

**PROGRAMA DE DOCTORADO
CONJUNTO EN BIOTECNOLOGÍA**



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**



**UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA**

DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Producción de proteínas recombinantes complejas en *Pichia pastoris*: Presencia del pro-domino y su influencia sobre el estrés de retículo.

**Tesis para optar al grado de Doctor en
biotecnología**

Rhonda Patricia Veas Inostroza

Director de Tesis Dr. Julio Berríos
Codirector de Tesis Dr. Nelson Osses

Valparaíso- Chile
Septiembre 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☐ Memoria o trabajo de título ☒ Tesis de Postgrado

Título del trabajo: Producción de proteínas recombinantes complejas en *Pichia pastoris*: Presencia del pro-domino y su influencia sobre el estrés de retículo

Nombre del candidato(a): Rhonda Veas Inostroza

Carrera / Grado: Doctor en biotecnología

Campus: Casa central Valparaíso **Departamento:** Ciencias

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Julio Berríos, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

☒ El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 2 años ☐ 3 años ☐ 5 años ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 31 julio de 2026 **Firma:**

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 31 julio de 2026 **Firma:**



Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

AGRADECIMIENTOS

A Nina Patricia. Un día cualquiera de este año partiste, que me alcance el tiempo para amarte, recordarte y honrarte cada día. Hasta que nos volvamos a encontrar mamita.

A mis tutores, Julio Berríos que siempre encontró las palabras necesarias para calmar mi ansiedad, sin presionarme, gracias por sus preguntas y su perspectiva. Nelson Osses, por su paciencia, experiencia y contribuciones, principalmente en los múltiples formularios a postulaciones.

A mi grupo de laboratorio, tanto al “Grupo Pichia” como al LabTCC, que generosamente me brindaron su tiempo cuando nada de este trabajo salía y pasaba el tiempo. Aprecio profundamente los consejos, las conversaciones, la contención y los momentos de esparcimiento. Al final uno termina pasando más tiempo en el laboratorio que en la casa, por lo que son una pieza fundamental para mantenernos cuerdos.

Agradezco a las fuentes de financiamiento, Beca doctorado nacional ANID 21211280; Beca de término de tesis PUCV 2024-2; Beca de término de tesis USM N° 046 / 2024; Beca de manutención y beca de exención de arancel Doctorado. PUCV, 2019-2022.

A mis amigos, Cristal, Johan, Carlita, Mayra, Victor, Felipe, Diego, Jonitt, Giglia, Karina, Cristobal. Sinceramente no me alcanzan las palabras para agradecer esta hermosa y generosa red de apoyo que me rodea, ustedes que me sacan sonrisas a diario, me abrazaron y sostuvieron cuando todo se vino abajo.

Por último, mis pilares. Mi familia, Astrid, Rodolfo, Chicho, Amanda, Isabella, Pamela. La vida es linda porque los tengo a ustedes. Nada de esto sería posible sin su apoyo incondicional.

*“Close your eyes and think of me
And soon I will be there
To brighten up even your darkest night”*

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCION	9
Proteínas recombinantes como fármacos.....	9
Sistemas de expresión de proteínas recombinantes... ..	11
<i>Pichia pastoris</i> como sistema de producción heteróloga.....	13
Producción de proteínas difíciles de expresar.....	14
Sistema de secreción de proteínas recombinantes.....	19
Estrés de retículo endoplasmático.....	20
Vía de secreción en <i>Pichia pastoris</i>	21
Estructura y Desafíos de Plegamiento de BMP2 y tPA.....	23
HIPOTESIS	24
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 Microorganismos.....	26
4.2 Medios de cultivo.....	26
4.3 Generación de los constructos.....	27
4.4 Estrategias de procesamiento de prodominio.....	27
4.5 Elección y síntesis del vector.....	27
4.6 Propagación de plásmidos.....	28
4.7 Transformación y Banco de células <i>P. pastoris</i>	29
4.8 Verificación de inserción del plásmido en <i>P. pastoris</i>	31
4.9 Selección de clones por número de copias.....	32
5. Caracterizar cepas transformantes para la expresión de BMP2 y tPA en <i>Pichia pastoris</i>	32
5.1 Producción de las proteínas BMP2 y tPA.....	33
5.2 Expresión de proteínas en matraz de agitación.....	33

5.3 Cuantificación de proteínas desde el medio de cultivo.....	33
6. Detección marcadores moleculares para UPR y ERAD.....	35
6.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	35
6.2 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	35
7. Análisis estadístico.....	37
RESULTADOS	38
Objetivo 1: Generar un sistema de producción heteróloga de BMP2 y t-PA en <i>Pichia pastoris</i> utilizando distintas estrategias de procesamiento del pro-dominio	
Generación de los constructos y Cepas transformantes.....	38
Diseño de los plásmidos.....	38
Transformación de las cepas.....	40
Selección clonal por número de copias del gen.....	50
Objetivo 2: Caracterizar cepas transformantes para la expresión de BMP2 y tPA en <i>Pichia pastoris</i>	
Caracterización de las cepas transformantes.....	52
Análisis de la producción de proteínas recombinantes BMP2 y tPA en cepas transformantes de <i>P. pastoris</i>	54
Cuantificación proteínas purificadas por cromatografía de afinidad.....	60
Objetivo 3: Determinar el efecto sobre el estrés de retículo de las variantes de BMP-2 y t-PA	
Activación Vía UPR y ERAD.....	63
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES	79
PROYECCIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXOS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras 3D de las proteínas recombinantes.....	18
Figura 2: Resumen de síntesis de proteínas e interrupciones en la vía secretora.....	20
Figura 3: Esquema representativo del diseño de vectores para evaluar la presencia del pro- dominio.....	39
Figura 4: Esquema de plásmidos pPic α sintetizados con los constructos integrados en la región de clonamiento múltiple.....	40
Figura 5: Fotografías representativas de transformación <i>E.coli</i> TOP10 con vectores de clonamiento.....	41
Figura 6: Comprobación de cepas transformantes.....	42
Figura 7: Digestión de plásmidos por enzima de restricción SacI.....	44
Figura 8: Selección de transformación en placas de YPD con Zeocin™ 200ug/mL.....	44
Figura 9: Electroforesis en gel de 1% agarosa integridad extracción de DNA total <i>P.pastoris</i> transformadas.....	45
Figura 10: Diagrama del diseño de partidores específicos (Bleo y Ps5).....	46
Figura 11: PCR de comprobación de partidores Bleo y Ps5 en plásmidos puros.....	47
Figura 12: PCR de comprobación <i>P. pastoris</i> transformadas genes AOX1, AOX2, Bleo, Ps5 cepas BMP2.....	49
Figura 13: PCR de comprobación <i>P. pastoris</i> transformadas genes AOX1, AOX2, Bleo, Ps5 cepas tPa.....	50
Figura 14: Selección de clones por número de copias del gen.....	51
Figura 15: Curvas de crecimiento de las cepas transformantes en medio de cultivo BMG.....	53
Figura 16: Microscopía óptica de las cepas transformantes en cultivo con medio BMG al alcanzar el estado estacionario.....	54
Figura 17: Cuantificación de proteínas totales desde el medio de cultivo para las cepas productoras de BMP2.....	57
Figura 18: Cuantificación de proteínas totales desde el medio de cultivo para las cepas	

productoras de tPA posterior a la inducción con metanol 0.5%.....	58
Figura 19: Geles de proteína en condiciones denaturantes SDS-PAGE revelado con azul de Coomassie.....	59
Figura 20: Cuantificación de proteínas totales desde fracciones rescatadas de Cromatografía de afinidad de níquel en cepas productoras de BMP2, en sobrenadante de cultivo las 48 horas de producción.....	61
Figura 21: Cuantificación de proteínas totales desde fracciones rescatadas de Cromatografía de afinidad de níquel de cepas productoras de tPA en sobrenadante de cultivo las 48 horas de producción.....	62
Figura 22: expresión relativa de marcadores moleculares asociados a la vía UPR en cepas que expresan BMP2.....	64
Figura 23: expresión relativa de marcadores moleculares asociados a la vía ERAD en cepas que expresan BMP2.....	65
Figura 24: expresión relativa de marcadores moleculares asociados a la vía UPR en cepas que expresan tPA.....	67
Figura 25: expresión relativa de marcadores moleculares asociados a la vía ERAD en cepas que expresan tPA.....	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: modificación sitio de corte.....	27
Tabla 2: Primers utilizados para la detección de la activación de las vías de estrés de retículo endoplasmático obtenidos de Huang 2019(82).....	36
Tabla 3: Tamaño esperado de los plásmidos.....	42
Tabla 4: Tamaños esperados para los fragmentos amplificados por los cebadores Ps5.....	47

RESUMEN

La levadura *Pichia pastoris* se ha consolidado como una plataforma de expresión económica y eficiente para la producción de proteínas recombinantes, con ventajas como tiempos de expresión rápidos y la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales (PTM). Reconocida como GRAS por la FDA, esta plataforma se ha empleado con éxito en la producción de más de 70 proteínas biofarmacéuticas. Sin embargo, su eficacia es limitada en el caso de proteínas recombinantes consideradas “difíciles de expresar”. Este tipo de proteínas son estructuralmente complejas y requieren PTMs específicas, como la formación de enlaces disulfuro y la glicosilación, que son fundamentales para su correcto plegamiento. La sobreexpresión de estas proteínas puede sobrecargar la maquinaria celular de plegamiento y secreción, lo que induce una respuesta de estrés en el retículo endoplásmico (RE).

El principal obstáculo para la secreción de una proteína recombinante es su plegamiento incorrecto, que activa la respuesta de proteína no plegada (UPR) y la degradación asociada a RE (ERAD). Una estrategia clave para superar esta limitación es la selección de señales de secreción adecuadas que dirijan de forma óptima el procesamiento postraduccional. Aquí, evaluamos si la presencia del pro-dominio de proteínas “difíciles de expresar” influye en la expresión y secreción de proteínas recombinantes producidas en *Pichia pastoris*.

Para ello, se utilizaron dos proteínas modelo de estructura compleja: la Proteína Morfogenética Ósea 2 (BMP2) y el activador tisular del plasminógeno (tPA). Se diseñaron y generaron cepas transformantes de *Pichia pastoris*, los constructos genéticos incluían tres variantes para cada proteína: la región madura ("m"), con el pro-dominio completo (pro-) y con una modificación en el sitio de corte Kex2 (K). Las cepas se caracterizaron y, una vez establecidas, se indujo la expresión de las proteínas. Para evitar los efectos del estrés masivo, se utilizaron cepas con una inserción del gen (monocopia). Se evaluó la activación del estrés de retículo mediante la cuantificación de la expresión de marcadores moleculares de UPR y ERAD en los distintos constructos.

Los resultados demostraron que la presencia del pro-dominio no influyó en la activación de

las vías de estrés celular (UPR y ERAD) en las cepas monocopia, lo que contrasta con el comportamiento de cepas multicopia que sí exhiben una sobreexpresión de marcadores como la Disulfuro isomerasa (PDI). Aunque el análisis por cromatografía de afinidad confirmó la presencia de las proteínas en todas las fracciones, no se observaron diferencias significativas entre las variantes de los pro-dominios. Estos hallazgos indican que, si bien la estrategia del pro-dominio no activó la respuesta de estrés celular en las cepas monocopia, no fue suficiente para lograr una alta producción de las proteínas de interés. Esto sugiere que el pro-dominio podría no ser el factor determinante en este sistema y que el cuello de botella podría residir en otra etapa de la vía secretora.

ABSTRACT

Pichia pastoris yeast has established itself as an economical and efficient platform for producing recombinant proteins, with advantages like rapid expression times and the ability to perform post-translational modifications (PTMs). Recognized as GRAS by the FDA, this platform has been successfully used to produce over 70 biopharmaceutical proteins. However, its effectiveness is limited for so-called "difficult-to-express" recombinant proteins. These proteins are structurally complex and require specific PTMs, such as disulfide bond formation and glycosylation, which are fundamental for their correct folding. Overexpression of these complex proteins can overwhelm the cell's folding and secretion machinery, inducing a stress response in the endoplasmic reticulum (ER).

The main obstacle to recombinant protein secretion is incorrect folding, which activates the unfolded protein response (UPR) and ER-associated degradation (ERAD) pathway. A key strategy to overcome this limitation is to select appropriate secretion signals that optimally guide post-translational processing. In this thesis, we evaluated whether the presence of a pro-domain in "difficult-to-express" proteins influences the expression and secretion of recombinant proteins produced in *Pichia pastoris*.

To do this, we designed and generated *Pichia pastoris* transformant strains carrying genetic constructs for two complex model proteins: Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) and tissue plasminogen activator (tPA). The constructs included three variants for each protein: the mature region ("m"), the full pro-domain ("pro-"), and a modification in the Kex2 cleavage site ("K"). The strains were characterized and, once established, protein expression was induced. To avoid the effects of massive stress, we used strains with a single gene insertion (monocopy). We evaluated the activation of ER stress by quantifying the expression of molecular markers for UPR and ERAD in the different constructs.

The results showed that the presence of the pro-domain did not influence the activation of cellular stress pathways (UPR and ERAD) in the monocopy strains, which contrasts with the behavior of multicopy strains that did exhibit an overexpression of markers like PDI.

Although affinity chromatography analysis confirmed the presence of proteins in all fractions, no significant differences were observed between the pro-domain variants. Likewise, the protein bands for BMP2 and tPA on the gels were faint, suggesting low production. These findings indicate that while the pro-domain strategy did not activate the cellular stress response in the monocopy strains, it was not enough to achieve high production of the target proteins. This suggests that the pro-domain may not be the determining factor in this system and that the bottleneck may reside elsewhere in the secretory pathway.

INTRODUCCIÓN

Proteínas recombinantes como fármacos

Las proteínas cumplen funciones fundamentales para la vida, catalizan reacciones metabólicas, forman complejos biológicos, participan activamente en la señalización celular y son responsables de las interacciones inter e intracelulares. Por ello, muchas de estas proteínas se utilizan en la biomedicina como blancos terapéuticos y/o productos farmacéuticos (1). Con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante se abrió una nueva etapa para la obtención de proteínas en sistemas de expresión heteróloga, transformándose en una plataforma convencional en la biotecnología moderna, para la obtención de proteínas recombinantes (rProt) de uso industrial (2) y proporcionando importantes avances en biomédica donde no solo se usan en investigación, sino también como medicamentos en el tratamiento de diversas enfermedades (3).

La primera rProt utilizada en la industria farmacéutica fue la insulina humana recombinante (Humulin®) que fue aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés, Food and Drug Administration) en 1982, proporcionando una nueva generación de terapias basadas en proteínas (4).

Actualmente se utiliza el término 'biofarmacéutico' para referirse a rProt terapéuticas (incluidos los anticuerpos), productos basados en ácidos nucleicos y productos basados en células o tejidos diseñados (5). Para el 2018, el número de biofarmacéuticos con licencias activas en los Estados Unidos y la Unión Europea era de 285 productos proteicos aprobados para su comercialización, estos incluyen hormonas recombinantes, interferones, interleucinas, factores de crecimiento, fármacos trombolíticos, etc. El objetivo es tratar enfermedades importantes como diabetes, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva y cáncer, entre otras patologías (5–7).

Desde entonces, la cifra ha seguido creciendo de manera sostenida, y para 2023 la FDA reportaba más de 400 biofármacos aprobados para su comercialización. Entre los ejemplos más destacados se encuentran los anticuerpos monoclonales terapéuticos (mAbs), que

dominan el mercado biotecnológico con aplicaciones en oncología (trastuzumab, rituximab) (8), enfermedades autoinmunes (Adalimumab, Infliximab) (9) y enfermedades inflamatorias crónicas (Etanercept) (10). Asimismo, proteínas recombinantes como los factores de coagulación (factor VIII y IX para hemofilia) (11), las eritropoyetinas para anemia asociada a insuficiencia renal crónica y los factores de crecimiento granulocitario (filgrastim, pegfilgrastim) (12) han transformado el tratamiento clínico de millones de pacientes.

En la última década, también se han incorporado proteínas de nueva generación como enzimas recombinantes utilizadas en terapias de reemplazo en enfermedades raras (por ejemplo, imiglucerasa y laronidasa), así como proteínas de fusión Fc diseñadas para aumentar la vida media en circulación (13,14). Paralelamente, varias proteínas recombinantes se encuentran en fases avanzadas de ensayos clínicos, incluyendo nuevas variantes de hormonas del crecimiento, interferones optimizados, BMPs para regeneración ósea y versiones mejoradas de activadores tisulares del plasminógeno (tPA) con mayor estabilidad y eficacia trombolítica. Vacunas recombinantes, como las aprobadas contra la hepatitis B (Shanvac™) y, más recientemente, las vacunas contra el COVID-19 (Corbevax®) (15).

Este panorama refleja no solo el crecimiento exponencial del número de proteínas recombinantes aprobadas, sino también la diversificación de sus aplicaciones, consolidando a las rProt como una de las clases de fármacos más relevantes e innovadoras en la medicina moderna.

El mercado de las rProt presenta drásticas diferencias en los precios de venta, donde las proteínas destinadas al uso industrial se venden por decenas de dólares por kilogramo (kg), mientras que las destinadas a la biomedicina pueden venderse por miles de millones de dólares por kg. A pesar de que ambas presentan similitudes técnicas en su fabricación, llevar un medicamento al mercado se estima en \$1.4 billones de dólares (16,17), lo que se traduce en que, desafortunadamente, los costos de los medicamentos proteicos a menudo son extremadamente altos. Un ejemplo representativo, para el 2013, la eritropoyetina humana recombinante (EPO), usada en el tratamiento para la anemia por insuficiencia renal o

tratamiento contra el cáncer, costaba más de 2 mil millones USD/kg. Del mismo modo, terapias de reemplazo de enzimas como las enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD) representaban más de \$150 mil USD/año por paciente. Estos altos costos se explican parcialmente por la inversión en el desarrollo de productos, los gastos asociados al análisis y control de calidad (18). Aunque la biofarmacéutica representa sólo una fracción menor de los productos médicos comerciales, dominan la lista de medicamentos más vendidos en todo el mundo. Incluso, por la creciente demanda mundial de medicamentos asequibles y la escasez de productos biofarmacéuticos esenciales se han establecido mercados ilegales, donde se comercializan sin ser autorizados y en algunos casos, incluso sin completar ensayos clínicos para establecer su seguridad (19). Debido a esto, existe una fuerte presión para la búsqueda de alternativas rentables e innovadoras en la producción de fármacos proteicos.

Sistemas de expresión de proteínas recombinantes.

Para producir proteínas recombinantes el primer paso es clonar el ADN deseado; entonces la proteína se amplifica en el sistema de expresión elegido. Existen variados sistemas de expresión de proteínas disponibles tanto procariotas, como eucariotas, que van desde cultivos celulares bacterianos, levaduras, mohos, mamíferos, plantas o insectos, incluso plantas y animales transgénicos. La elección del sistema de expresión adecuado dependerá de la calidad de la proteína, la funcionalidad, la velocidad de producción y el rendimiento que se requiera (20–24). Las proteínas con valor terapéutico a menudo requieren modificaciones postraduccionales (PTM) necesarias para llevar a cabo su función biológica natural. Estos incluyen, procesamiento proteolítico, formación de enlaces disulfuro, plegamiento de proteínas, glucosilación, entre otras. Además, las proteínas terapéuticas poseen complejas estructuras secundarias y terciarias que deben mantenerse (5), generando que el hospedero requiera de medios nutricionales complejos para realizar estas modificaciones, generando un crecimiento más lento, frágil, alargando los tiempos y costos de producción del biofármaco (25).

Los sistemas bacterianos de producción de proteínas terapéuticas son atractivos debido a los bajos costos de cultivo, el rápido crecimiento de las bacterias y su productividad. Sin

embargo, carecen de núcleo, retículo endoplásmico (ER) o aparato de Golgi, que desempeñan un papel importante en el transporte y las PTM. Dado que las PMT están involucradas en procesos de plegamiento, estabilidad y actividad biológica, una rProt derivada de bacterias podría estar inactiva o incluida en estructuras como los cuerpos de inclusión (26). Finalmente, las bacterias que sobre producen proteínas recombinantes son susceptibles a tensiones conformacionales o metabólicas, afectando negativamente la solubilidad de las proteínas (27).

Por otra parte, las líneas celulares de mamíferos son las plataformas de producción más utilizadas en la producción biomédica, debido principalmente a la similitud funcional en la síntesis de proteínas humanas y su capacidad de realizar PTM. La mayoría de los productos biofarmacéuticos comercializados se producen en líneas celulares inmortalizadas como ovario de hámster chino (CHO), células de mieloma murino (NS0), células de embrionarias de riñón humano 293 (HEK 293) y células de riñón de hámster bebé (BHK- 21). Aunque la producción en estos sistemas de expresión requiere medios de producción y crecimiento más sofisticados, son los más requeridos en la producción de proteínas (28,29).

Las células CHO se consideran el “*gold standard*” de la producción de proteínas de mamíferos especialmente a escala industrial donde pasó de producir títulos de 5–50 mg/L en 1985, a 5 g/L en el 2005 que siguen mejorando (30,31). Estos avances en la productividad se deben a que permite el crecimiento de células a altas densidades en cultivos en suspensión y la mejora de medios libres de suero definidos químicamente, que carecen de materiales derivados de animales. Estos medios personalizados son más rentables, ya que no requieren suplementos con suero de fetal bovino; son más seguros, ya que hay menos riesgo de contaminación viral y por priones del suero bovino; y han simplificado los requisitos de procesamiento (32). Sin embargo, aún se requiere la implementación de procesos de eliminación viral mediante el uso de filtros o resinas, así como los pasos de inactivación mediante el uso de pH bajo o detergentes, para prevenir el grave problema de seguridad de la contaminación viral de las sustancias farmacológicas proteicas, del mismo modo, son sensibles a variaciones en las condiciones de cultivo.

Problemas como la falta de nutrientes, la limitación de oxígeno, la acumulación de subproductos tóxicos y la alta osmolaridad, pueden conducir a la apoptosis celular, que tiene un impacto negativo en la productividad final (33).

Por otra parte, las levaduras, al ser organismos eucariotas también son capaces de realizar PTM, sus medios de cultivo son considerablemente menos costosos, son definidos y permiten obtener altos rendimientos de rProt, combinando producción en biorreactores a gran escala, con modificaciones genéticas fáciles de lograr y altas concentraciones de biomasa. Además, las levaduras son considerablemente menos susceptibles a la contaminación del cultivo y, finalmente, por su pared celular son menos sensibles y más resistentes al proceso de producción (34). Dadas estas características, representan una muy buena opción intermedia entre sistemas bacterianos y mamíferos.

El mecanismo de expresión de proteínas en estos microorganismos es cercano al de las células de mamíferos. En comparación con las bacterias, las células de levadura tienen ventajas como velocidad de crecimiento, PTM, expresión secretora y fácil manipulación genética. Las proteínas de expresión en *S. cerevisiae* a menudo están hiperglicosiladas, un proceso que puede alterar la estructura de la proteína y, como resultado, desencadenar una respuesta inmune en el organismo del paciente (35), esto no sucede en otras levaduras, como *Pichia pastoris* (36).

***Pichia pastoris* como sistema de producción heteróloga.**

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*P.pastoris*), recientemente reclasificada como *Komagataella phaffii* (37), es actualmente el sistema de expresión de proteínas más utilizado después de *Escherichia coli*, y se ha establecido como una plataforma exitosa especialmente en el sector de enzimas industriales y la industria biofarmacéutica. Como microorganismo considerado generalmente seguro (GRAS) varios productos biofarmacéuticos han sido aprobados para uso humano por organismos reguladores como la FDA, como es el caso del inhibidor de la calicreína Kalbitor[®] (38) y más de 70 productos que se encuentran en el mercado o en fase de desarrollo tardío (39). *P. pastoris*, al ser menos exigente en términos de tiempo y esfuerzo en relación con los sistemas eucariotas complejos, es capaz de producir títulos altos, siendo aplicada ampliamente para la

producción comercial de diversas proteínas biofarmacéuticas. Algunos ejemplos son: precursor de insulina a 1,5 g/L, Interleucina 2 intracelular 4 g/L, albúmina sérica humana secretada 4 g/L, factor de necrosis tumoral 6 g/L entre otras proteínas heterólogas de interés farmacéutico (22).

Pichia pastoris posee una serie de ventajas distintivas sobre otros hospederos. Es capaz de utilizar un modo de respiración aeróbico que le permite alcanzar una alta densidad celular de cultivo (130 g/ L). Además, se dispone de plásmidos con diversos promotores, como el constitutivo GAP o el inducible por metanol AOX1, lo que permite una expresión génica controlada (40).

Una de sus mayores fortalezas es su capacidad de realizar expresión secretora con un bajo nivel de secreción de proteínas endógenas (41). Esto facilita enormemente la purificación de la proteína recombinante. Por si fuera poco, a través de la ingeniería metabólica de la ruta de glicosilación, *Pichia pastoris* puede imitar el sistema de los mamíferos (42). Este proceso es fundamental para obtener proteínas terapéuticas, ya que la glicosilación es crucial para su correcto plegamiento, solubilidad, estabilidad y actividad biológica.

Estas características, sumadas a su capacidad de producir proteínas de manera intracelular o extracelular, han ampliado el espectro de proteínas recombinantes que pueden expresarse en este hospedero, convirtiéndolo en una plataforma ideal para la producción de proteínas de estructura compleja destinadas a la biomedicina.

Producción de proteínas difíciles de expresar

A pesar de los grandes avances en la expresión de rProt en sistemas heterólogos, la producción a escala sigue enfrentando desafíos significativos. Se ha estimado que aproximadamente un 50% de los experimentos fallan en la fase de expresión (43). En gran parte, esta alta tasa de fracaso se debe a que son un grupo de proteínas con estructura compleja consideradas “difíciles de expresar” debido a un conjunto de propiedades intrínsecas que complican su procesamiento en la célula huésped. Estas proteínas son estructuralmente complejas y presentan características que comprometen su secreción y

estabilidad (44).

Dichas propiedades incluyen un plegamiento riguroso, la necesidad de variadas y específicas PTMs, el ensamblaje en complejos homoméricos o heteroméricos, o bien, la capacidad de producir estrés en la vía traduccional del hospedero (44). Estos requerimientos a menudo exceden la capacidad celular, generando inconvenientes como cuellos de botella, toxicidad o la agregación de proteínas en cuerpos insolubles. Un problema recurrente es el plegamiento inadecuado de la proteína de interés, que resulta en la pérdida de su función nativa, un evento que ocurre con frecuencia en la expresión de proteínas humanas de interés farmacológico. Por lo tanto, a medida que aumenta la complejidad de estas proteínas, la eficacia de las plataformas de fabricación tradicionales se ve seriamente comprometida (45,46).

En el caso de las bacterias, esto se atribuye principalmente a factores como las diferencias en el uso de codones, la terminación prematura de la traducción por la presencia de secuencias repetitivas de ADN, diferencias en el potencial redox citoplasmático que interfieren con la formación de enlaces disulfuro y de la falta de PTM (47). Además, como la expresión funcional está relacionada con el tamaño y las características de la proteína heteróloga, donde se ha informado que las proteínas con gran peso molecular o aquellas que poseen varios dominios de membrana presentan una tendencia mucho mayor a formar agregados insolubles y son propensas a la proteólisis, generando títulos bajos (46,48). Algunos de estos problemas también se han detectado en la producción en células CHO. Principalmente, la información detallada sobre la productividad y los niveles de expresión en plataformas heterólogas se concentra en la obtención de anticuerpos monoclonales (mAb) y proteínas de fusión Fc (13,14,49). Esta abundancia de datos en torno a los mAb ha establecido un estándar de referencia implícito para el sector, pero al mismo tiempo, genera una brecha significativa. Como resultado, existe escasa información publicada sobre los niveles de expresión y secreción de otras clases de proteínas consideradas "difíciles de expresar". Esta disparidad dificulta de manera crítica la capacidad de definir umbrales claros que constituyan una baja o alta productividad para productos proteicos que no son mAb, volviendo difícil comparar y evaluar la eficiencia de

diferentes sistemas de producción (50,51).

La rProt puede ser difícil de expresar no solo debido a desafíos intracelulares que genera en el hospedero (como toxicidad y sobrecarga), sino también, debido a sus propiedades estructurales intrínsecas como la complejidad de su forma tridimensional o la tendencia a generar agregados. Estas características requieren el uso de estrategias de ingeniería para superar estas limitaciones de producción (52,53).

En contraste, es importante reconocer que las proteínas terapéuticas menos complejas, que requieren pocas o ninguna modificación postraducciona (PTM), han sido expresadas exitosamente en diversos hospederos. El caso más notable es el de la insulina humana recombinante (Figura 1A), una de las primeras rProt aprobadas, cuya estructura relativamente sencilla ha permitido su producción a escala y de manera eficiente en sistemas microbianos como las bacterias (54).

Sin embargo, a medida que la complejidad aumenta, la eficacia de las plataformas se compromete. A pesar de que *Pichia pastoris* es un referente en la producción de proteínas de membrana —un tipo de proteínas complejas consideradas difíciles de expresar (55)—, existe una brecha de conocimiento respecto a su capacidad para obtener otro tipo de proteínas dentro de este grupo (56). No obstante, al igual que en otros sistemas de expresión, parece haber un consenso en que la vía secretora y el correcto plegamiento de la rProt constituyen los principales cuellos de botella en la secreción. Se sabe que la generación de ciertas proteínas que requieren de múltiples PTMs sobrepasa la capacidad de plegamiento y secreción de la célula, lo que invariablemente desencadena estrés celular. Por lo tanto, aún se requiere investigar en profundidad el potencial de *P. pastoris* y sus límites para la expresión de proteínas complejas (57,58).

Un ejemplo de proteína compleja es la Proteína morfogenética ósea 2 (BMP2). Esta proteína cumple un rol osteoinductor y se utiliza en la regeneración de tejido óseo (59). Se considera una proteína difícil de expresar ya que su forma nativa se sintetiza como un zimógeno, es decir, una forma precursora biológicamente inactiva. Para alcanzar su forma funcional madura, la proteína requiere un procesamiento proteolítico específico, donde el pro-dominio conformado por 261 aminoácidos debe ser escindido o “cortado” del

péptido maduro, que posee 114 aminoácidos. Este pro-dominio es más que un simple fragmento; su presencia es crucial, ya que se encarga de asistir en el plegamiento correcto de la proteína madura antes de que ocurra el corte. La proteína madura es compleja (Figura 1B), presenta un nudo de cisteína con tres puentes disulfuro (dos intracatenarios y uno destinado a formar la estructura dimérica activa), además de requerir un sitio de potencial glicosilación (60). Es una proteína pequeña, cuyo homodímero tiene un peso molecular de 26 KDa. Se ha conseguido su producción en células CHO (61) sin embargo, no existen antecedentes de producción de BMP2 en *P. pastoris*, aunque se ha logrado expresar otras proteínas de esta familia como la proteína BMP4 y 7, pero estas no pudieron formar las estructuras nativas adecuadas (62).

Otro ejemplo de proteína compleja es el activador tisular del plasminógeno (tPA), una serina proteasa fundamental en el área clínica, cuya función principal es catalizar la conversión de plasminógeno en plasmina, enzima fundamental en la disolución de coágulos sanguíneos (63,64). Su estructura es un mosaico compuesto por 517 aminoácidos y posee cinco dominios (Figura 1C), requiere la formación de 17 puentes disulfuro y posee tres sitios potenciales de glicosilación en su estructura madura, se considera una proteína grande cuyo peso molecular es de 70 kDa. Si bien, esta proteína se produce comúnmente en células CHO, su vital aplicación clínica ha impulsado una extensa y variada investigación para optimizar su producción. Por ello, se ha conseguido su producción en una amplia gama de hospederos, incluyendo animales transgénicos (65) y levaduras como *P. pastoris*. Más aún, este fuerte interés por su producción se refleja en el desarrollo de fragmentos modificados y quiméricos, que solo contienen su fracción catalítica. Esta diversificación de estrategias y la simplificación estructural demuestran los esfuerzos de la biotecnología por superar los retos de producción y garantizar un suministro eficiente y funcional para su uso terapéutico (66–68).

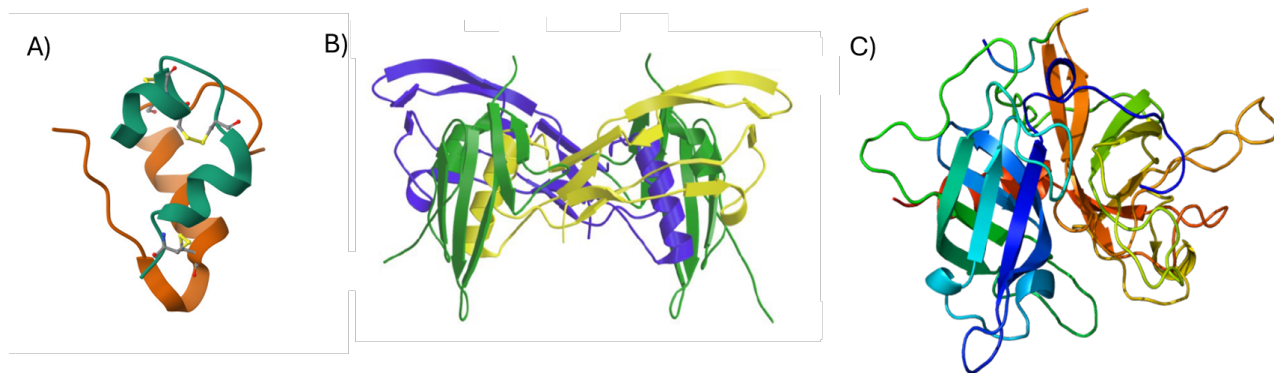


Figura 1: Estructuras 3D de las proteínas recombinantes. En A, se muestra la estructura cristalizada 3D de la insulina recombinante pdb_00006o17. En B la estructura cristalizada 3D de la proteína BMP2 extraída de Koztsh 2015 (69). En C, la estructura cristalizada 3D de la proteína tPA pdb_00001bda.

Dadas las características moleculares de ambas proteínas su producción en sistemas de expresión como las bacterias, que carecen de la maquinaria para realizar estas PTMs, a menudo resulta en proteínas inactivas o insolubles (44). Sin embargo, *P. pastoris* posee la capacidad para realizar estas modificaciones postraduccionales complejas, si bien el patrón de N-glicosilación de *P.pastoris* difiere del patrón mamífero, su naturaleza altamente manosilada ha demostrado ser compatible con la actividad biológica de numerosas proteínas de interés terapéutico y, en ciertos casos, incluso confiere ventajas como una mayor vida media sérica y una menor inmunogenicidad (70). Esta característica la posiciona como una plataforma ideal para la producción de moléculas biofarmacéuticas complejas que de otro modo se degradarían o serían inactivas en otros sistemas de expresión (71). Sin embargo, los mecanismos que guían la síntesis, PTMs (procesamiento proteolítico, glicosilaciones, dimerizaciones, formación de enlaces disulfuro) y secreción de rProt pueden ser sobrepasados en el caso de proteínas complejas como BMP2 y tPA, generando un cuello de botella de la vía secretora.

Sistema de secreción de proteínas recombinantes

La secreción de proteínas heterólogas no es solo un simple proceso homogéneo de síntesis de proteínas, sino que también involucra muchos otros factores como la translocación co- o postraduccional de la proteína nascente en el retículo endoplasmático (ER) mediada por un péptido señal, plegamiento de proteínas a su estado nativo, formación de enlaces disulfuro, control de calidad dentro del ER, glicosilación (en el ER y en el aparato de Golgi), tráfico y clasificación intracelular de proteínas, y estrés celular por plegamiento incorrecto o sobreexpresión de la proteína de interés (52,72,73) esquematizados en la Figura 2.

Por lo tanto, cuando la proteína es muy compleja, o requiere de muchas PTM, su procesamiento puede exceder la capacidad de plegamiento del ER generando un cuello de botella en la vía de secreción, desencadenando estrés celular. La respuesta celular al estrés se representa a nivel molecular induciendo la síntesis de chaperonas y/o proteasas. Las chaperonas actúan en el plegamiento, translocación y re-plegamiento de proteínas, capturando intermediarios plegables para evitar la agregación errónea y/o para facilitar el re-plegamiento, activando la respuesta de proteína no-plegada o mal plegada (UPR de sus siglas en inglés *Unfolded Protein Response*). Por otra parte, las proteasas aseguran que las proteínas dañadas y de corta duración se degraden eficientemente por la vía de degradación asociada a ER (ERAD, de sus siglas en inglés *Endoplasmic reticulum-associated degradation*) (74–76).

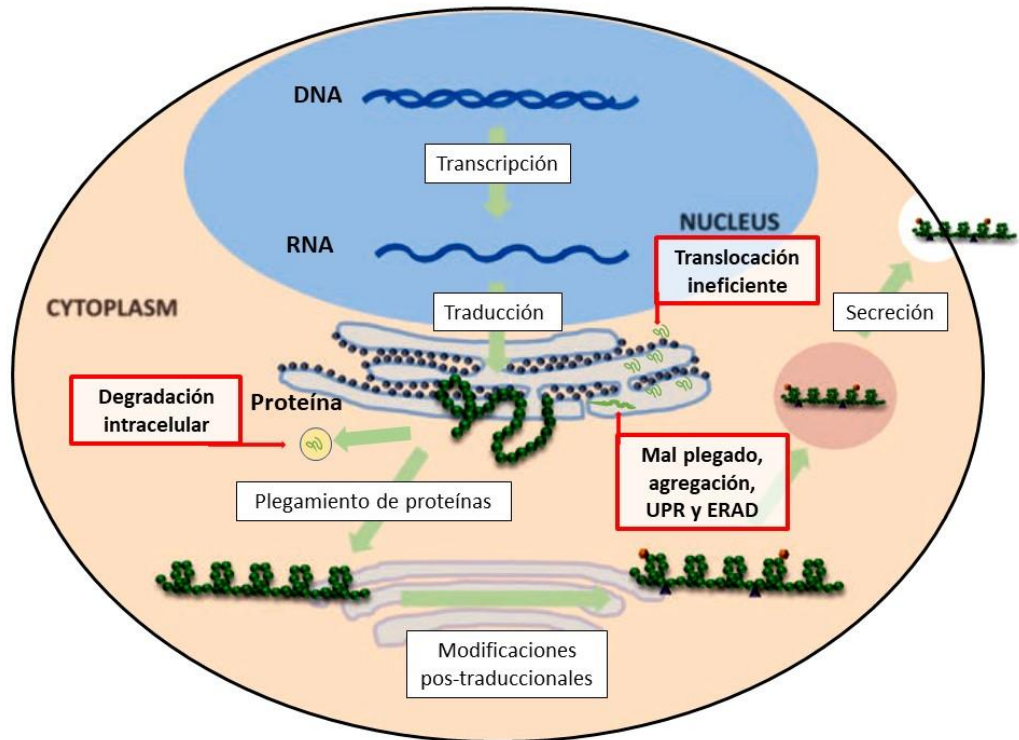


Figura 2: Resumen de síntesis de proteínas e interrupciones en la vía secretora. El ARN se transcribe en el núcleo y luego se transporta al citoplasma y se traduce por los ribosomas. Las proteínas se unen al ER, donde se pliegan y procesan antes de pasar al Golgi. Las proteínas sufren modificaciones postraduccionales y posteriormente se procesan a través de la vía secretora. En rojo se destacan los puntos principales “cuellos de botella” en el proceso de secreción de las proteínas. Modificada de Alves & Dobrowsky, 2017.

Estrés de retículo endoplasmático

El estrés de retículo endoplasmático (ER) es una respuesta adaptativa de la célula, pero cuando se mantiene de manera crónica debido a la sobreproducción de proteínas mal plegadas, puede conducir a consecuencias deletéreas. Cuando la acumulación de rProt activa la vía de UPR, se desencadena un mecanismo de señalización celular que inicia con el aumento del factor de transcripción HAC1. Este permite la traducción de una forma activa de la proteína Hac1p, que se transloca al núcleo para activar la expresión de genes

diana. Entre estos genes se encuentran la chaperona KAR2 (también conocida como BiP), que ayuda en el correcto plegamiento de la proteína de interés, la Proteína disulfuro isomerasa (PDI), que cataliza la formación de puentes disulfuro, y la oxidorreductasa ERO1, que aumenta la capacidad oxidativa del ER (77). Una UPR sostenida puede agotar las chaperonas del RE y las reservas energéticas, comprometiendo la viabilidad y activando vías de apoptosis celular, lo que se traduce en bajos títulos de producción (77).

La célula cuenta con un segundo mecanismo de control de calidad para las proteínas que no pueden ser correctamente plegadas: la Degradación asociada al Retículo Endoplasmático (ERAD). Esta vía es fundamental para eliminar proteínas mal plegadas que, de otra forma, se acumularían y causarían toxicidad celular (75). Los componentes clave de ERAD forman un complejo que identifica y retrotransloca las proteínas del lumen del RE hacia el citosol. Este complejo incluye el canal de translocación SEC63 y la proteína accesoria DER1 (76). Una vez en el citosol, la proteína mal plegada es marcada para su degradación por la ubiquitina ligasa HRD1, que añade cadenas de ubiquitina. Finalmente, estas proteínas ubiquitinadas son degradadas por el proteosoma. Una sobrecarga de la vía ERAD, causada por la producción de proteínas recombinantes con un plegamiento ineficiente, puede llevar a una disfunción del sistema, resultando en la retención de la proteína en el RE y, consecuentemente, en títulos de secreción bajos (78). Por lo tanto, un plegamiento ineficiente no solo activa la UPR, sino que también sobrecarga la vía ERAD, contribuyendo a la disminución de la productividad.

Vía de secreción en *Pichia pastoris*

La producción de proteínas recombinantes de alta complejidad en *Pichia pastoris* está intrínsecamente ligada a la eficiencia de su vía secretora (79).

La limitación para que una proteína considerada difícil de expresar ingrese a la vía de secreción puede estar mediada por tres factores, el primero, la translocación de la proteína nascente al ER mediada por el péptido señal, luego, los niveles de chaperonas para su plegamiento y finalmente, el mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína nativa.

El péptido señal más eficaz para dirigir la proteína a través de la vía secretora en *P. pastoris* es el factor de apareamiento de alfa (MF α) de *S. cerevisiae*. Este se compone de una región pre y pro, la pre-región es responsable de dirigir la proteína nascente post-traduccionalmente hacia el retículo endoplásmico (ER) y posteriormente es escindida por una peptidasa señal. Se cree que la región pro desempeña un papel en la transferencia de la proteína desde el ER al Golgi, ayuda a prevenir la preactivación de proteínas antes de que lleguen a sus destinos celulares finales e incluso, puede actuar como chaperona. Luego es escindido de la proteína nascente por proteasas tardías residentes en Golgi, como la proteasa Kex2 presente en levaduras que se ha descrito ampliamente en *S. cerevisiae* (42,80,81).

Respecto al plegamiento al estado nativo de la proteína diana, varios estudios han encontrado que los pro-dominios en algunas proteínas sintetizadas como zimógenos son importantes para la producción de proteínas maduras activas. Al igual que con MF α , los pro-dominios pueden actuar como chaperonas intramoleculares para ayudar al plegamiento adecuado de péptidos maduros o a estabilizar los péptidos maduros para aumentar su transporte de ER a Golgi (41,62). Por ello, la coexpresión de la secuencia del péptido maduro y el pro-dominio puede proporcionar una estrategia para la producción eficiente de proteínas difíciles de expresar y biológicamente activas en *P. pastoris*. Por lo tanto, una consideración fundamental para optimizar la expresión y secreción de proteínas en este ventajoso hospedero corresponde a la selección apropiada de señales de secreción que dirigen el procesamiento postraducciona l de la proteína nascente.

Al respecto, postulamos que, en la vía secretora de *Pichia pastoris*, no es suficiente con el péptido señal MF α ; la clave podría residir en un pro-dominio eficientemente diseñado puede facilitar la adquisición de la estructura nativa de proteínas con múltiples puentes disulfuro. Un pro-dominio funcional ayudaría a evitar la formación de agregados insolubles y la activación del mecanismo ERAD, promoviendo así un tránsito fluido a través del RE. Por el contrario, un pro-dominio no optimizado o la ausencia de este, podría resultar en un plegamiento ineficiente, aumentando la carga de trabajo del RE y desencadenando las vías de UPR y ERAD. Esta estrategia, que enfoca la eficiencia de

la secreción desde el diseño del pro-dominio, no ha sido evaluada previamente en detalle. De esta manera, las modificaciones en el pro-dominio se convierten en una estrategia directa para modular la secreción y mitigar el estrés celular.

Estructura y Desafíos de Plegamiento de BMP2 y tPA

Las proteínas seleccionadas, BMP2 y tPA, son patrones modelo que representan desafíos de plegamiento en la producción de biofármacos. BMP2 pertenece a la superfamilia TGF- β y se caracteriza por la presencia de siete residuos de cisteína que forman una estructura de "nudo de cisteínas" (cysteine knot), la cual es fundamental para su actividad osteoinductiva. El tPA, por su parte, es una serín proteasa con cinco dominios estructurales (dedo, Kringle 1, Kringle 2, dominio de crecimiento epidérmico y dominio de serín proteasa), cada uno de los cuales requiere un plegamiento preciso y la formación de múltiples puentes disulfuro intrínsecos. La producción de estas moléculas en sistemas procariotas o en levaduras con capacidades de plegamiento limitadas a menudo resulta en la formación de cuerpos de inclusión o proteínas inactivas. Por lo tanto, el uso de estas proteínas como modelos es ideal para evaluar cómo un pro-dominio puede mejorar la capacidad del retículo endoplasmático de *Pichia pastoris* para procesar y secretar estructuras proteicas de alta complejidad.

HIPÓTESIS

“Los niveles de secreción de proteínas complejas de producir en *Pichia pastoris* dependen de la presencia de su prodominio, lo que se asocia a un menor estrés de retículo”

Para evaluar este postulado, durante esta investigación se utilizaron dos proteínas modelo de estructura compleja, la Proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) y el activador tisular del plasminógeno (tPA).

OBJETIVOS:

Objetivo general:

Analizar la importancia del pro-dominio en la expresión y secreción de proteínas recombinantes complejas producidas en *Pichia pastoris*, evaluando su impacto en la activación de la respuesta de estrés en el retículo endoplasmático (UPR y ERAD).

Objetivos específicos:

1. Generar un sistema de producción heteróloga de BMP2 y tPA en *Pichia pastoris* utilizando distintas estrategias de procesamiento del pro dominio.
2. Caracterizar cepas transformantes para la expresión de BMP2 y tPA en *Pichia pastoris*.
3. Determinar el efecto sobre el estrés de retículo de las variantes de BMP-2 y t-PA.

MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Microorganismos

Escherichia coli

Para la multiplicación y amplificación de los plásmidos, se empleó la cepa *E.coli* TOP10, del banco de cepas del Laboratorio de cultivos celulares, EIB-PUCV.

Pichia pastoris

Para la expresión de BMP2 y tPA en levaduras se utilizó la cepa de *Pichia pastoris* X-33. Como control negativo de expresión se utilizó la cepa sin transformar *P. pastoris* X-33 (WT) y la cepa X-33 transformada con el plásmido pPicZ α vacío (sin inserto); como control positivo de expresión de proteínas la cepa 365 Gs115 pPicZ α -CalB, del cepario del laboratorio de cultivos celulares, EIB-PUCV.

4.2 Medios de cultivo

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron diversos medios de cultivo para cada microorganismo. El crecimiento de *E.coli* se llevó a cabo en medio Luria Bertani LB, constituido por 1% Triptona, 0.5% Extracto de levadura, 1% NaCl a pH 7.5 y LB agar con 1.5% agar-agar. Para realizar la selección de clones con antibiótico fue necesario utilizar medio LB Low Salt, que posee 1% Triptona, 0.5% Extracto de levadura con 0.5% NaCl a pH 7.5, dada la sensibilidad del antibiótico a las altas concentraciones de sal.

Para el aislamiento y mantención de las cepas de *P. pastoris* X-33 se utilizó el medio YPD constituido por 1% extracto de levadura, Peptona 2% p/v, Dextrosa (D-Glucosa) 2% p/v. Para la caracterización del crecimiento y la expresión de proteínas se utilizó el medio BMG de sus siglas en inglés “Buffered Minimal Glycerol” y BMM “Buffered Minimal Methanol”, constituidos por 100mM de fosfato de potasio pH 6.0, 1.34% Base de Nitrógeno de Levadura (YNB, Yeast Nitrogen Base en inglés), 4×10^{-5} % biotina, 1% glicerol o 0.5% methanol según

corresponda.

4.3 Generación de los constructos.

Búsqueda bibliográfica de proteínas complejas modelo

Se determinaron dos proteínas reportadas “difíciles de expresar” como modelo, BMP2 y tPA. Los genes que codifican para la proteína morfogenética ósea 2 (BMP2) y el activador tisular del plasminógeno (tPA), fueron obtenidos desde National Center for Biotechnology Information (NCBI) bajo los códigos NP_001191.1 para BMP2 y código AAO34406.1 para tPA.

4.4 Estrategias de procesamiento de prodominio

A partir de las secuencias obtenidas desde NCBI se generaron tres estrategias para dar origen a cada una de las proteínas en estudio. La primera, es la secuencia madura (m) o fragmento (f), que carece de péptido señal y pro dominio; la segunda cuenta con la presencia de péptido señal y pro dominio (pro-), y finalmente, la tercera forma presenta péptido señal, pro dominio pero con una modificación de la secuencia nativa de clivaje (K) para generar que la escisión del pro dominio sea reconocida por la enzima endopeptidasa Kex2 originaria de levaduras como *P. pastoris*, como se ve en la Tabla 1.

Tabla 1: modificación sitio de corte

Sito de corte nativo	Sito de corte inducido (K)
Arg-X-X-Arg	Lys- Arg- Glu-Ala

4.5 Elección y síntesis del vector

Se optó por un vector que cumpliera con los siguientes requerimientos: promotor AOX1, que determina la expresión del gen mediante la inducción con metanol; que permitiera la

expresión de proteínas grandes en cualquier cepa de *P. pastoris*; marcador de selección Zeocina; tenga además la presencia de una o más etiquetas para purificación y/o detección como el epítopo de polihistidina (Histag) y/o la etiqueta c-myc y finalmente la presencia de un péptido señal para asegurar la translocación al retículo endoplasmático como el factor de apareamiento Alpha de *Saccharomyces cerevisiae* (α MF).

Dadas sus características, el vector elegido fue pPicZ α A (invitrogen). Para la síntesis de los vectores fue necesario someter las secuencias nativas (humanas) a optimización de codones para su expresión en levadura. La generación de los plásmidos se llevó a cabo por la empresa Genscript.

Tras la recepción de los vectores contenidos en papel, se agregaron 200 μ L de agua libre de nucleasas estéril sobre la lámina, se sometió a vortex durante un minuto, posteriormente se centrifugó a 1500xg por 5 min, se cuantificó con nanodrop (BioSpec Nano) posteriormente se alicuotaron los plásmidos en tubos eppendorf de 1,5mL y se almacenaron a -20°C.

4.6 Propagación de plásmidos

Se realizó la transformación de células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes con los plásmidos previamente diseñados.

Para generar las células quimiocompetentes se cultivó una colonia de *E. coli* TOP10 overnight en medio LB, posteriormente se diluyó en 95 mL de medio fresco y se incubó a 37°C con agitación constante en agitador orbital a 300 RPM hasta alcanzar una densidad óptica OD₆₀₀ de 0,5-08. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 1500xg por 5 min a 4°C para descartar el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 25mL de cloruro de calcio (CaCl₂) 50mM y se incubó por 1 hora en hielo. Luego se centrifugó por 15 min a 1500xg a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en una solución de CaCl₂ al 12% de glicerol, posteriormente se dividió en alícuotas de 20 μ L en tubos Eppendorf de 1.5mL para finalmente almacenarlas a -80°C.

Una vez obtenidas las células quimiocompetentes se continuó con la transformación. Para ello se agregaron 10 μ L del producto de clonación (vector circular) sobre un vial que contiene

200µL de células quimiocompetentes, se agitó suavemente y se dejó incubar por 30 min en hielo. Transcurrida la incubación se sometió a shock térmico mediante una incubación breve (45 seg) a 42°C en Dry bath incubator (Rocker Scientific) y luego 2 min en hielo nuevamente. Se agregaron 300 µL de medio LB líquido bajo en sodio (poner concentración) a cada vial y se dejó incubar 1 hora a 37°C con agitación constante. Posteriormente se sembraron 120µL en una placa de medio LB bajo en sodio con zeocina 25µg/mL mediante siembra homogénea con asa de Drigalski, se incubaron por 24 hrs, a 37°C.

Una vez transcurrida la incubación se seleccionaron colonias al azar que fueron resembradas en placas con medio LB con zeocina 25µg/mL y posteriormente cultivadas en 15 mL de medio líquido LB low salt overnight. Desde este medio se realizó la purificación del plásmido utilizando kit comercial E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Omega) según las indicaciones del fabricante. El material genético obtenido se cuantificó por nanodrop (BioSpec Nano), se verificó mediante un gel de agarosa al 1% con Safeview Plus (Fermelo) a una concentración de 0.5 µL/mL, observado en un transiluminador LED de luz azul *SmartBlue* (Fermelo).

Las transformantes obtenidas fueron *E. coli* TOP10-BMP2m, *E. coli* TOP10-ProBMP2m, *E. coli* TOP10-ProKBMP2m; *E. coli* TOP10-tPA, *E. coli* TOP10-tPAF, *E.coli* TOP10-tPAKF. Como control de transformación se utilizó el plásmido carente de inserto (control +) *E.coli* TOP10-pPICZ.

Los clones positivos a la transformación fueron incubados en matraz de agitación 24 horas a 37°C con agitación de 300 rpm. Posteriormente fueron centrifugados a 500xg por 5 minutos. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en LB low salt con glicerol 30%, se realizaron alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -80°C.

4.7 Transformación y Banco de células *P. pastoris*.

Para realizar la transformación en *P. pastoris* fue necesario generar células competentes y posteriormente linealizar los vectores.

Inicialmente se cultiva una colonia de *P. pastoris* en medio YPD por 48 horas a 30 °C con agitación constante a 200 RPM, transcurrido el tiempo, se toma una colonia para inocular

25 mL de medio YPD fresco que se deja crecer overnight. Al día siguiente, se diluye en medio YPD hasta obtener una densidad óptica de OD₆₀₀ de 0,15-0,2. Se incuba alrededor de 6-8 horas hasta alcanzar un OD₆₀₀ 0,8- 1. Se centrifuga el cultivo a 500xg por 15 min a temperatura ambiente para descartar el sobrenadante de cultivo. El pellet se resuspende cuidadosamente en 9mL de solución BEDS estéril frío (10mM Bicine-NaOH pH:8,3, 3% v/v ethylene-glicol, 5% v/v DMSO grado biología molecular, 1M sorbitol) con 1 mL de Dithiothreitol (DTT). Se incubó por 5 min a 100 RPM a 30°C en agitador orbital. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 500xg durante 15 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de DTT, para ser utilizadas inmediatamente.

Paralelamente, los plásmidos puros obtenidos del kit comercial E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit (Omega) se sometieron a corte con enzima de restricción SacI (NewEngland) para su linealización ya que posee un sitio de corte único en la secuencia. Se utilizaron 10µg de DNA, se incubó por 1 hora a 37°C, se evaluó el corte mediante electroforesis en gel de agarosa y se inactivó por temperatura a 65°C por 20 minutos. Posteriormente se precipitó con Acetato de sodio (3M, pH 5.2), se centrifugó a 1500xg, se lavó con etanol 70% y se dejó secar al aire por 10 min. Finalmente, se resuspendió en 10 µL de Agua libre de nucleasas estéril y se utilizó inmediatamente.

Las transformaciones de *P. pastoris* se llevaron a cabo mediante la utilización del método de electrotransformación descrito en Cregg y Russell, 1998, donde se sometieron 10 ug de los plásmidos lineales pPicα-BMP2m; pPicα-proBMP2m; pPicα-proKBMP2m; pPicα-tPA; pPicα-tPAF; pPicα-tPAKF; pPicz vacío en conjunto con células competentes X-33, con 40 uL de células competentes a un pulso eléctrico mediante la utilización de un Electroporador Micropulser (Biorad) en cubetas de electroporación de 0,2 cm utilizando el programa PIC, especial para el procedimiento de transformación de *P.pastoris*. Posteriormente se permitió que las células transformadas se recuperaran durante 1h en 1 mL de sorbitol 1M a 30°C, luego se agregó 1mL de medio YPD y se incubó 1 h a 30°C con agitación 200xRPM. Posteriormente se sembraron en medio selectivo YPD con 100-200 µg/mL Zeocina y se incubó por 3 a 10 días. A continuación, las colonias transformadas se purificaron mediante

estrías para obtener colonias aisladas en medio selectivo YPD 200µg/mL de Zeocina. Obteniendo las células *P.pastoris* pPicα-BMP2m; *P.pastoris* pPicα-proBMP2m; *P.pastoris* pPicα-proKBMP2m; *P.pastoris* pPicα-tPA; *P.pastoris* pPicα-tPAF; *P.pastoris* pPicα-tPAKF; *P.pastoris* pPicα y *P.pastoris* WT.

Para conservar las células viables durante el proceso de investigación, se tomó una colonia de cada cepa para inocular 10 mL de medio YPD se incubó durante un periodo de 48 horas a 30 °C, en agitación a 200xG. Finalmente, estas fueron centrifugadas a 500xG por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y las células resuspendidas en YPD con Glicerol 30% v/v estéril. Las células fueron distribuidas en alícuotas de 1mL y almacenadas en ultrafreezer a -80°C.

4.8 Verificación de inserción del plásmido en *P. pastoris*

Para verificar la inserción del plásmido se realizó la extracción de DNA genómico y posterior PCR de verificación de todos los clones obtenidos.

Para la extracción de DNA genómico se utilizó el kit comercial YeaStar Genomic DNA kit (Zymo Research) siguiendo las indicaciones del proveedor. Una vez obtenido el DNA total de los clones se realizó la caracterización por PCR. Para ello, se realizaron dos reacciones de PCR con los oligonucleótidos AOX1 y AOX2. También se realizó con los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la región de resistencia antibiótica Bleo y un set de partidores que flanquea la región de clonamiento múltiple 5' AOX1 primer- 3' AOX1 primer (Ps5). Para montar la reacción se realizó un coctel con los siguientes reactivos: 13.3 µL de agua estéril libre de nucleasas, 5 µL de Green Buffer (5X), 2.5 µL de cada oligonucleótido (5 µM), 0.5 µL de dNTP's (10 mM cada uno), 0.2 µL de la enzima GoTaq Polimerasa (5 U/µL) y 1 µL del DNA de la muestra. En una de ellas se agregó agua libre de nucleasas en lugar de DNA como control negativo.

El resultado de la amplificación por PCR se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con Safeview Plus (Fermelo) a una concentración de 0.5 µL/mL, comparado con un estándar de peso molecular de 1 Kb Accuruler (Maestrogen). Observado en un

transiluminador LED de luz azul *SmartBlue* (Fermelo).

4.9 Selección de clones por número de copias

Para seleccionar los clones de trabajo se realizaron dos técnicas para determinar la cantidad de veces que se integró el plásmido en la secuencia de *P. pastoris*, en primer lugar, la selección clonal con altos niveles de Zeocina (200 µg/mL) y mediante cuantificación relativa con qPCR.

Se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivo celular que se centrifugaron a máxima velocidad por 2 min, se separó el sobrenadante en tubos limpios para su posterior cuantificación de proteínas y el pellet de cultivo se resuspendió en RNA later (Sigma). Se realizó una extracción de ARN mediante kit comercial YeaStar RNA kit (Zymo) según las indicaciones del proveedor, se cuantificó mediante el uso de nanodrop (BioSpec Nano) las muestras fueron almacenadas a -80°C. Posteriormente se realizó síntesis de ADNc mediante kit comercial Affinity Script cDNA Synthesis Kit (Agilent) y se almacenó a -20°C. El ADNc obtenido posteriormente se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). El número de copias de las transformantes se determinó mediante cuantificación relativa y el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ mediante el gen de resistencia de cada clon respecto a un gen constitutivo (ACT1). Se seleccionaron aquellos clones que tuvieran la misma cantidad de inserciones en todas las cepas transformadas estudiadas.

Los clones seleccionados poseen la siguiente nomenclatura: M1C2 que corresponde a *P.pastoris* pPic α -BMP2m; M2C3 que corresponde a *P.pastoris* pPic α -proBMP2m; M3C8 que corresponde a *P.pastoris* pPic α -proKBMP2m; M4C9 que corresponde a *P.pastoris* pPic α -tPA; M5C3 que corresponde a *P.pastoris* pPic α -tPAF; M6C8 que corresponde a *P.pastoris* pPic α -tPAKF; M7C3 que corresponde a *P.pastoris* pPic α -Vacío.

5. Caracterizar cepas transformantes para la expresión de BMP2 y tPA en *Pichia pastoris*.

5.1 Expresión de proteínas en matraz de agitación

Para el crecimiento e inducción de las cepas de *P. pastoris* productoras se usaron los medios BMG/BMM, el primer medio contiene como fuente de carbono al glicerol para la obtención de biomasa pero que reprime el promotor inducible AOX1. Se inoculó una colonia de cada cepa transformante, se incubó por 24 horas hasta alcanzar una alta concentración de biomasa, se suplementó el cultivo con 0.5% metanol para adaptar a las células al cambio de fuente de carbono. Transcurridas 24 horas de adaptación, se concentraron los cultivos mediante centrifugación a 1500xg por 5 min. El pellet se homogenizó con medio de inducción BMM que contiene metanol como fuente de carbono se incubó por 96 horas suplementando medio con 0.5% de metanol cada 24 horas.

Estos medios al contener tampón en el medio permiten estabilizar el pH, que ayuda a mantener el producto, cuando este se excreta al medio extracelular. Como control se utilizó cepa X-33 WT que no secreta proteínas endógenas al medio de cultivo.

Se obtuvieron alícuotas de 2 mL de los cultivos cada 12 horas para controlar el nivel de expresión de BMP2 y tPA en el sobrenadante de cultivo. Para ello, las alícuotas se centrifugaron a 1500xg por 5 min para separar la biomasa del sobrenadante de cultivo, que se reservan por separado a -20°C hasta su uso.

5.2 Cuantificación de proteínas desde el medio de cultivo.

Durante la expresión, las rProt que entren a la vía secretora llegan al medio de cultivo, para poder obtenerlas desde el extracto crudo.

Se extrajo 1 mL de medio de cultivo, se sometió a centrifugación a 1500xg por 5 min, se separó el pellet del sobrenadante que fue utilizado directo para la medición de proteínas totales. se cuantificó mediante kit comercial Pierce BCA (Thermo Scientific) en microplaca de 96 pocillos. Se utilizaron 25µL de medio de cultivo con 200 µL de la solución de BCA, se

incubó a 37°C por 30 min para luego ser medido en espectrofotómetro (Multiskan Skyhigh) a 592 nm.

Paralelamente se tomaron 5 mL de medio de cultivo que fue concentrado en pequeño volumen mediante la utilización de filtros de ultracentrífuga Amicon (Merk) con tamaño de 50kDa y 10kDa.

Posteriormente fueron analizadas las muestras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Para la realización de la electroforesis, se prepararon geles de acrilamida/bisacrilamida 15%, para BMP2 y al 10% para tPA. Los geles fueron corridos a 70 V por 1 hora (gel concentrador) y a 120 V por 2 horas (gel separador). Una vez lista la electroforesis, se tiñeron los geles con 20 mL de solución de tinte azul de Coomassie (etanol 30 %, ácido acético 10 %, azul de Coomassie 0.05 %, agua DD) por 30 min con agitación gentil. Posteriormente ser desteñidos con 30 mL de solución de distinción (etanol 40 %, ácido acético 10%, Agua dd) por 3 horas con agitación gentil a temperatura ambiente, hasta visualizar las bandas.

Finalmente, para determinar que las proteínas obtenidas fueran las proteínas de interés, se tomaron 6 mL de medio de cultivo y se sometieron a cromatografía de afinidad con las columnas Ni-NTA HisPur™ (ThermoFisher) que se basa en la interacción específica entre el níquel y la histidina. Según las indicaciones del fabricante, se equilibran las columnas con buffer de equilibrio, se centrifuga a 700xG por 5 minutos, se elimina el buffer, posteriormente se le agrega la muestra, se incuba en 1 hora, a 4°C en rotación constante. Se centrifuga a 700xG por 5 minutos y se recupera el flujo (F0) luego se lava 2 veces con buffer de lavado, ambas fracciones se recuperan (W1 y W2) finalmente se agrega buffer de elución que posee 300mM de imidazol, se centrifuga y se recupera el eluido, este paso se repite dos veces (F1 y F2) posteriormente se cuantificaron todas las fracciones obtenidas con kit comercial Pierce BCA (Thermo Scientific).

6. Detección marcadores moleculares para UPR y ERAD

6.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Para verificar si la expresión de las rProt modelo está generando estrés en el ER se midió la expresión de diversos marcadores moleculares asociados a la respuesta UPR y ERAD. Para ello, se tomaron muestras desde los distintos cultivos a las 0, 24 y 48hrs, mediante centrifugación a máxima velocidad se separó la biomasa del medio de cultivo, este último se utilizó para medir proteínas y la biomasa fue resuspendida en RNA Later (Sigma) para conservar la integridad de las muestras, posteriormente fueron almacenadas a -20°C.

Desde el pellet almacenado se realizó una extracción de ARN mediante kit comercial YeaStar RNA kit (Zymo), en primer lugar, se trataron las muestras con la enzima Zymoliase durante 60 min, luego se sometió a lisis celular, se cuantificó el ARN obtenido mediante el uso de nanodrop (BioSpec Nano) las muestras fueron almacenadas a -80°C.

Posteriormente se realizó síntesis de ADNc mediante kit comercial Affinity Script cDNA Synthesis Kit (Agilent) y se almacenó a -20°C. El ADNc obtenido posteriormente se sometió a diluciones seriadas, se estandarizó y analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en el equipo AriaMx Real-Time PCR (Agilent).

6.2 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Se analizaron los niveles de transcripción mediante qRT-PCR de seis genes que participan en la síntesis de proteínas, la vía de secreción y el estrés de RE, como describe Huang 2019[61].

Los genes *HAC1*, *KAR2*, *PDI* y *ERO1* se usaron como marcadores moleculares para determinar si se activa la respuesta de proteínas desplegadas (UPR) y los marcadores moleculares *DER1*, *HRD3*, *SEC61* para censar la activación de la vía de degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD), como gen de referencia se utilizó el gen de actina (*ACT1*) dada su estabilidad en todas las cepas de *P. pastoris*(Besleaga *et al.*,2023) Tabla 1.

La expresión de los genes se midió mediante el uso de la expresión relativa de genes utilizando el programa Agilent Aria 2.1.1 donde se obtuvieron los valores de CT de cada

muestra y fueron comparados con la expresión del gen de actina mediante la fórmula de ddCQ para obtener las veces de cambio de caga gen. Para la determinación de los niveles de expresión de los genes analizados, se empleó la cuantificación relativa y el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. En los ensayos de qPCR realizados se analizaron todas las cepas transformantes en los tiempos 0 (sin inducción por metanol), a las 24 y las 48 horas (post inducción con metanol) se estudiaron todos cultivos con el mismo gen al mismo tiempo.

Tabla 2: Primers utilizados para la detección de la activación de las vías de estrés de retículo endoplasmático obtenidos de Huang 2019(82).

Origen	Nombre primer	Secuencia (5' -> 3')
UPR	HAC1-F	TTCGAAATCGGAGAAAGCAT
	HAC1-R	TTCGTCCTCTTCTTCGTCGT
	KAR2-F	TGGTATTCCACCAGCTCCAAG
	KAR2-R	CAGTTCCTTATCGGTGGCA
	PDI1-F	CATTGGCTGAGTTTGTAAGGAGA
	PDI1-R	TTTTCTCCTCGACTGGTCTGAG
ERAD	DER1-F	CGATTACCTCTACTCATTGGTG
	DER1-R	CGTTGGGATTCTGTTTGC
	SEC61-F	CTTCAAGTGACTCCTCTGACC
	SEC61-R	GAACAACCTCTGTCTGCTTTG
	HRD1-F	CTCTCGGTTCTCAAGTTTGTC
	HRD1-R	TGGCATCGCTTAGTTTCAC
Control	Actin-F	GTCCAGCATAAACACGCCG
	Actin-R	CAGTGGGAAAAACCCACGAA

7. Análisis estadístico

Cada experimento fue realizado en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Las curvas concentración-efecto y los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism 10.5.0 (GraphPad© Software Inc.). Los resultados fueron comparados entre sí y con los controles. Las variables cuantitativas fueron expresadas como promedio más desviación estándar, y analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías según corresponda.

RESULTADOS

Objetivo 1: Generar un sistema de producción heteróloga de BMP2 y t-PA en *Pichia pastoris* utilizando distintas estrategias de procesamiento del pro-dominio.

Generación de los constructos y Cepas transformantes

Diseño de los plásmidos

Las secuencias genómicas fueron obtenidas desde National Center for Biotechnology Information (NCBI): Proteína Morfogenética Ósea 2 (BMP2) código NP_001191.1; Activador Tisular del Plasminógeno (tPA) código AAO34406.1. A partir estas secuencias se generaron tres estrategias que dan origen a cada una de las proteínas en estudio, estas son: secuencia madura (m) o fragmento (f) donde el constructo solo posee la zona madura y/o catalítica de la proteína; presencia del pro-dominio (pro-), que representa la forma completa de la proteína nativa, y finalmente, una modificación sitio específica de la secuencia nativa de clivaje de levaduras (K) entre la región pro- y la región madura.

Una vez definidas las estrategias para la expresión de cada una de las proteínas modelos, se determinaron los parámetros esenciales para la elección del vector de clonación.

Como criterio fundamental el vector requería la presencia del promotor AOX1, este determina la expresión del gen mediante la inducción con metanol y permite la expresión de proteínas grandes en cualquier cepa de *P. pastoris*, además, la presencia de una o más señales de secreción.

En la Figura 3 se puede observar un esquema representativo del diseño de los constructos. En todos los modelos se puede apreciar la presencia del promotor AOX1, que es inducible por metanol, péptido señal (α -MF), las variantes diseñadas para la expresión de las proteínas modelo (m o F; pro-; K) y en el extremo C-terminal (después de la secuencia clonamiento múltiple) etiquetas para detección y purificación del producto, seguido de la región de resistencia a antibiótico.

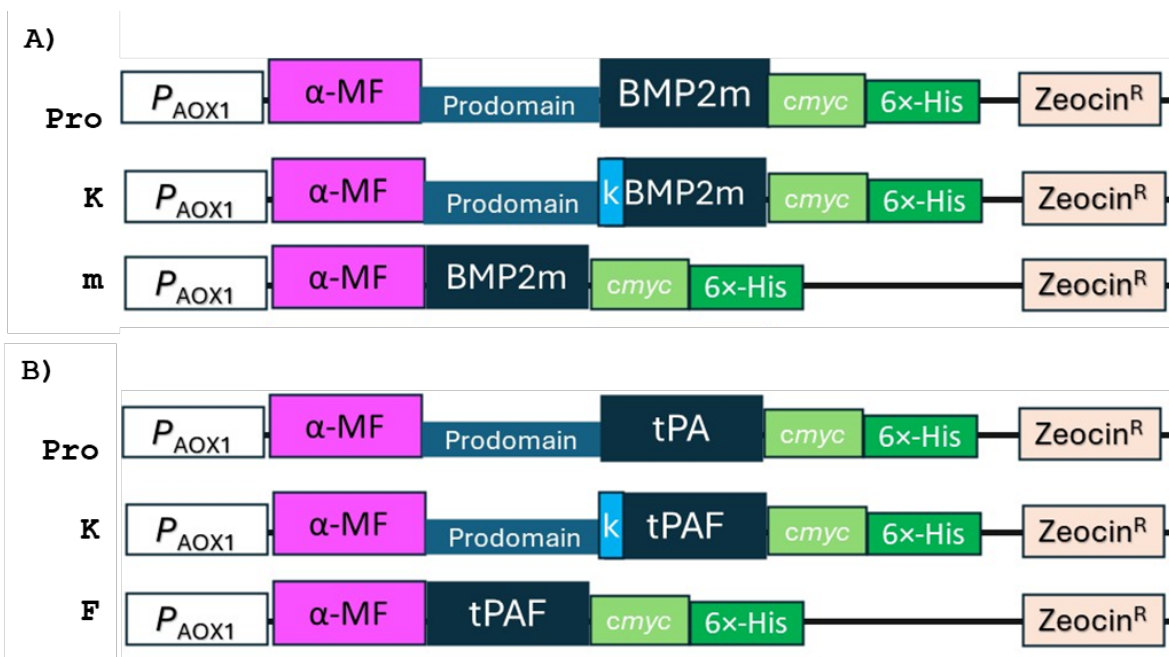


Figura 3: Esquema representativo del diseño de vectores para evaluar la presencia del pro-dominio.

A partir de los criterios establecidos se realizó un análisis dentro de los diversos vectores comerciales presentes en el mercado. El plásmido elegido fue pPicZ α (invitrogen). Este vector posee un tamaño de 3,6 kb permite la expresión y secreción de proteínas de interés, presenta etiquetas de epítopos de polihistidina (Histag) y c-myc para detección y purificación de la proteína, sumado a la presencia de una señal de secreción de factor alpha de *Saccharomyces cerevisiae* (α MF).

Una vez determinado el diseño final de los vectores, las secuencias de origen humanas fueron sometidas a optimización de codones para su expresión en *P. pastoris* y posterior síntesis de los plásmidos por la empresa Genscript. La Figura 4 posee los esquemas de la construcción final de los plásmidos, en ella podemos apreciar la orientación en sentido del promotor, la señal de secreción α MF, en gris la región de clonamiento múltiple, las señales de purificación y la resistencia a antibiótico que posee cada uno de ellos.

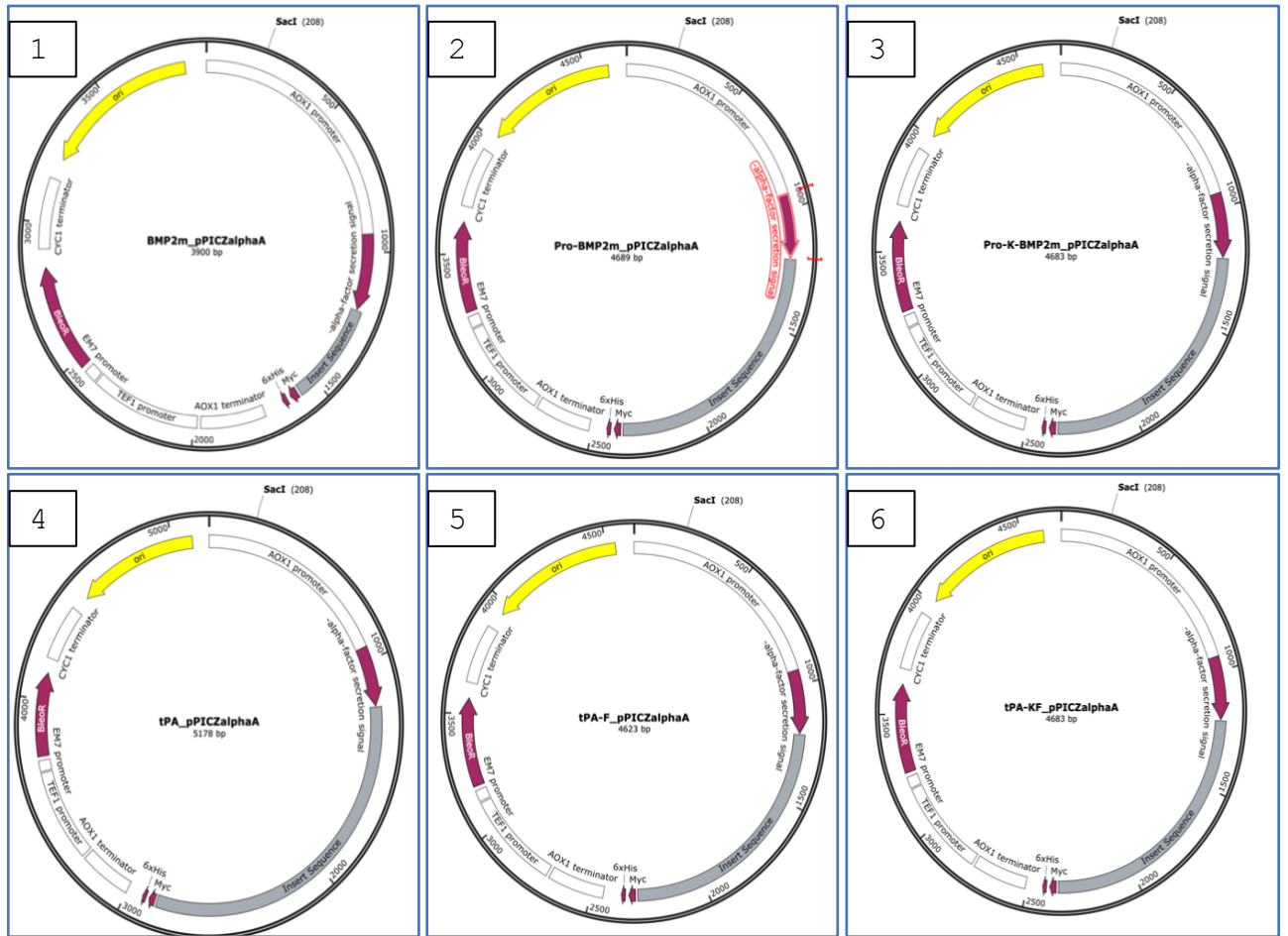


Figura 4: Esquema de plásmidos pPicZ α sintetizados con los constructos integrados en la región de clonamiento multiple. 1-3 representan los plásmidos diseñados para la expresión de las variantes de la proteína Bmp2 y 4-6 los plásmidos diseñados para la expresión de las variantes de tPA. Las diversas estrategias de procesamiento del prodominio para la producción de BMP y tPA dieron origen a 1) pPicZ α -BMP2m; 2) pPicZ α -proBMP2m; 3) pPicZ α -proKBMP2m; 4) pPicZ α -tPA; 5) pPicZ α -tPAF; 6) pPicZ α -tPAKF.

6.1.2 Transformación de las cepas.

Los plásmidos generados que se observan en la Figura 4, fueron amplificados por transformación en *E. coli*. Se seleccionaron en placas con de Zeocina. Los clones que integraron el plásmido obtuvieron la resistencia al antibiótico por lo que crecieron en el

medio de cultivo (Figura 5) dando origen a las cepas: *E. coli* TOP10-BMP2m, *E. coli* TOP10-ProBMP2m, *E. coli* TOP10-ProKBMP2m; *E. coli* TOP10-tPA, *E. coli* TOP10-tPAF, *E. coli* TOP10-tPAKF. Como control de transformación se utilizó el plásmido carente de inserto *E. coli* TOP10-pPicZ vacío (control), y una cepa salvaje *E. coli* TOP10.

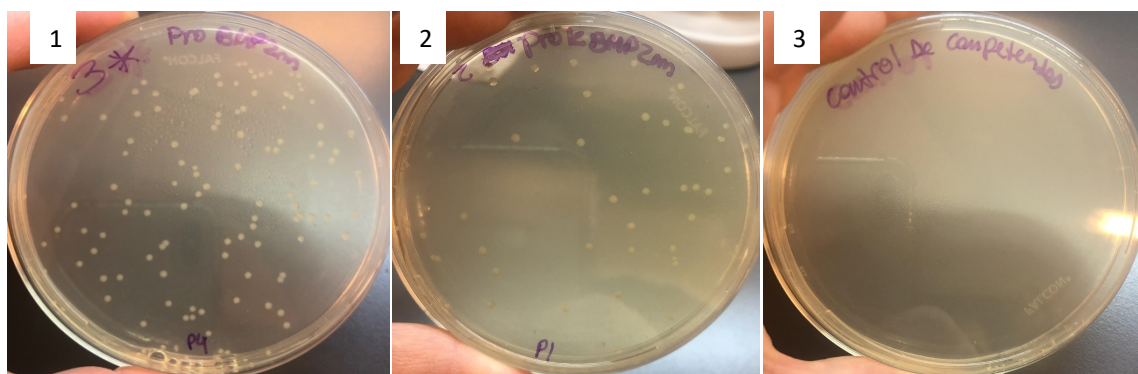


Figura 5: Fotografías representativas de transformación *E.coli* TOP10 con vectores de clonamiento. 1) *E. coli* TOP10-ProBMP2m, 2) *E. coli* TOP10-ProKBMP2m 3) Control negativo, en medio LB low salt-Zeocina 25ug/ml.

Se tomaron colonias al azar desde el centro de la placa y se realizó una comprobación de inserción mediante electroforesis en gel de agarosa 1% revelado con Safeview. para corroborar los distintos tamaños, Figura 6. Los tamaños de banda esperados se muestran en la Tabla 3.

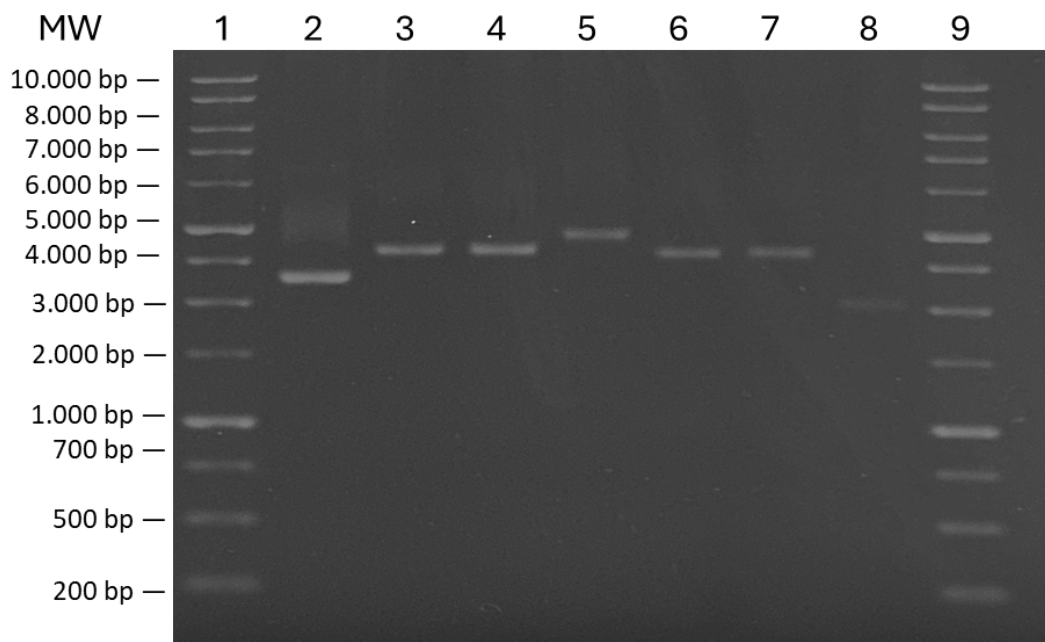


Figura 6: Electroforesis de DNA plasmidial para verificación por tamaño de muestras obtenidas síntesis de plásmido. 1) 1Kb Ladder; 2) pPicza-BMP2m; 3) pPicza-proBMP2m; 4) pPicza-proKBMP2m; 5) pPicza-tPA; 6) pPicza-tPAF; 7) pPicza-tPAKF; 8) pPICZ vacío, 9) 1Kb Ladder.

Tabla 3: Tamaño esperado de los plásmidos

	Tamaño del inserto	Tamaño total del plásmido
Bmp2m	359 bp	3900 bp
proBmp2m	1148 bp	4689 bp
ProKBmp2m	1142 bp	4683 bp
tPA	1637 bp	5178 bp
tPAF	1082 bp	4623 bp
tPAKF	1142 bp	4683 bp

Una vez verificada la integridad de los plásmidos puros obtenidos, se procedió con la transformación de *P. pastoris*. Para realizar esta transformación fue necesario generar entre 5 y 20 µg de producto de clonación. En primera instancia se linealizaron los plásmidos mediante corte con enzima de restricción *SacI*, esta enzima posee un sitio de corte único en la secuencia del plásmido. Para evaluar la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 7). En esta se puede observar dos bandas por carril, la inferior corresponde a los plásmidos lineales y la banda superior a al plásmido no digerido indicando una multimerización del plásmido que se evidencia por peso molecular del doble o más del tamaño esperado. Los tamaños de banda esperados se pueden encontrar en la Tabla 3, este procedimiento se repitió hasta la obtención de producto de clonación lineal necesario para transformar *P. pastoris*.

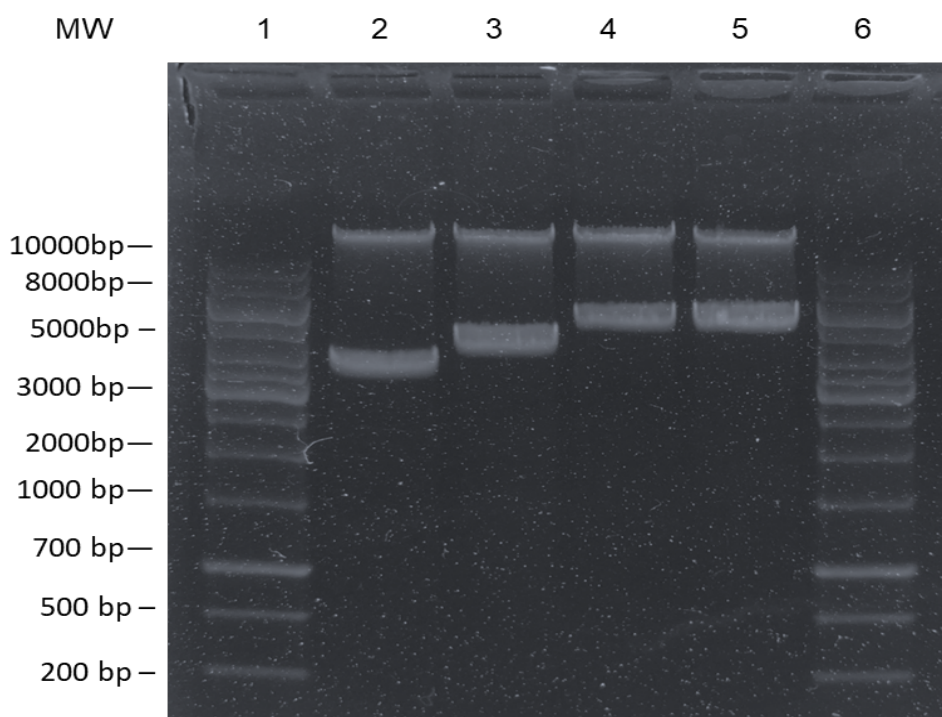


Figura 7: Extracción de DNA plasmidial digerido por enzima de restricción *SacI* para transformación de *P.pastoris*. 1) 1Kb Ladder; 2) pPICZA (plásmido vacío; 3) BMP2m; 4) proBMP2m; 5) proKBMP2m; 6) 1Kb Ladder.

Tras la transformación, en la Figura 8, se evidencia crecimiento de clones positivos en las placas de agar YPD suplementadas con 200 µg Zeocina por 10 días. Dado que *P.pastoris* es

altamente sensible al antibiótico, sólo crecen aquellas células que integran la resistencia presente en el vector.

Se observó una diferencia en el tamaño de las colonias obtenidas dado que aquellas que aparecen antes (a los 3 días) generan un crecimiento robusto a los 10 días de incubación, este procedimiento se repitió hasta obtener al menos 15 clones para cada cepa transformante.

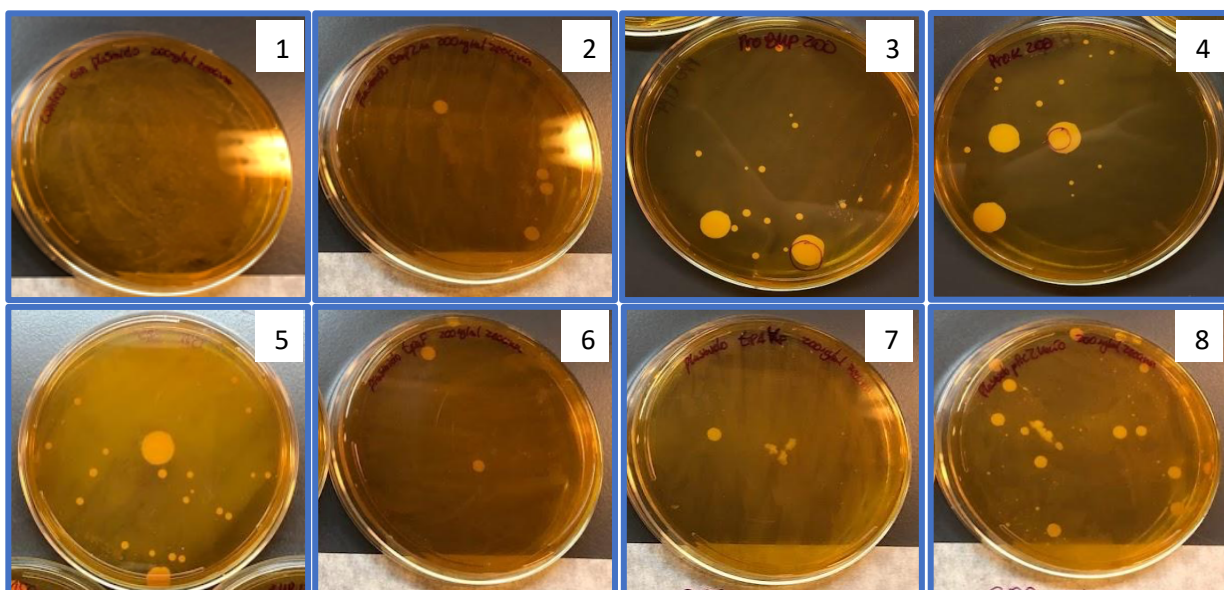


Figura 8: Selección de transformación en placas de YPD con Zeocin™ 200ug/mL: 1) WT x-33; 2) pPicα-BMP2m; 3) pPicα-proBMP2m; 4) pPicα-proKBMP2m; 5) pPicα-tPA; 6) pPicα-tPAF; 7) pPicα-tPAKF; 8) Control pPicz

Para confirmar la integración de los vectores en *P.pastoris* fue necesario tomar clones al azar para realizar una extracción de DNA total. La integridad del material genético obtenido se cuantificó por nanodrop y se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 9). Al ser muestras de extracción de DNA total se esperaba que las bandas obtenidas se vieran por sobre el marcador de peso molecular (1kb ladder) ya que *P. pastoris* tiene una longitud de aproximadamente 9,38 Mbp.

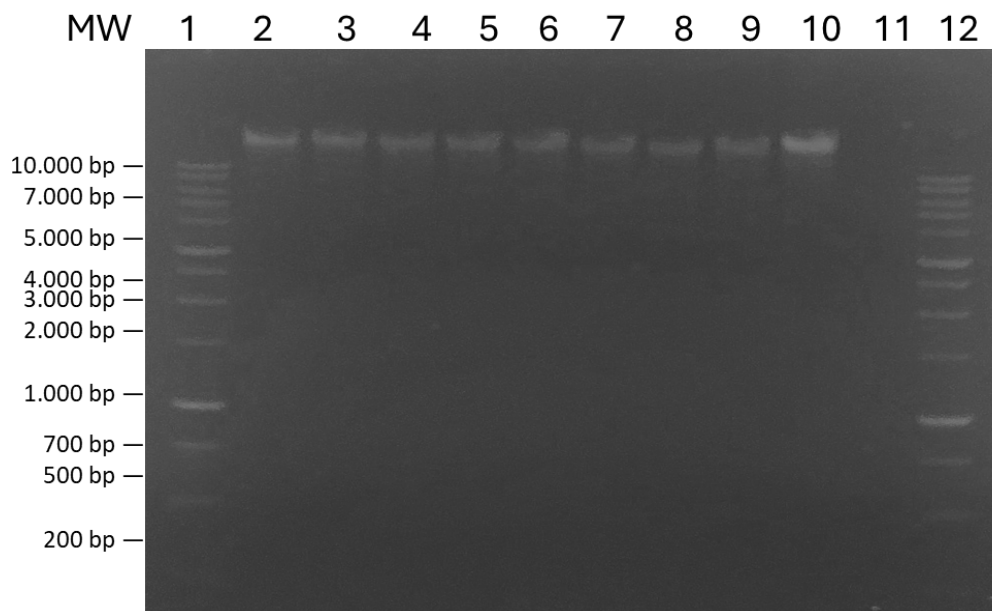


Figura 9: Electroforesis en gel de 1% agarosa integridad extracción de DNA total *P.pastoris* transformadas. 1) 1kb ladder 2) *P.pastoris* pPic α -BMP2m; 3) *P.pastoris* pPic α -proBMP2m; 4) *P.pastoris* pPic α -proKBMP2m; 5) *P.pastoris* pPic α -tPA; 6) *P.pastoris* pPic α -tPAF; 7) *P.pastoris* pPic α -tPAKF; 8) *P.pastoris* Control pPicz; 9) *P.pastoris* WT; 10) *P.pastoris* PiczCalB (control+); 11) Control -; 12) 1Kb Ladder.

Una vez obtenido el DNA total de las cepas, fue necesario confirmar la integración de los vectores mediante la técnica de PCR. Para ello, se diseñaron partidores específicos (Figura 10) para genes de resistencia antibiótica del plásmido (Bleo, señalados en rojo) y para flanquear el sitio de clonamiento múltiple (Ps5, señalados en azul).

La Figura 10, corresponde al diagrama que señala el sitio donde se localizan los cebadores diseñados, la Figura 11 muestra el resultado de PCR utilizado para la corroboración por amplificación de los genes en los plásmidos puros. Bleo, está diseñado para generar un amplicón de 200 bp, la Figura 11A se puede observar que todos los plásmidos utilizados para generar las cepas transformantes presentan amplificación del fragmento que corresponde al gen de resistencia a Zeocina.

Por otra parte, los cebadores diseñados denominados Ps5 presente en la Figura 11B, flanquea el sitio de clonación múltiple desde una parte del promotor AOX1, por lo que el

tamaño que refleja incluye al α MF que posee un tamaño de 223 bp, la secuencia insertada (Tabla 3), los reporteros correspondientes a una cola de histidina (6xHis) de 17 bp y al c-Myc de 17 bp, por lo que se pueden observar amplicones de diferentes tamaños para cada uno de los plásmidos evaluados presentes en la Tabla 4.

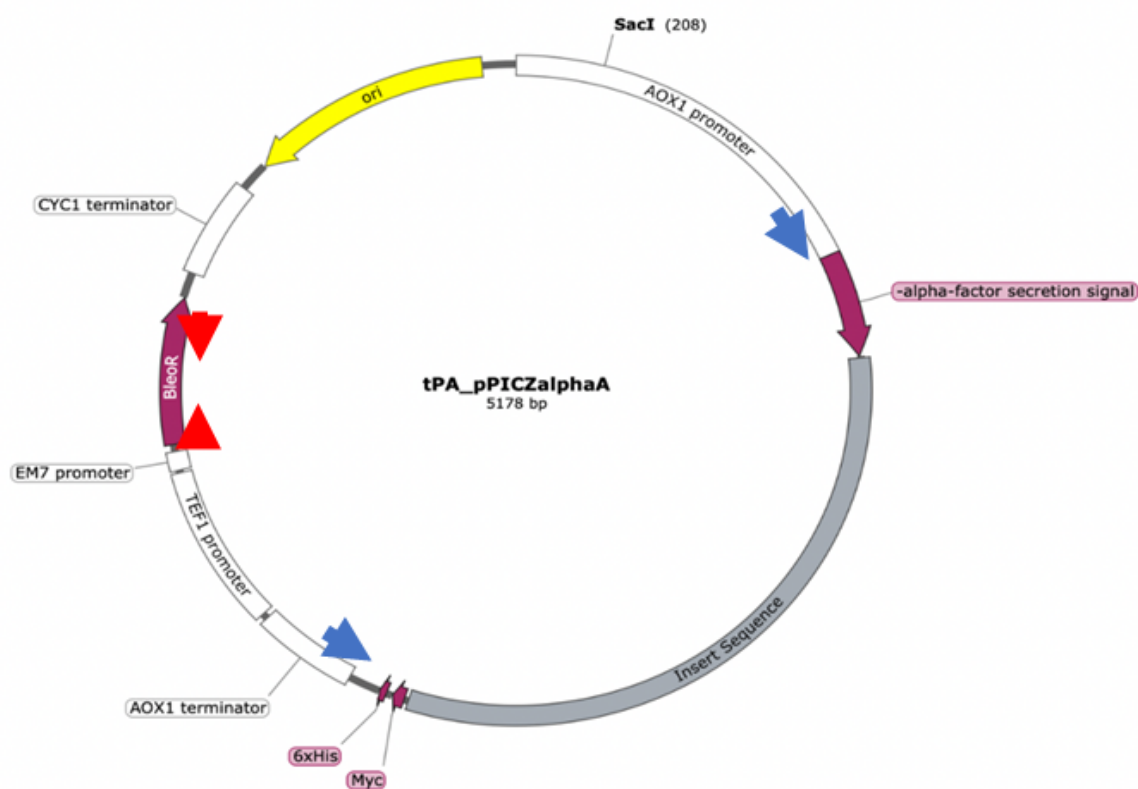


Figura 10: Diagrama del diseño de partidores específicos (Bleo y Ps5). En rojo se señalan los partidores que se diseñaron para la identificación del gen de resistencia a Zeocina (Bleo). En azul los cebadores de amplificación del sitio de clonamiento múltiple, ambos partidores se realizaron para la verificación de integración del vector de expresión.

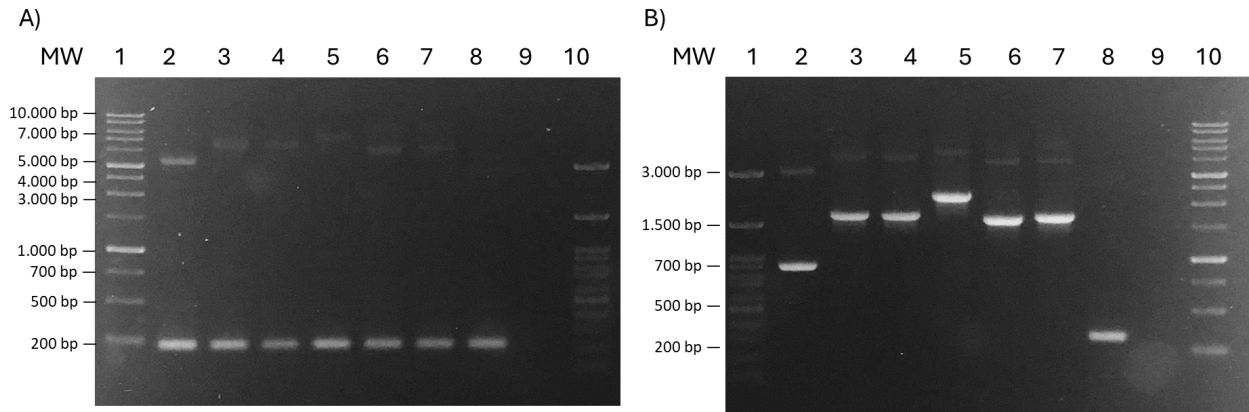


Figura 11: PCR de validación de primers diseñados para detección de marcador de selección (Bleo) y sitio de clonamiento múltiple (Ps5) en plásmidos puros. En Figura A podemos observar 1) 1kb ladder; 2) Bleo pPic α -BMP2m; 3) Bleo pPic α -proBMP2m; 4) Bleo pPic α -proKBMP2m; 5) Bleo pPic α -tPA; 6) Bleo pPic α -tPAF; 7) Bleo pPic α -tPAKF ; 8) Control pPicz; 9) Control -; 10) 100bp Ladder; En la Figura B podemos observar 1) Ps5 pPic α -BMP2m; 2) Ps5 pPic α -proBMP2m; 3) Ps5 pPic α -proKBMP2m; 4) Ps5 pPic α -tPA; 5) Ps5 pPic α -tPAF; 6) Ps5 pPic α -tPAKF; 7) Ps5 Control pPicz; 8) Ps5 Control -; 9) Control -; 10) 1Kb Ladder.

Tabla 4: Tamaños esperados para los fragmentos amplificados por los cebadores Ps5.

Tamaño fragmentos generados con Ps5	
BMP2m	696 bp
pro-BMP2m	1485 bp
ProKBMP2m	1479 bp
tPA	1974 bp
tPAF	1419 bp
tPAKF	1479 bp

Para verificar la inserción de los plásmidos en las cepas transformadas de *P. pastoris* se realizó una comprobación múltiple desde el DNA genómico, evaluando los genes nativos AOX1 y AOX2, sumado a la presencia de los genes Bleo y Ps5 mediante PCR convencional y electroforesis en gel de agarosa al 1%, los resultados se exponen en la Figura 12 y 13.

En los carriles 5, 9 y 13 de la Figura 12 y en los carriles 9 y 13 de la Figura 13 se prueba observar una doble banda. Esto sucede ya que la banda superior de aproximadamente 2.2kb corresponde al gen AOX1 presente en la cepa WT y la banda de menor tamaño en los mismos carriles corresponde producto proveniente del plásmido que flanquea al sitio de clonamiento múltiple cuyos tamaños se encuentran en la Tabla 4.

En los carriles 2,6 y 10, tanto en la Figura 12 como 13, podemos observar la amplificación de un “fragmento” del gen AOX1 que corresponde a 200 bp, el par de cebadores con los que se amplificó este fragmento, está diseñado para qPCR, por lo que su tamaño es muy inferior al fragmento nativo que podemos observar con los partidores Ps5.

En los carriles 3, 7 y 11 de ambas Figuras podemos encontrar una banda de 1992 bp correspondiente a AOX2. La amplificación de los genes AOX1 y AOX2 nos indica que el DNA genómico obtenido corresponde a *P. pastoris*, la presencia del amplicón del gen Bleo de 200 bp presente en los carriles 4, 8 y 16 en ambos geles y Ps5 nos indica que el plásmido está integrado en el genoma de la levadura. Siguiendo esta idea, los carriles 2,3,4 y 5, corresponden a la extracción de DNA de la cepa productora de BMP2m, que nos confirma la integración del plásmido en el genoma de la cepa X-33 de *P. pastoris*. Del mismo modo, los carriles 6,7,8 y 9, corresponden a la cepa proBMP2m, los carriles 10,11,12 y 13 a la cepa proKBMP2. Los carriles 14,15,16 son controles negativos y finalmente los carriles 17, 18 son controles positivos.

El mismo orden encontramos en la Figura 11 para la confirmación de las cepas productoras de tPA. Los carriles 2,3,4 y 5 corresponden a la cepa productora de tPA nativa. En el carril 5 podemos observar que, a diferencia de las otras cepas productoras, la amplificación por Ps5 no presenta duplicidad de banda, sino solo una banda de mayor intensidad en su brillo. Esto se atribuye a que el tamaño del fragmento que se amplifica

por este set de partidores posee un peso molecular cercano al de AOX1 por lo que se podrían estar solapando las bandas. En los carriles 6,7,8 y 9, corresponden a la cepa tPAF y 10,11,12 y 13 a la cepa tPAKF..

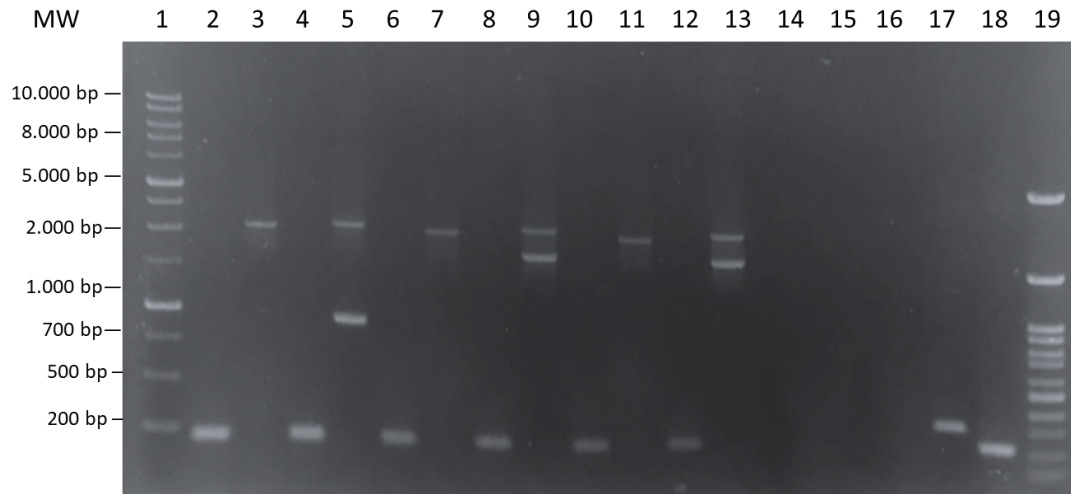


Figura 12: Validación por PCR en cepas de *P. pastoris* transformadas. Detección de genes endógenos AOX1, AOX2, genes introducidos BMP2 y marcador de selección Bleo. 1)1kb ladder; 2) AOX1 *P.pastoris* pPicza-BMP2m; 3) AOX2 *P.pastoris* pPicza-BMP2m; 4) Bleo *P.pastoris* pPicza-BMP2m; 5) Ps5 *P.pastoris* pPicza-BMP2m; 6)AOX1 *P.pastoris* pPicza-proBMP2m; 7) AOX2 *P.pastoris* pPicza-proBMP2m; 8) Bleo *P.pastoris* pPicza-proBMP2m; 9)Ps5 *P.pastoris* pPicza-proBMP2m; 10) AOX1 *P.pastoris* pPicza-proKBMP2m; 11) AOX2 *P.pastoris* pPicza-proKBMP2m; 12) Bleo *P.pastoris* pPicza-proKBMP2m; 13) Ps5 *P.pastoris* pPicza-proKBMP2m; 14) AOX1 control (-); 15) AOX2 control (-); 16) Bleo control (-); 17) Ps5 Control pPicz; 18) Bleo Control pPicz; 19) 100 bp Ladder.

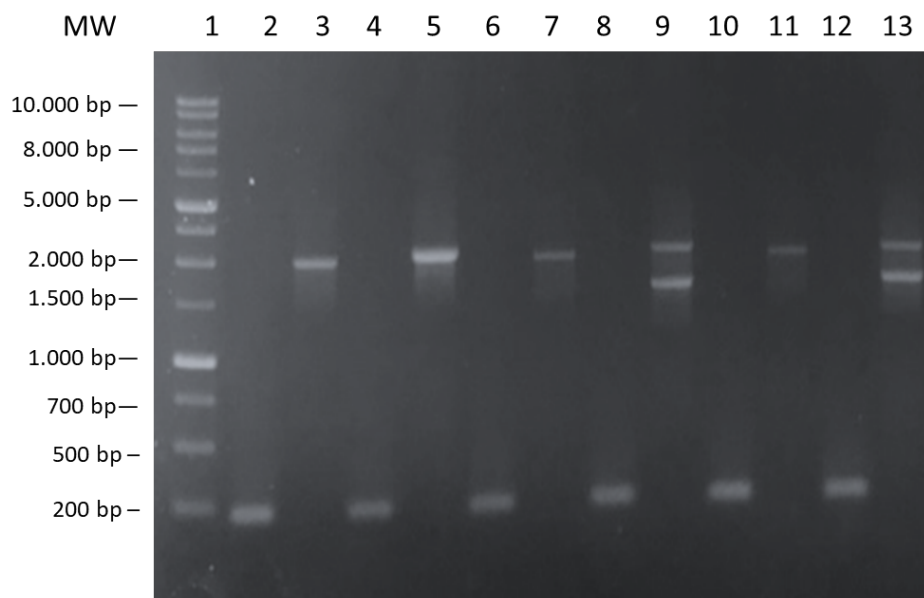


Figura 13: Validación por PCR en cepas de *P. pastoris* transformadas. Detección de genes endógenos AOX1, AOX2, genes introducidos tPA y marcador de selección Bleo.

1) 1kb ladder; 2) AOX1 *P.pastoris* pPicα-tPA; 3) AOX2 *P.pastoris* tPA; 4) Bleo *P.pastoris* tPA; 5) Ps5 *P.pastoris* tPA; 6) AOX1 *P.pastoris* pPicα-tPaF; 7) AOX2 *P.pastoris* pPicα-tPaF; 8) Bleo *P.pastoris* pPicα-tPAF; 9) Ps5 *P.pastoris* pPicα-tPAF; 10) AOX1 *P.pastoris* pPicα-tPAkF; 11) AOX2 *P.pastoris* pPicα-tPAkF; 12) Bleo *P.pastoris* pPicα-tPAkF; 13) Ps5 *P.pastoris* pPicα-tPAkF

Selección clonal por número de copias del gen.

Una vez verificada la inserción del plásmido se realizó la selección de los clones según número de copias insertadas en el genoma de la levadura.

Se seleccionaron diez clones de cada una de las cepas transformadas, los cuales fueron sometidos a extracción de material genético. La cuantificación del número de copias insertadas se realizó mediante qPCR relativa utilizando el método $\Delta\Delta C_t$, empleando un gen endógeno como referencia interna. Con base en estos análisis, se seleccionó un clon representativo de cada cepa transformante, correspondiendo en todos los casos a aquellos que presentaron una única copia del gen de interés. En el gráfico (Figura 14) se pueden observar 10 cepas transformantes para cada inserto localizadas en el eje X, enumeradas del

1 al 10.

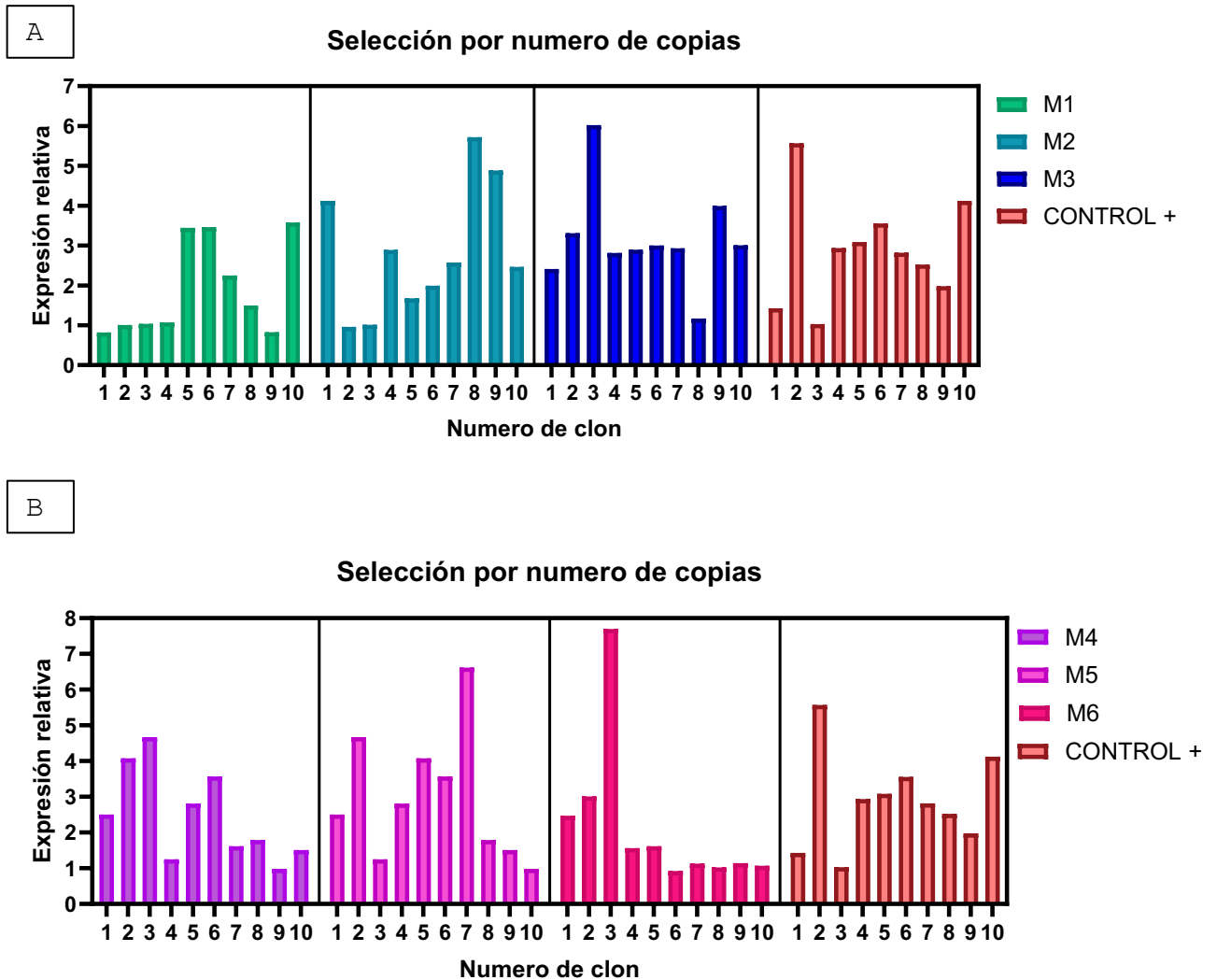


Figura 14: Selección de clones por número de copias del gen. Se tomaron 10 clones de cada cepa, se extrajo su material genético y mediante expresión relativa se estableció la cantidad de copias del inserto presentes en cada transformante. En el eje x se puede observar el número asignado a cada clon (1-10); en el eje Y se puede observar el número de copias que posee cada uno de ellos. En A observan los clones correspondientes a las cepas M1: *P.pastoris* pPic α -BMP2m; M2: *P.pastoris* pPic α -proBMP2m; M3: *P.pastoris* pPic α -proKBMP2m; control positivo de transformación *P.pastoris* pPic α vacío. En B los clones correspondientes a M1: *P.pastoris* pPic α -tPA; M2: *P.pastoris* pPic α -tPAF; M3 *P.pastoris* pPic α -tPAKF; control positivo de transformación *P.pastoris* pPic α vacío.

Las cepas seleccionadas adquirieron la nomenclatura según el vector utilizado (MX) seguido del clon seleccionado (CY). Siguiendo esta nomenclatura las cepas que se utilizaron en los estudios posteriores son: M1C2; M2C3; M3C8; M4C9; M5C3; M6C8. Adicionalmente se utilizaron las cepas M3C3 y M6C3 como controles multi copia, ya que presentan más de 6 copias cada uno.

Objetivo 2: Caracterizar cepas transformantes para la expresión de BMP2 y tPA en *Pichia pastoris*.

Caracterización de las cepas transformantes

Una vez realizada la comprobación de la transformación fue necesario caracterizar cada una de las cepas nuevas, para ello, se realizó una cinética de crecimiento en medio BMG hasta alcanzar el estado estacionario del cultivo (20-24 horas) a 30°C en matraz de agitación. En la Figura 15 A observamos las cepas M1C2, M2C3, M3C8, que codifican para las diversas variantes de BMP2, en B las cepas M4C9, M5C3, M6C8 que codifican para las diversas formas de tPA, sumado al control de transformación M7C3 con el plásmido vacío.

Todas Las cepas fueron crecidas con glicerol como única fuente de carbono, se obtuvieron alícuotas del cultivo y se midió la absorbancia del medio de cultivo (OD600) cada una hora hasta completar 24 horas. Se observa que la fase de crecimiento exponencial de las cepas productoras de BMP2 se encuentra aproximadamente entre las 10 y 15 hrs de cultivo. La cepa M3C8 posee un crecimiento retardado durante esta etapa, sin embargo se normaliza al momento de llegar a fase estacionaria donde alcanza un mayor OD600, evidenciando que genera mayor cantidad de biomasa que las variantes M1C2 y M2C3. A las 20 hrs de cultivo todas las cepas alcanzan el estado estacionario en estado estacionario (Figura 15A). Un comportamiento distinto observamos en las cepas productoras de tPA (Figura 15B) donde la zona exponencial se alcanza entre las 4 y las 12 horas de cultivo, la fase estacionaria se ve muy marcada posterior a las 12 horas. Si observamos el crecimiento de las cepas individualmente podemos destacar que M6C8 alcanza niveles mayores de OD600, evidenciando mayor cantidad de biomasa, en contraste a la cepa M5C3 cuyo crecimiento

es menor a la cepa control, pero sin embargo se normaliza pasadas las 20 horas de cultivo, alcanzando igual concentración de biomasa.

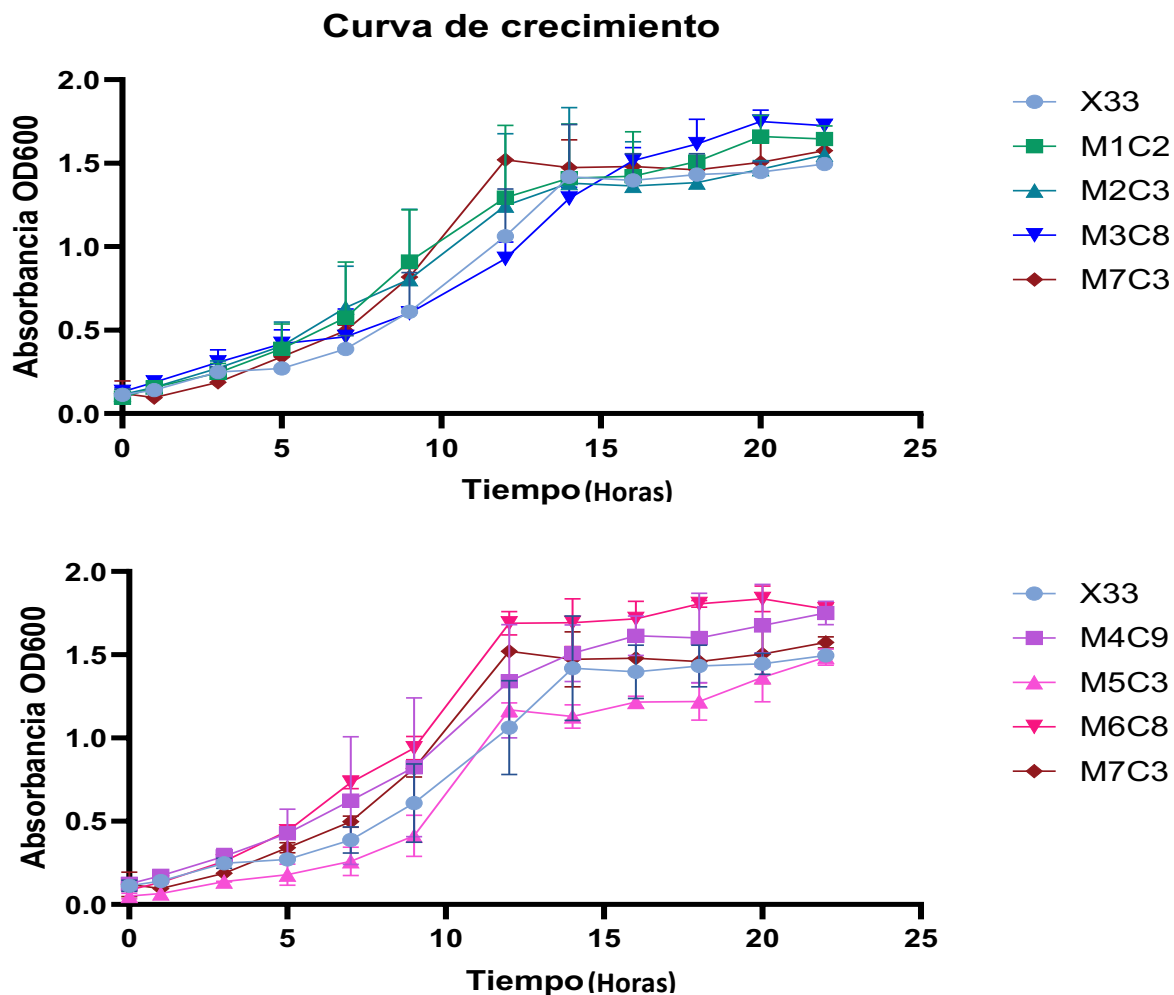


Figura 15: Curvas de crecimiento de las cepas transformantes en medio de cultivo BMG.

Para evaluar la integridad de las células en cada cultivo se utilizó microscopía óptica tradicional. Como se puede apreciar en la Figura 16, todas las cepas poseen células ovaladas, presentan gemación y no se encuentran en estado de floculación, característico de las levaduras en fase estacionaria tardía (envejecidas). Además, podemos observar que los cultivos son axénicos, ya que no se observa contaminación por bacterias.

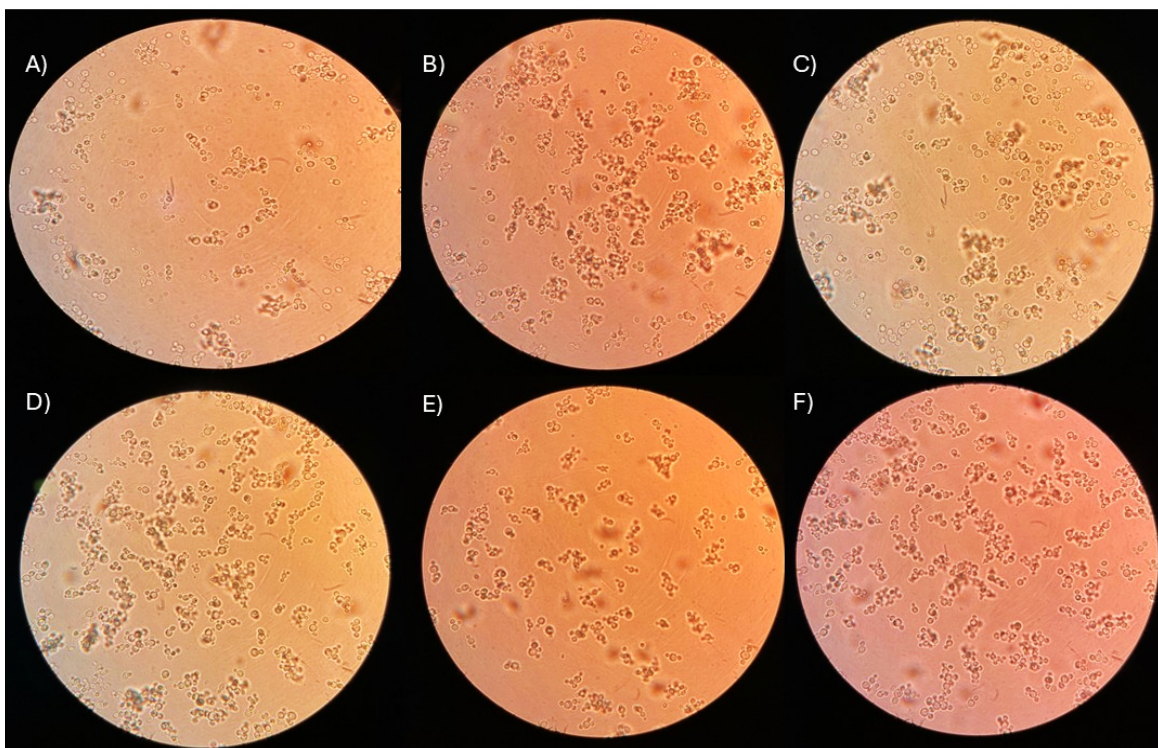


Figura 16: Microscopía óptica de las cepas transformantes en cultivo con medio BMG al alcanzar el estado estacionario. En A-C observación microscópica de cepas productoras de BMP2, D-F observación microscópica de las cepas productoras tPA.

Análisis de la producción de proteínas recombinantes BMP2 y tPA en cepas transformantes de *P. pastoris*.

Como se evidenció en la Figura 15, todas las cepas a las 24 hrs de cultivo se encuentran en estado estacionario con altas concentraciones de biomasa. En este punto, se cambió la fuente de carbono del cultivo a metanol 0,5% v/v para inducir al promotor AOX1 y generar la expresión de proteínas, se suplementó nuevamente con metanol 0,5% v/v a las 24 y 48 hrs.

En las Figuras 17 y 18 podemos observar la cuantificación de proteínas totales obtenidas desde el sobrenadante de cultivo de las cepas monocopia. T0 corresponde a las 24 horas de crecimiento con medio de cultivo BMG, que al poseer glicerol en el medio de cultivo reprime el sistema de producción de proteínas heterólogas por lo que evidenciamos una muy baja concentración de proteínas en el medio de cultivo. La presencia de 0,5% v/v de

metanol induce el promotor inducible AOX1 activando la maquinaria para la producción de proteínas recombinantes por lo que podemos observar un aumento en la cuantificación de proteínas totales en el medio de cultivo a las 24 hrs (T24). Tras este punto se suplementó nuevamente con metanol para mantener la concentración de 0,5% v/v, esto se ve reflejado en el aumento en la obtención de proteínas en el sobrenadante (T48).

Se utilizaron 4 controles, la cepa WT (X33), la cepa transformada con el vector vacío (control), la cepa 365 que sintetiza una enzima lipasa denominada CalB como control de expresión de una proteína que requiere pocas modificaciones post traduccionales y finalmente una cepa transformante multicopia (6-8 copias del gen).

En la Figura 17 se puede apreciar la cuantificación de proteínas para las variantes de BMP2 con sus respectivos controles. En el tiempo cero (T0), encontramos una muy baja concentración de proteínas totales, lo cual es el comportamiento esperado antes de la inducción con metanol. Aquí se observa que las cepas M1 (productora de BMP2 madura) y M3 (prodominio con sitio de corte Kex2 modificado) muestran una concentración similar a los controles (WT y plásmido vacío), un comportamiento que también se repite en la cepa multicopia (M3MC). De manera destacada, la cepa M2, que posee el prodominio completo en su estructura, genera una concentración de proteínas totales ligeramente mayor respecto al control. Sin embargo, en este punto, la cepa que produce la proteína control CalB (cepa 365) ya muestra una concentración de proteína superior a todas las cepas productoras de BMP2. El panorama cambia significativamente al inducir con 0,5% v/v de metanol, donde a las 24 horas (T24), se aprecia un aumento en las proteínas totales en todas las cepas en estudio respecto al control. En este punto, las cepas M1, M2 y M3 presentan una concentración de proteínas en el medio de cultivo que es muy similar entre ellas, mientras que se evidencia un aumento en la cepa multicopia. Transcurridas las 48 horas (T48) de inducción, las cepas M1, M2 y M3 mantienen una concentración de proteínas totales muy similar entre sí, y la cepa multicopia (M3MC) continúa mostrando un aumento. No obstante, la cepa productora de CalB (cepa 365) mantiene su posición como el sistema más productivo, mostrando una concentración mucho mayor de

proteínas totales secretadas en comparación con todas las cepas productoras de BMP2.

Un comportamiento similar podemos observar en la Figura 18, donde en T0 encontramos una muy baja concentración de proteínas totales, sin diferencia entre las cepas en estudio y la cepa control, esto cambia al inducir con 0,5% v/v de metanol, donde a las 24 hrs (T24) se muestra un aumento en las proteínas totales en todas las cepas, aquí llama fuertemente la atención que la cepa productora de tPAF (M5), muestra una menor concentración de proteínas que el control, el mismo comportamiento podemos observar en la cepa multicopia (M6MC). Las cepas M4 y M6, presentan una concentración de proteínas similar al control, sin embargo, la cepa 365 mantiene su posición como el sistema más productivo, mostrando una concentración mucho mayor de proteínas totales secretadas en comparación con todas las cepas productoras de tPA.

Finalmente, a las 48 hrs (T48), la cepa M5 mantiene una baja concentración de proteínas totales que, sin embargo, muestra un leve aumento respecto al control. Llama la atención que la cepa M4, que genera tPA completa, presenta altos niveles de concentración de proteínas, superiores a los exhibidos por la cepa multicopia y similares a los observados en la cepa 365.

Posteriormente algunas muestras T48 fueron analizadas mediante electroforesis en condiciones denatürantes SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie (Figura 19).

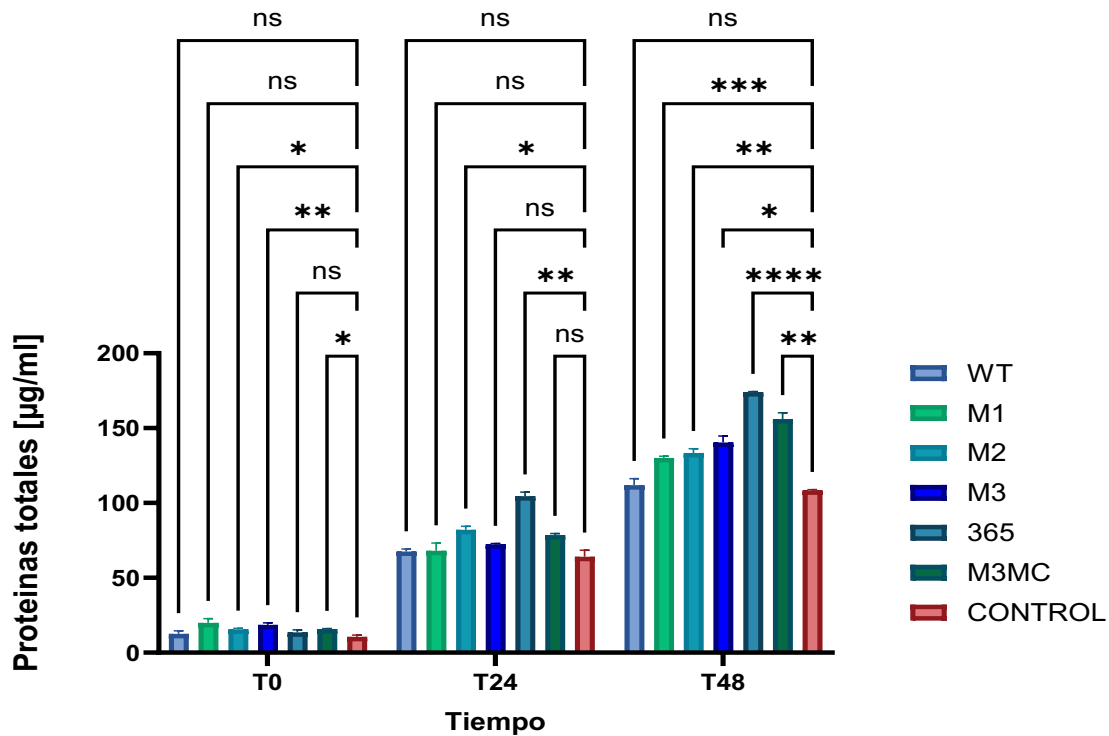


Figura 17: Cuantificación de proteínas totales desde el medio de cultivo para las cepas productoras de BMP2. Se pueden observar las diversas cepas evaluadas al tiempo 0 (sin metanol), inducción con metanol transcurridas 24 horas, y transcurridas 48 horas de producción. Podemos observar la cepa WT, la cepa productora de BMP2m (M1) la cepa productora de Bmp2 con presencia del predominio (M2) y la cepa que posee el sitio de corte inducido K (M3). Además, se puede observar un control de expresión de la enzima CalB (365), una cepa con corte inducido “K” que posee 6 copias del gen “múltiples copias” (M3MC) y el control de transformación vacío. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías **** $p \leq 0,0001$

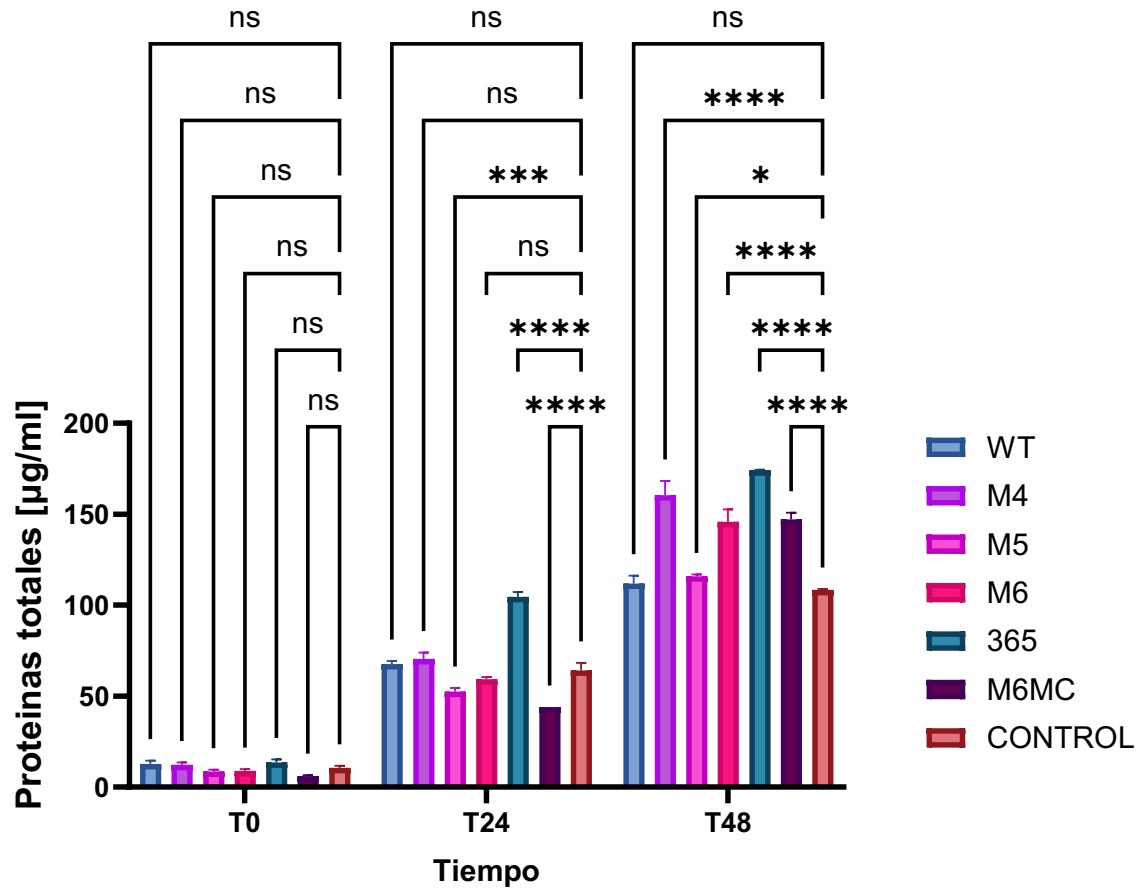


Figura 18: Cuantificación de proteínas totales desde el medio de cultivo para las cepas productoras de tPA posterior a la inducción con metanol 0.5%. Se pueden observar las diversas cepas evaluadas al tiempo 0 (sin metanol) transcurridas 24 horas y a las 48 horas de producción. Podemos observar la cepa WT, la cepa productora de tPA nativa (M4) la cepa productora de tPA fragmento (M5) y la cepa que posee el sitio “k” de corte inducido (M3). Además de puede observar un control de proteína “siempre” CalB (365), una cepa con corte inducido que posee 7 copias del gen “múltiples copias” (M3MC) y el control de transformación vacío. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías **** $p \leq 0,0001$

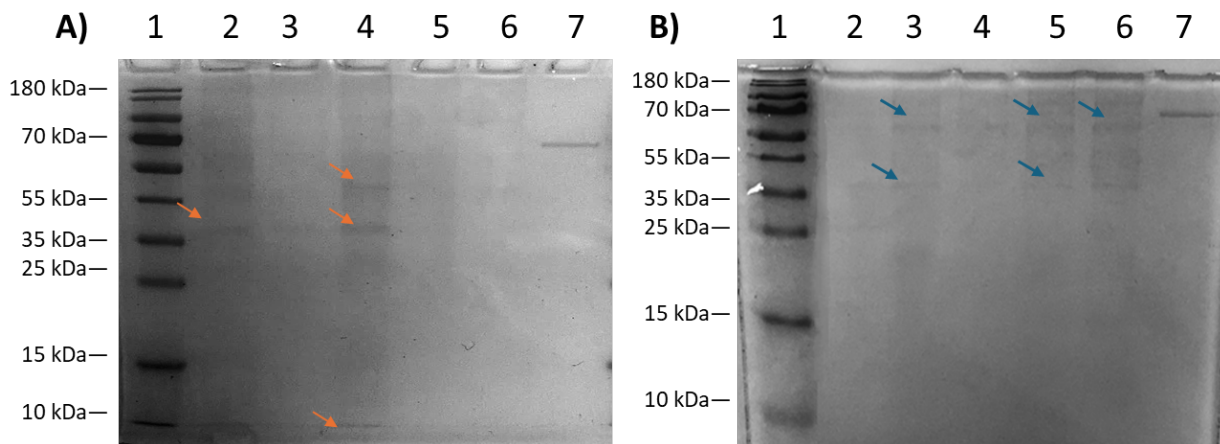


Figura 19: Geles de proteína en condiciones denaturantes SDS-PAGE revelado con azul de Coomassie. En A se observan las variantes para la expresión de Bmp2. En el carril 1 se encuentra el peso molecular de proteínas; en el carril 2 sobrenadante de cultivo cepa WT; 3 sobrenadante de cultivo cepa M1C3 (Bmp2m); 4 sobrenadante de cultivo cepa M2C3; 5 sobrenadante de cultivo cepa M3C8; En el carril 6 sobrenadante de cultivo para control de plásmido vacío (M7); 7 control positivo de la técnica BSA (70 kDa). En B se observan las variantes para la expresión de tPA, 1 peso molecular de proteínas, 2 sobrenadante de cultivo cepa WT; 3 sobrenadante de cultivo cepa M4C9; 4 sobrenadante de cultivo cepa M5C3; 5 sobrenadante de cultivo cepa M6C8; 6 sobrenadante de cultivo cepa M7; 7 control de carga BSA (70kDa).

Ambos geles de proteínas presentan condiciones denaturantes dado el tratamiento que recibieron con β -mercaptoetanol (BME) que rompe los enlaces disulfuro presentes en la proteína, por lo que en el gel A deberíamos encontrar bandas que se encuentren cercanas a los 15 kDa, ya que el monómero de BMP2 posee un tamaño de 16kDa. Una banda de bajo peso molecular cercano a los 10 kDa se puede observar solo en el carril 4, que corresponde al sobrenadante de la cepa M2. Sin embargo, en el carril 2 y 4 se pueden observar dos bandas inespecíficas cercanas a los 35kDa.

Por otra parte, en el gel B, se deberían observar bandas que corresponden a 70kDa que es el peso molecular de la proteína tPA nativa y una banda cercana a los 40 kDa que es el peso molecular aproximado de la proteína fragmento. En los carriles 3,4,5, que son las

muestras M4, M5 y M6 respectivamente, se logra observar una banda muy tenue cercana a los 70 kDa. Adicionalmente en el carril 6, que corresponde a la cepa M7 se logra ver una los tenue cercana a los 35kDa.

Cuantificación proteínas purificadas por cromatografía de afinidad

Posterior a la cuantificación de proteínas totales y corroboración con los geles SDS-PAGE, se sometieron las muestras a cromatografía por afinidad para su purificación. En este caso, se utilizaron columnas cromatográficas de níquel (HisPur™ Ni-NTA) ya que este metal pesado presenta una alta afinidad con los fragmentos ricos en histidina.

Los plásmidos generados tienen integrada una cola de polihistidina (6xHis) en la región N-terminal (Figura 3), por lo que las proteínas generadas deberían quedar retenidas en las columnas.

Para la cromatografía Se recuperaron 5 fracciones, la primera, nombrada F0 que corresponde a todas las proteínas que no poseen cola de histidina en su estructura. A continuación, las fracciones W1 y W2 que corresponden a los lavados de las columnas, aquí se espera obtener proteínas que pudieran tener histidina en su composición, pero en baja cantidad. Finalmente, las fracciones F1 y F2 que corresponden a los eluidos con imidazol. Este compuesto químico compite por el sitio de unión del níquel por ello, se emplea como un agente de competición para eluir (liberar) las proteínas purificadas de la resina.

En las Figuras 20 y 21 se puede observar la cuantificación de proteínas en las distintas fracciones obtenidas desde las cromatografías. En la Figura 20 podemos observar el estudio de las cepas productoras de BMP2, aquí podemos observar que el mayor contenido de proteínas en el sobrenadante de cultivo no presenta afinidad por la columna ya que la cuantificación de F0 nos señala la falta de cola de histidina en las proteínas totales desde el medio de cultivo, esto se ve principalmente en la muestra M2. Sin embargo, se pudo cuantificar la presencia de proteínas en w1, w2, F1 y F2. Un comportamiento similar se observa en la Figura 21, donde vemos que la fracción F0 todas las variantes de tPA, presentan una alta cuantificación de proteínas.

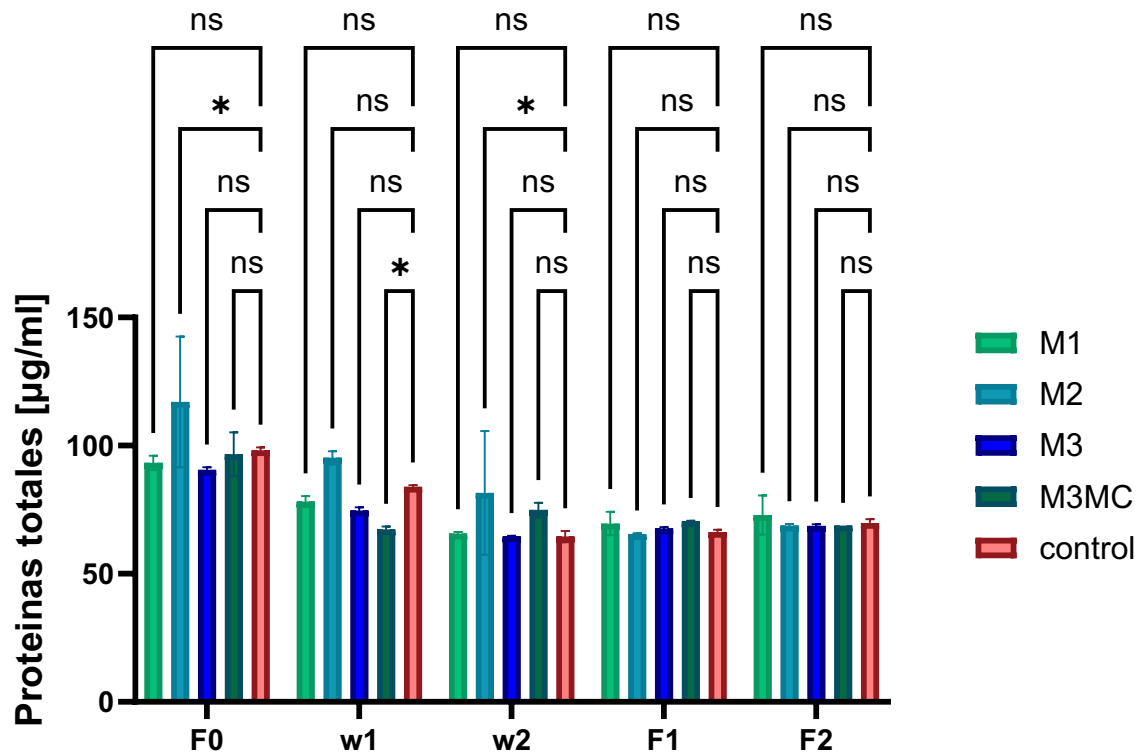


Figura 20: Cuantificación de proteínas totales desde fracciones rescatadas de Cromatografía de afinidad de níquel en cepas productoras de BMP2, en sobrenadante de cultivo las 48 horas de producción. En el eje x se encuentran las fracciones estudiadas donde F0 corresponde a proteínas que no 6xHis, W1 y W2 corresponden a las fracciones recuperada de los lavados de las columnas. F1 y F2 son las fracciones recuperadas posterior al tratamiento con 300 mM de imidazol. Se observan las siguientes cepas: M1 productora de BMP2m, M2 la cepa productora de Bmp2 con presencia del prodominio y M3 cepa que posee el sitio de corte inducido “k”. Además, M3MC una cepa con corte inducido que posee 7 copias del gen y control de plásmido vacío. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías ****p ≤ 0,0001

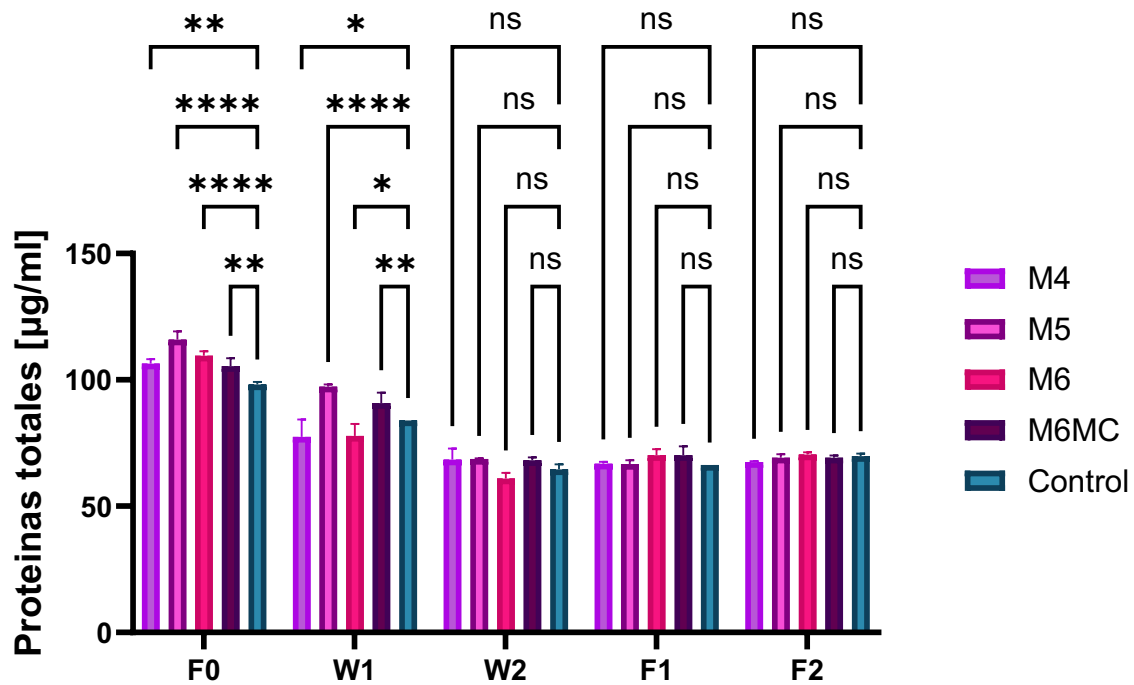


Figura 21: Cuantificación de proteínas totales desde fracciones rescatadas de Cromatografía de afinidad de níquel de cepas productoras de tPA en sobrenadante de cultivo las 48 horas de producción. En el eje x se encuentran las fracciones estudiadas donde F0 corresponde a proteínas que no 6xHis, W1 y W2 corresponden a las fracciones recuperada de los lavados de las columnas. F1 y F2 son las fracciones recuperadas posterior al tratamiento con 300 mM de imidazol. Se observan las siguientes cepas: M4, cepa productora de tPA; M5 cepa que posee el sitio de corte inducido “k”; M6 productora de fragmento de tPA. Además, M6MC una cepa con corte inducido que posee 6 copias del gen y control de plásmido vacío. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías **** $p \leq 0,0001$

Objetivo 3: Determinar el efecto sobre el estrés de retículo de las variantes de BMP-2 y t-PA.

Activación Vía UPR y ERAD

Para evidenciar el estrés generado en el retículo endoplasmático (RE) que causa la expresión de las proteínas difíciles de expresar BMP2 y tPA, se evaluó la expresión de genes clave para la vía UPR y la vía ERAD. Para UPR se utilizaron los genes *HAC1*, *KAR2*, *PDI* y *ERO1*; para la detección de la vía ERAD se utilizaron *DER1*, *HRD3*, *SEC61*, como gen de referencia se utilizó el gen de actina (*ACT1*) de *P. pastoris* Tabla 2.

Para el análisis de las muestras se evaluaron las cepas productoras de BMP2 que se observan en la Figura 22 y 23, donde se evaluaron los marcadores moleculares para la vía UPR y ERAD respectivamente. Se puede observar en la Figura 22 que las cepas de copia única que expresan BMP2 poseen una expresión relativa de todos los marcadores de la vía UPR similar a la cepa control por lo que no mostraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$). Sin embargo, la cepa que posee múltiples copias del gen, sobreexpresan *HAC1* y *PDI* mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en las muestras con 48 horas de inducción con metanol. Por otra parte, la cepa 365 que produce CalB también sobreexpresa el marcador molecular *PDI* a las muestras de 48 horas. De igual forma, las cepas que poseen copia única del gen no generan cambios en los marcadores moleculares de la vía ERAD, sin embargo, la cepa M3, que expresa la variante de BMP2 con corte inducido por la endopeptidasa nativa Kex2 de *P. pastoris*, presenta un aumento en la expresión de *SEC61* en el tiempo 0 (T0) previo a la inducción con metanol.

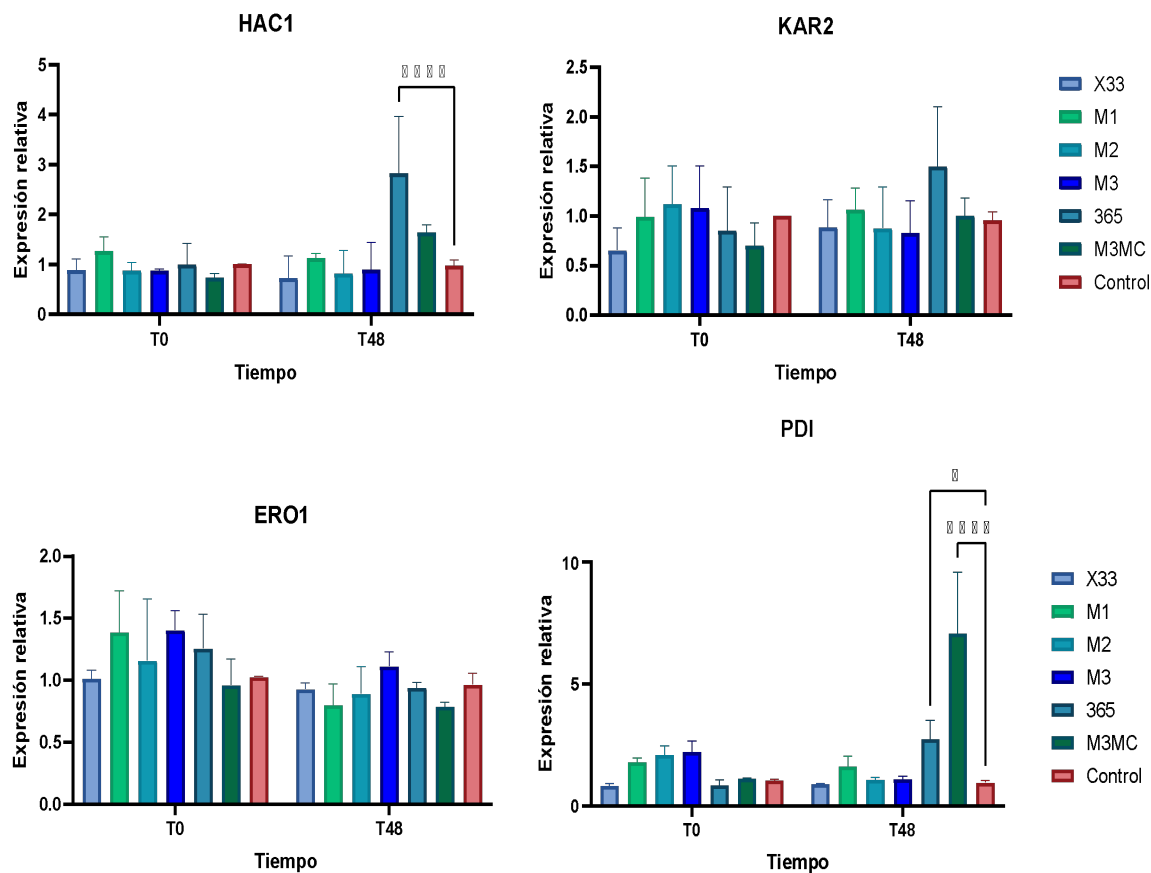


Figura 22: expresión relativa de marcadores moleculares asociados a la vía UPR en cepas que expresan BMP2. Para la determinación de los niveles de expresión de los genes analizados, se empleó la cuantificación relativa y el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. En los ensayos de qPCR realizados se analizaron todas las cepas transformantes en los tiempos 0 (sin inducción por metanol), y a las 48 horas (post inducción con metanol) se estudiaron todos cultivos con el mismo gen al mismo tiempo. Las muestras analizadas son: M1 productora de BMP2m, M2 la cepa productora de Bmp2 con presencia del prodominio y M3 cepa que posee el sitio de corte inducido “k”. Además, M3MC una cepa con corte inducido que posee 7 copias del gen y control de plásmido vacío. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías **** $p \leq 0,0001$

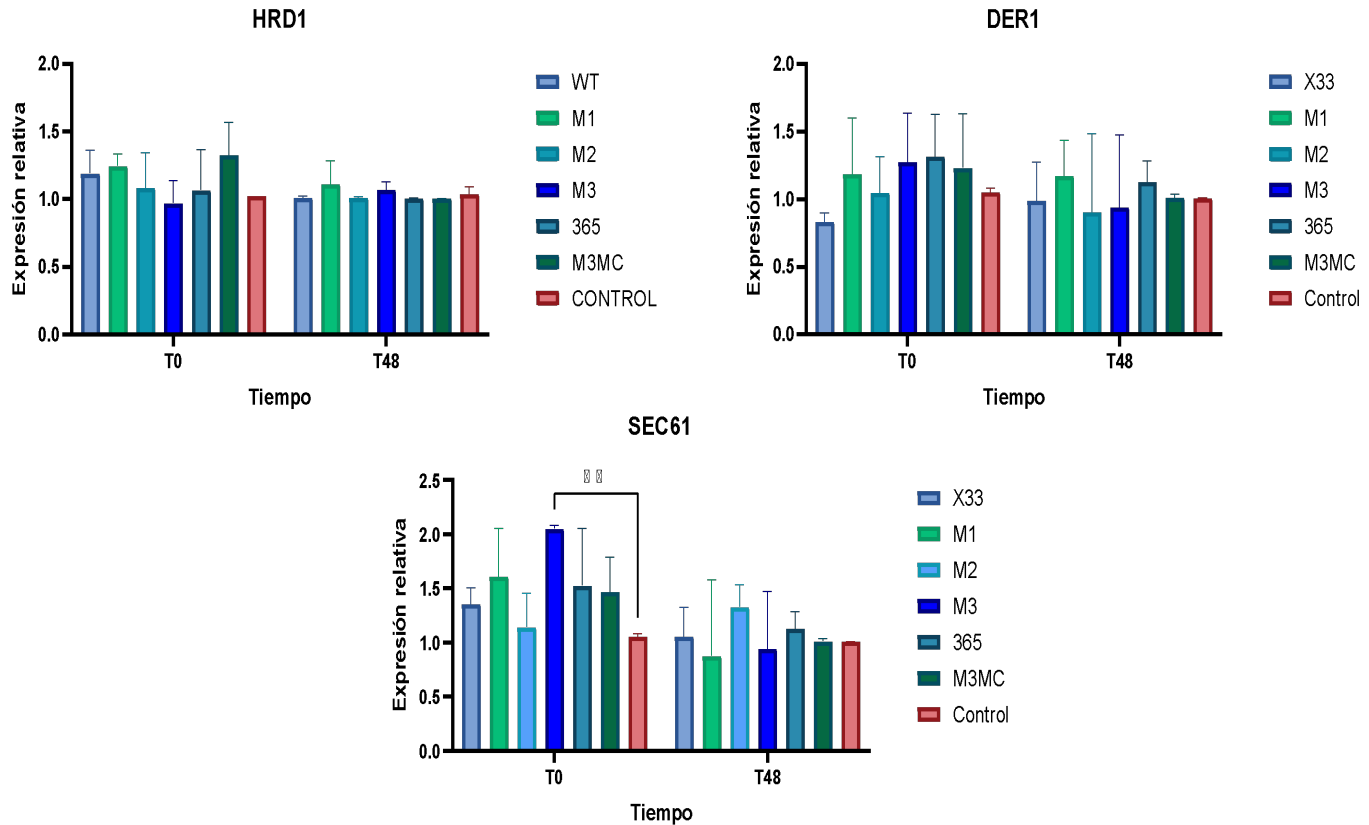


Figura 23: expresión relativa de marcadores moleculares asociados a la vía ERAD en cepas que expresan BMP2. Para la determinación de los niveles de expresión de los genes analizados, se empleó la cuantificación relativa y el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. En los ensayos de qPCR realizados se analizaron todas las cepas transformantes en los tiempos 0 (sin inducción por metanol), y a las 48 horas (post inducción con metanol) se estudiaron todos cultivos con el mismo gen al mismo tiempo. Las muestras analizadas son: M1 productora de BMP2m, M2 la cepa productora de Bmp2 con presencia del prodominio y M3 cepa que posee el sitio de corte inducido “k”. Además, M3MC una cepa con corte inducido que posee 7 copias del gen y control de plásmido vacío. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías **** $p \leq 0,0001$

Respecto al análisis de las cepas productoras de tPA que se observan en la Figura 24 y 25, igualmente se evaluaron los marcadores moleculares para la vía UPR y ERAD respectivamente. Se puede observar en la Figura 24 que las cepas de copia única que expresan tPA poseen una expresión relativa similar al control en la evaluación de los marcadores moleculares HAC1, KAR2 y PDI, sin embargo, se puede apreciar un aumento en la expresión del marcador ERO1 en las tres variantes productoras de tPA (M4, M5, M6) estudiadas al tiempo 0. Respecto a la cepa que posee múltiples copias del gen, podemos observar que genera un aumento en la expresión de los genes HAC1 y PDI a las 48 horas de inducción con metanol. Por otra parte, la cepa 365 que produce CalB también sobre expresa el marcador molecular PDI.

De igual forma, las cepas que poseen copia única del gen no generan cambios en los marcadores moleculares de la vía ERAD (Figura 25), salvo la cepa M4 productora de tPA , que presenta un aumento en la expresión de HAC1 en el tiempo 0 (T0) previo a la inducción con metanol.

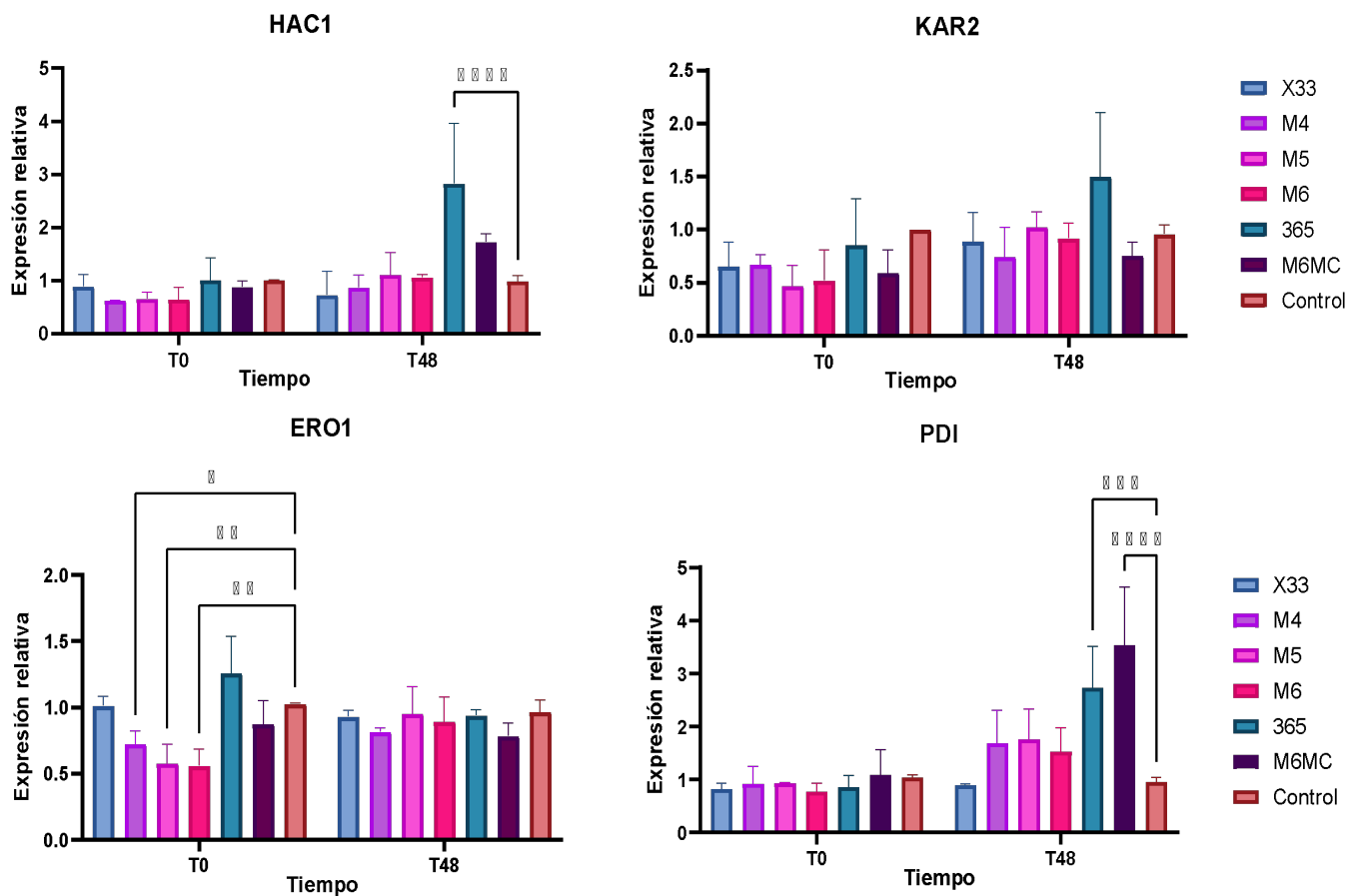


Figura 24: expresión relativa de marcadores moleculares asociados a la vía UPR en cepas que expresan tPA. Para la determinación de los niveles de expresión de los genes analizados, se empleó la cuantificación relativa y el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. En los ensayos de qPCR realizados se analizaron todas las cepas transformantes en los tiempos 0 (sin inducción por metanol), y a las 48 horas (post inducción con metanol) se estudiaron todos cultivos con el mismo gen al mismo tiempo. Las muestras analizadas son: M4 productora de tPA, M5 que corresponde a cepa productora del fragmento catalítico de tPA y M6 cepa que posee el sitio de corte inducido “k”. Además, M6MC una cepa con corte inducido que posee 8 copias del gen y control de plásmido vacío. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías ****p≤ 0,0001.

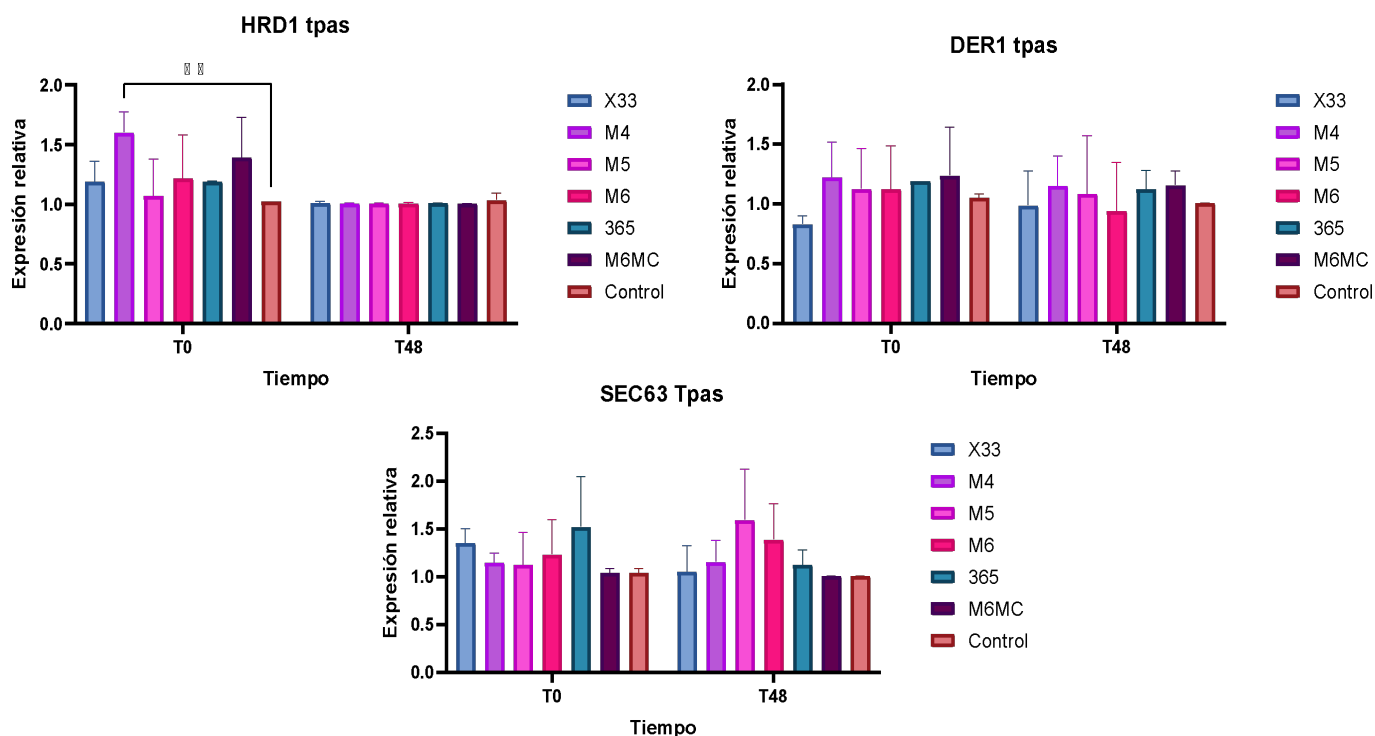


Figura 25: expresión relativa de marcadores moleculares asociados a la vía ERAD en cepas que expresan tPA. Para la determinación de los niveles de expresión de los genes analizados, se empleó la cuantificación relativa y el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. En los ensayos de qPCR realizados se analizaron todas las cepas transformantes en los tiempos 0 (sin inducción por metanol), y a las 48 horas (post inducción con metanol) se estudiaron todos cultivos con el mismo gen al mismo tiempo. Las muestras analizadas son: M4 productora de tPA, M5 que corresponde a cepa productora del fragmento catalítico de tPA y M6 cepa que posee el sitio de corte inducido “k”. Además, M6MC una cepa con corte inducido que posee 8 copias del gen y control de plásmido vacío. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías **** $p \leq 0,0001$.

DISCUSIÓN

La producción de proteínas recombinantes con aplicación terapéutica representa un desafío cuando se trata de moléculas complejas consideradas “difíciles de expresar”, debido a que presentan requerimientos estructurales y bioquímicos que superan la capacidad de procesamiento basal del hospedero. Entre estas limitaciones se incluyen la necesidad de plegamiento intrincado, una elevada demanda de modificaciones postraduccionales (PTM), la formación de múltiples enlaces disulfuro y patrones específicos de glicosilación. La sobreexpresión de este tipo de proteínas puede saturar la maquinaria de plegamiento y secreción, provocando la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y de la vía de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD)(77).

En este contexto, se seleccionaron dos proteínas modelo de alta complejidad: BMP2 y tPA. La dificultad de BMP2 radica principalmente en la estricta disposición de puentes disulfuro que conforman un nudo de cisteína con tres enlaces intracatenarios y un enlace intermolecular que estabiliza la forma homodimérica, careciendo además de sitios de N-glicosilación en su estructura madura, sin embargo, en su prodominio posee 3 sitios de N-glicosilación que podrían ayudar al plegamiento de la proteína (83).

Por su parte, tPA requiere la formación de 17 puentes disulfuro y posee tres sitios de N-glicosilación, características que la convierten en una molécula altamente demandante en términos de plegamiento y procesamiento secretorio (63).

Ambas proteínas son biofarmacos de alto requerimiento en la industria farmacéutica, por lo que la presencia de N-glicosilaciones puede marcar la diferencia al momento de ser suministrada a un paciente (84). La importancia de la N-glicosilación se subraya al considerar que ambas proteínas modelo son biofármacos de alto requerimiento. Este proceso es fundamental para guiar el plegamiento correcto, la solubilidad y la estabilidad de la proteína, lo que lo convierte en un factor determinante para la eficacia clínica (85). Si bien la elección de *Pichia pastoris* es ventajosa por sus glicanos naturalmente más cortos, su vía nativa aún puede generar hipermanosilación, lo que podría resultar en una respuesta inmunológica o una vida media sérica reducida (86).

Frente a las exigencias del modelo, la elección del vector de expresión en *P. pastoris* es un factor crítico para lograr una producción eficiente. Entre los plásmidos comercialmente disponibles, los derivados del sistema pPIC (Invitrogen/ThermoFisher) constituyen la principal plataforma de uso. Una de sus características determinantes es la combinación de un promotor fuerte e inducible (AOX1) con un péptido señal eficiente, que en conjunto definen tanto la intensidad de transcripción como la correcta entrada de la proteína en la vía secretoria (87,88).

En este trabajo se utilizó el vector pPICZ α , ya que porta el promotor AOX1 y el péptido señal del factor de apareamiento alfa (MF α) de *Saccharomyces cerevisiae* como se puede observar en la Figura 3 y 4. El promotor AOX1 a diferencia del promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (PGAP) asegura altos niveles de expresión bajo inducción con metanol (89). Normalmente, la concentración de metanol de hasta el 5% es tolerable para los organismos, pero los niveles altos de concentraciones de metanol (por encima del 5%) son muy tóxicos para la viabilidad celular y pueden detener el proceso de producción (58) por ello actualmente se está trabajando en la búsqueda de promotores que inducen la expresión de proteínas libres de metanol (90). Por su lado, el péptido señal MF α dirige la proteína nascente hacia el retículo endoplásmico, donde comienza su procesamiento y plegamiento (91). Este péptido posee una región “pre”, que facilita la translocación, y una región “pro”, que actúa como chaperona intramolecular favoreciendo el tráfico hacia el aparato de Golgi. La escisión de la región pro en *P. pastoris* es mediada por la proteasa Kex2p, homóloga a la furina en mamíferos, que reconoce secuencias dibásicas y permite la maduración de diversas proteínas secretadas. Para optimizar este paso, se adaptó la secuencia de corte nativa de las proteínas estudiadas, originalmente dependientes de furina, para que fueran reconocidas de manera eficiente por Kex2p, asegurando la liberación de la forma madura y funcional en el medio extracelular (41,92). De este modo, la combinación AOX1–MF α representa una estrategia fundamental para obtener proteínas terapéuticas complejas con alta productividad y calidad estructural. En la etapa de transformación, a diferencia del sistema bacteriano, las células competentes de *P. pastoris* requieren grandes cantidades (a nivel de μ g) del plásmido,

por ello para su integración es necesario linealizar con una enzima de corte único el plásmido (Figura 7) (93).

Adicionalmente, en la expresión de proteínas recombinantes el número de copias integradas del gen de interés constituye un factor determinante. En la mayoría de los casos, se produce un solo cruce en el genoma, pero se producen inserciones múltiples en el 1–10% de los casos (41). Aunque la integración de múltiples copias suele correlacionarse con mayores niveles transcripcionales (94), también incrementa el riesgo de saturar la maquinaria secretora y acumular proteínas mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico, activando la UPR y generando un estrés celular que enmascara los efectos intrínsecos del diseño del constructo (73,94). Por ello, al analizar el número de copias que se integraron en las células transformantes, se optó por aquellas que poseían una copia única (Figura 14). Al elegir aquellas que son monocopia minimizamos la variabilidad asociada a la sobreexpresión masiva y atribuimos las diferencias observadas en plegamiento, secreción o activación de rutas de estrés directamente a la presencia del prodominio y sus modificaciones (Figura 3).

Dentro de las estrategias planteadas en este estudio se encuentra la expresión de la proteína en su forma funcional, es decir, biológicamente activa. Por parte de BMP2 corresponde únicamente a la región madura, designada como BMP2m, y por parte de tPA se asignó el nombre tPAF derivado del fragmento que cataliza la reacción de disolución de coágulos, homólogo a la proteína comercial Reteplasa (65). En esta estrategia se esperaba que la proteína al ser la región madura, por tanto, más pequeña, no requiera de tanto procesamiento y sea más sencilla de generar en *P. pastoris*.

Esto se ve reflejado en la cuantificación de proteínas (Figura 14 y 15) donde podemos apreciar que la expresión de proteínas totales en el sobrenadante de cultivo a las 48 horas de inducción con metanol presenta una mayor concentración de proteínas respecto al control. La cepa M1 equivale a $130 \pm 1,24$ µg/mL, la cepa M5 presenta una concentración de proteínas totales que asciende a 115 ± 1 µg/mL. Por otra parte, si lo comparamos con una proteína pequeña que requiere pocas modificaciones postraduccionales como es Calb

[2], [69](cepa 365) que se utilizó como control, vemos que esta genera mayor cantidad de proteínas totales que equivale a $174 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ lo que podría indicar que es más fácil de sintetizar para el microorganismo. Este aumento respecto al control podría sugerir que, aunque ambas proteínas fueron secretadas, su eficiencia fue menor en comparación con una proteína más sencilla como CalB (95), lo que podría confirmar que el nivel de complejidad estructural sigue siendo un factor limitante en *P. pastoris*.

La segunda estrategia planteada en este estudio es la expresión de la forma “nativa” de la proteína, es decir, que el cassette de transformación contenga la información para la síntesis de la forma precursora, con la presencia del prodominio, cuyo sitio de corte es reconocido por la endopeptidasa humana (furina). Con esta estrategia se buscó que, tras las modificaciones postraduccionales requeridas, de origen a la proteína en su forma madura activa. Para BMP2 esta estrategia dio origen a la cepa M2 y en tPA a la cepa M4. Al observar la cuantificación de proteínas totales encontramos $133 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$ de proteínas totales en la cepa M2; y $160 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ en la cepa M4, en ambos casos podemos observar que la cuantificación es superior a las cepas control (WT y CONTROL), pero inferior a la cepa 365 productora de CalB ($174 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$). A su vez, la cepa M2 presenta niveles similares a la cepa M1, demostrando que el prodominio podría no estar influyendo en la mayor generación de proteínas. Sin embargo, al comparar la cepa M4 ($160 \pm 7 \mu\text{g/mL}$) y la cepa M5 ($115 \pm 1 \mu\text{g/mL}$) podemos observar que hay una mayor detección de proteínas, lo que sugiere la presencia de la estructura precursora en la cepa M4 podría estar facilitando una mayor eficiencia de producción o secreción, lo que se ve reflejado en una mayor concentración de proteínas totales en comparación con el fragmento tPAF de la cepa M5.

Para alivianar el costo energético que significa para la levadura llevar a cabo los cortes proteolíticos necesarios para generar una proteína funcional, es decir, el corte de furina que se encarga de escindir el prodomino nativo, se modificó la región de corte para que sea reconocida por la misma endopeptidasa que corta el MF α , Kex2p. Para ello se

generaron las variantes M3 que tuvo una cuantificación de proteínas totales de $140 \pm 4,34$ $\mu\text{g/mL}$ y M6 146 ± 6 $\mu\text{g/mL}$.

Todas las cepas generaron mayor cantidad de proteínas totales que los controles WT y vector vacío (CONTROL), a su vez, menor cuantificación de proteínas que la cepa productora de CalB.

Por otra parte, se evaluaron las cepas M3 y M6 que poseían múltiples copias del inserto. En ambos casos estas generaron un aumento significativo en la cuantificación de proteínas totales donde M3MC $156 \pm 4\mu\text{g/mL}$ y M6MC $147 \pm 4\mu\text{g/mL}$ respectivamente, ambas superiores al control, pero similares a su homólogo sin el corte inducido.

Los resultados exhibidos por la cuantificación de proteínas totales no se ven reflejados fielmente en los geles de SDS PAGE presentes en la Figura 19 A y B, donde se observan bandas que no corresponden al peso molecular que se esperaba. En la Figura 19A se observaron dos bandas, una equivalente a 10kDa y otra de 35 kDa en los carriles 2 y 4, que corresponden a la cepa M1 y M3. Este tamaño difiere de los 16 kDa que corresponde al tamaño del monómero de BMP2, ya que se encuentra en condiciones denaturantes. Algo similar ocurre en la Figura 19B, donde se debería observar una banda de 70 kDa en el carril 3 y una banda cercana a los 40 kDa en los carriles 4 y 5. En los carriles 3,4,5, que son las muestras M4, M5 y M6 respectivamente, se logra observar una banda muy tenue cercana a los 70 kDa. Sin embargo, también se observa en el carril 6, que corresponde a la cepa M7 (control de transformación de plásmido vacío), una banda tenue cercana a los 35kDa.

Se conoce por literatura que una de las ventajas de utilizar a la levadura *P. pastoris* como sistema de expresión heteróloga es que posee un bajo nivel de secreción de proteínas endógenas, lo que simplifica los procesos de purificación de proteínas recombinantes (96). Sin embargo, en los análisis experimentales se observaron bandas inespecíficas que evidencian la presencia de proteínas endógenas en el sobrenadante de cultivo. De acuerdo con estudios proteómicos, podrían corresponder a proteasas, la mayoría de estas proteínas se encuentran en un rango de 10 a 70 kDa, siendo un contaminante recurrente

la proteasa extracelular de la familia de las subtilisinas (~37 kDa) (97,98). Este tamaño coincide con las bandas encontradas en los geles.

Este resultado podría reflejarse también en la baja intensidad de las bandas en el gel de proteínas, pese a que en la cuantificación queda en evidencia la expresión de proteínas secretadas y que los geles se cargaran con 2 µg cada una de las muestras, se esperaba una intensidad de la banda fuera similar al control de carga (BSA), sin embargo esto no sucede, lo que podría sugerir que gran parte de la proteína recombinante no se está secretando o se podría estar degradando ya que, aunque las proteasas endógenas se producen en bajas cantidades, nuestra proteína de interés también lo está, lo que hace a las proteasas un factor significativo. Una oportunidad de mejora podría ser revelar con plata, cuya sensibilidad es mayor respecto al azul de coomassie (99,100) y podría proporcionarnos mayor detalle de las proteínas presentes en el sobrenadante, o el uso de cepas deficientes de subtilisinas (87).

La presencia de diferentes patrones de glicosilación o la hipermanosilación también podría verse reflejada en los geles SDS-PAGE como bandas difusas o “*smears*”, con un peso molecular aparente mayor al teórico de la proteína (101). Un resultado así indicaría que la homogeneidad de la rProt está comprometida por la maquinaria de glicosilación del huésped. Por lo tanto, aunque *Pichia* es una plataforma robusta, el éxito final y la funcionalidad de la proteína dependen de la calidad de esta modificación postraduccional. Esto subraya la necesidad de implementar estrategias de ingeniería metabólica, como *Pichia GlycoSwitch* (41), para obtener un perfil de N-glicanos complejo que asegure la funcionalidad terapéutica y la homogeneidad molecular de las proteínas secretadas, que se esperaría ver como bandas más definidas en el gel.

Este postulado podría descartarse mediante la aplicación de inmunoensayos como Elisa o Western Blot aprovechando la cola de histidina (6xHis) presentes en el vector (102,103). Como la cuantificación fue realizada con las proteínas totales del sobrenadante de cultivo, la presencia de proteasas puede estar sobrestimando las lecturas por lo que se optó por purificar mediante cromatografía de afinidad los sobrenadantes (Figura 20 y 21). Aquí podemos observar que hay presencia de proteínas en todas las fracciones, indicativo de la

heterogeneidad de las proteínas que pudimos obtener de los sobrenadantes de cultivo de las cepas transformantes estudiadas.

Se observa una fuerte presencia de proteínas en la fracción que no se une a la resina de níquel-NTA (F0) donde deberíamos encontrar la mayor parte de los productos proteicos que carecen de la cola de 6xHIS. A su vez deberíamos encontrar proteínas que tuvieron una leve afinidad en las fracciones W1 y W2, finalmente podremos encontrar nuestras proteínas de interés en las fracciones F1 y F2, donde el imidazol presente en el buffer compite con la proteína para unirse a la resina consiguiendo liberar nuestra proteína de interés, sin embargo no se logran observar diferencias significativas respecto al control, por lo que se sugiere realizar una electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) para corroborar el porcentaje de la proteína de interés en contraste con las proteasas que se podrían estar produciendo.

Parte central de la presente propuesta era que el prodominio podría influir en la baja expresión de proteínas de interés, ligada a la activación de las vías de UPR o de ERAD. El primer punto que llama fuertemente la atención es que, si se analiza de forma global, las cepas que se seleccionaron que poseen una inserción única del gen, no inducen la activación de los principales marcadores moleculares de estrés de retículo (Figura 22, 23, 24 y 25), a diferencia de aquellas que presentan múltiples copias del gen (M3MC y M6MC), que aumentan la expresión de genes cruciales, principalmente de UPR. Si vemos la Figura 22, podemos observar las distintas variantes generadas para la expresión de BMP2, (M1, M2, M3 y M3MC) no presentan diferencias en los marcadores moleculares HAC1; KAR2 y ERO1, respecto al control de plásmido vacío, sin embargo podemos observar que la cepa multicopia (M3MC) presenta un aumento significativo en la expresión de PDI.

Como lo señalan diversos autores, la inserción de múltiples copias del gen sobrepasa el sistema de plegamiento del retículo y en este se comienzan a acumular intermediarios mal plegados, generando un cuello de botella. En este caso, BMP2 pese a que requiere pocos enlaces disulfuro estos son bastante específicos ya que requieren formar un nudo de

cisteína, este suele ser el paso crítico para su producción y esto se ve reflejado en el aumento de la expresión de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) como una respuesta celular dirigida (56,77).

Un efecto similar podemos observar en la Figura 24, donde se aprecian las variantes de tPA (M4-M5-M6-M6MC), donde al igual que BMP2, las variantes de procesamiento del prodominio a las 48 horas de inducción con metanol no generan la sobreexpresión de HAC1, KAR2 o ERO1, sin embargo, la cepa multicopia (M6MC) sobreexpresa PDI lo que indica que el cuello de botella dentro del retículo se está dando principalmente a nivel de formación de puentes disulfuro, lo que podría esperarse ya que tPA requiere la formación de 17 puentes disulfuro para su forma activa (65,68).

Aunque no es significativo podemos ver también que ambas cepas “multicopia” generan un aumento en HAC1 (1,5-1,8 veces de cambio), este factor de transcripción funciona como la principal respuesta a la sobrecarga en el retículo, confirmando que se está formando un cuello de botella (73,104).

Llama la atención que el marcador molecular KAR2 no se vea sobre expresado. La falta de sobreexpresión de KAR2 (una chaperona general que se une a polipéptidos desplegados) es muy interesante. Si el problema fuera una saturación global de la capacidad de plegamiento del RE, esperaríamos ver un aumento de todas las chaperonas, incluyendo KAR2. Su ausencia sugiere que, a pesar de la activación de la UPR, el estrés no es por la presencia masiva de proteínas completamente mal plegadas, sino por la acumulación de intermediarios de plegamiento defectuosos específicamente en el paso de formación de los puentes disulfuro.

Por otra parte, es importante observar que en la cepa control que genera la proteína CalB (365) se ve aumentada la expresión de HAC1 y PDI, sin embargo, en este caso no sabemos cuántas copias del gen posee, pero sí podemos observar que hay una mayor cantidad de proteínas (Figuras 14 y 18) demostrando que se está sobre produciendo pero que a su vez está induciendo la vía UPR.

Es llamativo también que el gen ERO1 a tiempo 0 (T0) se vea subexpresado para la

generación de tPA respecto al control, en las tres variantes de tPA. En primer lugar, esto deja en evidencia que la subexpresión no está ligada a la presencia del prodominio sino a la formación de la proteína recombinante en general, y por otra parte, nos indica un cuello de botella, donde la subexpresión de *ERO1* significa que la levadura está produciendo menos de la enzima clave para generar los puentes disulfuro, ya que *ERO1* codifica una oxidorreductasa Ero1p, enzima que genera el poder oxidante necesario para que PDI pueda formar nuevos enlaces disulfuro, lo que podría estar reflejado en el bajo título de proteínas (77,97,98).

Por otra parte, el mismo gen en las variantes de BMP2 poseen una expresión mayor respecto al control a tiempo 0, sin embargo, esta diferencia no es significativa, demostrando una vez más que las variaciones en los marcadores moleculares son independientes al grado de complejidad de la proteína en estudio.

Respecto a la vía de degradación del retículo endoplasmático (ERAD), llaman la atención principalmente dos resultados. El primero es la sobreexpresión de SEC61 en la cepa productora de BMP2 con corte inducido por Kex2p, la cepa M3. En la Figura 23 se puede observar que a tiempo 0, es decir sin inducción por metanol, existe una sobreexpresión de SEC61, esto podría indicar que la célula está respondiendo a una sobrecarga, no en el plegamiento, sino en la translocación de la proteína al retículo endoplasmático (105). Según diversos autores, este fenómeno se da en muchos sistemas de expresión, y es el primer punto que evidencia el estrés, ya que, si la proteína no puede entrar al RE, se acumula en el citoplasma, lo que puede llevar a la formación de agregados y al colapso de la producción (106).

En el caso de la producción de las variantes de tPA, llama la atención la sobreexpresión del gen HRD1 inducido por la cepa productora de tPA nativa (M4) sin inducción por metanol (T0). El gen HRD1 codifica para una ubiquitina ligasa (E3) que reside en la membrana del retículo endoplasmático (RE). Las ligasas E3 son las responsables de marcar las proteínas mal plegadas para su degradación (75,76,107). Esto puede estar señalando que la baja expresión de tPA podría estar ligada a la degradación por ubiquitinación de forma basal. Finalmente es importante destacar que no hay una activación significativa en ninguno de

los marcadores moleculares estudiados para la vía de ERAD por las variantes generadas en este estudio a las 48 horas post inducción con metanol.

En resumen, nuestros resultados indican que el estrés del retículo endoplasmático (RE) en cepas de *Pichia pastoris* que expresan tPA y BMP2 es una consecuencia directa de la cantidad de proteína secretada, no de la complejidad del pro-dominio.

En el caso de las cepas monocopia, la baja a moderada carga de expresión del gen no generó una respuesta UPR significativa. Este hallazgo sugiere que, a pesar de la complejidad de proteínas como tPA y BMP2, la maquinaria celular nativa es capaz de lidiar con el plegamiento de forma eficiente cuando la demanda es controlada.

A diferencia de esto, en las cepas multicopia, la alta carga de expresión del gen desencadenó una respuesta UPR robusta. Esta clara activación del mecanismo de adaptación celular evidencia que la sobreproducción masiva de la proteína satura los sistemas de translocación y plegamiento, confirmando que el cuello de botella es la capacidad de procesamiento del hospedero, y no un fallo intrínseco asociado a la presencia o diseño del pro-dominio.

De este modo, nuestros resultados destacan que, más que la complejidad intrínseca de BMP2 y tPA, es el número de copias lo que determina el grado de estrés celular en *P. pastoris*, lo cual tiene implicaciones directas para la estrategia de ingeniería en la producción de proteínas terapéuticas.

CONCLUSIONES

Este estudio se analizaron las limitaciones asociadas a la expresión y secreción de proteínas recombinantes complejas en *Pichia pastoris*, utilizando BMP2 y tPA como proteínas modelo. Mediante la generación y caracterización de cepas con distintas variantes del pro-dominio, se evaluó el impacto del diseño de la construcción génica, las diferencias respecto al número de copias, la carga sobre el plegamiento proteico y la activación del estrés del retículo endoplasmático (UPR y ERAD)..

Considerando los resultados planteados durante el desarrollo de este trabajo es posible concluir que se generaron exitosamente cepas de *Pichia pastoris* que integraron las distintas construcciones del pro-dominio para la expresión de las proteínas recombinantes BMP2 y tPA, permitiendo evaluar de manera controlada el efecto del pro-dominio y de la carga génica sobre la expresión y secreción de proteínas complejas. Además, vimos que las cepas transformantes, independientemente del tipo de pro-dominio o del número de copias integradas, no presentaron diferencias significativas en sus tasas de crecimiento, indicando que las modificaciones genéticas introducidas no comprometieron la viabilidad celular ni el metabolismo basal del hospedero.

Por otra parte, fue posible la caracterización de las cepas transformantes de *Pichia pastoris* para la expresión de BMP2 considerando el número de copias integradas, el crecimiento celular y la capacidad de expresión de las proteínas recombinantes. El análisis comparativo entre cepas monocopia y multicopia, portadoras de distintas variantes del pro-dominio, evidenció que las modificaciones introducidas no afectaron significativamente la cinética de crecimiento, permitiendo descartar efectos deletéreos sobre la fisiología basal del hospedero. Esta caracterización permitió evaluar de manera independiente el impacto del pro-dominio y de la carga génica sobre la expresión y secreción de proteínas recombinantes complejas. Sin embargo, se evidenció una baja recuperación de proteínas en el medio extracelular lo que se podría atribuir a proteasas extracelulares del hospedero lo que resalta la importancia de considerar factores post-

secreción en la evaluación del rendimiento productivo de proteínas complejas en *P. pastoris*.

Finalmente se determinó el efecto sobre el estrés de retículo de las variantes de las distintas variantes estudiadas, donde evidenciamos que la presencia o modificación del pro-dominio en cepas monocopia no indujo una activación significativa de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), sugiriendo que, bajo condiciones de carga de expresión baja a moderada, la maquinaria de plegamiento del retículo es capaz de manejar eficientemente proteínas recombinantes complejas como BMP2 y tPA. Este resultado se contrasta al observar exclusivamente las cepas multicopia donde se evidencia, una activación robusta de la UPR, lo que indica que el estrés de retículo está determinado principalmente por la carga génica y la sobreexpresión, más que por la complejidad estructural del pro-dominio.

Estos resultados sugieren refinar la hipótesis inicial, demostrando que el pro-dominio, si bien no es suficiente por sí solo para reducir el estrés de retículo bajo condiciones de alta carga de expresión, contribuye a un contexto celular compatible con un plegamiento adecuado cuando la expresión se mantiene dentro de los límites de la capacidad secretora del hospedero.

PROYECCIONES

Si bien la estrategia del prodominio se comportó adecuadamente en cepas monocopia, el desafío de la baja productividad y la degradación proteolítica persiste. Por lo tanto, futuras investigaciones deben enfocarse en soluciones experimentales directas: se podría optimizar el *host* mediante ingeniería genética para reducir la actividad de las proteasas extracelulares y aumentar la recuperación de la proteína íntegra, o bien, realizar ensayos de coexpresión de chaperonas en el Retículo Endoplásmico para asistir el plegamiento y aumentar la eficiencia de secreción.

Finalmente, la integración de herramientas de vanguardia como los sistemas de expresión *cell-free*, esta estrategia podría ofrecer un ambiente simplificado donde se pueden controlar directamente los componentes de plegamiento y minimizar la degradación, resolviendo el problema de la toxicidad celular y los cuellos de botella de la vía secretora. O la integración de herramientas de biología sintética y edición génica (como CRISPR) que abren la posibilidad de diseñar cepas a medida (*custom-made*), capaces de superar las limitaciones observadas, avanzando hacia una producción más eficiente, escalable y con mayor rendimiento de biomoléculas de interés terapéutico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Manning MC, Patel K, Borchardt RT. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharmaceutical research* [Internet]. 1989 Nov;6(11):903–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2687836>
2. Basso A, Serban S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis* [Internet]. 2019;479(August):110607. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
3. Kulagina N, Besseau S, Godon C, Goldman GH, Papon N, Courdavault V, et al. Yeasts as Biopharmaceutical Production Platforms. *Frontiers in Fungal Biology*. 2021;2(September):1–8.
4. Kinch MS. An overview of FDA-approved biologics medicines. *Drug Discovery Today* [Internet]. 2015;20(4):393–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.003>
5. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature Biotechnology*. 2018;36(12):1136–45.
6. Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today* [Internet]. 2010 Sep;15(17–18):773–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.009>
7. Pham P V. Medical biotechnology: Techniques and applications. *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*. 2018;1:449–69.
8. Shpilberg O, Jackisch C. Subcutaneous administration of rituximab (MabThera) and trastuzumab (Herceptin) using hyaluronidase. *British Journal of Cancer* 2013 109:6 [Internet]. 2013 Sep 3 [cited 2025 Sep 1];109(6):1556–61. Available from: <https://www.nature.com/articles/bjc2013371>
9. Kim ES, Kang B. Infliximab vs adalimumab: Points to consider when selecting anti-tumor necrosis factor agents in pediatric patients with Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2023 [cited 2025 Sep 1];29(18):2784. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10237103/>
10. Davis JC, Van Der Heijde D, Braun J, Dougados M, Cush J, Clegg DO, et al. Recombinant human tumor necrosis factor receptor (etanercept) for treating

ankylosing spondylitis: A randomized, controlled trial. *Arthritis & Rheumatism* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2025 Sep 1];48(11):3230–6. Available from: [/doi/pdf/10.1002/art.11325](https://doi/pdf/10.1002/art.11325)

11. Morfini M, Coppola A, Franchini M, Minno G Di. Clinical use of factor VIII and factor IX concentrates. *Blood Transfusion* [Internet]. 2013 [cited 2025 Sep 1];11(Suppl 4):s55. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3853992/>
12. Neumann TA, Foote MA. The Safety Profile of Filgrastim and Pegfilgrastim. Twenty Years of G-CSF [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2025 Sep 1];395. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7122905/>
13. Schaible P. Modifying enzyme replacement therapy – A perspective. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2023;27(2):165–73.
14. Suzuki S, Annaka H, Konno S, Kumagai I, Asano R. Engineering the hinge region of human IgG1 Fc-fused bispecific antibodies to improve fragmentation resistance. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–10.
15. Yang J, Wang W, Chen Z, Lu S, Yang F, Bi Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature*. 2020;586(7830):572–7.
16. Puetz J, Wurm FM. Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes*. 2019;7(8):476.
17. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics* [Internet]. 2016;47:20–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
18. Corchero JL, Gasser B, Resina D, Smith W, Parrilli E, Vázquez F, et al. Unconventional microbial systems for the cost-efficient production of high-quality protein therapeutics. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2013;31(2):140–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.09.001>
19. Janvier S, De Spiegeleer B, Vanhee C, Deconinck E. Falsification of biotechnology drugs: current dangers and/or future disasters? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [Internet]. 2018;161:175–91. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.037>

20. Assenberg R, Wan PT, Geisse S, Mayr LM. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology* [Internet]. 2013 Jun;23(3):393–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2013.03.008>
21. Burnett MJB, Burnett AC. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*. 2020;2(2):121–32.
22. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2009;27(3):297–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
23. Drugmand JC, Schneider YJ, Agathos SN. Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2012;30(5):1140–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.014>
24. McKenzie EA, Abbott WM. Expression of recombinant proteins in insect and mammalian cells [Internet]. Vol. 147, *Methods*. Elsevier; 2018. p. 40–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.05.013>
25. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology* [Internet]. 2014 Oct 9;32(10):992–1000. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.3040>
26. Bhatwa A, Wang W, Hassan YI, Abraham N, Li XZ, Zhou T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9(February):1–18.
27. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero J, Vázquez E, Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories* [Internet]. 2009;8(1):17. Available from: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-8-17>
28. Adrio JL, Demain AL. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*. 2010;1(2):116–31.

29. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2012;30(5):1158–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>
30. Kim JY, Kim Y-G, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012 Feb;93(3):917–30.
31. Zeh N, Schmidt M, Schulz P, Fischer S. The new frontier in CHO cell line development: From random to targeted transgene integration technologies. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2024;75(February):108402. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108402>
32. Bandaranayake AD, Almo SC. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters* [Internet]. 2014 Jan 21;588(2):253–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15370834>
33. Krampe B, Al-Rubeai M. Cell death in mammalian cell culture: Molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology*. 2010;62(3):175–88.
34. Martínez JL, Liu L, Petranovic D, Nielsen J. Pharmaceutical protein production by yeast: Towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012;23(6):965–71.
35. Thompson N, Wakarchuk W. O-glycosylation and its role in therapeutic proteins. *Bioscience Reports*. 2022;42(10):1–14.
36. Krainer FW, Gmeiner C, Neutsch L, Windwarder M, Pletzenauer R, Herwig C, et al. Knockout of an endogenous mannosyltransferase increases the homogeneity of glycoproteins produced in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports*. 2013;3.
37. Kurtzman CP. Biotechnological strains of *Komagataella* (*Pichia*) *pastoris* are *Komagataella phaffii* as determined from multigene sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009;36(11):1435–8.
38. Thompson CA. FDA approves kallikrein inhibitor to treat hereditary angioedema. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2010;67(2):93.

39. Çelik E, Çalik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances*. 2012;30(5):1108–18.
40. Türkanoglu Özçelik A, Yılmaz S, Inan M. *Pichia pastoris* Promoters. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2019;1923:97–112.
41. Karbalaeei M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;
42. Juturu V, Wu JC. Heterologous Protein Expression in *Pichia pastoris*: Latest Research Progress and Applications. *ChemBioChem*. 2018;19(1):7–21.
43. Bhandari BK, Lim CS, Remus DM, Chen A, van Dolleweerd C, Gardner PP. Analysis of 11,430 recombinant protein production experiments reveals that protein yield is tunable by synonymous codon changes of translation initiation sites. *PLoS Computational Biology* [Internet]. 2021;17(10):1–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009461>
44. Chen J-P, Gong J-S, Su C, Li H, Xu Z-H, Shi J-S. Improving the soluble expression of difficult-to-express proteins in prokaryotic expression system via protein engineering and synthetic biology strategies. *Metabolic engineering*. 2023 Jul;78:99–114.
45. Kaneyoshi K, Kuroda K, Uchiyama K, Onitsuka M, Yamano-Adachi N, Koga Y, et al. Secretion analysis of intracellular “difficult-to-express” immunoglobulin G (IgG) in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Cytotechnology* [Internet]. 2019;71(1):305–16. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10616-018-0286-5>
46. Unzueta U, Vázquez F, Accardi G, Mendoza R, Toledo-Rubio V, Giuliani M, et al. Strategies for the production of difficult-to-express full-length eukaryotic proteins using microbial cell factories: production of human alpha-galactosidase A. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(14):5863–74.
47. Francis DM, Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*. 2010;(SUPPL. 61):1–29.
48. Kim K, Choe D, Lee DH, Cho BK. Engineering biology to construct microbial chassis

for the production of difficult-to-express proteins. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(3).

49. Rath T, Baker K, Dumont JA, Peters RT, Jiang H, Qiao S-W, et al. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Critical Reviews in Biotechnology* [Internet]. 2015 Apr 3;35(2):235–54. Available from: file:///C:/Users/Carla Carolina/Desktop/Artigos para acrescentar na qualificação/The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the.pdf
50. Kumar V, Barwal A, Sharma N, Mir DS, Kumar P, Kumar V. Therapeutic proteins: developments, progress, challenges, and future perspectives [Internet]. Vol. 14, 3 *Biotech*. Springer International Publishing; 2024. 1–32 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13205-024-03958-z>
51. Li ZM, Fan ZL, Wang XY, Wang TY. Factors Affecting the Expression of Recombinant Protein and Improvement Strategies in Chinese Hamster Ovary Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2022;10(July):1–12.
52. Alves CS, Dobrowsky TM. Heterologous Protein Production in CHO Cells. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2017;1603:1–23. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6972-2_1
http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6972-2_1
53. Hussain H, Fisher DI, Abbott WM, Roth RG, Dickson AJ. Use of a protein engineering strategy to overcome limitations in the production of “Difficult to Express” recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017;114(10):2348–59.
54. Falcetta P, Aragona M, Bertolotto A, Bianchi C, Campi F, Garofolo M, et al. Insulin discovery: A pivotal point in medical history. *Metabolism* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2025 Oct 1];127:154941. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026049521002419>
55. Byrne B. *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Current Opinion in Structural Biology* [Internet]. 2015;32:9–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2015.01.005>
56. Vanz AL, Lünsdorf H, Adnan A, Nimtz M, Gurramkonda C, Khanna N, et al.

- Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: Catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microbial Cell Factories*. 2012;11:1–11.
57. Idiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. Engineering of protein secretion in yeast: Strategies and impact on protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;86(2):403–17.
 58. Barone GD, Emmerstorfer-Augustin A, Biundo A, Pisano I, Coccetti P, Mapelli V, et al. Industrial Production of Proteins with *Pichia pastoris*—*Komagataella phaffii*. *Biomolecules* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 Aug 31];13(3):441. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10046876/>
 59. Freilich M, Patel C, Wei M, Shafer D, Schleier P, Hortschansky P, et al. Growth of new bone guided by implants in a murine calvarial model. *Bone*. 2008;43(4):781–8.
 60. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. *Cellular Signalling* [Internet]. 2011;23(4):609–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.003>
 61. Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK, Kaufman RJ. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in chinese hamster ovary cells. *Growth Factors* [Internet]. 1992 Jan 11;7(2):139–50. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08977199209046403>
 62. Huang Y, Zhen B, Lin Y, Cai Y, Lin Z, Deng C, et al. Expression of codon optimized human bone morphogenetic protein 4 in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2014;61(2):175–83.
 63. Gravanis I, Tsirka SE. Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2008;12(2):159–70.
 64. Rogers SD, Riemersma LB, Clements SD. Tissue Plasminogen Activator: An Evaluation of Clinical Efficacy in Acute Myocardial Infarction [Internet]. Vol. 7, *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 1987. p. 111–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.1875-9114.1987.tb04035.x>
 65. He Z, Lu R, Zhang T, Jiang L, Zhou M, Wu D, et al. A novel recombinant human

- plasminogen activator: Efficient expression and hereditary stability in transgenic goats and in vitro thrombolytic bioactivity in the milk of transgenic goats. *PLoS ONE*. 2018;13(8):1–16.
66. Chevilley A, Lesept F, Lenoir S, Ali C, Parcq J, Vivien D. Impacts of tissue-type plasminogen activator(tPA) on neuronal survival. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9(OCTOBER).
 67. Hébert M, Lesept F, Vivien D, Macrez R. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Revue Neurologique*. 2016;172(3):186–97.
 68. Saadatirad A, Sardari S, Kazemali M, Zarei N, Davami F, Barkhordari F, et al. Expression of a Novel Chimeric-Truncated tPA in *Pichia pastoris* with Improved Biochemical Properties. *Molecular Biotechnology*. 2014;56(12):1143–50.
 69. Kotzsch A, Keller S, Sebald W, Mueller TD. Structure analysis of the ligand-receptor complex of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and its high-affinity receptor BMPRII. 2015;2(March).
 70. Chen B, Liu W, Li Y, Ma B, Shang S, Tan Z. Impact of N-Linked Glycosylation on Therapeutic Proteins. *Molecules*. 2022;27(24):1–10.
 71. Gasser B, Prielhofer R, Marx H, Maurer M, Nocon J, Steiger M, et al. *Pichia Pastoris* : Protein Production Host and Model Organism for Biomedical Research. *Future Microbiology* [Internet]. 2013 Feb [cited 2021 Jun 8];8(2):191–208. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/fmb.12.133>
 72. Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(12):5301–17.
 73. Murasugi A. Secretory Expression of Human Protein in the Yeast *Pichia pastoris* by Controlled Fermentor Culture. *Recent Patents on Biotechnology*. 2010;4(2):153–66.
 74. Whyteside G, Alcocer MJC, Kumita JR, Dobson CM, Lazarou M, Pleass RJ, et al. Native-State stability determines the extent of degradation relative to secretion of protein variants from *Pichia pastoris*. *PLoS ONE*. 2011;6(7):1–10.
 75. Zahrl RJ, Mattanovich D, Gasser B. The impact of ERAD on recombinant protein

- secretion in *Pichia pastoris* (Syn *Komagataella* spp.). *Microbiology* (United Kingdom). 2018;164(4):453–63.
76. Wang X-D, Jiang T, Yu X-W, Xu Y. Effects of UPR and ERAD pathway on the prolyl endopeptidase production in *Pichia pastoris* by controlling of nitrogen source. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [Internet]. 2017 Jul 1;44(7):1053–63. Available from: <https://academic.oup.com/jimb/article/44/7/1053/5995763>
 77. Raschmanová H, Weninger A, Knejzlík Z, Melzoch K, Kovar K. Engineering of the unfolded protein response pathway in *Pichia pastoris*: enhancing production of secreted recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2021;105(11):4397–414.
 78. Tsai YC, Weissman AM. The Unfolded Protein Response, Degradation from the Endoplasmic Reticulum, and Cancer. *Genes & Cancer* [Internet]. 2010 [cited 2025 Sep 1];1(7):764. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3039444/>
 79. Delic M, Göngrich R, Mattanovich D, Gasser B. Engineering of protein folding and secretion - Strategies to overcome bottlenecks for efficient production of recombinant proteins. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2014;21(3):414–37.
 80. Damasceno LM, Huang CJ, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012;93(1):31–9.
 81. Weinacker D, Rabert C, Zepeda AB, Figueroa CA, Pessoa A, Farías JG. Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013;44(4):1043–8.
 82. Huang J, Wang Q, Bu W, Chen L, Yang Z, Zheng W, et al. Different construction strategies affected on the physiology of *Pichia pastoris* strains highly expressed lipase by transcriptional analysis of key genes. *Bioengineered*. 2019;10(1):150–61.
 83. Zheng Y, Wu G, Zhao J, Wang L, Sun P, Gu Z. RhBMP2/7 heterodimer: An osteoblastogenesis inducer of not higher potency but lower effective concentration

compared with rhBMP2 and rhBMP7 homodimers. *Tissue Engineering - Part A*. 2010;16(3):879–87.

84. Bretthauer RK, Castellino FJ. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 1999;30(3):193–200.
85. Bretthauer RK. Genetic engineering of *Pichia pastoris* to humanize N-glycosylation of proteins. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(11):459–62.
86. Laukens B, De Wachter C, Callewaert N. Engineering the *Pichia pastoris* N-Glycosylation Pathway Using the GlycoSwitch Technology. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2015;1321:103–22.
87. Zha J, Liu D, Ren J, Liu Z, Wu X. Advances in Metabolic Engineering of *Pichia pastoris* Strains as Powerful Cell Factories. *Journal of Fungi* 2023, Vol 9, Page 1027 [Internet]. 2023 Oct 19 [cited 2025 Sep 1];9(10):1027. Available from: <https://www.mdpi.com/2309-608X/9/10/1027/htm>
88. Bustos C, Quezada J, Veas R, Altamirano C, Braun-Galleani S, Fickers P, et al. Advances in Cell Engineering of the *Komagataella phaffii* Platform for Recombinant Protein Production. *Metabolites* [Internet]. 2022 Apr 14 [cited 2022 Oct 5];12(4):346. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/12/4/346>
89. Zhang C, Ma Y, Miao H, Tang X, Xu B, Wu Q, et al. Transcriptomic Analysis of *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) GS115 During Heterologous Protein Production Using a High-Cell-Density Fed-Batch Cultivation Strategy. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2020 Mar 20 [cited 2025 Aug 31];11:517786. Available from: www.frontiersin.org
90. Wang J, Wang X, Shi L, Qi F, Zhang P, Zhang Y, et al. Methanol-Independent Protein Expression by AOX1 Promoter with trans-Acting Elements Engineering and Glucose-Glycerol-Shift Induction in *Pichia pastoris*. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7(December 2016):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41850>
91. Baghban R, Farajnia S, Rajabibazl M, Ghasemi Y, Mafi AA, Hoseinpoor R, et al. Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances. *Molecular Biotechnology*

- [Internet]. 2019;61(5):365–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-019-00164-8>
92. Schwarzthans JP, Luttermann T, Geier M, Kalinowski J, Friehs K. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2017;35(6):681–710. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.009>
 93. Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*. 2004 Jan;36(1):152–4.
 94. Yu XW, Sun WH, Wang YZ, Xu Y. Identification of novel factors enhancing recombinant protein production in multi-copy *Komagataella phaffii* based on transcriptomic analysis of overexpression effects. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16577-x>
 95. Ramakrishnan K, Prattipati M, Samuel P, Sankaranarayanan M. Transcriptional control of gene expression in *Pichia pastoris* by manipulation of terminators. *Applied Microbiology and Biotechnology* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2025 Sep 1];104(18):7841–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32715362/>
 96. Tachioka M, Sugimoto N, Nakamura A, Sunagawa N, Ishida T. Biotechnology for Biofuels Development of simple random mutagenesis protocol for the protein expression system in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for Biofuels*. 2016;1–10.
 97. He H, Wu S, Mei M, Ning J, Li C, Ma L, et al. A Combinational Strategy for Effective Heterologous Production of Functional Human Lysozyme in *Pichia pastoris*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [Internet]. 2020 Mar 10;8. Available from: www.frontiersin.org
 98. Sallada ND, Harkins LE, Berger BW. Effect of gene copy number and chaperone coexpression on recombinant hydrophobin HFBI biosurfactant production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. 2019 Aug 16;116(8):2029–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.26982>
 99. Brunelle JL, Green R. Coomassie Blue Staining. *Methods in Enzymology* [Internet].

- 2014 Jan 1 [cited 2025 Aug 30];541:161–7. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124201194000136>
100. Kavran JM, Leahy DJ. Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel. *Methods in Enzymology* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2025 Aug 30];541:169–76. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124201194000148>
 101. Yang Z, Zhang Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2018;36(1):182–95. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.11.002>
 102. Kreisig T, Prasse AA, Zscharnack K, Volke D, Zuchner T. His-tag protein monitoring by a fast mix-and-measure immunoassay. 2014;1–5.
 103. Debeljak N, Feldman L, Davis KL, Komel R, Sytkowski AJ. Variability in the immunodetection of His-tagged recombinant proteins. *Analytical biochemistry*. 2006 Dec;359(2):216–23.
 104. Schwarzhans JP, Luttermann T, Geier M, Kalinowski J, Friehs K. Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Advances* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2025 Sep 1];35(6):681–710. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28760369/>
 105. Zimmermann R, Blatch GL. A novel twist to protein secretion in eukaryotes. *Trends in Parasitology* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2025 Sep 1];25(4):147–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471492209000439>
 106. Dudek J, Pfeffer S, Lee PH, Jung M, Cavalié A, Helms V, et al. Protein Transport into the Human Endoplasmic Reticulum. *Journal of Molecular Biology* [Internet]. 2015 Mar 27 [cited 2025 Sep 1];427(6):1159–75. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283614003040>
 107. Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, Dragosits M, Rodríguez-Carmona E, Baumann K, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. *Microbial Cell Factories*. 2008;7:1–18.

ANEXOS

Tablas suplementarias:

TablaS1: Secuencias de proteínas originales y posterior a la optimización de codones.

Nombre	Secuencia proteína	Secuencia optimización de codones
BMP2	MQAKHKQRKRLKSSCKRHP LYVDFSDVGWNDWIVAPP YHAFYCHGECFPPLADHLNS TNHAIVQTLVNSVNSKIPKAC CVPTELSAISMLYLDENEKVV LKNYQDMVVEGCGCR	ATGCAAGCAAAACATAAGCAAAGAAAGCGACTCAAATCGTCATGCAAAACGTACCCGTTGTA TGTCGACTTCAGTGATGTGGGGTGGGAATGACTGGATTGTTGCGCCACCAGGGTACCACGCTT TCTATTGCCATGGCGAGTGTCGGTTTCTTTAGCTGATCACCTGAATAGCACTAACCATGCCAT CGTCCAGACGCTAGTCAATTGCGTAAACTCTAAGATCCCCAAGGCGTGTGCGTACCCACCGA ACTTTCTGCAATATCCATGTTGTACCTAGACGAAACGAAAAAGTTGTGCTTAAAAATTACCA GGATATGGTGGTAGAGGGATGCGGTTGTCGG
Pro-BMP2m	MGAAGLVPELGRRKFAAASS GRPSSQPSDEVSEFELRLLS MFGLKQRPTPSRDAVVPY MLDLYRRHSGQPGSPAPDH RLERAASRANTVRSFHHEESL EELPETSQKTRRRFFNLSSIP TEEFITSAELQVRFREQMQDA LGNNSSFHHRINIYEIIPATA NSKFPVTRLLDTRLVNQNAS RWESFDVTPAVMRWTAQG HANHGFVVEVAHLEEKQGV SKRHVRISRLHQDEHSWSQ IRPLLVTFGHDGKGHPLHKKR EKRAQAKHKQRKRLKSSCKRH PLYVDFSDVGWNDWIVAPP GYHAFYCHGECFPPLADHLN STNHAIVQTLVNSVNSKIPKA CCVPTELSAISMLYLDENEKV VLKNYQDMVVEGCGCR	ATGGGGGCGAGCTGGGTGGTGCCGAATTGGGGCGACGAAAATTCGCCGCCGCTCTTCGG GTCGTCCTTCGAGTCAGCCGAGCGACGAAGTATTGAGTGAGTTGAATTACGCTCTTTGTCTA TGTTTGGCCTTAAGCAGCGTCTCTACTCCATCCAGAGACGCTGTGGTTCCCCCATACATGCTAG ACTTATACAGAAGACACTCAGGCCAGCCGGGGTACCAGCCCTGATCATAGACTGGAGAGG GCCGCTTCTCGTGCTAACACCGTTCGCTCTTCCACCACGAAGAGTCTTTAGAGGAACTCCG GAAACATCCGGAAAAACAACCTCGCGGTTTTTCTCAATCTCAGTTCGATCCCAACAGAGGAA TTTATAACGTCGCGGAACTTCAAGTGTTCGAGAACAGATGCAGGACGATTGGGAAATAA CTCATCTTCCACCATCGCATCAATATATACGAGATCATAAACCCGGCGACGGCAATAGCAA GTTCCCTGTTACCCGGCTATTAGATACTCGCTAGTCAACCAAAACGCATCGCGGTGGGAGTC GTTTGATGTCACCCCTGCAGTGATGAGGTGGACCGCTCAAGGCCATGCCAATCACGGTTTTGT TGTCGAAGTAGCGCATCTCGAAGAAAAGCAAGGTGTAAGTAAGCGACACGTACGCATTAGCC GGAGCCTTCATCAGGACGAGCATTCTTGTTACAGATTCTGTCATTACTAGTTACGTTGGAC ACGACGGTAAAGGCCACCCACTACATAAGAGGGAAAAAAGGCAAGCTAAGCATAAACCAACG AAAGCGCTCAAAAGTTGCTGTAAGAGACATCCTCTGTATGTAGACTTCTCAGATGTCGGATG GAACGATTGGATTGTTGCCCCCTGGCTATCACGCTTTCTACTGCCATGGTGAGTGCCCTTC CCCCTGGCAGACCCTGAATTCGACAAATCATGCAATAGTACAGACGCTGGTCAATTAGTA AACAGTAAATTCGAAAGGCGTGTGTGTTCCGACTGAGCTTTCTGCGATCAGCATGCTATAT CTCGATGAGAACGAGAAGGTGGTGTTAAAAAACTATCAAGATATGGTCGTCGAGGGGTGTG GATGTAGG
Pro-K-BMP2m	MGAAGLVPELGRRKFAAASS GRPSSQPSDEVSEFELRLLS MFGLKQRPTPSRDAVVPY MLDLYRRHSGQPGSPAPDH RLERAASRANTVRSFHHEESL EELPETSQKTRRRFFNLSSIP TEEFITSAELQVRFREQMQDA LGNNSSFHHRINIYEIIPATA NSKFPVTRLLDTRLVNQNAS RWESFDVTPAVMRWTAQG HANHGFVVEVAHLEEKQGV SKRHVRISRLHQDEHSWSQ IRPLLVTFGHDGKGHPLHKEK REAEQAKRRLKSSCKRHPLYV DFSDVGWNDWIVAPPYH AFYCHGECFPPLADHLNSTN HAIVQTLVNSVNSKIPKACCV PTELSAISMLYLDENEKVLK NYQDMVVEGCGCR	ATGGGAGCTGCGGGCTTGTTCCCTGAATTGGGAAGGCGAAAGTTTGACGACGCTGCTCTG GTCGACCAAGTTCACAGCCGAGTGATGAAGTACTCAGCGAATTCGAACTTCGCCTCTTGCTA TGTTGCGGTTAAAGCAACGTCAGCGCCGTCCAGGGACGCTGTAGTCCCGCCCTATATGTTAG ATCTATATCGTCGACACTCAGGCCAGCCGGTTTCGCGACACCTGATCATAGACTGGAGCGA GCGGCATCGAGAGCCAATACTGTACGGTCTTTTACCACGAGGAGTCATTGGAGGAATTACC TGAGACCTCGGGAAAAAATAACCCGCGTTTTTTTTTAATTTATCTTCCATCCCTACGGAGGAA TTCATAACATCTGCGGAACCTCAAGTATTCCGTGAACAGATGCAAGACGCTCTGGCAATAAT TCCAGTTTCCACCATCGAATTAACTTTACGAGATCATAAAGCCTGCCACAGCCAACAGCAAG TTTCCCGTCACGAGGCTACTCGACACCAGACTTGCAATCAGAACGCAAGTAGATGGGAATCC TTTGACGTTACACCCGAGTGATGAGGTGGACTGCCCAAGGACATGCCAATCACGGCTTTGTT GTTGAGGTGGCTCATTTGGAAGAAAAACAGGGAGTATCGAAACGCCACGTCCGCATATCTCG TTCATTACATCAAGACGAACACAGCTGGTCGCAAAATTAGGCCCTTCTCGTCACATTCGGCCAT GATGGTAAGGGTCAACCCCTCCATAAGGAGAAACGGGAGGCTGAAGCGCAACGGAAACGCC TCAAATCAAGTTGTAAGAGACATCCACTGTACGTCGACTTCTCAGATGTTGGGTGGAATGATT GGATCGTTGCCCAACGGGGTACCACGCGTTCTATTGCCACGGGGAGTGCCATTCCCGCTAG CTGATCATCTAAATTCACCAACCATGCAATCGTGCAGACTCTGGTGAACAGCGTGAACAGCA AGATTCAAAGGCGTGTGTGTACCTACGAGCTTCCGCCATAAGCATGTTATATCTAGATG AGAACGAAAAAGTTGTGCTGAAAAACTACCAGGACATGTTGTGGAGGTTGCGGGGTGTCG G

tPA	MSQEIHFRRGARSYQVIC RDEKTMIIYQQHQSWLRPV LRSNRVEYWCNSGRAQCH SVPVKSCSEPRCFNGGTCQQ ALYFSDVFCQCEPFGAGKCC EIDTRATCYEDQGISYRGW STAESGAECTNWNSSALAQ KPYSGRRPDAIRLGLGNHNY CRNPDRDSKPCWCVFKAGK YSSEFCSTPACSEGNSDCYFG NGSAYRGTHSLTESGASCLP WNSMILIGNVYTAQNPSAQ ALGLGKHNYCRNPDGDAKP WCHVLKNRRLTWEYCDVPS CSTCGLRQYSQPQFRIKGGFL ADIASHPWQAIAFAKHRRSP GERFLCGGILISSCWILSAHC FQERFPFHLLTVILGRTRYV PGEEEQKFVEKYIVHKEFDD DTYDNDIALQLKSDSSRCA QESSVVRTVCLPPADLQLPD WTECELSGYGKHEALSPFYSE RLKEAHVRLYPSRSCTSQHLL NRTVTDNMLCAGDTRSGGP QANLHDACQGDGSGPLVCL NDGRMTLVGIISWGLGCGQ KDVPGVYTKVTNYLDWIRD NMRP	ATGAGCCAGGAAATACATGCTCGTTTCCGTAGGGGTGCGCGTTCTTACCAGGTATATGTCGG GATGAAAAGACGCAATGATCTACCAACAGCATCAATCGTGTTGCGACCGGTTCTCCGTTCA AACAGAGTTGAGTATTGTTGGTGCAACTCGGGAAGAGCACAATGCCACTCTGTGCCCGTTAA GTCGTGACGCGAGCCAAGATGTTTCAATGGCGGCACTTGTCAACAAGCCCTTATTTCAGCGA CTTTGTATGTCAATGTCCAGAAGGCTTCGCTGGCAAATGTTGTGAGATCGATACACGCGCGAC ATGTTACGAAGATCAGGGAATCAGCTACAGGGGGACCTGGTCAACGGCGGAATCCGGTGCA GAGTGTACGAATTGGAATAGTTCTGCTTTGGCACAGAAACCTATTCCGGACGACGCGCTGA CGCCATTGCGACTGGGTTTAGGTAACCAACTATTGCCCAACCCGACCGTGACTCAAAACC ATGGTGCTACGTGTTCAAGGCCGTAATAATTCTCCGAATTTGACGACTCCCGTTGTTCT GAAGGGAACAGCGACTGCTACTTCGGGAACGGTTACGCTACCGAGGGACACATTCTCTAAC TGAGTCTGGCGGAGTTGCCCTTCTGGAACGATGATTCTTATAGGCAACGTGTATACGGC ACAAAATCCTTCGCTCAGGCATTGGGTCTAGGGAAACATAATTATTGCCGCAACCCGGACG GAGACGCTAAACCATGGTGTACGTGCTTAAAAATAGACGACTCACCTGGGAGTACTGCACG TCCCGTCATGTAGTACGTGTGGTCTAAGGCAGTATAGTCAACCCAGTTTCGGATTAAGGGG GGGCTATTTGCAGACATCGCGTCGACCCCTGCGCAGGCAGCCATATTCCGGAAGACCGGAG ATCCCCGGGAGAACGTTTTTTGTGCGGGGGCATTTTAAGCTCATGTTGGATATTGTCTGC GGCGCATTGTTTTCAGGAACGCTTCCACCTCACCATTGACCGTAATCTGGGTAGAACATA TCGGGTGCTCCCGGGCGAAGAGGAACAAAAGTTTGAAGTGAAAAATACATTGTACACAAG GAGTTTGATGACGATACATACGATAATGATATTGCCTACTACAAGTAAATCTGATAGTAGC CGGTGCGCCAGGAGTCTCGGTAGTCCGACTGTTGCTCGCTCCGCTCCGCTGCTACCAATTA CCGGACTGGACTGAATGCGAACTCTCCGGCTATGGAAGCATGAGGCACTGAGTCTTTCTAT TCCGAGCGCTTAAAGAGGCGCCACGTCGCTTATACCATCATCAGTTGCACGAGTCAGCAT CTCCTGAATAGGACTGTAACCGATAATATGCTCTGCGTGGTGACACAGGTGCGGAGGACC CCAGGCTAATTTACATGATGCGGTGCAAGGGGATAGTGAGGGCCCTCTCGTTTGCCTGAATG ACGGTCGAATGACCCTTGATAGGTATAATCAGCTGGGGGCTTGGCTGTGGACAGAAGGATGTG CCCGGGGTTTACACCAAGGTTACAATAATCTCGACTGGATTCTGTATAACATGCGGCCA
tPA-F	MSYQGNSDCYFGNGSAYRG THSLTESGASCLPWNSMILIG KVYTAQNPSAQALGLGKH YCRNPDGDAKPWCHVLKNR RLTWEYCDVPSCTCGLRQY SQPQFRIKGGFLADIASHPW QAIAFAKHRRSPGERFLCGGI LISSCWILSAHCFQERFPPH HLTIVILGRTRYRVVPGEEQKF EVEKYIVHKEFDDDTYDNDIA LLQLKSDSSRCAQESSVVRTV CLPPADLQLPDWTECELSGY GKHEALSPFYSERLKEAHVRL YPSRCTSQHLLNRTVTDNM LCAGDTRSGGPQANLHDAC QGDGSGPLVCLNDGRMTLV GIISWGLGCGQKDVPGVYTK VTNYLDWIRDNMRP	ATGAGTACCAGGGAAATAGCGATTGTTATTTCCGCAACGGTTCTGCTTACAGGGGGACCCA CAGTCTTACGGAGTCAGGCGCATCGTGCTGCCGTGGAACAGTATGATTCTTATCGGGAAGG TATATACTGCACAGAATCCTAGTGCTCAAGCTTTAGGCCCTCGGAAACATAACTACTGTCCGA ATCCGGATGGCGACGCCAAGCCATGGTGTACGTACTTAAAAATCGCCGATTGACGTGGGAG TACTGCGATGTTCTTCTATGTAGCACCTGTGGTTTGGCGCAGTATTCTCAGCCACAATTTCCGA TCAAGGGCGGTTTGTTCGCTGATATAGCATCGCATCCATGGCAGGCCGCTATCTTTGCCAAGC ATAGAAGATCCCCGGGGGAGCGTTTCTATGCGGTGGTATATTGATCTTTCGTGCTGGATAC TATCTGCCGCTCACTGTTTCCAGGAACGGTTTCCGCCACATCAATTAACAGTATAGGACG TACTTACAGAGTAGTACCTGGAGAAGAGGAGCAGAAGTTTGAAGTGAAAAATATATTGTGC ACAAAGAATTCGACGACGACAGTATGACAATGACATTGCTCTGCTTCAACTGAAATCTGATT CAAGTCGATGCGCACAAGAATCGTCCGTCGTACGCACCGTCTGCTTACCCCTGCGGACTTAC AACTCCCAGATTGGACCGAGTGTGAGCTATCCGGATACGGTAAACACGAAGCGCTTTACCCCT TTTATAGTGAGCGATTGAAGGAAGCGCAGTGCCTATATCTTCTTCTAGGTGT ACTTGCAGCATTTACTCAACAGGACAGTCACTGACAATATGCTATCGCCGGGATACAAG AAGCGGCGGCCCCAAGCAAACTCCACGACGCGTGTCAAGGGGACTCAGGTGGCCCCCTCG TTTGCCTAATGATGGGCGCATGACACTGGTTGGGATTATCTTGGGGGCTCGGTTGCGGTC AAAAGGATGTCCCCGGAGTCTATACAAAAGTTACGAACACTCGGATTGGATAAGGGATAAC ATGCGTCTCT
tPA-KF	MSQEIHFRRGAREKRAE ASYQGNSDCYFGNGSAYRG THSLTESGASCLPWNSMILIG NVYTAQNPSAQALGLGKH YCRNPDGDAKPWCHVLKNR RLTWEYCDVPSCTCGLRQY SQPQFRIKGGFLADIASHPW QAIAFAKHRRSPGERFLCGGI LISSCWILSAHCFQERFPPH HLTIVILGRTRYRVVPGEEQKF EVEKYIVHKEFDDDTYDNDIA LLQLKSDSSRCAQESSVVRTV CLPPADLQLPDWTECELSGY GKHEALSPFYSERLKEAHVRL YPSRCTSQHLLNRTVTDNM LCAGDTRSGGPQANLHDAC QGDGSGPLVCLNDGRMTLV GIISWGLGCGQKDVPGVYTK VTNYLDWIRDNMRP	ATGAGTCAAGAAATTCATGCTCGATTCCGGCGAGGCGGAGAGAGAAAAGGGAGGAGAG GCAAGCTATCAGGGCAATTCTGACTGCTACTTCGGTAATGGTTCTGCTTACCGAGGGACGCAC TCATTAACCGAATCGGGTGCTTCTTGTCTACCTGGAACCTAATGATCTTGATTGGGAACGTCT ACACTGCACAAAATCCGAGTGCAGGCCCTCGGACTAGGTAAAGCATAATTATTGTGCAAC CCGGATGGGGATGCTAAGCCATGGTGTGATGTAATAAAAAACCGTCTGCTAATACATGGGAGTA TTGCGACGTTCTTCTGTAGTACATGCGGACTTAGACAATACAGCCAGCCCCAATTTCCGATT AAAGGGGGCTTATTGCGCCGACATAGCCTCGCATCCTTGGCAGGCGCGATATTCCGCAACA CAGGCGCTCGCTGGCGAGCGTTTCTGTGTGGCGGAATTCTTATATCATCGTGTGATCTT ATCAGCGGCTCACTGTTTTCAAGAGCGGTTTCCGCCACATCACTAACCGTGATCCTCGGTAG AACATATCGGGTGGTTCCCGGGGAAGAAGAGCAAAAATTTGAGGTAGAAAAAGTATATCGTA CATAAGGAGTTTGACGACGACAGTACGATAATGATATAGCGCTTCTGCAGCTCAAGTCTGAC TCCTCCAGGTGCGCACAAGAATCCAGTGTGGTTGCTACAGTGTGCTTCCGCCAGCGGACTCT CAGCTCCCGGACTGGACGAGTGTGAAGTGTGCGGATACGGTAAACACGAAGCTTTATCTCC GTTCTACAGCGAACGACTCAAAGAAGCACAGTACGCTATATCCATCAAGTAGGTGCACTTC TCAACACCTCCTGAATAGAACCCTCACTGATAATATGTTGTGCGCAGGTGACACGCGTTCGG GGGCCCCAAGCCAATTGATGATGCTTGCCAGGGGGACAGCGGAGGCCCACTTGTCTGTC TGAACGACGACGACGATGACTTTGGTGGGAATCATAAGCTGGGGTTTAGGGTGTGGCCAGAA GGATGTCCTGGTGTCTACACCAAGGTTACAAACTATCTGGATTGGATTAGGGATAATATGCG GCCT

Tabla S2: Secuencias primer para verificación por PCR de los insertos.

Origen	Nombre primer	SECUENCIA
Plásmido (pPICZalpha)	Ps5- F	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
	Ps5-R	GGATGTCAGAATGCCATTTGC
	Bleo-F	ACGTGACCCTGTTTCATCAGC
	Bleo-R	CTCCTCGGCCACGAAGTG
<i>P.pastoris</i>	AOX1-F	GTGCCCAACTTGAAGTGAAGG
	AOX1-R	AGATCGTCAAATGGGGTGGT
	AOX2-F	GACTCCTGGACACCCTGAAA
	AOX2-R	CCTCTTGCAAACAAGCATCA

Figuras suplementarias

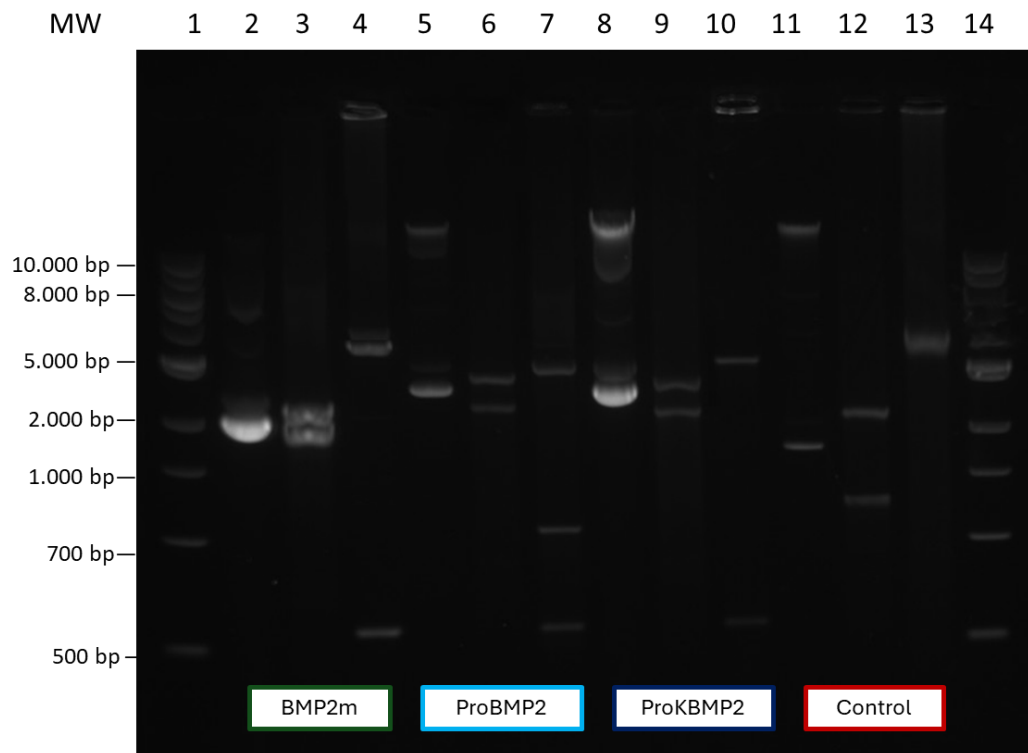


Figura S1: Validación de variantes de BMP2 con mapeo enzimático en muestras de extracción plásmidos. 1) 1kb ladder; 2) Plásmido pPic α -BMP2m sin corte; 3) Plásmido pPic α -BMP2m digerido con SacI/BamHI; 4) Plásmido pPic α -BMP2m digerido con BbsI; 5) Plásmido pPic α -proBMP2 sin corte; 6) Plásmido pPic α -proBMP2 digerido con SacI/BamHI; 7) Plásmido pPic α -proBMP2 digerido con BbsI; 8) Plásmido pPic α -proKBMP2 sin corte; 9) Plásmido pPic α -proKBMP2 digerido con SacI/BamHI; 10) Plásmido pPic α -proKBMP2 digerido con BbsI; 11) Control Plásmido pPic α vacío(-) sin corte; 12) Control Plásmido pPic α digerido con SacI/BamHI; 13) Plásmido pPic α digerido con BbsI(-); 14) 1Kb Ladder.

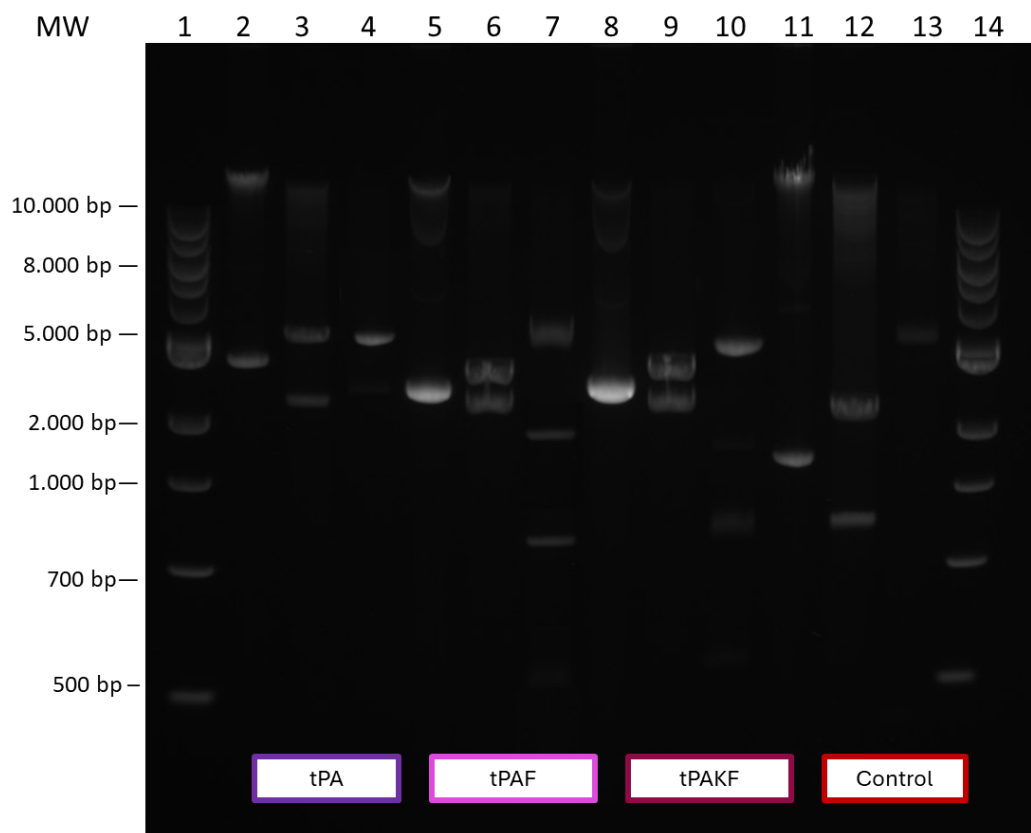


Figura S2: Validación de variantes de tPA con mapeo enzimático en muestras de extracción plásmidos. 1)1kb ladder; 2) Plásmido pPic α -tPA sin corte; 3) Plásmido pPic α -tPA digerido con SacI/BamHI; 4) Plásmido pPic α -tPA digerido con BswI/HindIII; 5) Plásmido pPic α -tPAF sin corte; 6) Plásmido pPic α -tPAF digerido con SacI/BamHI;7) Plásmido pPic α -tPAF digerido con BswI/HindIII; 8) Plásmido pPic α -tPAKF sin corte; 9) Plásmido pPic α -tPAKF digerido con SacI/BamHI;10) Plásmido pPic α -tPAKF digerido con BswI/HindIII;11) Control Plásmido pPic α vacío(-)sin corte; 12) Control Plásmido pPic α digerido con SacI/BamHI ; 13) Plásmido pPic α digerido con BswI/HindIII; 14) 1Kb Ladder.

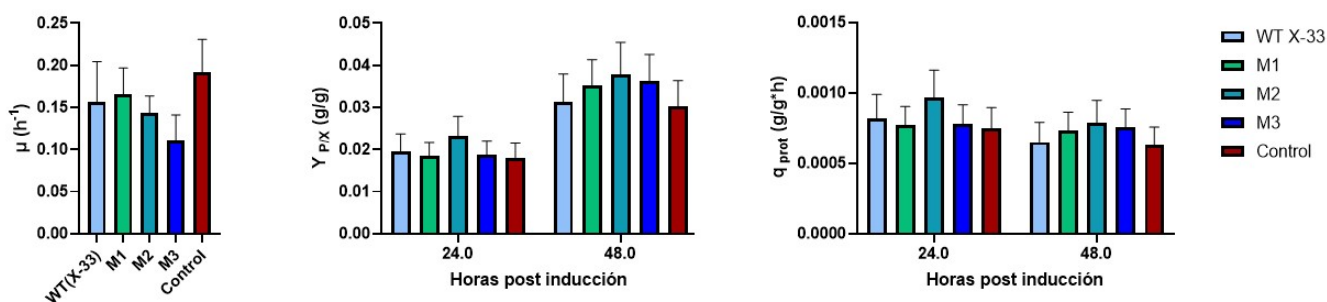


Figura S3: Parámetros cinéticos de cultivos de cepas transformadas para la producción de BMP2. A) Tasa específica de crecimiento celular; B) Rendimiento de producción de proteína por biomasa; C) Tasa específica de producción de proteínas. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías **** $p \leq 0,0001$.

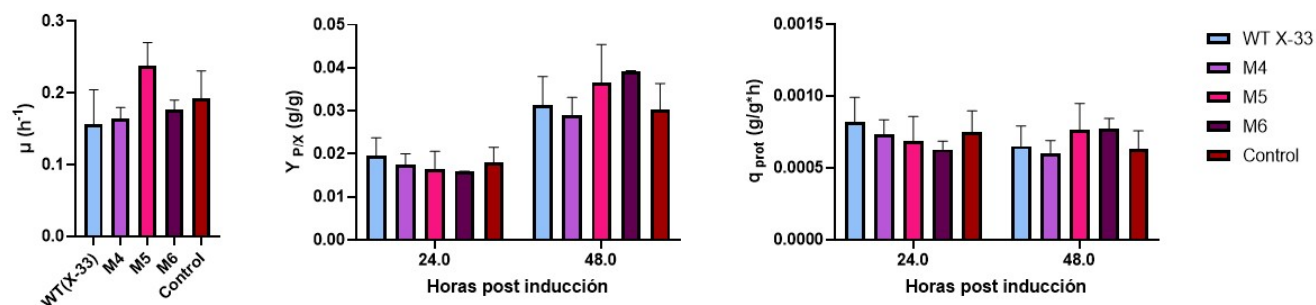


Figura S4: Parámetros cinéticos de cultivos de cepas transformadas para la producción de tPA. A) Tasa específica de crecimiento celular; B) Rendimiento de producción de proteína por biomasa; C) Tasa específica de producción de proteínas. Cada experimento fue realizado en triplicado, los datos fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test ANOVA, de dos vías **** $p \leq 0,0001$.

2.- Productividad

- Bustos C, Quezada J, **Veas R**, Altamirano C, Braun-Galleani S, Fickers P, Berrios J. (2022). Advances in Cell Engineering of the *Komagataella phaffii* Platform for Recombinant Protein Production. *Metabolites*. Apr 14;12(4):346. <https://doi.org/10.3390/metabo12040346>
- **Veas R**, Rojas-Pirela M, Castillo C, Olea-Azar C, Moncada M, Ulloa P, Rojas V, Kemmerling U. Microalgae extracts: Potential anti-Trypanosoma cruzi agents? *Biomed Pharmacother*. 2020 Jul;127:110178. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110178. Epub 2020 May 3. PMID: 32371317

3.- Participación en Congresos

- **Veas, Rhonda**, Quezada, Johan; Guerrero, Karlo; Altamirano, Claudia; Fickers, Parick; Osses, Nelson; and Berrios, Julio. Production of complex recombinant proteins in *Pichia pastoris*: presence of the pro-domain and its influence on reticulum stress, 37th International Specialised Symposium on Yeasts, ISSY37, Adelaide, Australia. Noviembre de 2023.
- **Veas, Rhonda**, Quezada, Johan; Guerrero, Karlo; Altamirano, Claudia; Fickers, Parick; Osses, Nelson; and Berrios, Julio. Production of complex recombinant proteins in *Pichia pastoris*: presence of the pro-domain and its influence on reticulum stress. IX Simposio latinoamericano de tecnología de cultivos celulares SLATCC Santa Fe, Argentina, octubre de 2022.
- Karlo Guerrero, Johan Quezada, **Rhonda Veas**, Claudia Altamirano, Patrick Fickers and Julio Berrios. Modification of the assimilative metabolism of *Pichia pastoris* for the improvement of tolerance to methanol and the productivity of recombinant protein. IX Simposio latinoamericano de tecnología de cultivos celulares SLATCC Santa Fe, Argentina, octubre de 2022.