara de transferencia con buffer de transferencia frío. Realizar la transferencia a 100V durante 2 horas a 4°C
- v. Una vez terminada la transferencia, desensamblar el sándwich y teñir con azul de Coomassie el gel transferido.
- vi. Lavar la membrana de nitrocelulosa dos veces con PBS por 5 minutos.
- vii. Incubar la membrana con solución de bloqueo por 3 horas o por toda la noche a 4°C.
- viii. Lavar la membrana dos veces con TPBS durante 5 a 10 minutos.
- ix. Incubar la membrana por 2 horas con la solución del anticuerpo primario a una dilución 1:1000 a 4°C.



- x. Lavar la membrana dos veces con TPBS durante 5 a 10 minutos.
- xi. Incubar la membrana por 2 horas con la solución del anticuerpo secundario a una dilución 1:3000 a 4°C.
- xii. Lavar la membrana dos veces con TPBS durante 5 a 10 minutos.
- xiii. Hacer un último lavado con PBS para remover el tween 20.
- xiv. Retirar el PBS y bañar la membrana con la solución de quimioluminiscencia (750µL Peróxido de Hidrogeno y 750µL de Luminol) durante 1 minuto.
- xv. Colocar la membrana entre dos acetatos tratando de no dejar burbujas.
- xvi. En un cuarto oscuro, poner sobre los acetatos una placa de radiografía (Kodak Biomax) y dejar pasar 10 minutos.
- xvii. Sumergir placa en solución fijadora y revelante (Soluciones Kodak GBX) durante 15 segundos sucesivamente.
- xviii. Tomar fotografía en el fotodocumentador.

### **4.3. Objetivo III**

#### **4.3.1. Escalamiento a biorreactor**

- i. Prepara el biorreactor con 250mL de medio inductor base-BMMY y esterilizarlo. Agregar la cantidad necesaria de biotina, metanol y buffer de fosfatos por uno de los puertos de alimentación en condiciones estériles.



- ii. Inocular en 40mL de medio YPD, una asada de la colonia de interés. Dejar creciendo por toda la noche para que genere una biomasa de aproximadamente 5 unidades.
- iii. Centrifugar por 10min a 5,000 rpm a 4°C. Decantar sobrenadante y resuspender pellet al vortex en 10mL de agua destilada estéril fría.
- iv. Centrifugar por 10min a 5,000 rpm a 4°C. Decantar y repetir lavado anteriores dos veces más.
- v. Resuspender en 10mL de agua (o el menor volumen posible) el pellet de levaduras y agregarlo al biorreactor por uno de los puertos de alimentación en condiciones estériles.
- vi. Conectar el biorreactor a la consola y comenzar la fermentación a una agitación de 200rpm. Monitorear la temperatura, pH y oxígeno disuelto. Si hay presencia de espuma, agregar una a dos gotas de antiespumante.
- vii. Tomar 4mL de muestra por el puerto de cosecha y depositarlo en un microtubo de 2mL. Centrifugar por 3 minutos a 13,000rpm y transferir el medio de cultivo a un nuevo microtubo. Congelar para analizar posteriormente. Repetir toma de muestra cada 24 horas durante el tiempo de inducción.
- viii. Ajustar la agitación a 300rpm a las 24 horas y a 400rpm a las 48 horas, para compensar la oxigenación con el aumento de biomasa y evitar sedimentación.





- ix. Dializar muestras recolectadas, precipitar proteínas y analizar por SDS-PAGE.

#### **4.4. Objetivo IV**

##### **4.4.1. Purificación de proteínas**

- i. Realizar una triple precipitación del dializado de la muestra a purificar y resuspender en 400  $\mu$ L buffer de pH8.
- ii. Tomar 200  $\mu$ L e incubar durante 30 minutos con 50  $\mu$ L de resina homogenizada. Los 200  $\mu$ L restantes serán el control antes de purificar.
- iii. Pasados los 30 minutos, centrifugar durante 10 segundos a 13,000 rpm, retirar sobrenadante y poner en un tubo de 2 mL. Esta fracción es llamada SN (sobrenadante).
- iv. Realizar dos lavados agregando buffer pH 6.3 e invirtiendo durante 10 minutos. Retirar sobrenadantes y transferirlos tubos nuevos de 2 mL. Fracciones L1 y L2.
- v. Realizar 3 eluciones agregando buffer pH 4 y vortexeando durante 30 segundos. Retirar sobrenadantes y transferirlos a tubos nuevos de 2 mL. Fracciones E1, E2 y E3.
- vi. Realizar precipitación de todas las fracciones y analizar por SDS-PAGE.



## CAPÍTULO V: RESULTADOS

### 5.1. Objetivo I

#### 5.1.1. Diseño del casete de expresión del gen E2-VP16 wild type

El gen E2-VP16 silvestre o wild type (en adelante como E2WT) se encontraba disponible en el laboratorio de biotecnología en un plásmido de propagación PUC. Sin embargo, éste carecía de los sitios de restricción *XhoI* y *AvrII* que serían utilizados para la clonación de la secuencia en el plásmido de expresión pPIC9. Por lo cual, fueron diseñados primers que amplificaran el marco de lectura abierta de E2WT y que contuvieran los elementos que son requeridos para su clonación y expresión en el sistema de recombinante. A continuación se muestra la secuencia de E2WT de referencia descargada del NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés) con el número de acceso AF534061:

```
ATGGAGACTCTTTGCCAACGTTTAAATGTGTGTCAGGACAAAATACTAACACATTATGAAAATGATAGTAC
AAACCTACGTGACCATATAGACTATTGGAAACACATGCGCCTAGAATGTGCTATTTATTACAAGGCCAGAG
AAATGGGATTTAAACATATTAACCACCAGGTGGTGCCAACACTGGCTGTATCAAAGAATAAAGCATTACAA
GCAATTGAACTGCAACTAACGTTAGAAACAATATATAACCCACAATATAGTAATGAAAAGTGGACATTACA
AGACGTTAGCCTTGAAGTGTATTTAACTGCACCAACAGGATGTATAAAAAACATGGATATACAGTGGAAAG
TGCAGTTTGATGGAGACATATGCAATACAATGCATTATACAAACTGGAAACATATATATATTTGTGAAGAA
GCATCAGTAACTGTGGTAGAGGGTCAAGTTGACTATTATGGTTTATATTATGTTTCATGAAGGAATACAAAC
ATATTTTGTGCAGTTTAAAGATGATGCAGAAAAATATAGTAAAAATAAAGTATGGGAAGTTCATGCGGGTG
GTCAGGTAATATTATGTCCTACATCTGTGTTTAGCAGCAACGAAGTATCCTCTCCTGAAACTATTAGGCAG
CACTTGGCCAACCACTCCGCCGCGACCCATACCAAAGCCGTCGCCCTTGGGCACCAAAGAAACACAGACGAC
TATCCAGCGACCAAGATCAGAGCCAGACACCGGAGACCCCTGCCACACCACTAAGTTGCTGCACAGAGACT
CAGTGGACAGTACTCCAATCCTCACTGCATTTAACAGCTCACACAAAGGACGGATTAAGTGAATAGTAAC
ACTACACCCATAGTACATTTAAAAGGTGATGCTAATACTTTAAAATGTTTAAAGATATAGATTTAAAAGCA
TTGTAATTGTATACTGCAGTGTCTCATGTCATTGGACAGGACATAATGTAACATAAAAAGTGCAA
```



TTGTTACACTTACATATGATAGTGAATGGCAACGTGAACAATTTTTGTCTCAAGTTAAAATACCAAAA  
ACTATTACAGTGTCTACTGGATTTATGTCTATA TGA

En base a esta secuencia se diseñaron primers que hibridan 15 pares en los extremos 5' y 3' y que además contienen las secuencias de clonación y expresión siguientes:

- Sitio de restricción *Xho*I (extremo 5'): CTCGAG
- Secuencia para escisión de secuencia señal: AAAAGA
- Etiqueta de histidinas: CATCATCATCATCATCAT
- Sitio de restricción *Avr*II (extremo 3'): CCTAGG

Adicionando estas secuencias a las 15 pares de bases propias del marco de lectura (ATGGAGACTCTTTGC) y agregando 3 pares de bases más a los extremos, para que la DNA polimerasa pueda situarse correctamente en la cadena de ADN durante la amplificación por PCR, se consiguió diseñar los siguientes primers:

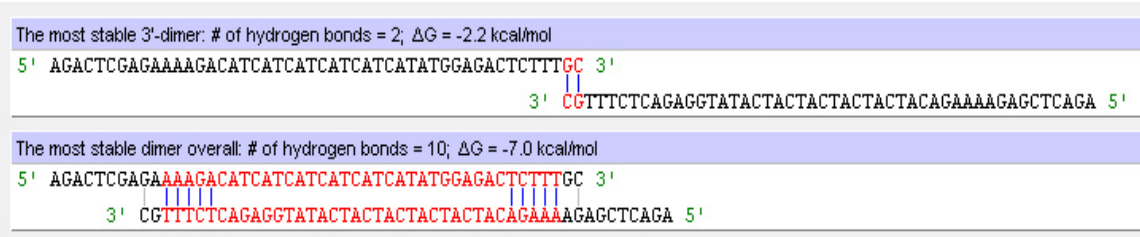
Primer forward 5'→3':

AGACTCGAGAAAAGACATCATCATCATCATATGGAGACTCTTTGC

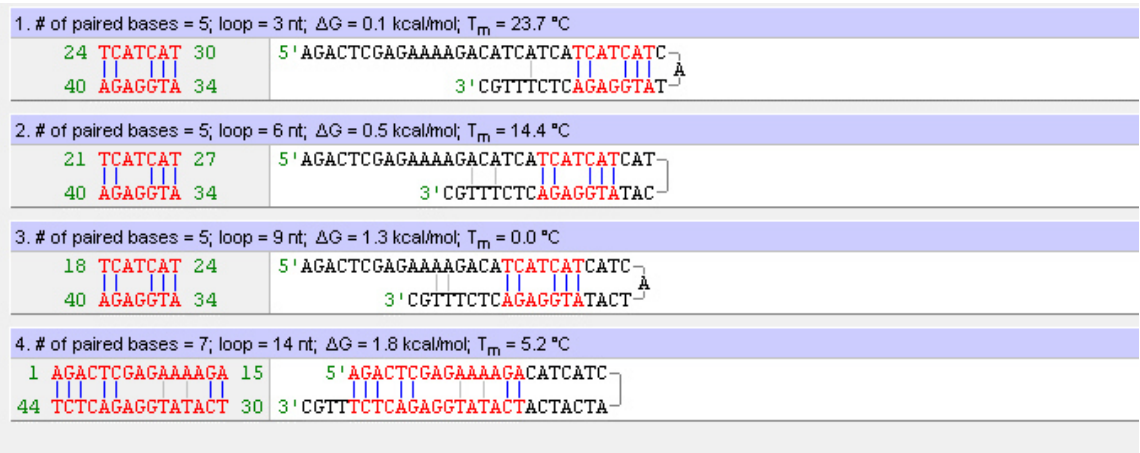
Primer reverse 5'→3': AGACCTAGGTCATATAGACATAAA

Mediante el software Oligo7 se analizaron las estructuras secundarias de los primers diseñados

- Primer forward

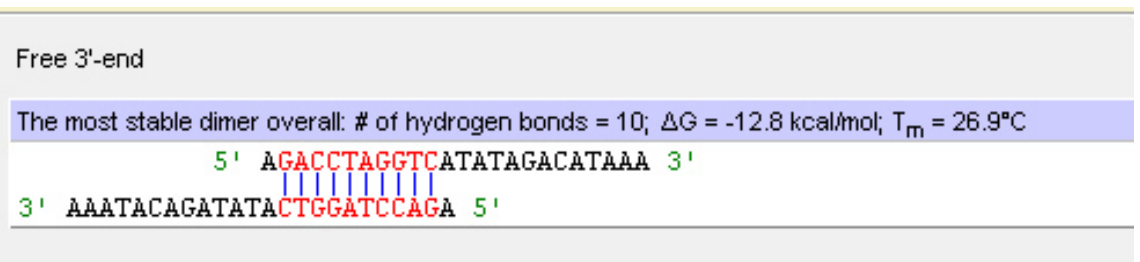


**Figura 7: Interacción inter primers**



**Figura 8: Interacción intra primers**

- Primer reverse



**Figura 9: Interacción inter primers**

No se encontraron interacciones intra primers

El producto resultante de la amplificación con los primers diseñados se predice de una longitud de 1,134 pares de bases, con una estructura como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10: Estructura del casete de expresión del gen E2WT con la amplificación de los primers diseñados.** X: Sitio de restricción *XhoI*. S: Secuencia de escisión de la secuencia de secreción. H6: Etiqueta de 6 histidinas. A: Sitio de restricción *AvrII*

### 5.1.2. Optimización del marco de lectura de lectura del gen E2-VP16

La secuencia del gen E2WT descargada del NCBI fue optimizada por la compañía GenScript®, con codones sinónimos preferenciales hacia *P. pastoris* que permitieran una mayor tasa de producción de la proteína recombinante. La secuencia resultante es la siguiente:

```
ATG GAAACTTTGTGCCAACGCCTGAACGTGTGCCAAGATAAGATTCTGACTCATTACGAAAACGATTCTAC  
TAACTTGC GCGACCACATTGATTATTGGAAACACATGAGATTGGAATGTGCCATCTATTACAAAGCGCGCG  
AAATGGGTTTTAAGCATATTAACCACCAAGTTGTGCCTACCCTGGCTGTTAGTAAAAATAAGGCTTTGCAA  
GCAATCGAATTGCAGCTGACATTAGAAAACGATCTATAACCCACAATACTCTAACGAAAAGTGGACTCTGCA  
GGATGTTTTATTAGAAGTGATTTGACCGCCCCGACTGGTTGCATCAAAAAGCATGGCTACACAGTTGAAG  
TGCAATTCGATGGTGACATTTGTAACACCATGCACTACACTAACTGGAAGCATATCTATATCTGCGAAGAA  
GCGTCTGTTACAGTCGTAGAGGGTCAGGTGGATTATTACGGCCTGTATTACGTTACGAAGGCATTCAAAC  
GTATTTTGTGCAGTTCAAAGATGACGCTGAAAAGTACAGCAAAAACAAGGTCTGGGAAGTACATGCAGGTG  
GCCAAGTTATCTTATGTCCTACAAGTGTCTTTTCTTCAAACGAAGTAAGCAGTCCAGAAACGATTTCGCCAG
```



CATTTGGCCAATCACTCCGCTGCAACACATACGAAAGCCGTTGCGCTGGGTACAAAGGAAACGCAAACCAC  
 TATCCAGCGTCCAAGATCGGAACCGGATACTGGCGACCCGTGTACACAACGAAACTGTTACATCGTGATA  
 GCGTGGACAGTACACCTATTTTAAACGGCTTTTAACTCCTCGCACAAAGGTAGAATTAATTGCAACTCTAAC  
 ACCACTCCGATCGTCCATCTGAAAGGCGATGCAAATACCTTGAAGTGTCTGCGCTATCGTTTCAAAAAGCA  
 TTGCAAATTGTACTACTGCCGTGTCTTCAACCTGGCATTGGACTGGTCACAATGTCAAACATAAGTCCGCGA  
 TTGTAACCCTGACTTATGACTCGGAATGGCAACGTGAACAGTTCTTGTCCCAGGTCAAATCCCAAAAACC  
 ATCACAGTCTCAACGGGCTTTATGTCCATCTGA

Después de la optimización, se realizó un alineamiento entre la secuencia de E2WT y la secuencia E2 optimizada (en adelante como E2OPT), el cual dio como resultado una similitud del 76.59% (Figura 11).

E2WT ATGGAGACTCTTTGCCAACGTTTTAAATGTGTGTGTCAGGACAAAATACTAACACATTATGAA 60  
 E2OPT ATGGAAACTTTGTGCCAACGCCTGAACGTGTGCCAAGATAAGATTCTGACTCATTACGAA 60  
 \*\*\*\*\*.\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*.\* \*\* \*\*.\* \*\*.\*:\*.\*\*:\*\*\*\*\* \*\*

E2WT AATGATAGTACAAACCTACGTGACCATATAGACTATTGGAAACACATGCGCCTAGAATGT 120  
 E2OPT AACGATTCTACTAACTTGC GCGACCACATTGATTATTGGAAACACATGAGATTGGAATGT 120  
 \*\* \*\*\*: \*\*\*:\*\* \*.\* \*\*\*\*\* \*\*:\*\* \*\*\*\*\*.\*. \*.\*\*\*\*\*

E2WT GCTATTTATTACAAGGCCAGAGAAATGGGATTTAAACATATTAACCACCAGGTGGTGCCA 180  
 E2OPT GCCATCTATTACAAAGCGCGCAAATGGGTTTTAAGCATATTAACCACCAAGTTGTGCCT 180  
 \*\* \*\* \*\*\*\*\*.\*. \*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\* \*\*\*:

E2WT ACACTGGCTGTATCAAAGAATAAAGCATTACAAGCAATTGAACTGCAACTAACGTTAGAA 240  
 E2OPT ACCCTGGCTGTTAGTAAAAATAAGGCTTTGCAAGCAATCGAATTGCAGCTGACATTAGAA 240  
 \*.\*\*\*\*\*: :\*.\*\*\*\*\*.\*\*:\*.\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*.\*\*.\*.\*\*\*\*\*

E2WT ACAATATATAACCCACAATATAGTAATGAAAAGTGGACATTACAAGACGTTAGCCTTGAA 300  
 E2OPT ACGATCTATAACCCACAATACTCTAACGAAAAGTGGACTCTGCAGGATGTTTCATTAGAA 300  
 \*\*.\*.\*\*\*\*\*: \*\* \*\*\*\*\*: \*.\*.\* \*\*\*: .\*:\*\*

E2WT GTGTATTTAACTGCACCAACAGGATGTATAAAAAACATGGATATACAGTGAAGTGCAG 360  
 E2OPT GTGTATTTGACCGCCCCGACTGGTTGCATCAAAAAGCATGGCTACACAGTTGAAGTCAA 360  
 \*\*\*\*\*.\* \*\*.\*.\*.\*\*:\*\*:\* \*\*.\*\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\* \*\*\*\* \*\*\*\*\*.



E2WT TTTGATGGAGACATATGCAATACAATGCATTATACAAACTGGAAACATATATATATTTGT 420  
E2OPT TTCGATGGTGACATTTGTAACACCATGCACTACTAAGTGGAAAGCATATCTATATCTGC 420  
\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\* \*\* \*\* .\*\*\*\*\* \*\* \*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*

E2WT GAAGAAGCATCAGTAACTGTGGTAGAGGGTCAAGTTGACTATTATGGTTTATATTATGTT 480  
E2OPT GAAGAAGCGTCTGTTACAGTCGTAGAGGGTCAGGTGGATTATTACGGCCTGTATTACGTT 480  
\*\*\*\*\*.\*\*:\*\*:\*\*:\*\* \*\* \*\*\*\*\*.\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*.\*\*\*\*\* \*\*

E2WT CATGAAGGAATACAAACATATTTTGTGCAGTTTAAAGATGATGCAGAAAAATATAGTAAA 540  
E2OPT CACGAAGGCATTCAAACGTATTTTGTGCAGTTCAAAGATGACGCTGAAAAGTACAGCAA 540  
\*\* \*\*\*\*\*.\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\* \*\* \*\*

E2WT AATAAAGTATGGGAAGTTCATGCGGGTGGTCAGGTAATATTATGTCCTACATCTGTGTTT 600  
E2OPT AACAAAGTCTGGGAAGTACATGCAGGTGGCCAAGTTATCTTATGTCCTACAAGTGTCTTT 600  
\*\* \*\* .\*\* .\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\* .\*\*:\*\* .\*\*\*\*\*: \*\* \*\*

E2WT AGCAGCAACGAAGTATCCTCTCCTGAAACTATTAGGCAGCACTTGGCCAACCACTCCGCC 660  
E2OPT TCTTCAAACGAAGTAAGCAGTCCAGAAACGATTCGCCAGCATTGGCCAATCACTCCGCT 660  
: : .\*\*\*\*\*: \*: \*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*.\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

E2WT GCGACCCATACCAAAGCCGTCGCCTTGGGCACCAAAGAAACACAGACGACTATCCAGCGA 720  
E2OPT GCAACACATACGAAAGCCGTTGCGCTGGGTACAAAGGAAACGCAAACCACTATCCAGCGT 720  
\*\*.\*\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*.\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*.\*\*\* \*\*\*\*\*:

E2WT CCAAGATCAGAGCCAGACACCGGAGACCCCTGCCACACCACTAAGTTGCTGCACAGAGAC 780  
E2OPT CCAAGATCGGAACCGGATACTGGCGACCCGTGTACACAACGAAACTGTTACATCGTGAT 780  
\*\*\*\*\*.\*\*.\*\*\*.\*\* \*\* \*\* .\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*.\*\* \*\* .\*\* \*\*.\*.\*\*:\*\*

E2WT TCAGTGGACAGTACTCCAATCCTCACTGCATTTAACAGCTCACACAAAGGACGGATTAAC 840  
E2OPT AGCGTGGACAGTACACCTATTTTAAACGGCTTTTAACTCCTCGCACAAAGGGTAGAATTAAT 840  
: .\*\*\*\*\*:\*\*:\*\* \*.\*\* \*\*:\*\*\*\*\*: \*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*:.\*.\*\*\*\*\*

E2WT TGTAATAGTAACACTACCCCATAGTACATTTAAAAGGTGATGCTAATACTTTAAAATGT 900  
E2OPT TGCAACTCTAACCACTCCGATCGTCCATCTGAAAGGCGATGCAAATACCTTGAAGTGT 900  
\*\* \*\* : \*\*\*\*\* \*\*:\*\* \*\*.\*.\*\*\* \*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*.\*.\*\*\*



```

E2WT  TTAAGATATAGATTTAAAAAGCATTGTAAATTGTATACTGCAGTGTTCGTCTACATGGCAT  960
E2OPT CTGCGCTATCGTTTCAAAAAGCATTGCAAATTGTACACTGCCGTGTCTTCAACCTGGCAT  960
      *..*.*.*.*.*:* ** ***** ***** *****.****** **:*.*.******

E2WT  TGGACAGGACATAATGTAAAACATAAAAGTGCAATTGTTACTTACATATGATAGTGAA  1020
E2OPT TGGACTGGTCACAATGTCAAACATAAGTCCGCGATTGTAACCCTGACTTATGACTCGGAA  1020
      *****:*:*:** *****.******.: **.******:*:*.* **:****** : **

E2WT  TGGCAACGTGAACAATTTTTGTCTCAAGTTAAAATACCAAAAACCTATTACAGTGTCTACT  1080
E2OPT TGGCAACGTGAACAGTTCTTGTCCCAGGTCAAATCCCAAAAACCATCACAGTCTCAACG  1080
      *****.* ** ***** **.* ** *****.****** ** ***** **:***

E2WT  GGATTTATGTCTATATGA  1098
E2OPT GGCTTTATGTCCATCTGA  1098
      **.****** **.***

```

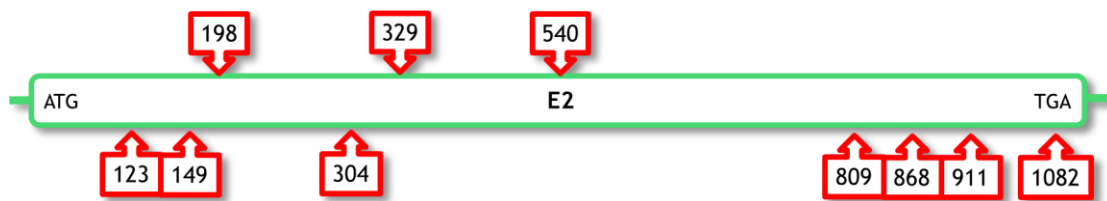
**Figura 11: Alineamiento entre secuencias E2WT y E2OPT.** Alineamiento de las secuencias E2WT y E2OPT mediante el software ClustalW2. Una coincidencia entre bases se representa con “\*”.

Adicionalmente la secuencia fue analizada en busca de regiones desestabilizantes del ARN mensajero que disminuyeran la eficiencia de traducción de la proteína. Se identificaron 10 regiones desestabilizantes a lo largo del marco de lectura abierto como se muestra en la Tabla 3 y en la Figura 12.



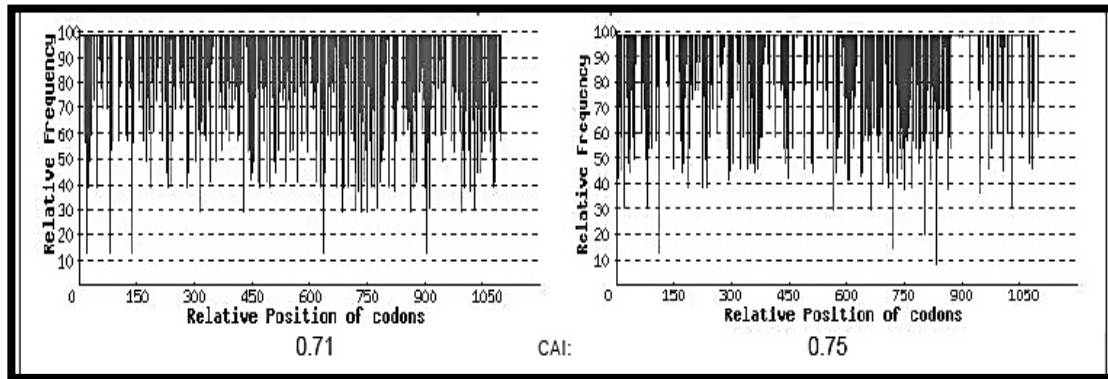
**Tabla 3:** Sitios desestabilizantes del ARN mensajero dentro del marco de lectura abierto.

Elementos desestabilizantes	Original	Optimizada	Sitio
PoliA (AATAAA)	2	0	198, 540
PoliA (AAAAAA)	1	0	329
Desestabilizante (ATTTA)	7	0	123, 149, 304, 809, 868, 911, 1082



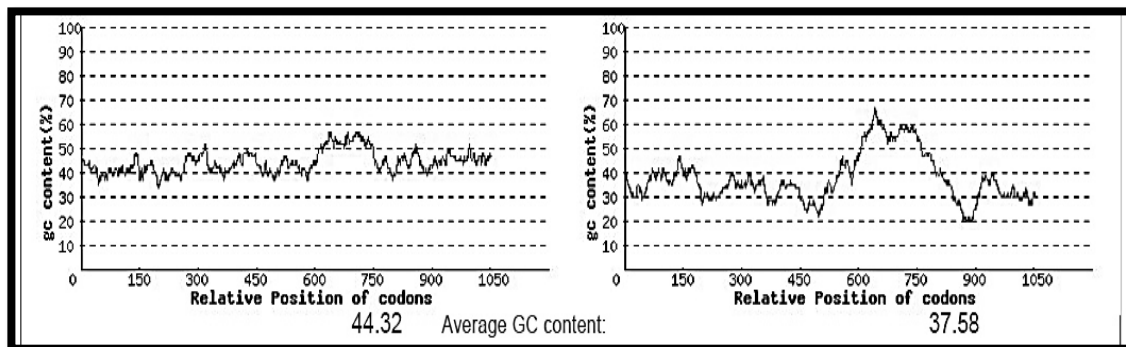
**Figura 12:** Sitios desestabilizantes encontrados a lo largo del marco de lectura abierto y sus posiciones.

Otros parámetros evaluados durante la optimización de codones, fueron el índice de adaptación de codones (CAI, por sus siglas en inglés), el porcentaje de GC y la frecuencia de codones óptimos (FOP, por sus siglas en inglés). El CAI es un parámetro de predicción de la eficiencia de traducción, que entre más cercano sea de 1, predice una mejor eficiencia de la misma. Para el gen E2WT el CAI calculado fue de 0.71, mientras que del gen E2OPT fue de 0.75, un incremento de 0.04 (Figura 13).



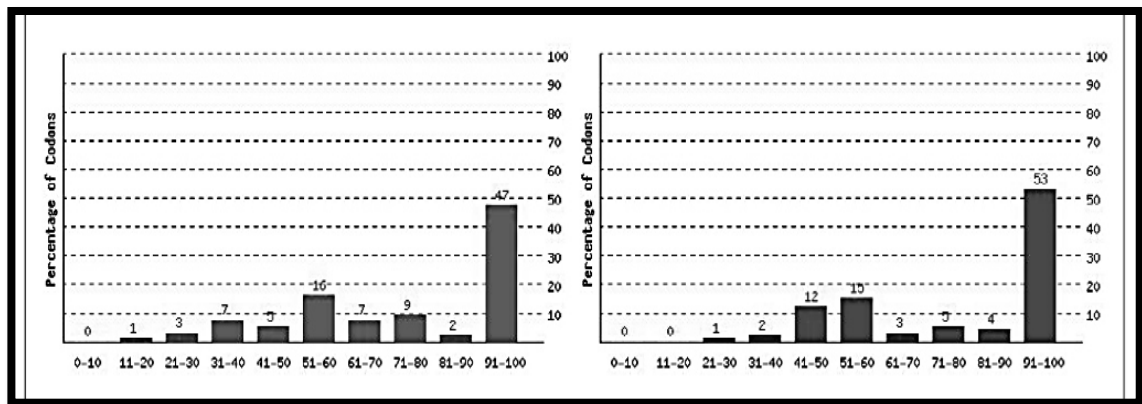
**Figura 13: Comparación de CAI.** Gráfica que representa el índice de adaptación de codones, antes (izquierda) y después (derecha) de la optimización de codones.

El porcentaje de GC a lo largo del marco de lectura abierto disminuyó de un 44.32% a un 37.68% como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14: Comparación de contenido de GC.** Gráfica que representa el porcentaje de GC en el marco de lectura abierto, antes (izquierda) y después (derecha) de la optimización de codones.

La Figura 15 muestra la frecuencia y distribución de los codones óptimos a lo largo de la secuencia de los genes E2WT Y E2OPT. Después de la optimización de codones, se disminuyó la frecuencia de codones poco usados en el organismo de *P. pastoris*.



**Figura 15: Comparación de FOP.** Gráfica que representa la distribución de codones óptimos, antes (izquierda) y después (derecha) de la optimización de codones.

Una vez optimizado el marco de lectura abierto, se adicionaron las mismas secuencias nucleotídicas necesarias para la clonación y expresión de la proteína E2, además de una secuencia de reconocimiento para la enzima enterocinasa (GATGATGACGACAAG), con el objetivo de eliminar la etiqueta de histidinas una vez producida la proteína. El casete de expresión resultante es mostrado en la Figura 16.



**Figura 16: Estructura del casete de expresión del gen E2OPT con la adición de los elementos génicos que se incluyeron en el diseño de los primers. X:** Sitio de restricción *XhoI*. S: Secuencia de escisión de la secuencia de secreción. H6: Etiqueta de 6 histidinas. EK: Sitio de reconocimiento a enterocinasa A: Sitio de restricción *AvrII*.

Como ya se mencionó, la secuencia del gen E2OPT fue sintetizada por la compañía GenScript®, y enviada al laboratorio en un plásmido de propagación PUC57. Además, se decidió diseñar los siguientes dos primers para entre otras cosas amplificar el gen E2OPT y facilitar la clonación del gen en el plásmido de expresión y caracterizar las cepas construidas por medio de PCR.

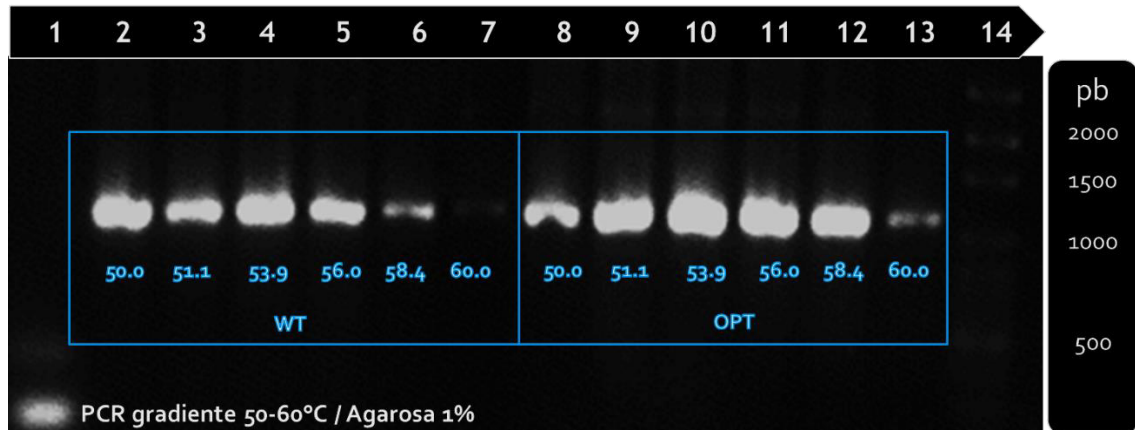
Primer forward 5'-3': AGACTCGAGAAAAGACAC

Primer reverse 5'-3': CCGCCTAGGTCAGATG

### 5.1.3. Construcción de los plásmidos de expresión de los genes E2WT y E2OPT

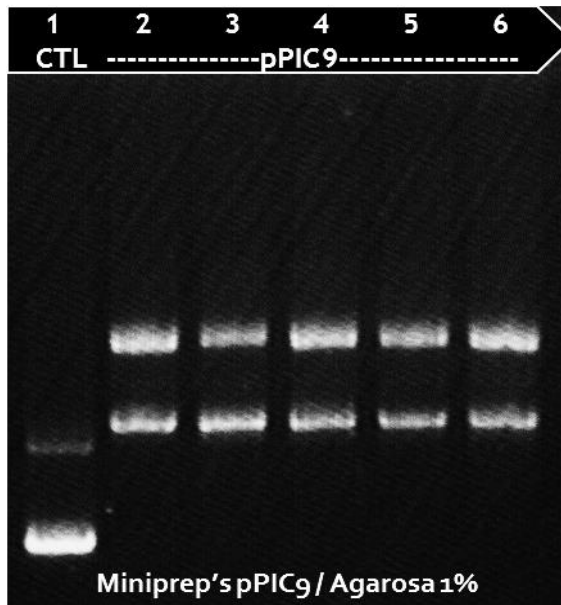
Una vez diseñados los genes de interés y los primers que los amplificaran, lo siguiente fue la estandarización de las temperaturas óptimas de amplificación para ambos genes. Se realizó una PCR en gradiente de temperatura de 50 a 60°C con cada uno de los genes. Como se muestra en la Figura 17, se logró una

correcta amplificación en las temperaturas entre 50°C y 56°C para ambos genes, con una temperatura óptima cercana a los 54°C.



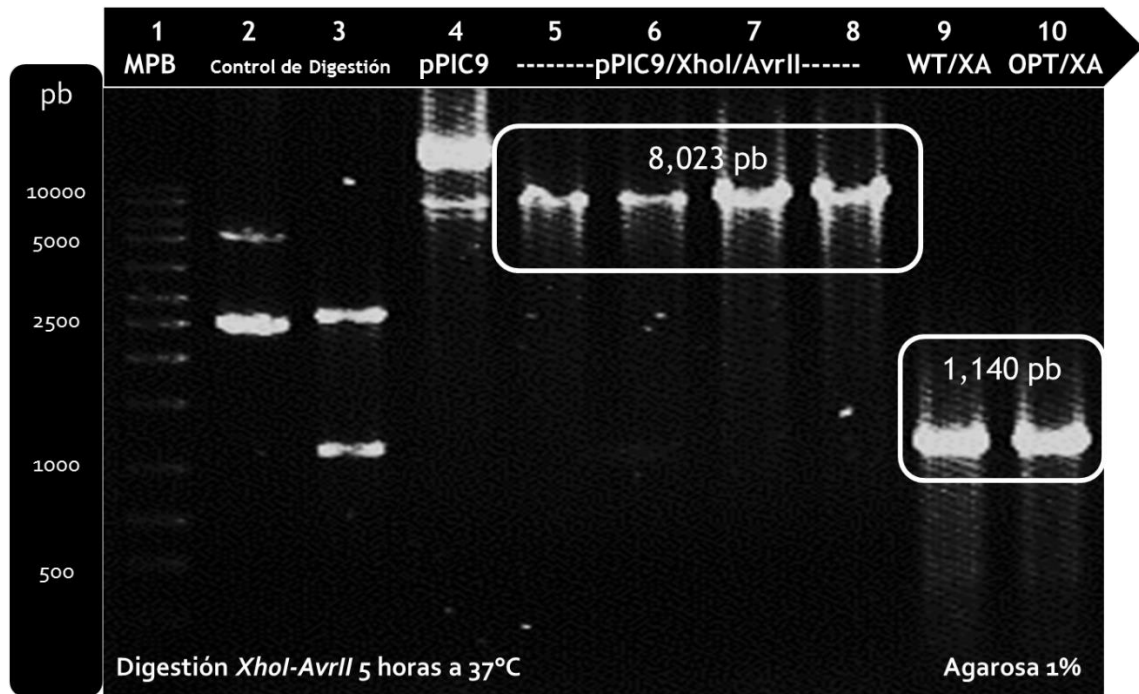
**Figura 17: Estandarización de PCR.** PCR en gradiente de temperatura para la amplificación de los genes E2WT y E2OPT. En los recuadros se señala el amplificado de 1140 pares de bases.

Posterior a la amplificación de los genes E2, se realizó la propagación del plásmido pPIC9 en *E. coli*, transformando a las bacterias por el método químico de cloruro de calcio y choque térmico. Después de la transformación se realizó una extracción plasmídica por el método de lisis alcalina. La Figura 18 muestra el gel de agarosa para la evaluación de la extracción plasmídica del vector de expresión.



**Figura 18: Miniprep's plásmido pPIC9.** Carril 1: Control de electroforesis, plásmido PUC57 de aproximadamente 3,800pb. Carriles 2 al 6: Muestras de miniprep's de pPIC9 (tamaño de plásmido 8,023pb).

Después de la extracción plasmídica y la amplificación de los genes E2, se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII*, con el fin de preparar el vector y los insertos para ser ligados. La Figura 19 muestra el gel de agarosa de los productos digeridos durante 5 horas.



**Figura 19: Digestión del plásmido de expresión pPIC9 y los amplificadores de los genes E2.** Carril 1: Marcador de pares de bases (1kb Ladder DNA Marker Axygen®). Carriles 2 y 3 se muestra un control de digestión para ambas enzimas *XhoI* y *AvrII*. Carriles 4 al 8 la digestión de pPIC9. Carriles 9 y 10 se observa la digestión del gen E2WT y E2OPT respectivamente.

Posteriormente a la digestión del plásmido aceptor y de los amplificadores, estos se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con cristal violeta, que permitiera observar a simple vista la migración de las bandas de interés. De esta forma se evita la visualización con luz UV que pueda dañar los extremos digeridos de los ADN's de interés. La electroforesis teñida con cristal violeta fue hecha con



el kit de clonación TOPO XL de la marca InvitroGen, como se describe en la metodología.

Las bandas de interés, fueron cortadas y purificadas con el kit de purificación Wizard SV Gel and PCR clean-up system, de la marca Promega, con el protocolo descrito en la metodología. Al terminar la purificación, se realizó la ligación de las especies con la enzima Quick stick, de la marca BioLine. La ligación se realizó con una proporción de vector:inserto de 1:3, con un total de ADN de 200ng aproximadamente. La reacción fue incubada por 30min y posteriormente se realizó la transformación en *E. coli*, cepa TOP10F incluida en el kit de Pichia Expression Kit de la compañía Invitrogen, por el método de cloruro de calcio y choque térmico, utilizando 2-5µL de la reacción de ligación. Tras un día de incubación en placas de medio LB a 37°C se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 4.

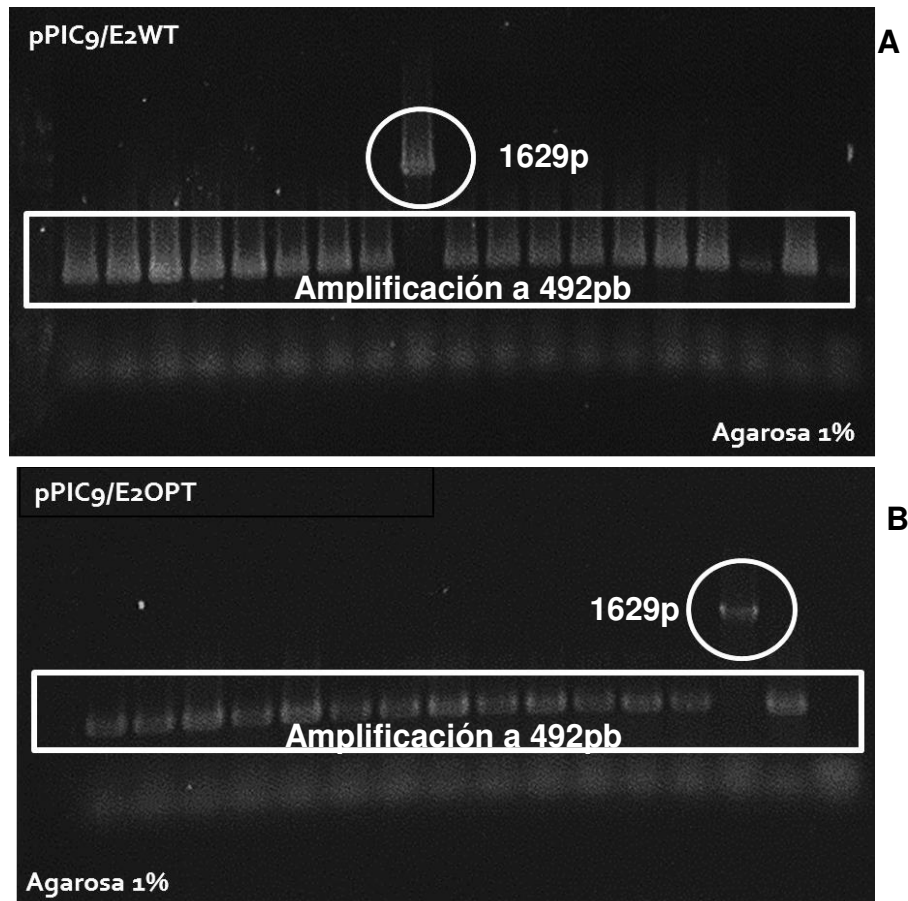




**Tabla 4:** Resultados de la transformación en *E. coli*/TOP10F de los productos de ligación.

Muestra	Número de colonias	Eficiencia de transformación
Control Negativo	0	0
Control Negativo (pPIC9 lineal)	30	$1.5 \times 10^4$ UFC/ $\mu$ gADN
Control Positivo (pPIC9 circular)	200	$1 \times 10^5$ UFC/ $\mu$ gADN
Ligación pPIC9-E2WT	150	$7.5 \times 10^4$ UFC/ $\mu$ gADN
Ligación pPIC9-E2OPT	100	$5 \times 10^4$ UFC/ $\mu$ gADN

Posteriormente se evaluaron las colonias obtenidas mediante PCR con primers dirigidos a secuencias del gen *AOX* de *P. pastoris*, que flanquean el sitio de policlonación en el plásmido pPIC9. Cuando el casete de expresión del plásmido está vacío, se obtiene un producto de amplificación de 492pb. Si la ligación fue correcta, el producto de amplificación debe ser de 1629pb (492pb propias del plásmido y 1137pb que es la longitud de los genes E2WT y E2OPT con el casete de expresión). En la Figura 20 se muestra la electroforesis de los productos de amplificación.

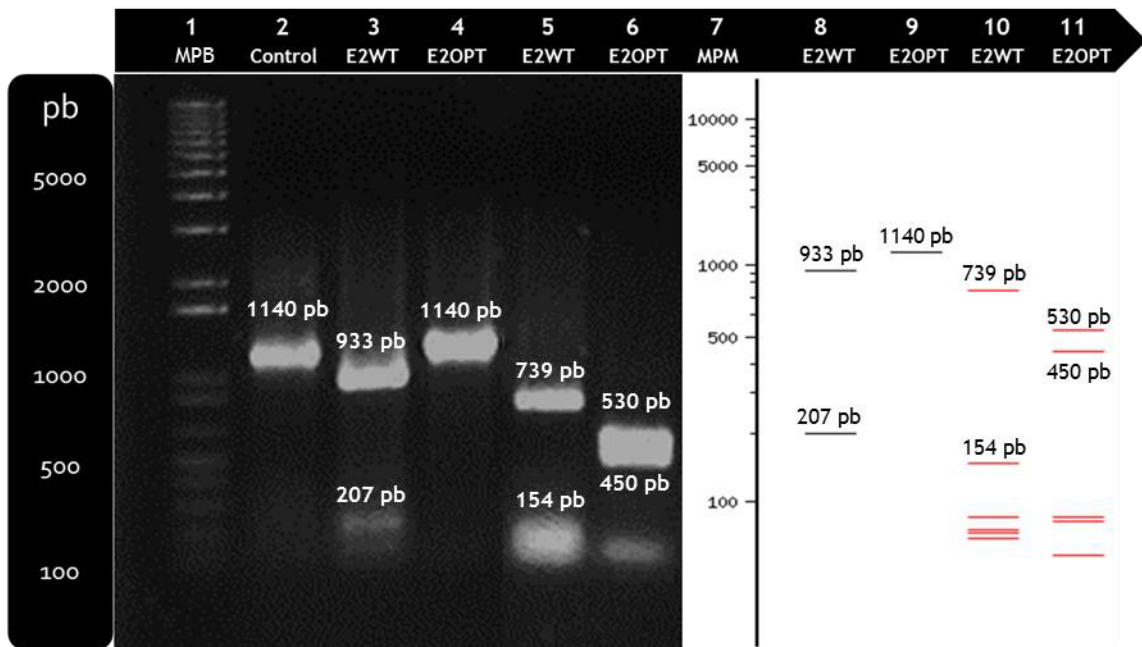


**Figura 20: Verificación de la ligación.** PCR con primers AOX para verificar la ligación de los genes A) E2WT y B) E2OPT.

En total fueron analizadas 30 clonas para la construcción de E2OPT y 68 clonas para la construcción de E2WT y como se observa en la Figura 20, fue posible la construcción de ambos vectores pPIC9-E2WT y pPIC9-E2OPT.

Para verificar las construcciones, se amplificaron los genes con los primers diseñados para cada uno, tomando como templado el ADN plasmídico de la construcción para posteriormente realizar una caracterización con enzimas de

restricción. Se buscaron sitios de restricción que se modificaran con la optimización de codones en el gen E2OPT. La Figura 21 muestra la caracterización con las enzimas *DraIII* y *HpyCH4IV*, donde se puede corroborar la construcción de los plásmidos con los genes E2 listos para ser transformados en la levadura.



**Figura 21: Caracterización enzimática de las construcciones pPIC9-E2WT y pPIC9-E2OPT.** Carril 1. Marcador de pares de bases. 2. Control sin digerir. 3 y 4. Digestiones con *DraIII*. 5 y 6. Digestiones con *HpyCH4IV*. 8 y 9. Digestión in silico con *DraIII*. 10 y 11. Digestión in silico con *HpyCH4IV*



## 5.2. Objetivo II

### 5.2.1. Transformación y fenotipificación de clonas de *P. pastoris*.

Una vez propagados los plásmidos pPIC9-E2WT y pPIC9-E2OPT, se realizó una extracción plasmídica por el método de lisis alcalina y posteriormente, una digestión de los mismos con la enzima *BglIII* para linearizarlos y poder transformarlos en *P. pastoris*.

La transformación fue realizada por medio de electroporación de *P. pastoris* cepa GS115, con una cantidad de aproximadamente 2µg de ADN digerido. Después de la incubación en placas MD por cinco días a temperatura ambiente, el resultado de la transformación se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5:** Resultados de la transformación en *P. pastoris*/GS115 de las construcciones linearizadas con *BglIII*.

Muestra	Número de colonias	Eficiencia de transformación
Control Negativo	0	0
Control Positivo (pPIC9 lineal)	5	5 UFC/µgADN
pPIC9-E2WT / <i>BglIII</i>	93	465 UFC/µgADN
pPIC9-E2OPT/ <i>BglIII</i>	28	140 UFC/µgADN

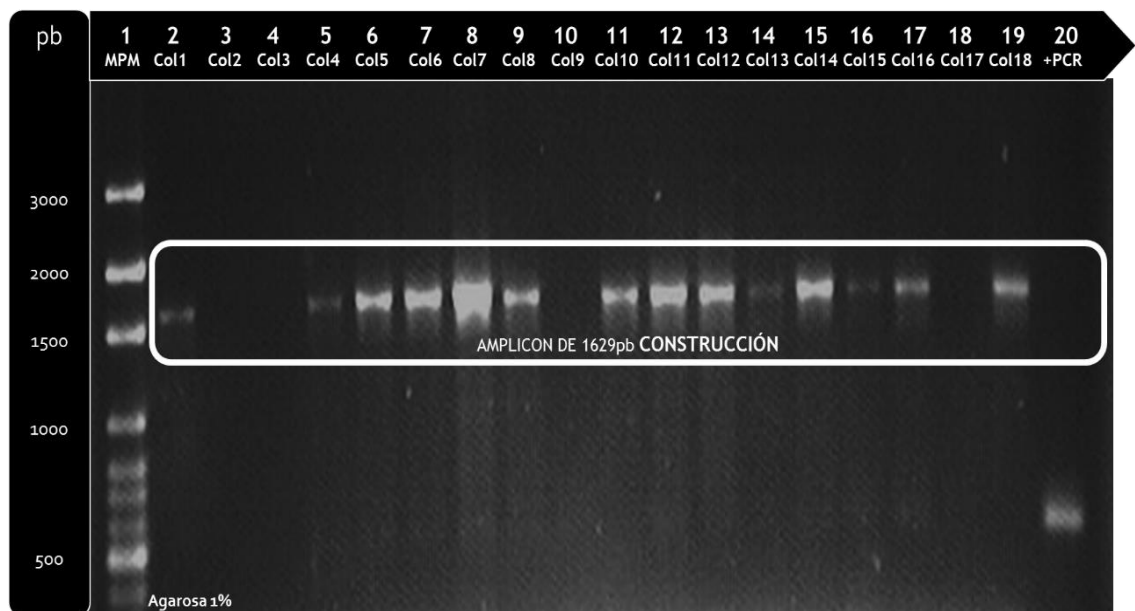


Para verificar la integración de los genes recombinantes al genoma de *P. pastoris* se realizó PCR de colonia con los primers contra las regiones AOX. Si se obtiene un amplificado de 492pb, se puede concluir que el sitio recombinante está vacío y no hubo integración del gen recombinante. Si se obtiene una banda de aproximadamente 1629pb, el gen E2 se integró al sitio recombinante y la colonia presenta un fenotipo Mut<sup>s</sup>. Si además de la banda recombinante, se observa una banda a 2100pb, la recombinación dejó el gen de AOX1, lo cual representa que la colonia tiene un fenotipo Mut<sup>+</sup> y dicha colonia tendrá un procesamiento más eficiente del metanol (Figura 22).

Se fenotipificaron al término del trabajo en total 25 clonas para el gen E2OPT y 17 clonas para el gen E2WT (Figuras 23 y 24).



**Figura 22: Fenotipificación de las clonas resultantes de la transformación de *P. pastoris* con los casetes recombinantes.** Carriles 1 y 14 (100pb Ladder DNA Marker Axygen®). Marcador de pares de bases. Carriles 2 al 9. Clonas de E2OPT. Carriles 10 y 11. Clonas transformadas con pPIC9 vacío linearizado (Mock). Carril 12. Control positivo de PCR (Reacción con ADN plasmídico). Carril 13. Control negativo de PCR. Reacción con agua. Carriles 15 al 18. Clonas de E2WT. Se señala el fenotipo Mut<sup>+</sup> o Mut<sup>S</sup> para aquellas clonas que dieron positivo a la integración del casete recombinante. Además la presencia de una banda de 2100 pares de bases, en el carril 4, es indicativo de un fenotipo Mut<sup>+</sup>.



**Figura 23: Fenotipificación de segunda ronda de clonas para el gen E2OPT.**

Carril 1. Marcador de pares de bases (1kb Ladder DNA Marker Axygen®).

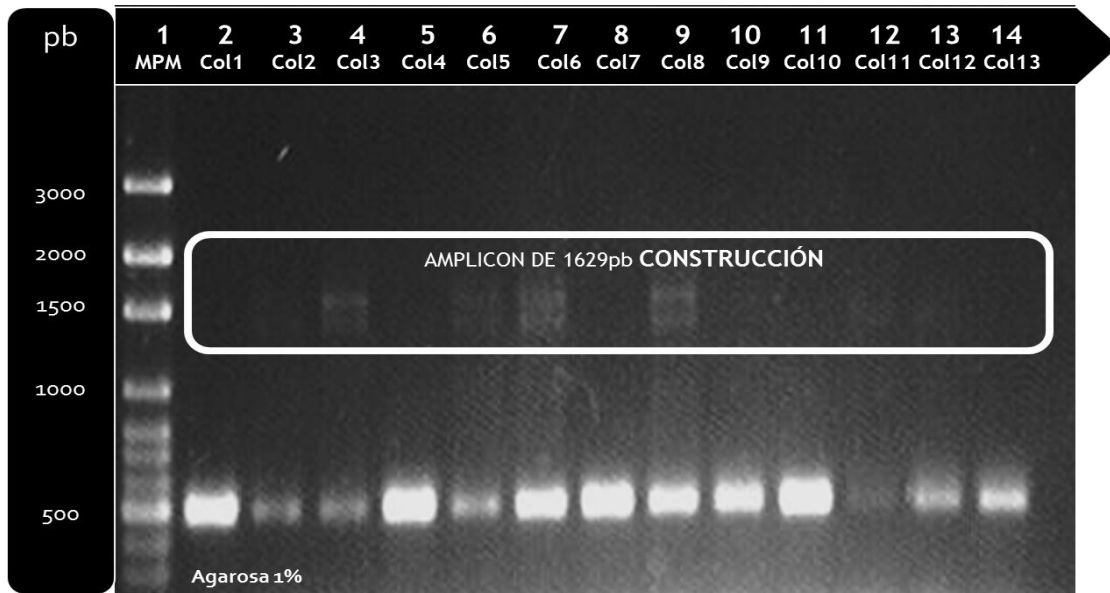
Carriles 2 al 19. Clonas recombinantes. Carril 20. Control positivo de PCR, ADN

plasmídico. Solo se observa la banda indicativa de integración del gen

recombinante en las colonias 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 18 con un

fenotipo Mut<sup>s</sup>.





**Figura 24: Fenotipificación de segunda ronda de clonas para el gen E2WT.**

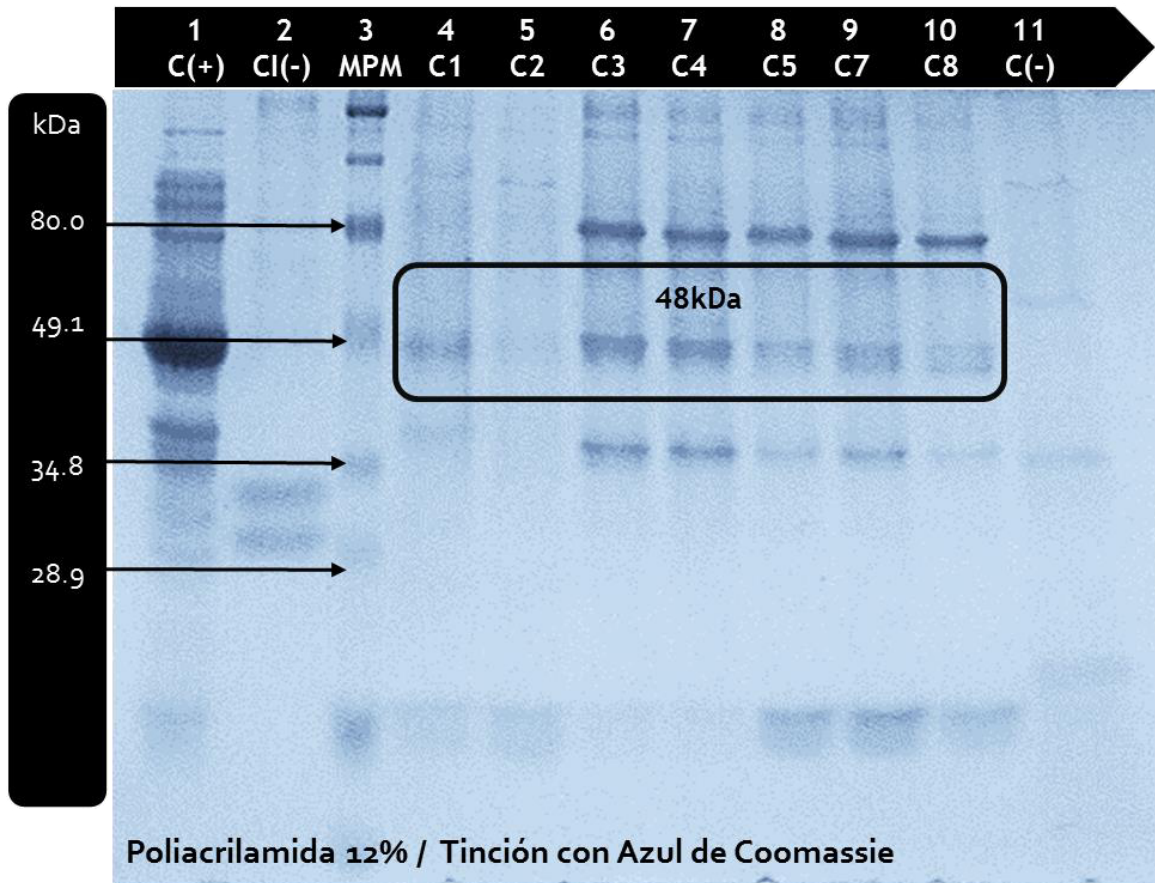
Carril 1. Marcador de peso molecular (1kb Ladder DNA Marker Axygen®). Carriles 2 al 14. Clonas recombinantes. Sólo se observa la banda indicativa de integración del gen recombinante en las colonias 3, 5, 6 y 8 con un fenotipo Mut<sup>s</sup>.

### 5.2.2. Ensayos de expresión

De las 43 colonias candidatas (26 colonias del gen E2OPT y 17 del gen E2WT) sólo se llevaron a fase de producción 7 colonias del gen E2OPT y 4 del gen E2WT con los fenotipos que se observan en la Figura 18. En un primer ensayo de expresión, se indujeron las colonias del gen E2OPT bajo las condiciones descritas en la metodología, posteriormente se realizó una diálisis del medio de cultivo durante 24 horas, con cambios de agua a las 2, 4 y 12 horas, con agitación y a una temperatura de 4°C Después se precipitó 1.5mL de las muestras con

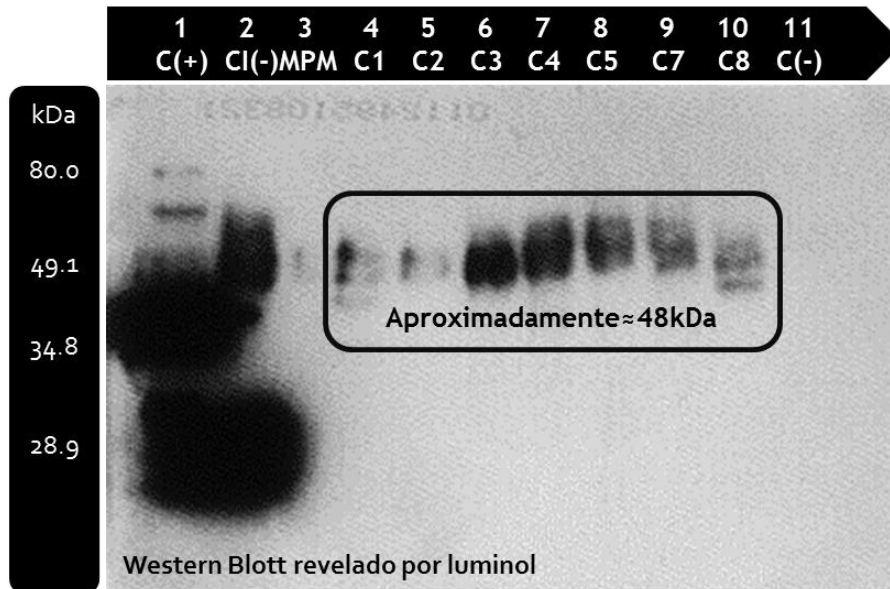


metanol-cloroformo y se analizaron por SDS-PAGE y western-blot. Las figuras 25 y 26 muestran los resultados del análisis.



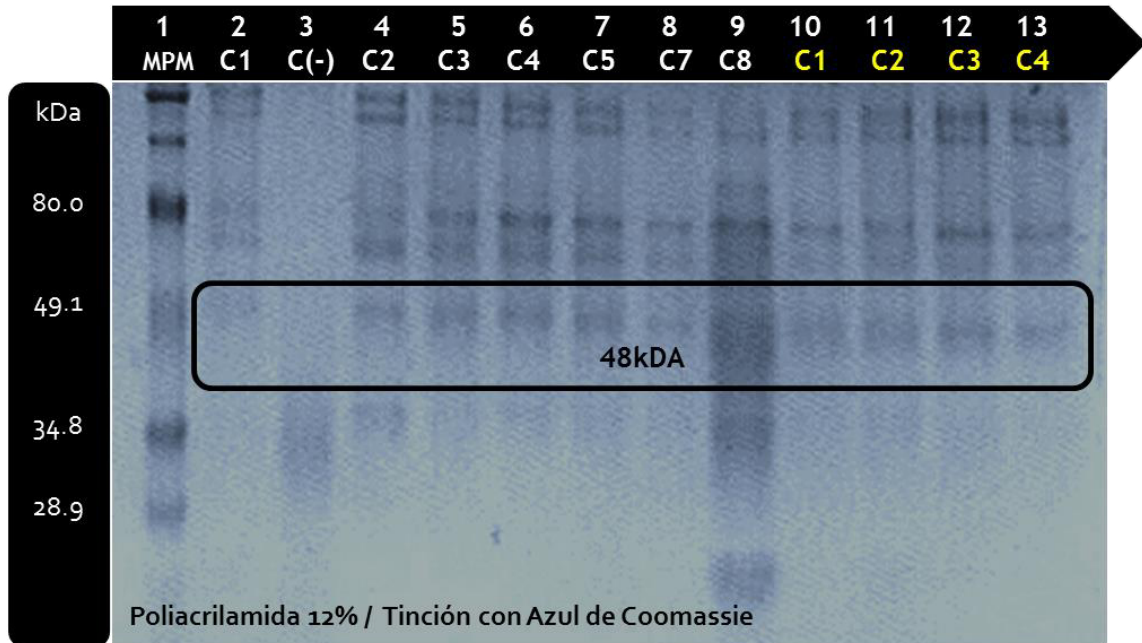
**Figura 25: SDS-PAGE para el análisis de la inducción de las colonias 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 8 de la primera ronda de construcción.** Carril 1: Control positivo para Western-blot (proteína recombinante expresada en *E. coli* de 40kDa con his-tag). Carril 2: Control positivo de inducción, proteína recombinante expresada en *P. pastoris* de 23 kDa con his-tag. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carriles 4 al 10: Colonias de E2OPT inducidas. Carril 11: Control negativo de inducción, colonia Mock de *P. pastoris*. Se observa en el recuadro negro bandas

de alrededor de 49 kDa que no se observan en la colonia Mock. Las bandas coinciden con el peso esperado para la proteína E2OPT.



**Figura 26: Western-blot del gel de poliacrilamida anterior.** La señal positiva en los carriles uno y dos corresponden a las proteínas recombinantes control de 40kDa y 23kDa respectivamente. Se observa señal positiva en bandas de aproximadamente 49kDa en los carriles 4 al 10, de las colonias recombinantes con el gen E2OPT y ausencia de esta señal en el carril 11 del control Mock.

En un segundo ensayo de inducción se incluyeron las 4 colonias de la primera ronda (Figura 18) del gen E2WT. El análisis sólo se hizo por SDS-PAGE como se muestra en la Figura 27.



**Figura 27: SDS-PAGE del segundo ensayo de expresión de las proteínas E2OPT y E2WT.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 3: Control negativo de inducción (Mock). Carriles 2, 4-9: Colonias E2OPT primera generación. Carriles 10-13: Colonias E2WT primera generación. En el recuadro se señalan las bandas de aproximadamente 49kDa en todas las muestras de inducción y su ausencia en el carril 3 del control negativo.

### 5.3. Objetivo III

#### 5.3.1. Escalamiento de la producción

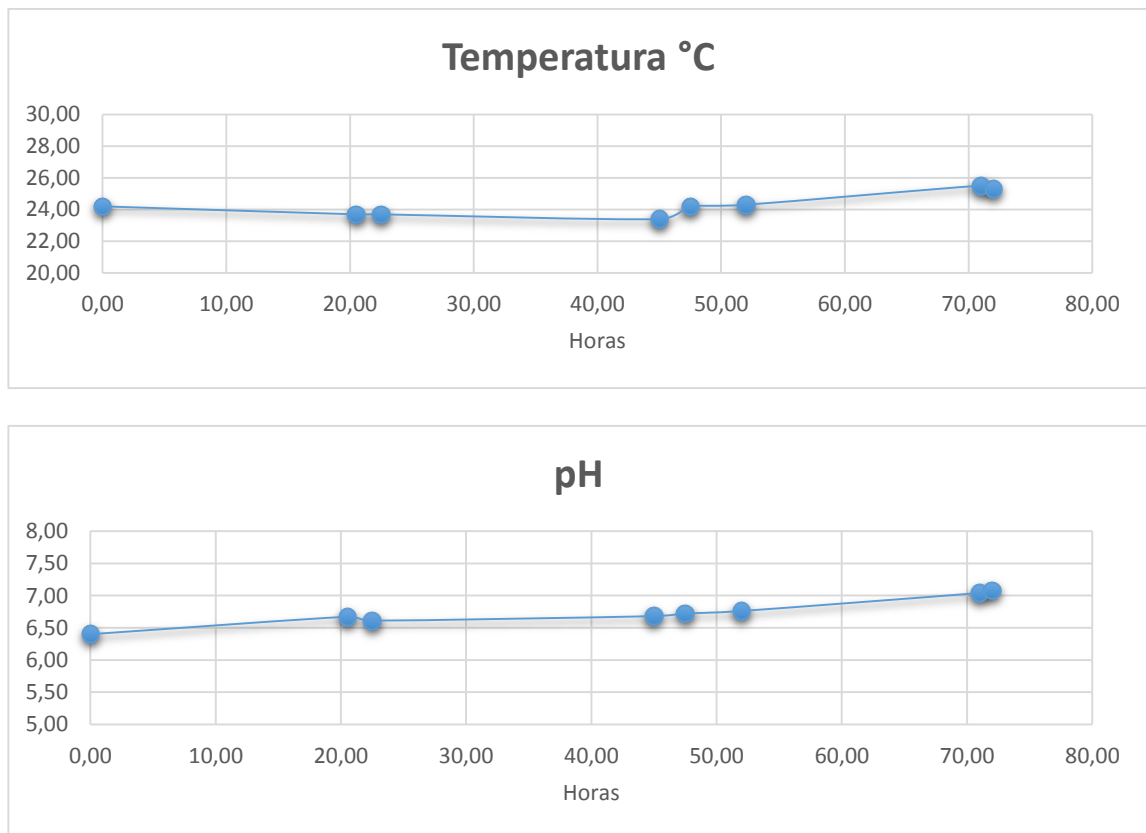
Para el ensayo de escalamiento de la producción a biorreactor se seleccionó la colonia número 3 del gen E2OPT, la cual en los dos ensayos de expresión y en el western-blot mostró ser la clona con mayor expresión.



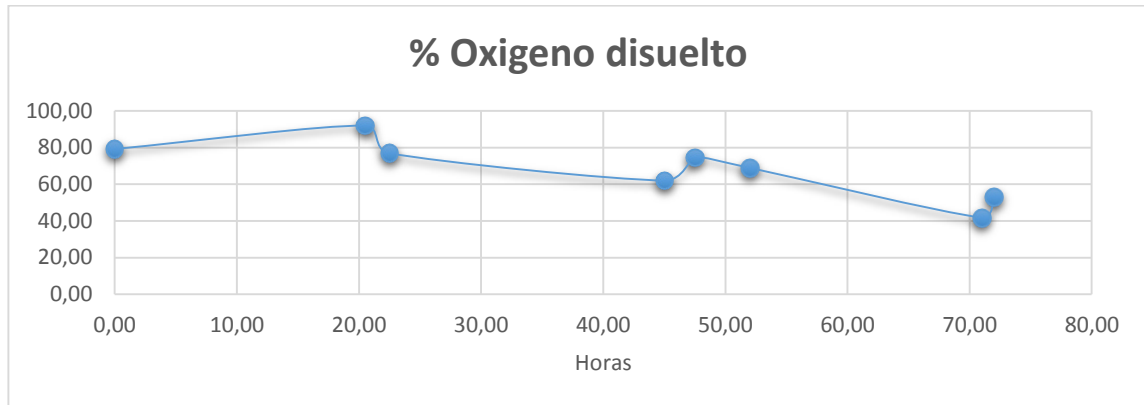
El ensayo de producción se llevó a cabo en un biorreactor de 1 litro marca Aplikon con los que contaba el laboratorio. Durante la fermentación se monitoreó la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto. La inyección de O<sub>2</sub> se mantuvo constante para que el oxígeno disuelto sólo se viera afectado por el metabolismo aeróbico durante la fermentación de la levadura. Los resultados del monitoreo se muestran en la tabla 6 y en las figuras 28 y 29.

**Tabla 6:** Monitoreo de los parámetros en biorreactor de la producción de E2OPT.

Tiempo (Horas)	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno disuelto (%)
0,00	24,20	6,40	79,20
20,50	23,70	6,67	91,90
22,50	23,70	6,61	76,90
45,00	23,40	6,68	62,00
47,50	24,20	6,72	74,70
52,00	24,30	6,76	68,90
71,00	25,50	7,04	41,80
72,00	25,30	7,08	53,10



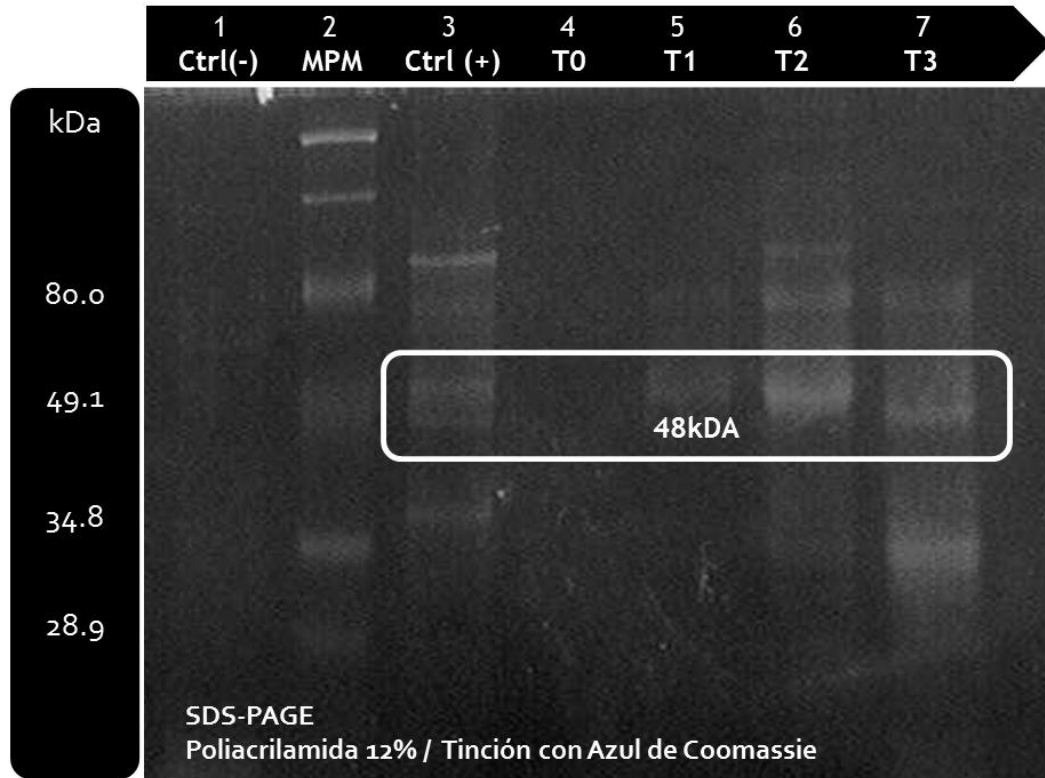
**Figura 28: Monitoreo de los parámetros en biorreactor.** Representación gráfica de los cambios de temperatura y pH a lo largo de los 3 días de producción de la proteína E2OPT.



**Figura 29: Monitoreo de los parámetros en biorreactor.** Representación gráfica de los cambios en el oxígeno disuelto a lo largo de los 3 días de fermentación.

Fueron tomadas muestras de 2mL cada 24 horas para evaluar la expresión de la proteína a lo largo de la fermentación. Cada muestra tomada fue dializada, precipitada y preparada para su análisis en SDS-PAGE (Figura 30).





**Figura 30: SDS-PAGE de las muestras tomadas durante la fermentación.**

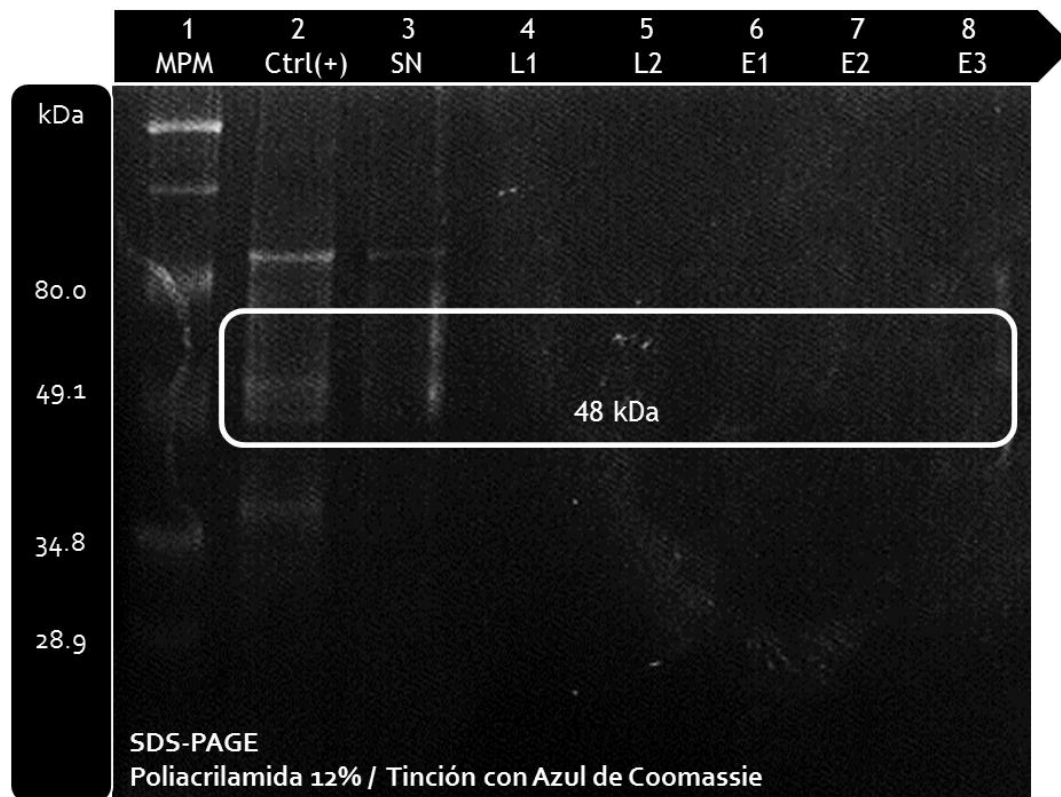
Carril 1: Control negativo (Mock). Carril 2: Marcador de peso molecular Carril 3: Control positivo de producción, muestra de una producción a nivel matraz. Carriles 4 al 6: Muestras a 0, 24, 48 y 72 horas.

Se observó producción de E2OPT recombinante a partir de las 24, 48 y 72 horas después del cambio a medio inductor.

## 5.4. Objetivo IV

### 5.4.1. Ensayo de purificación

La colonia 3 recombinante de E2OPT, mostró ser la colonia mejor productora de proteína recombinante, por lo cual fue utilizada para los ensayos de purificación. Se tomaron 1.5mL del dializado de la producción en matraz de la colonia 3, y se purificaron por cromatografía de afinidad con resina de níquel como se describe en la metodología. Tras la purificación se analizaron las muestras por SDS-PAGE (Figura 31).



**Figura 31: SDS-PAGE de la purificación de E2OPT por cromatografía de afinidad con resina de níquel.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Control positivo, muestra de colonia 3 E2OPT sin purificar. Carril 3: SN,





sobrenadante después de la incubación con la resina. Carriles 4 y 5: Lavados. Carriles 6 al 8: Eluciones. Recuadro de la izquierda muestra banda de 49kDa en el carril del sobrenadante. El recuadro de la derecha resalta la banda entorno a 49kDa en la elución 3.

Es posible apreciar una banda de alrededor de 49kDa en la elución 3, que coincide con la banda que se aprecia en el control positivo.



## CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

Como un sistema de expresión eucariótico, *P. pastoris* posee muchas ventajas, tales como un plegamiento eficiente de proteínas, capacidad de secreción, capacidad de modificaciones postraduccionales y buen rendimiento en la producción. Su modificación genética es relativamente sencilla y el análisis costo-beneficio indica que es un organismo de alta eficiencia biotecnológica [45] [46]. Sin embargo, la diferencias entre la frecuencia de uso de codones entre el organismo fuente de la proteína de interés y el organismo huésped para la producción de la proteína recombinante, pueden impactar en la eficiencia de producción de la misma. Por ello, diversos autores recomiendan la optimización de codones y el diseño de genes con alta eficiencia de producción de proteínas heterólogas en el desarrollo de sistemas de expresión [47-49]. El objetivo del trabajo fue el desarrollar la plataforma recombinante que expresara la proteína E2 del VPH16 optimizado en su marco de lectura por codones preferenciales, además de su contraparte la proteína E2 wild type, en el hospedero de *P. pastoris*.

Durante el análisis del gen E2 para la optimización con codones preferenciales, se detectaron regiones ricas en adeninas y timinas, como la secuencia “ATTTA”, que han sido ampliamente descritas como elementos desestabilizadores del ARNm y que disminuyen su eficiencia de traducción del gen recombinante [50-53] Estos sitios fueron eliminados con el cambio de



codones sinónimos y preferenciales. De esta forma hubo un incremento de 0.71 a 0.75 en el índice de adaptación de codones, un parámetro que nos indica la eficiencia de traducción y que mientras más cercano es a 1, predice una mayor eficiencia [54-56].

Se construyeron los plásmidos de expresión pPIC9-E2WT y pPIC9-E2OPT, los cuales fueron correctamente integrados en la cepa GS115 de *P. pastoris*. Posteriormente, de las clonas resultantes de la electrotransformación, fueron analizadas 43 clonas para determinar su fenotipo Mut<sup>s</sup> o Mut<sup>+</sup>, que determina su capacidad metabólica en presencia de metanol como fuente de carbono. Se obtuvieron 42 clonas con un fenotipo Mut<sup>s</sup> y una clona de la construcción pPIC9-E2OPT con fenotipo Mut<sup>+</sup>. De las 43 clonas fenotipificadas, se llevaron a fase de expresión a nivel matraz 11 clonas, 7 clonas pPIC9-E2OPT (incluyendo la clona con fenotipo Mut<sup>+</sup>) y 4 clonas pPIC9-E2WT. La comparación entre el nivel de expresión de ambos genes requiere la exploración de más clonas productoras y su fenotipificación, la cuantificación de proteína total y la estandarización del tamaño de inóculo en base al fenotipo observado (Mut<sup>s</sup> o Mut<sup>+</sup>), ya que el alto metabolismo en presencia de metanol de las clonas con fenotipo Mut<sup>+</sup> le confieren la capacidad de alcanzar mayores niveles de biomasa en determinado tiempo; sin embargo, el fenotipo Mut<sup>s</sup>, a pesar de tener una menor tasa de crecimiento y generación de biomasa, tiene una mayor disponibilidad de la maquinaria metabólica para la expresión de la proteína de



interés. Este tema es aún controversial y la única conclusión objetiva, hasta el momento, es que debe ser evaluada la expresión de la proteína de interés en ambos fenotipos, experimentalmente [57].

La clona con fenotipo Mut<sup>+</sup> de la construcción pPIC9-E2OPT, mostró mayor producción de proteína recombinante, al menos en los primeros ensayos; por ello fue seleccionada para el escalamiento de su producción en biorreactor de 1L tipo lote alimentado (fed-batch). La temperatura, pH y oxígeno disuelto fueron monitoreados durante la inducción y éste último, fue indicador del metabolismo de metanol durante la fermentación. El análisis por SDS-PAGE confirmó la producción de la proteína E2OPT a partir de las 24 horas pos-inducción, sin embargo es necesario optimizar los parámetros de fermentación, así como la cantidad y tiempos de alimentación del agente inductor para obtener mayor rendimiento, ya que diversos estudios muestran que es posible aumentar la producción de otras proteínas recombinantes escalando la fermentación [58-60].

Se realizó un ensayo de purificación por cromatografía de afinidad a etiqueta de histidinas. La presencia de una banda en la tercera elución de aproximadamente 49kDa, sugiere que fue posible purificar en cierto grado la proteína E2OPT. Sin embargo, también se observa proteína en el sobrenadante de la incubación con la resina. Esto indica que la resina de Ni no está logrando



retener parte de la proteína E2OPT, por lo que es necesario la optimización del protocolo para obtener mayor interacción con la resina y aumentar así el rendimiento de purificación. Este paso es fundamental la producción de proteínas recombinantes que tienen como fin ensayos biológicos, inmunológicos, la creación de productos profilácticos o desarrollo de terapias clínicas, entre otras, para eliminar contaminantes y proteínas nativas del hospedero que puedan alterar los ensayos o despertar alguna reacción adversa en un paciente [61-63] [64].



## CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

- ✓ Se construyeron dos plásmidos de expresión de la proteína recombinante E2-  
VPH16
- ✓ Se analizaron 43 clonas para su fenotipo Mut<sup>s</sup> y Mut<sup>+</sup>.
- ✓ Se produjo la proteína recombinante E2 del VPH-16 desde el gen nativo y desde el gen optimizado con codones preferenciales en *P. pastoris*.
- ✓ Se logró el escalamiento de la clona mejor productora obtenida para la proteína E2 optimizada.
- ✓ Se logró la purificación de la proteína recombinante por medio de cromatografía de afinidad.



## CAPÍTULO VIII: ANEXOS

### 8.1. Medios de cultivo

#### 8.1.1. Medio LB (Luria-Bertani)

1% Peptona

0.5% Extracto de levadura

1% Cloruro de sodio

2.2% Agar, si es medio sólido

- i. Para un litro, disolver lo siguiente en 950mL de agua destilada
  - a. 10g de peptona
  - b. 5g de extracto de levadura
  - c. 10g de cloruro de sodio
  - d. 22g de agar, si es medio sólido
- ii. Ajustar el pH de la solución a 7.0 con hidróxido de sodio y aforar a un litro.
- iii. Esterilizar el medio por 20min en autoclave. Dejar enfriar aproximadamente a 55°C y agregar antibiótico si es necesario. Conservar a 4°C.



### 8.1.2. Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)

1% Extracto de levadura

2% Peptona

2% Glucosa

2.2% Agar, si es medio sólido

- i. Para un litro, disolver lo siguiente en 950mL de agua destilada
  - a. 10g de extracto de levadura
  - b. 20g de peptona
  - c. 20g de glucosa
  - d. 22g de agar si es para medio sólido
- ii. Esterilizar el medio por 20min en autoclave. Dejar enfriar aproximadamente a 55°C y agregar antibiótico si es necesario. Conservar a 4°C.

### 8.1.3. Medio MD (Minimal Dextrose)

1.34% YNB

4X10<sup>-5</sup> % Biotina

2% Glucosa

2.2% Agar, si es medio sólido

- i. Para medio líquido, esterilizar 800mL de agua destilada por 20 minutos
- ii. Enfriar aproximadamente a 60°C y agregar:
  - a. 100mL de 10X YNB





- b. 2mL de 500X Biotina
- c. 100mL de 10x Glucosa
- iii. Si es medio sólido agregar 22g de agar en el paso 1 y proceder.  
Conservar a 4°C.

#### **8.1.4. Medio BMMY (Buffered Methanol-complex Medium)**

1% Extracto de levadura

2% Peptona

100mM buffer de fosfatos, pH 6.0

1.34% YNB

$4 \times 10^{-5}$  % Biotina

0.5% Metanol

- i. Disolver 10g de extracto de levadura, 20g de peptona en 700mL de agua destilada
- ii. Esterilizar por 20min en autoclave
- iii. Enfriar a temperatura ambiente y agregar lo siguiente:
  - a. 100mL de 1M buffer de fosfatos, pH 6.0
  - b. 100mL de 10X YNB
  - c. 2mL de 500X Biotina
  - d. 5mL de Metanol
- iv. Conservar a 4°C.



### 8.1.5. Soluciones stock

#### 8.1.5.1. 10X YNB (13.4% yeast nitrogen base con sulfato de amonio sin aminoácidos)

- i. Disolver 134 g de YNB en 1L de agua destilada. Calentar la solución hasta disolver completamente.
- ii. Esterilizar por filtración y conservar a 4°C.

#### 8.1.5.2. 500x Biotina (0.02% Biotina)

- i. Disolver 20mg de biotina en 100mL de agua destilada y esterilizar por filtración.
- ii. Conservar a 4°C

#### 8.1.5.3. Buffer de fosfatos 1M, pH 6.0

- iii. Combina 132mL de 1M  $K_2HPO_4$ , 868mL de 1M  $KH_2PO_4$  y confirmar el pH=6.0. Ajustar con ácido fosfórico o hidróxido de sodio si es necesario.
- iv. Esterilizar por 20min en autoclave y conservar a temperatura ambiente.

### 8.2. Material biológico

Las cepas usadas durante la realización de este trabajo (*E. coli*/TOP10F y *P. pastoris*/GS115) fueron obtenidas del kit “Pichia Expression Kit” de la compañía Invitrogen® (No. de catálogo K1710-01)



## CAPÍTULO IX: REFERENCIAS

1. Hou, J., et al., *Metabolic engineering of recombinant protein secretion by Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 2012. **12**(5): p. 491–510.
2. Liu, Z., et al., *Different Expression Systems for Production of Recombinant Proteins in Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, 2012. **109**(5): p. 1259–1268.
3. Malmoud, K., *Recombinant Protein Production: Strategic Technology and a Vital Research Tool*. Research Journal of Cell and Molecular Biology, 2007. **1**(1): p. 9-22.
4. Liu, Z., et al., *Correlation of cell growth and heterologous protein production by Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013: p. 1-8.
5. Walsh, G., *Biopharmaceuticals: Biochemistry and biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. West Sussex, UK, 1998.
6. Tottrup, H. and S. Carlsen, *A process for the production of human proinsulin in Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and bioengineering, 1990. **35**(4): p. 339-348.
7. Bomholt, J., et al., *Recombinant Production of Human Aquaporin-1 to an Exceptional High Membrane Density in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE, 2013. **8**(2): p. e56431.
8. Ferndahl, C., et al., *Increasing cell biomass in Saccharomyces cerevisiae increases recombinant protein yield: the use of a respiratory strain as a microbial cell factory*. Microb Cell Fact, 2010. **9**: p. 47.
9. Lundstrom, K., *Structural genomics on membrane proteins: mini review*. Comb Chem High Throughput Screen, 2004. **7**(5): p. 431-439.
10. Lundstrom, K., et al., *Structural genomics on membrane proteins: comparison of more than 100 GPCRs in 3 expression systems*. J Struct Funct Genomics, 2006. **7**(2): p. 77-91.



11. Freigassner, M., H. Pichler, and A. Glieder, *Tuning microbial host for membrane protein production* Microbial Cell Factories 2009. **8**(1).
12. Granseth, E., et al., *Membrane protein structural biology – How far can the bugs take us?* Mol Membr Biol, 2007. **24**: p. 329-332.
13. Gordon, E., et al., *Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in Escherichia coli*. Protein Expr Purif, 2008. **62**(1): p. 1-8.
14. Walsh, G., *Biopharmaceutical benchmarks*. Nat Biotechnol, 2010. **28**(9): p. 917–924.
15. Goder, V., T. Junne, and M. Spiess, *Sec61p Contributes to Signal Sequence Orientation According to the Positive-Inside Rule*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1470-1478.
16. Widmann, M. and P. Christen, *Comparison of folding rates of homologous prokaryotic and eukaryotic proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 18619-22.
17. Jonasson, P., et al., *Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli*. Biotechnology Applied Biochemistry, 2002. **35**: p. 91-105.
18. Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius, *Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway*. Science, 1999. **286**(5446): p. 1882-1888.
19. Demain, A.L. and P. Vaishnav, *Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms*. Biotechnology Advances, 2009. **27**(3): p. 297-306.
20. Böer, E., et al., *Yeast expression platforms*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. **77**(3): p. 513-523.
21. Wagner, S., et al., *Tuning Escherichia coli for membrane protein overexpression*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(38): p. 14371-14376.



22. Miroux, B. and J.E. Walker, *Over-production of Proteins in Escherichia coli: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels*. Journal of Molecular Biology, 1996. **260**(3): p. 289-298.
23. Shukla, A.K., et al., *Heterologous expression and characterization of the recombinant bradykinin B2 receptor using the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Protein Expr Purif, 2007. **55**(1): p. 1-8.
24. Berlec, A. and B. Štrukelj, *Current state and recent advances in biopharmaceutical production in Escherichia coli, yeasts and mammalian cells*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013. **40**(3-4): p. 257-274.
25. Romanos, M.A., C.A. Scorer, and J.J. Clare, *Foreign gene expression in yeast: a review*. Yeast, 1992. **8**(6): p. 423-488.
26. André, N., et al., *Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in Pichia pastoris to levels required for structural studies via a single expression screen*. Protein Science, 2006. **15**(5): p. 1115-1126.
27. Kozlov, G., et al., *Crystal Structure of the bb2 Domains of the Protein Disulfide Isomerase ERp57*. Structure (London, England : 1993), 2006. **14**(8): p. 1331-1339.
28. Hirano, N., et al., *Molecular Cloning of the Human Glucose-Regulated Protein ERp57/GRP58, a Thiol-Dependent Reductase*. European Journal of Biochemistry, 2004. **234**(1): p. 336-342.
29. Tan, N.S., B. Ho, and J.L. Ding, *Engineering a novel secretion signal for cross-host recombinant protein expression*. Protein Engineering, 2002. **15**(4): p. 337-345.
30. Mattanovich, D., et al., *Stress in recombinant protein producing yeasts*. Journal of Biotechnology, 2004. **113**(1-3): p. 121-135.
31. Sarramegna, V., et al., *Heterologous expression of G-protein-coupled receptors: comparison of expression systems from the standpoint of large-*



- scale production and purification*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2003. **60**(8): p. 1529-1546.
32. Batista, K.A., et al., *Development of culture medium using extruded bean as a nitrogen source for yeast growth*. Journal of Microbiological Methods, 2013. **92**(3): p. 310-315.
33. Choi, Y.R., et al., *Chromatographically-purified capsid proteins of red-spotted grouper nervous necrosis virus expressed in Saccharomyces cerevisiae form virus-like particles*. Protein Expr Purif, 2013. **89**(2): p. 162-168.
34. McLaughlin-Drubin, M. and K. Münger, *Oncogenic activities of human papillomaviruses*. Virus Research, 2009. **143**(2): p. 195-208.
35. Muller, M. and C. Demeret, *The HPV E2-Host Protein-Protein Interactions: A Complex Hijacking of the Cellular Network*. Open Virol J., 2012. **6**: p. 173-189.
36. Bernard, H.-U., et al., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-79.
37. Doorbar, J., *Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection*. Disease Markers, 2007. **23**(4): p. 297-313.
38. Thierry, F., *Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma*. Virology, 2009. **384**(2): p. 375-379.
39. Longworth, M.S. and L.A. Laimins, *Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(2): p. 362-372.
40. Chow, L.T., T.R. Broker, and B.M. Steinberg, *The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia*. APMIS, 2010. **118**(6-7): p. 422-449.



41. Reimers, L., et al., *Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2009. **18**(3): p. 792-800.
42. Herzog, T.J. and B.J. Monk, *Reducing the burden of glandular carcinomas of the uterine cervix*. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2007. **197**(6): p. 566-571.
43. Lizano-Soberón, M., A. Carrillo-García, and A. Contreras-Paredes, *Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis*. *Cancerología*, 2009. **4**: p. 205-216.
44. Schiffman, M., et al., *Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer*. *Journal of the National Cancer Institute*, 2011.
45. Bai, J., et al., *A Gene Optimization Strategy that Enhances Production of Fully Functional P-Glycoprotein in Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 2011. **6**(8): p. e22577.
46. Yang, J.-K., et al., *de novo Design and Synthesis of Candida antarctica Lipase B Gene and  $\alpha$ -Factor Leads to High-Level Expression in Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(1): p. e53939.
47. Chung, B.K.-S. and D.-Y. Lee, *Computational codon optimization of synthetic gene for protein expression*. *BMC Systems Biology*, 2012. **6**: p. 134-134.
48. Yu, P., et al., *Codon optimisation improves the expression of Trichoderma viride sp. endochitinase in Pichia pastoris*. *Scientific Reports*, 2013. **3**: p. 3043.
49. Hu, H., et al., *Codon Optimization Significantly Improves the Expression Level of a Keratinase Gene in Pichia pastoris*. *PLoS ONE*, 2013. **8**(3): p. e58393.
50. Yang, C., et al., *A Novel Cold-Regulated Cold Shock Domain Containing Protein from Scallop Chlamys farreri with Nucleic Acid-Binding Activity*. *PLoS ONE*, 2012. **7**(2): p. e32012.





51. Monte, M.M., et al., *Cloning and Characterization of Rainbow Trout Interleukin-17A/F2 (IL-17A/F2) and IL-17 Receptor A: Expression during Infection and Bioactivity of Recombinant IL-17A/F2*. *Infection and Immunity*, 2013. **81**(1): p. 340-353.
52. Abdel Wahab, N., J. Gibbs, and R.M. Mason, *Regulation of gene expression by alternative polyadenylation and mRNA instability in hyperglycaemic mesangial cells*. *Biochemical Journal*, 1998. **336**(Pt 2): p. 405-411.
53. Kim, J.-W., et al., *Molecular identification and expression analysis of a natural killer cell enhancing factor (NKEF) from rock bream *Oplegnathus fasciatus* and the biological activity of its recombinant protein*. *Results in Immunology*, 2011. **1**(1): p. 45-52.
54. Itkonen, J.M., et al., *Codon optimization and factorial screening for enhanced soluble expression of human ciliary neurotrophic factor in *Escherichia coli**. *BMC Biotechnology*, 2014. **14**(1): p. 92.
55. Ferreira, A.R., et al., *Evaluation of Naturally Acquired IgG Antibodies to a Chimeric and Non-Chimeric Recombinant Species of *Plasmodium vivax* Reticulocyte Binding Protein-1: Lack of Association with HLA-DRB1\*/DQB1\* in Malaria Exposed Individuals from the Brazilian Amazon*. *PLoS ONE*, 2014. **9**(8): p. e105828.
56. Ahn, J.-H., J.-W. Keum, and D.-M. Kim, *Expression Screening of Fusion Partners from an *E. coli* Genome for Soluble Expression of Recombinant Proteins in a Cell-Free Protein Synthesis System*. *PLoS ONE*, 2011. **6**(11): p. e26875.
57. Spadiut, O., et al., *Quantitative comparison of dynamic physiological feeding profiles for recombinant protein production with *Pichia pastoris**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2014. **37**(6): p. 1163-1172.





58. Ruth, C., et al., *Pichia pastoris Aft1 - a novel transcription factor, enhancing recombinant protein secretion*. *Microbial Cell Factories*, 2014. **13**(1): p. 120.
59. Gurramkonda, C., et al., *Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with Pichia pastoris: Application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen*. *Microbial Cell Factories*, 2009. **8**: p. 13-13.
60. Bawa, Z., et al., *Functional recombinant protein is present in the pre-induction phases of Pichia pastoris cultures when grown in bioreactors, but not shake-flasks*. *Microbial Cell Factories*, 2014. **13**(1): p. 127.
61. Rogé, S., et al., *Recombinant Antigens Expressed in Pichia pastoris for the Diagnosis of Sleeping Sickness Caused by Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2014. **8**(7): p. e3006.
62. Liu, Y., et al., *Codon optimization, expression, purification, and functional characterization of recombinant human IL-25 in Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013. **97**(24): p. 10349-10358.
63. Tam, Y.J., et al., *Enhanced cell disruption strategy in the release of recombinant hepatitis B surface antigen from Pichia pastoris using response surface methodology*. *BMC Biotechnology*, 2012. **12**: p. 70-70.
64. Weinacker, D., et al., *Applications of recombinant Pichia pastoris in the healthcare industry*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013. **44**(4): p. 1043-1048.