



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

**ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE ANGIOSTATINA HUMANA
RECOMBINANTE EN CEPAS DE ESCHERICHIA COLI.**

Tesista: NIOSI, Luciano

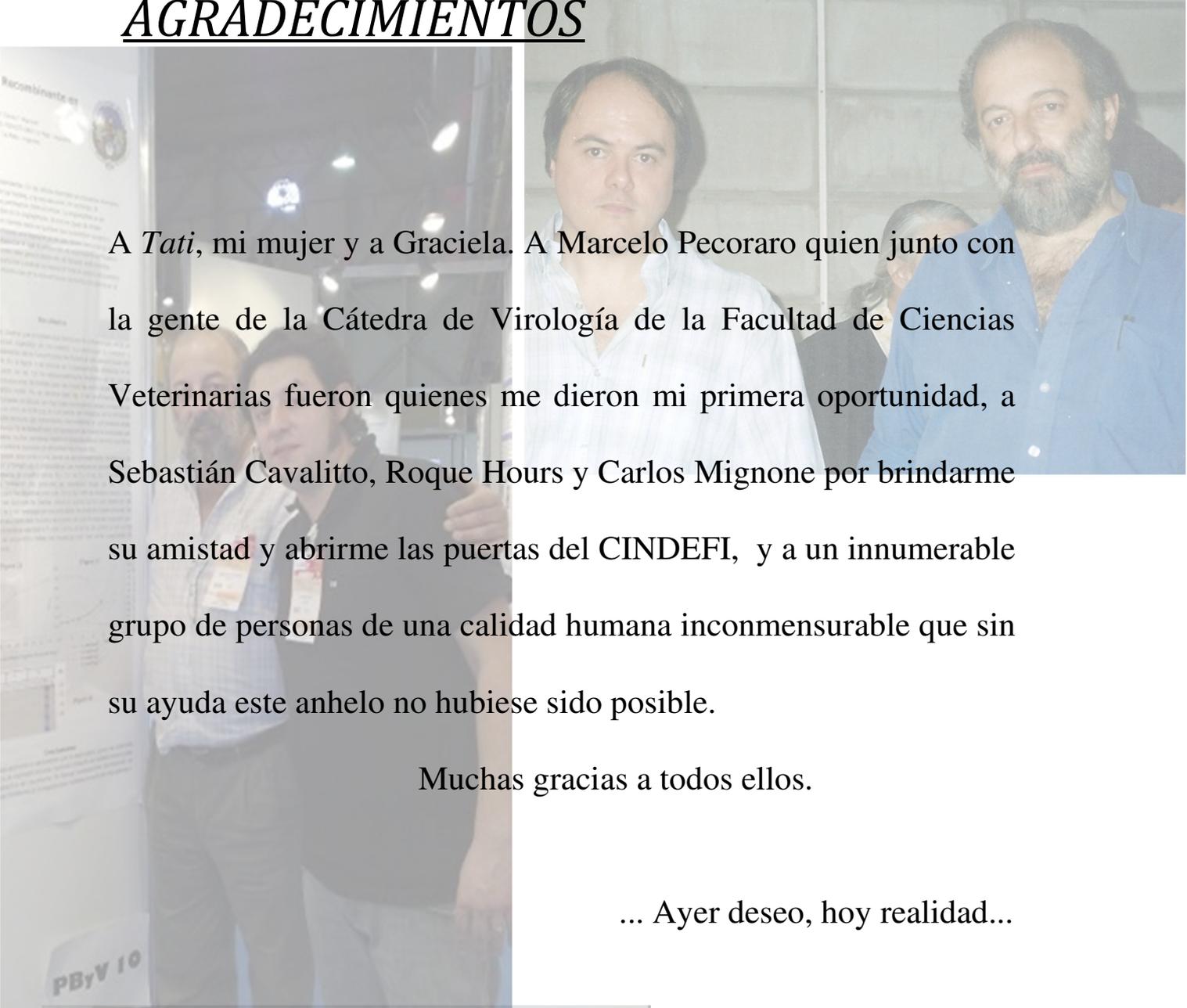
Director: Dr. Sebastián Cavalitto

Codirector: Ph.D. Marcelo R. Pecoraro

Año: 2022

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas fue realizado entre la Catedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP y el Centro de Investigaciones y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, con el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

AGRADECIMIENTOS

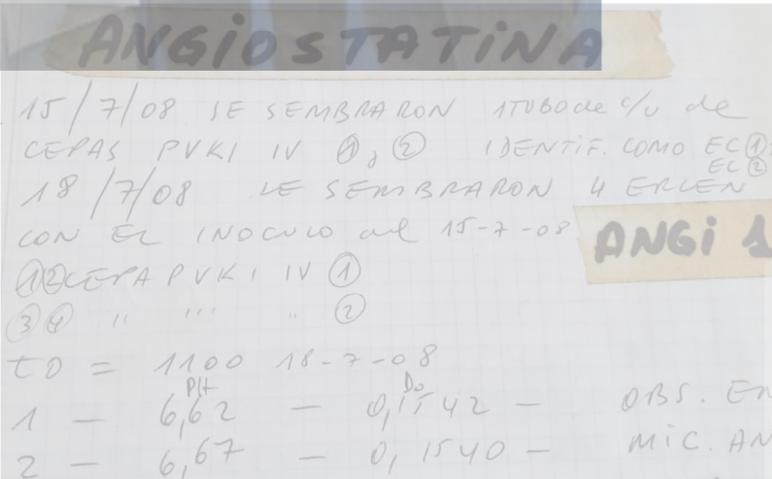


A *Tati*, mi mujer y a Graciela. A Marcelo Pecoraro quien junto con la gente de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias fueron quienes me dieron mi primera oportunidad, a Sebastián Cavalitto, Roque Hours y Carlos Mignone por brindarme su amistad y abrirme las puertas del CINDEFI, y a un innumerable grupo de personas de una calidad humana inconmensurable que sin su ayuda este anhelo no hubiese sido posible.

Muchas gracias a todos ellos.

... Ayer deseo, hoy realidad...

Luciano Niosi



ANGIOSTATINA

15/7/08 SE SEMBRARON 1706 de % de
CEPAS PVKI IV ①, ② IDENTIF. COMO EC ① y
18/7/08 SE SEMBRARON 4 ERLEN
CON EL INOCULO del 15-7-08
① CEPAS PVKI IV ①
③ ④ " " " " ②

TD =	1100	18-7-08		
1 -	6,62	-	0,1542	- OBS. EN
2 -	6,67	-	0,1540	- MIC. AN.

J. Chem. Tech. Biotechnol. 1984, 34B, 121-126

Measurement of Oxygen Transfer Coefficient under Growth Conditions by Dynamic Model Moment Analysis

Carlos F. Mignone and Rodolfo J. Ertola

Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales,
Facultad de Ciencias Exactas UNLP, 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina
(Manuscript received 7 January 1984 and accepted 20 January 1984)

Contenido

RESUMEN1

CAPITULO 1: INTRODUCCION4

4

5

8

10

24

26

1.6 Bibliografía48

CAPITULO 2:61

HIPOTESIS Y OBJETIVOS61

61

63

2.3 Bibliografía66

CAPITULO 3:67

MATERIALES Y METODOS67

67

71

82

91

106

CAPITULO 4:109

CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE CLONADO Y EXPRESIÓN109

109

112

116

131

4.5 Bibliografía132

134

134

135

148

153

5.3 Bibliografía212

218

218

218

219

CAPITULO 7:232

Discusión y Conclusiones232

232

240

241

7.4 Bibliografía 247

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

~	Aproximadamente
(p/v)	Relación peso/volumen
(v/v)	Relación volumen/volumen
Aa	Aminoácidos
Amp	Ampicilina
AOX	Promotor de la enzima alcohol oxidasa
ATP	Adenosín trifosfato
BA	Batch alimentado
BAE	Células endoteliales de arteria bovina
BC	Balance de carbono
BSA	Seroalbúmina bovina
CaA	Casa aminoácidos (Casein acid hydrolysate vitamin free. CAS Number: 91079-40-2)
CC	Cultivo Continuo
cDNA	DNA complementario
DB	Dot Blot
DBA	Diaminobencidina
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxiribonucleósidos-trifosfato
DOT	Porcentaje de oxígeno disuelto (%)
DO _{600/615}	Densidad óptica a 600 / 615 nm
ECL	Quimioluminiscencia mejorada
ECM	Matriz extracélular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Estado Estacionario
F	Flujo de medio de cultivo (ml/lh)
FAK	Actividad quinasa de adhesión focal
FCE	Fuente de Carbono y Energía
FN	Fuente de Nitrógeno
FTA	Factor tumoral de angiogénesis

g	Gramos
GTP	Guanosín trifosfato
g/L	Gramos por litro
HGF	Factor de crecimiento hepatocitario
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPLG	Plásminogeno humano
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
IB	Cuerpos de inclusión
IbpA/B	Proteínas de choque térmico de <i>Escherichia coli</i>
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
Kbp	kilo par de bases (1000 bp)
KDa	Kilodaltons
<i>k_la</i>	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
Lts	Litro
M	Concentración molar
mA	Miliampers
MCS	Sitio de Clonado Múltiple
mg	Miligramos
Min	Minutos
ml	Mililitros
M-LP	Medio de cultivo Low Phosphate
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinasas de matriz
MR	Medio de cultivo Riesenber
MOPS	Ácido 3 - morfolino - propano - 1 - sulfónico
M-XP	Medio de cultivo High Phosphate
MWCO	Corte de peso molecular
nm	Nanómetro
N_R	Concentración de Nitrógeno en el reservorio (mol/L)
nt	Nucleótidos
ORF	Marco de lectura abierto
ORI	Origen de replicación

P_i	Concentración en estado estacionario del producto i (en c-mol/L)
PAGE	Electrofóresis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
PBS	Buffer Fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
phoA	Región promotora del gen de la fosfatasa alcalina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
ppGpp	Guanosina tetrafosfato
psi	Libras por pulgada cuadrada
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RCO ₂	C-moles de dióxido de carbono (C-mol L ⁻¹ h ⁻¹)
RO ₂	Tasa volumétrica de consumo de oxígeno (mmol L ⁻¹ h ⁻¹)
RQ	Coefficiente respiratorio (mol CO ₂ mol ⁻¹ O ₂)
S_{EE}	Concentración de glucosa en estado estacionario (c-mol/L)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
seg	Segundos
s_p	Concentración de fosfato en estado estacionario (mM)
S_R	Concentración de Glucosa en el reservorio (g/L)
T	Tiempo de cultivo (h)
TAE	Tris/Acetato/EDTA
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletildiamina
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
Tris (Base)	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UFC	Unidades formadoras de colonias
u-PA	Activador del plasminógeno uroquinasa
V	Voltios
Vc	Volumen de cultivo (L)
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular

X	Biomasa; Peso de células secas (g L⁻¹)
\bar{x}	Concentración de biomasa a la salida del biorreactor
WB	Western Blot
WT	Wild type (cepa silvestre)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-tiogalactopiranosido
Y_{x/s}	Coefficiente de rendimiento para la biomasa debido al sustrato (g biomasa /g sustrato)
αKG	Ácido α-cetoglutarato
λ	Longitud de onda
μ	Velocidad específica de crecimiento (h⁻¹)
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micromolar

RESUMEN

L

a angiogénesis se define como el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros ya pre existentes. La angiostatina es una fracción del plasminógeno de 38 KDa, que ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* poseer la capacidad de disminuir el crecimiento tumoral y la diseminación metastásica. La importancia de la angiostatina radica en que se observó que era capaz de inhibir específicamente la proliferación endotelial y, de forma colateral, el crecimiento de los tumores [1].

Fue la primera proteína antiangiogénica endógena de origen natural descubierta bajo financiación de EntreMed (desde el 16 de junio de 2014 cambió su nombre a CASI Pharmaceuticals) en 1994 por los doctores Michael O' Reilly y Judah Folkman¹, investigadores del Hospital de Niños de Boston (EE.UU.). A la fecha, se han realizado una innumerable serie de estudios clínicos en vías de su empleo como biofármaco para el tratamiento de varias enfermedades como ser artritis reumatoidea, retinopatía diabética, glaucoma neovascular y el desarrollo de tumores.

Esta tesis se refiere a la investigación sobre la expresión de angiostatina humana recombinante en diferentes cepas de *Escherichia coli* como sistema modelo de estudio. Para tal fin fueron utilizados dos sistemas de expresión. En un caso, mediante la inducción con IPTG. El mismo se trata del sistema de expresión comercial pET22b / BL21 (DE3), y su elección radica en que es uno de los sistemas de más alta difusión y ha sido extensamente utilizado para la obtención de proteínas recombinantes a mediana o gran escala [2] [3].

En el otro sistema de expresión elegido para la producción de angiostatina, la inducción ocurre por una limitación nutricional. La inducción se lleva a cabo mediante la limitación del fosfato inorgánico en el medio de cultivo, a través del promotor de la fosfatasa alcalina de *E. coli* ubicado en el plásmido de expresión. Ambas construcciones poseen características bien diferenciadas, por un lado la última mencionada, es una inducción gradual en el tiempo, con lo cual la adaptación celular al proceso sería mayor que en el caso de inducción por IPTG.

¹ Judah Folkman (Cleveland, EUA 24 de febrero de 1933 - 14 de enero de 2008).

Con el fin de caracterizar ambos sistemas, se estudiaron parámetros como ser el crecimiento celular, la estabilidad, la pérdida y la amplificación del plásmido, la sobreproducción de proteína recombinante, el metabolismo celular, y algunas respuestas de estrés después de la inducción de la expresión en sistemas de cultivo continuo, cultivos en batch, tanto en erlenmeyers agitados como en biorreactor para pasar por último al sistema de batch alimentado limitado en fuente de carbono como en fosfato inorgánico.

Como se mencionó, serán evaluadas diferentes cepas de *E. coli* en diferentes tipos de medios cultivo. El motivo es que en experiencias llevadas a cabo previamente, se evidenciaron comportamientos muy diferenciales con respecto a la estabilidad del plásmido recombinante y muy fundamentalmente sobre la producción de metabolitos indeseados que afectan la estabilidad del sistema de expresión como es el ácido acético, y se ha demostrado que su acumulación ejerce un efecto adverso sobre la expresión de diversas proteínas recombinantes [4].

Otros parámetros intrínsecos de los microorganismos recombinantes serán estudiados como ser la evaluación de las velocidades máximas de crecimiento ($\mu_{máx}$), en algunos casos el coeficiente de mantenimiento celular (m_s) con el objetivo de observar el impacto y el costo energético para crecer a una velocidad específica de crecimiento deseada tal que no se evidencie la aparición de ácidos orgánicos [5]. Estos últimos trabajos se contrastaron con sus respectivas cepas silvestres, debido a que da una idea del estrés producido sobre el hospedador debido a la inducción de la expresión. Hay mucha bibliografía sobre los sistemas inducibles por IPTG [6] pero prácticamente nada respecto al sistema de inducción por medio del promotor de la fosfatasa alcalina.

Finalmente, podemos decir, en términos generales, que en la búsqueda de la optimización de la expresión de proteínas recombinantes, deben tenerse en cuenta características inherentes de los microorganismos hospedadores, como ser el problema técnico de la acumulación de acetato en el cultivo y la respuesta celular debida a la inducción. Estas últimas cuestiones se engloban en un concepto denominado *carga metabólica* donde generalmente se manifiesta consumo de sustrato no asociado al crecimiento. El interés estriba en redirigir los flujos metabólicos para incrementar productividad del proceso, y lograr la correcta expresión a altos niveles del gen clonado en el microorganismo huésped elegido [7].

Desde el año 2005 se creó una vinculación entre el CINDEFI (Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales) y el Departamento de Cirugía, Programa de

Biología Vascular Escuela de Medicina de Harvard y del Hospital de Niños de Boston, Massachusetts, (EE.UU), grupo de trabajo del doctor Folkman. Dicha institución apporto el material genético codificante para la angiostatina humana. A partir del mismo se planteó esta tesis donde se estudió la expresión de angiostatina como proteína modelo para estudiar la capacidad de producción de la misma expresada en *E. coli* recombinante inducible por IPTG y por la limitación de fosfato inorgánico en el medio de cultivo.

Bibliografía

[1] O' Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. 1994. *Cell*; 79: 315-328.

[2] Hoffman BJ, Broadwater JA, Johnson P, Harper J, Fox BG, Kenealy WR: Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3): process control yielding high levels of metal-incorporated, soluble protein. 1995. *Protein Expr. Purif*, 6: 646-654.

[3] Neubauer P, Hofmann K: Efficient use of lactose for the lac promoter-controlled overexpression of the main antigenic protein of the foot and mouth disease virus in *Escherichia coli* under fed-batch fermentation conditions. 1994. *FEMS Microbiol Rev*. 14: 99-102.

[4] L. Yee, H. W. Blanch: Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. 1993. *Biotechnology and Bioengineering*, 41 (8): 781-790.

[5] Stouthamer, A.H. and van Verseveld, H.W.: Microbial energetics should be considered in manipulating metabolism for biotechnological purposes. 1987. *TIBTECH* 5: 149-155.

[6] S.K. Bhattacharya, A. K. Dubey: Metabolic Burden as Reflected by Maintenance Coefficient of Recombinant *Escherichia coli* Overexpressing Target Gene. 1995. *Biotechnology Letters*, 17 (11): 1155-1160.

[7] Sauer U, Lasko D. R., Fiaux J., Hochuli M., Glaser R., Szyperski T., Wüthrich K., Bailey J. E.: Metabolic Flux Ratio Analysis of Genetic and Environmental Modulations of *Escherichia coli* Central Carbon Metabolism. 1999, *J. Bacteriol.*, 181(21): 6679–6688.

CAPITULO 1: INTRODUCCION

1.1 La problemática del Cáncer

El cáncer abarca un grupo de trastornos genéticos que conducen a la transformación de una célula normal con la consiguiente alteración de su comportamiento. Su desarrollo, se relaciona en primer lugar con la desregulación de la proliferación celular de las células tumorales, obviando los patrones de crecimiento establecidos en el ambiente circundante. En contraste con células normales, las cuales responden apropiadamente a las señales que controlan el crecimiento y la muerte celular por apoptosis, el cáncer es una patología que logra evadir tal control, permitiendo que una célula crezca y se reproduzca de manera descontrolada, invadiendo tejidos y órganos sanos, diseminándose eventualmente en el organismo.

El cáncer puede ser el resultado de la proliferación anormal de cualquiera de los distintos tipos celulares presentes en el organismo por ende, existen más de 100 tipos distintos de cáncer, que varían notablemente en cuanto a su desarrollo y respuesta al tratamiento. En medicina, se define *neoplasia* al término que se utiliza para designar a una masa anormal en un cierto tejido. Las mismas pueden catalogarse en dos grandes grupos: benignas y malignas. Las diferencias entre ambas residen en su distinto comportamiento biológico, en las benignas, las células se dividen lentamente, son parecidas a las normales, los tejidos mantienen su disposición normal y el tumor esta siempre restringido a la zona donde se inició la proliferación, presentando un límite neto con los tejidos que lo rodean. Por el contrario, en las neoplasias malignas las células se dividen rápidamente y son pobremente diferenciadas, remedando sólo vagamente a las células de los tejidos de origen. En este caso las células se infiltran e invaden los tejidos adyacentes y son capaces de dispersarse en el organismo a través del sistema circulatorio o linfático para formar focos secundarios de implantación o metástasis.

Generalmente la palabra cáncer se la asocia solamente a los tumores malignos y a su agresividad biológica como la habilidad de invadir y generar metástasis. Mientras que los tumores benignos pueden ser removidos quirúrgicamente en casi todos los casos, la

Capítulo 1

dispersión por el organismo de los tumores malignos hace que estos no siempre tengan resolución quirúrgica.

Basado en las últimas estadísticas sobre la incidencia del cáncer y sus tasas de mortalidad en todo el mundo, se pone de manifiesto que los casos de diversos tipos de cáncer están creciendo a un ritmo alarmante y subraya la necesidad de adoptar urgentemente estrategias eficaces de prevención para poner freno a la enfermedad.

En 2020 alcanzó a 19.3 millones de personas y se cobró diez millones de vidas en el mundo, convirtiéndose en la segunda causa de muerte, informó la Organización Mundial de la Salud (OMS), y advirtió que en las próximas décadas los nuevos casos aumentarían para llegar a ser casi un 50% más altos en 2040. No obstante en el avance de este mal, la agencia de la ONU recalcó que muchos tipos de cáncer tienen grandes probabilidades de curarse si se diagnostican y tratan oportuna y adecuadamente.

Actualmente una de cada cinco personas padece cáncer en algún momento de su vida, provocando la muerte de uno de cada ocho hombres y una de cada once mujeres diagnosticadas con algún tipo cáncer.

Con un 11.7% de los casos nuevos, el de seno es la manifestación más común del cáncer. Le siguen el cáncer de pulmón, el de colon y el de próstata.

Más del 60% de todos los casos del mundo se producen en África, Asia, América Central y América del Sur, y estas regiones registran aproximadamente el 70% de las defunciones por cáncer en el ámbito mundial, una situación que se agrava por la falta de mecanismos de detección precoz y de acceso a tratamientos².

Actualmente las estrategias terapéuticas están dirigidas a buscar tratamientos prolongados, ya que las nuevas tendencias apuntan a considerar al cáncer como enfermedad crónica, con la cual debe convivir el paciente. Mediante el uso de medicamentos no tóxicos dirigidos a blancos moleculares específicos, que gobiernan el comportamiento anómalo de las células cancerosas y una nueva generación de vacunas oncológicas, sería posible combatir focos residuales de la enfermedad. Estas nuevas terapias en conjunción con los métodos convencionales que han probado ser eficaces son las estrategias más prometedoras para el tratamiento del cáncer en los años venideros.

1.2 Naturaleza de la Angiogénesis Tumoral

² Fuente Organización Mundial de la Salud (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>)

Capítulo 1

La angiogénesis es el proceso por el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir otros preexistentes. El doctor Judah Folkman es hasta hoy considerado como el mayor experto y fundador del campo de la angiogénesis. Según James Watson, codescubridor de la estructura del DNA, dijo que "el Dr. Judah Folkman sería recordado como Darwin..." haciendo referencia a sus aportes en las investigaciones sobre el cáncer. Las ideas de Folkman relativas al papel de la angiogénesis en el crecimiento y diseminación de los tumores fueron propuestas hace 30 años [8]. Según la hipótesis de Folkman, las células tumorales se mantienen inicialmente en un estado avascular quiescente. Cuando se dispara la angiogénesis, los tumores crecen y se diseminan. El oxígeno y los nutrientes llegan a las células tumorales por difusión y en estas condiciones, las células tumorales y los vasos no pueden estar separados por una distancia superior a los 100 - 200 μm . Sin la formación de nuevos vasos los tumores no pueden crecer. Cuando las células tumorales adquieren el fenotipo angiogénico, segregan factores que desencadenan en la angiogénesis, permitiendo el crecimiento y la diseminación del tumor. De acuerdo con esta hipótesis planteada en su momento, el crecimiento de los tumores podría bloquearse inhibiendo la producción de los factores angiogénicos del tumor o bloqueando sus efectos biológicos. Una premisa esencial a partir de la cual resultaría posible la destrucción selectiva de los vasos postula que los vasos recién formados en los tumores son distintos de los vasos maduros de otros tejidos. Esta diferencia es la que permitiría la destrucción de los vasos tumorales sin dañar los vasos normales del organismo. Aunque la terapia antiangiogénica no consiguiera la erradicación completa del tumor, sería capaz de inducir la regresión tumoral hasta reducir la masa tumoral al tamaño inicial. Los tumores no siempre se desarrollan en territorios avasculares, sino al contrario, pueden formarse en tejidos muy irrigados, a pesar de lo cual permanecen en estado quiescente. Se ha demostrado recientemente que la razón de la quiescencia del tumor es la regresión de los vasos en el territorio del tumor [9-10]. Sólo cuando el tumor es capaz de contrarrestar la regresión vascular se produce el crecimiento y la diseminación de las células tumorales. Estas pueden expresar uno o varios de los factores reguladores positivos de angiogénesis. El crecimiento tumoral va siempre asociado a proliferación vascular sin la cual no es posible la multiplicación de las células neoplásicas.

La neovascularización inducida por el tumor se desencadena cuando las células tumorales liberan una sustancia que se denomina factor tumoral de angiogénesis (FTA),

Capítulo 1

el cual posee la capacidad de estimular el crecimiento de vasos sanguíneos en el tejido sano adyacente, para generar nuevos capilares que crecen hacia la incipiente y hasta entonces neoplasia avascular para proveerla de nutrientes, que incluye oxígeno, y remover los desechos celulares. Entre los factores endógenos ya identificados como angiogénicos se destaca el factor de crecimiento endotelial vascular (en inglés VEGF). Este es considerado hasta ahora el más importante en el control de la angiogénesis normal y patológica.

Debido a que el crecimiento de una masa neoplásica requiere de manera imprescindible el establecimiento de un lecho vascular que le permita a las células tumorales nutrirse, tener acceso al oxígeno y por el que pueda llevarse a cabo la remoción de sus productos de desecho, rápidamente se acontece un fenómeno de hipoxia donde rápidamente el desarrollo de un foco tumoral se incrementa debido a la alta tasa proliferativa de las células que lo componen. Las células tumorales no pueden crecer más de 100 μm de distancia a un vaso sanguíneo ya que la difusión de oxígeno se torna escasa y las células se vuelven hipóxicas. Bajo estas condiciones, los tumores pueden permanecer en estado latentes meses e incluso años hasta que una subpoblación adquiere la capacidad de inducir angiogénesis. En este estado se dice que el tumor tuvo un cambio angiogénico o “switch angiogénico” y el tumor entonces es capaz de expandir su tamaño y obtiene también una ruta de escape para diseminarse a otros órganos [11-12].

El “switch” puede ocurrir en diferentes etapas del desarrollo tumoral dependiendo del tipo tumoral que se trate y el ambiente que lo rodea, por ejemplo algunas lesiones pre malignas, muchas veces asociadas a diferentes tipos de cáncer oral, son capaces de inducir angiogénesis y este evento permite la progresión de la enfermedad.

El interés en la angiogénesis tumoral comenzó en 1968 [13] cuando se encontró que los tumores secretaban una sustancia que estimulaba la angiogénesis. Desde entonces varias líneas de investigación se han dedicado a la búsqueda y la investigación de nuevos factores angiogénicos tumorales con el propósito de entender más la biología tumoral y adentrarse en la búsqueda de nuevas terapias para combatir el cáncer [14-15].

Los vasos sanguíneos que induce el tumor, al igual que muchas de las características del propio tumor, escapan a los mecanismos fisiológicos normales. De esta manera, la vasculatura tumoral posee una arquitectura distintiva y anómala en estructura y función. Poseen una estructura y diámetro irregular, generalmente dilatados, con una morfología tortuosa, con grietas y propensos a la hemorragia, ya que tienen paredes débiles y permeables. Por otro lado, su estructura irregular no siempre termina conectada a otro

Capítulo 1

vaso y muchas veces no resultan funcionales [16]. Además, los vasos sanguíneos tumorales no se encuentran organizados en vénulas, arteriolas y capilares definidos como sucede en la vasculatura normal, sino que comparten características de todos los tipos. Esto es debido al constante estímulo de factores angiogénicos secretados por el tumor, induciendo un crecimiento sostenido de nuevos vasos.

El flujo sanguíneo en los vasos tumorales es generalmente irregular como resultado de la estructura caótica, desplazándose más lentamente que lo normal y a veces en forma oscilante; esto conduce frecuentemente a que los capilares sean disfuncionales [17]. Asimismo, los vasos sanguíneos tumorales sufren una constante remodelación y la permeabilidad vascular varía ampliamente en el interior del tumor. Estas redes vasculares fisiológicamente disfuncionales no aseguran un suministro regular de nutrientes. Además, el crecimiento rápido, una característica de los tumores malignos, también implica que el suministro de oxígeno y nutrientes puede escasear en los bordes menos vascularizados, ya que el tumor posee una demanda mucho mayor respecto del suministro provisto por la vasculatura. Tanto la vascularización anormal como el crecimiento tumoral generan áreas de hipoxia que, a su vez, estimulan una mayor formación de vasos.

El proceso neo-angiogénico tumoral no difiere en las características generales del proceso fisiológico. Sin embargo, la fuente de los inductores angiogénicos y la sobreestimulación por parte del tumor y el microambiente tumoral dan como resultado una vasculatura poco organizada y disfuncional como se describió previamente. La membrana basal y la matriz extracelular deben ser degradadas para permitir la migración de las células endoteliales. A medida que esto ocurre las células endoteliales forman una columna de migración, proliferan y se produce la diferenciación endotelial, donde las células cambian su forma y se adhieren unas a otras formando el lumen tubular. Las proteasas extracelulares están encargadas de la degradación de las proteínas de la matriz extracelular durante la progresión de la migración celular y la invasión.

En su momento se propusieron a las proteasas como blancos moleculares para el tratamiento del cáncer fue una idea atractiva en el comienzo, pero resultó poco efectivo debido a que las mismas son indispensables para el desarrollo y el normal funcionamiento orgánico por su multifuncionalidad.

1.3 Terapias basadas en la Angiogénesis Tumoral

Capítulo 1

En las últimas décadas, la obtención a partir de diversos organismos huésped de fármacos biotecnológicos con fines terapéuticos, los biofármacos, ha demostrado ser una herramienta de gran importancia para la industria farmacéutica en la búsqueda de nuevos medicamentos. En la actualidad los biofármacos constituyen una de las principales alternativas para el tratamiento de diversas enfermedades graves ya que muestran una serie de propiedades farmacológicas y farmacocinéticas ventajosas que los diferencian de los fármacos clásicos, generalmente de síntesis química.

Cada vez es más aceptada la idea de que una terapia antitumoral efectiva requiere la combinación de varios agentes que ataquen el problema mediante diferentes estrategias. Existe una extensa evidencia preclínica que indica que la acción combinada de agentes antiangiogénicos con agentes citotóxicos convencionales o terapia radiante resulta en un efecto antitumoral aditivo o incluso sinérgico [18 - 19]. Numerosos agentes antiangiogénicos se encuentran actualmente en evaluación clínica y muchos más son los que se encuentran en etapas avanzadas del desarrollo preclínico.

A la fecha, la línea más avanzada en los tratamientos antiangiogénicos, tiene como blanco molecular al VEGF. En particular, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el VEGF y pequeñas moléculas inhibidores de Tirosin Kinasa (TKI en inglés), que bloquean los receptores de VEGF son las estrategias que más han progresado en la clínica. El Bevacizumab es el primer anticuerpo monoclonal humanizado del mundo para la angiogénesis antitumoral que puede usarse para tratar el cáncer de colon y otros tumores sólidos. Su nombre comercial es AVASTIN®. Hasta junio de 2020, seis empresas han presentado solicitudes públicas de Bevacizumab. Por lo tanto, a medida que aparezcan más medicamentos biosimilares en el mercado, el precio del Bevacizumab probablemente volverá a bajar en el futuro, lo que abrirá aún más el mercado.

El Bevacizumab entre los numerosos anticuerpos anti-VEGF en desarrollo, es bien tolerado en pacientes con tumores sólidos y puede ser combinado en forma segura con otros fármacos [20 – 22].

En el cáncer colorectal, él bevacizumab se utiliza habitualmente en combinación con otros fármacos antitumorales como 5-fluorouracilo, ácido folínico, irinotecán y otros. Se ha demostrado su eficacia en cáncer de mama en estado metastásico en combinación con otro fármaco llamado Paclitaxel (Taxol®). En el tratamiento del cáncer de pulmón

Capítulo 1

no microcítico³, el Bevacizumab también se suele administrar junto a una quimioterapia con derivados del platino.

1.4 Inhibidores endógenos de la Angiogénesis

Numerosos son los ensayos preclínico que buscan encontrar en los antiangiogénicos endógenos el éxito en la terapia dirigida contra la angiogénesis tumoral [23-25]. La razón por la cual es muy atractivo el uso de agentes inhibidores de la angiogénesis de tipo endógenos es su baja toxicidad y la ausencia de respuesta inmunogénica. La ausencia de efectos colaterales o tóxicos es debida a que ejercen su acción específicamente sobre la vasculatura en activa proliferación y no en los vasos donde su estado es quiescente. Otra característica interesante de estos efectores antiangiogénicos se relaciona con que sus moléculas progenitoras son biológicamente inactivas hasta que son activadas en el *estroma tumoral* debido a proteasas celulares provocando la liberación de los fragmentos con capacidad antiangiogénica. Los cánceres no se componen únicamente de células cancerosas, sino que son "ecosistemas" complejos que comprenden muchos tipos de células diferentes y factores no celulares. El estroma tumoral es un componente crítico del micro ambiente tumoral, donde tiene un papel crucial en la iniciación, progresión y metástasis del tumor. Por otro lado, la mayoría de los antiangiogénicos suprimen la proliferación endotelial independientemente de los agentes estimuladores de la angiogénesis, por tanto, la combinación con otros agentes quimioterápicos clásicos ofrece la posibilidad de tener un efecto sinérgico sin el perjuicio de mayor toxicidad [26-27].

En resumen, la regulación de la angiogénesis es un mecanismo fundamental para el control de la progresión tumoral. A partir de los capilares, arterias y venas presentes en el tejido circundante se forman nuevos vasos en respuesta a factores de crecimiento solubles secretados por la masa tumoral. Este evento es primordial para que el tumor comience a crecer más allá de los límites impuestos por la difusión del oxígeno y los nutrientes.

Existen numerosos agentes inhibidores endógenos de la angiogénesis que contrabalancean y establecen un fino de balance con su contraparte proangiogénicas conduciendo a la homeóstasis vascular.

³ El cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés Small-cell lung cancer), también es llamado carcinoma microcítico de pulmón.

Capítulo 1

De todos los antiangiogénicos endógenos conocidos, la angiostatina y la endostatina son las sustancias más prometedoras para su aplicación en pacientes con cáncer. En la próxima sección repasaremos las características más destacadas de la endostatina y luego exclusivamente de la angiostatina.

1.4.1 Clasificación – Relación Estructura Función

En muchos casos los inhibidores endógenos son fragmentos de proteínas de la matriz extracelular/membrana basal o de proteínas implicadas en la coagulación. El primer inhibidor endógeno de la angiogénesis aislado asociado con una regulación negativa hacia el crecimiento tumoral, fue la trombospondina 1 (TSP1) que presenta actividad antiangiogénica, inhibiendo la proliferación y migración de células endoteliales por interacción con el receptor CD36 expresado en la superficie de estas células. [28]. Desde entonces, varios otros inhibidores endógenos han sido identificados, incluyendo angiostatina, endostatina, tumstatina (un fragmento de 28 kDa escindido del colágeno tipo IV), vasotenina, serpin-antitrombina entre otros [1] [29-35]. Con respecto a la antitrombina los pacientes que no tienen suficiente de esta proteína funcional poseen una incidencia más alta de desarrollar coágulos sanguíneos anormales. Curiosamente, varios inhibidores endógenos de la angiogénesis son fragmentos proteolíticos de precursores proteicos de mayor tamaño, como por ejemplo la angiostatina, originada del plasminógeno y la endostatina que deriva del colágeno de tipo XVIII. Estos procesamientos proteolíticos parecen jugar papeles claves de manera dual para el control de la angiogénesis de manera que cumplen roles claves como ser proteasas que son requeridas para la invasión y la migración de células, y de otros factores pro-angiogénicos que pueden ser liberados por proteasas desde la matriz extracelular [36-37].

De la mayoría de todos los inhibidores endógenos, la angiostatina y la endostatina han sido vistos como los más promisorios [38].

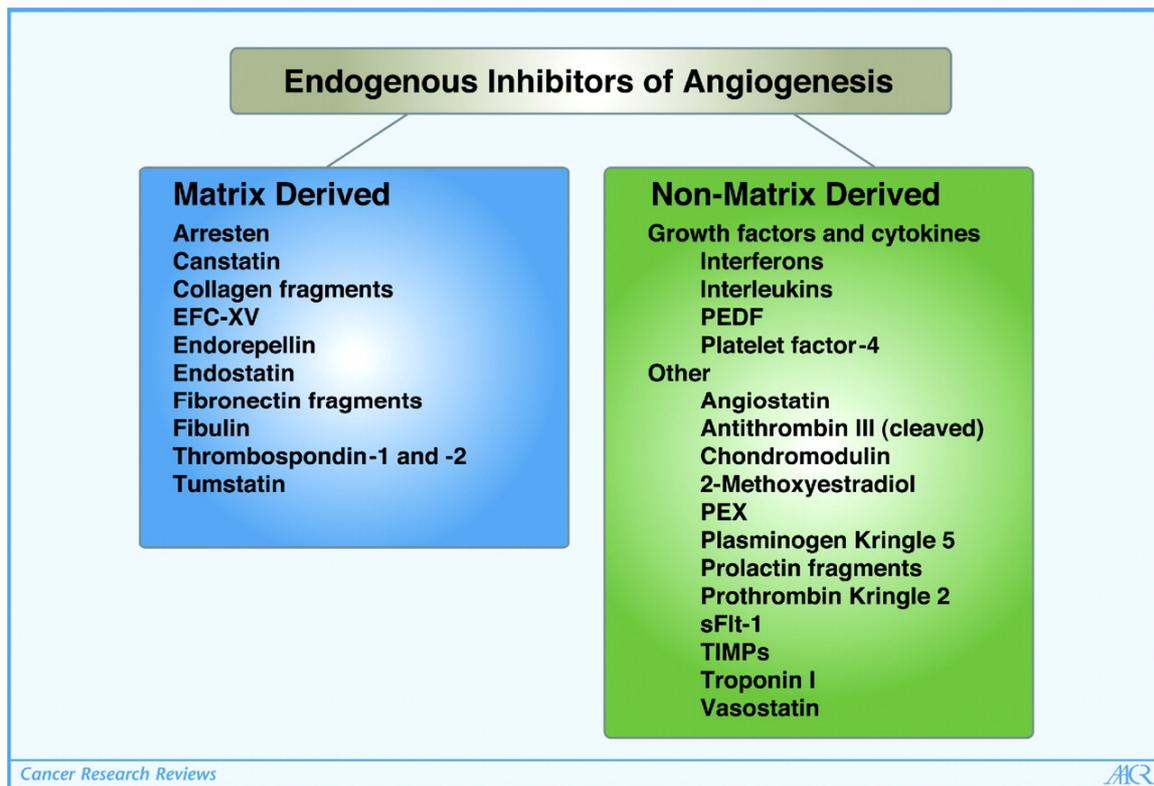


Figura 1 Los inhibidores endógenos de la angiogénesis. Tomado de [38]. Pia Nyberg y col. 2005

❖ **Endostatina**

Como se mencionó, dentro de los derivados de matriz, la endostatina es un fragmento de 20 KDa del extremo carboxilo terminal del colágeno de tipo XVIII, es uno de los agentes anti-angiogénicos más eficaces disponibles debido a que ha demostrado ser un potente inhibidor de amplio espectro. Se encontró por primera vez secretada en células de ratón a partir de una línea celular hemangioendotelioma y posteriormente se encontró en los seres humanos [39-40].

La endostatina ya ha sido utilizada para tratar la arteriosclerosis y también fue evaluado en ensayos clínicos contra el cáncer [41-42]. En un modelo de ratón xenogénico, mostró una inhibición de forma significativa en el número de vasos (95% al día 20); la capacidad de migración endotelial también fue afectada y se observó además una pobre maduración de los vasos formados, con escasos pericitos [43].

La endostatina recombinante fue inicialmente el inhibidor de la angiogénesis más estudiado en el contexto clínico. Los primeros ensayos de fase clínica fueron publicados entre 2002 y 2003 [44-45]. Sin embargo, los resultados fueron decepcionantes.

Capítulo 1

Posteriormente en 2005 dos informes indicaron que aunque los ensayos endostatina confirmaban la seguridad de la misma como un agente farmacológico, hasta esa fecha era difícil establecer la dosis biológicamente eficaz [46-47].

Múltiples receptores de la superficie celular y mecanismos de acción se han descrito para la endostatina. La endostatina recombinante humana (Endostar[®]) ha sido aprobada para su uso en ciertos tipos de cáncer de pulmón en China y se está experimentando en cáncer de mama, páncreas y colon [48]. Sin embargo, si bien se encuentra muy avanzada su utilización como biofármaco, su inestabilidad provoca una disminución en su eficacia en esos estudios debido a su pobre farmacocinética, la vida media en circulación resulto de ser 1-2 horas [49]. Se ha producido una endostatina humana recombinante conjugándola con el dominio Fc de IgG y expresando la quimera en cultivos celulares de mamíferos mejorando la estabilidad en el orden de 100 veces [50].

Recientemente [51] una nueva endostatina humana recombinante producida en *E. coli* desarrollada por Medgenn Co. Ltd., con la inclusión de nueve aminoácidos (MGGSHHHHH) en su extremo amino terminal resulto en aportarle una mayor estabilidad que le permitió duplicar los valores de potencia obtenidos inicialmente por Folkman en modelos animales en 2005 [52]. Para más información se puede ver una excelente revisión [53].

A pesar de extensos estudios de los efectos de Endostar[®] sobre estas enfermedades, su mecanismo molecular sigue siendo ambiguo. La investigaciones muestran que Endostar[®] restringe la angiogénesis inducida por VEGF mediante el bloqueo del mismo y la inducción de apoptosis a través de la activación de caspasa-3 y la disminución de Bcl-2 en células endoteliales de cordón umbilical humana (HUVECs) [54-55].

Los ensayos clínicos de fase III mostraron sobre 493 pacientes que, en combinación con vinorelbina y cisplatina (un régimen de quimioterapia estándar) la adición de Endostar[®] al régimen de quimioterapia estándar en estos pacientes con cáncer de pulmón avanzado resultó tener una mejora clínicamente significativa en la tasa de respuesta, respecto del régimen de quimioterapia solo.

Actualmente se está estudiando completamente en combinación con quimioterapia para el cáncer de mama avanzado. Los estudios han demostrado que Endostar[®] puede disminuir la expresión de MMP-2 y MMP-9 en las células TNBC, inhibir la fosforilación de ERK1/2 y prevenir significativamente la proliferación y migración de células de cáncer de mama [55^a].

Capítulo 1

❖ **Angiostatina**

Desde hace tiempo los investigadores se han concentrado en ciertos aspectos de la evidencia clínica, como ser que la masa tumoral primaria puede suprimir el crecimiento tumoral a distancia. Es sabido que la eliminación de ciertos tipos de tumores primarios puede ser seguida por el rápido crecimiento de metástasis distantes [56-57]. Algunos tumores primarios pueden inhibir su crecimiento, pero no el número de metástasis a distancia [58-59]. En su momento se propusieron algunas hipótesis explicar cómo ciertos tumores pueden inhibir sus metástasis, o cómo la masa tumoral primaria puede inhibir el crecimiento del tumor. Una de las hipótesis fue que el foco tumoral primario produce factores antimetastáticos que inhiben la proliferación de las células tumorales, dentro de una metástasis. Sin embargo, ninguna de estas ideas había proporcionado un mecanismo molecular para explicar cómo se suprime el crecimiento del tumor en masa del tumor [60].

En 1994 en el laboratorio de Folkman se planteó la hipótesis de que ciertos tumores primarios pueden “soltar” inhibidores de la angiogénesis en la circulación.

Los experimentos comenzaron con un modelo animal en el cual se desarrolló el carcinoma de pulmón de Lewis. Se cultivó por vía subcutánea. Después de que había llegado a 1-2 cm³, se extirparon quirúrgicamente. El número de metástasis pulmonares había aumentado 10 veces llegado al día 13, en comparación con controles en los que el tumor primario no se había eliminado [61]. Las metástasis pulmonares fueron altamente neovascularizadas. La purificación de la sangre y la orina por cromatografía de afinidad de heparina dio como resultado la aparición de un fragmento de 38 KDa que correspondía a una porción interna del plasminógeno, que contenía unas estructuras moleculares propuestas con el nombre de “*kringle*” dispuestas en cuatro formas simultáneas o sucesivas, abreviada comúnmente como *kringle* 1-4 (Fig. 2). Los miembros del laboratorio a esta estructura la bautizaron *angiostatina* [1]. Un “*kringle*” (*kringla* en sueco) es un tipo de galleta que se pliega formando tres anillos. Este término fue adoptado para describir la estructura de triple *loop* unida entre sí por los tres puentes disulfuro como los presentes en la molécula de pro trombina, un factor de coagulación dependiente de vitamina K, responsable de formar la enzima central de la coagulación, la trombina.

Capítulo 1

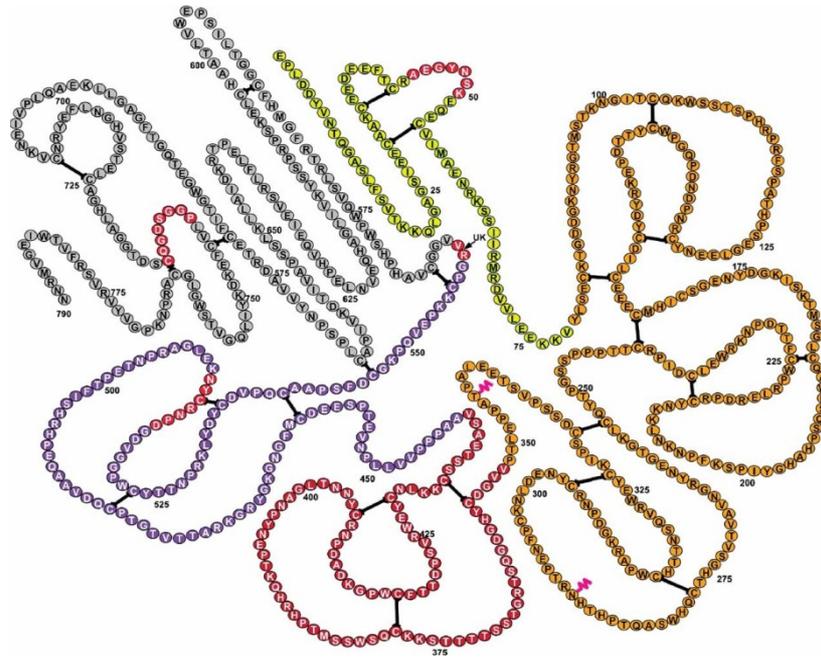


Figura 2: Estructura modular del plasminógeno y los fragmentos de angiostatina contenidos. Tomado de L. Wahl y col. [71].

La secuencia de aminoácidos del plasminógeno de longitud completa se representa como una cadena de letras, siguiendo el código de aminoácidos de 1 letra. Los enlaces disulfuro se muestran como barras negras que conectan pares distantes de residuos de cisteína. Los sitios de glicosilación están representados en el tercer dominio kringle mediante líneas onduladas rojas. El dominio catalítico de plasmina está representado en gris, kringle 5 en púrpura, kringle 4 en rojo y kringles 1-3 en naranja.

La figura 2 muestra también en forma esquemática, la secuencia de la angiostatina (kringles 1-5) a partir del aminoácido Val⁷⁸ (V), sus sitios de glicosilación, y la distribución de sus puentes disulfuro. La figura 3, representa el modelo de la galleta sueca “*Kringla*”.



Capítulo 1

Figura 3: Modelo de la galleta sueca “Kringla”. La palabra proviene del nórdico antiguo Kringla lo que significa anillo o círculo. Su origen se remonta a los monjes católicos romanos en el siglo XIII.

En células endoteliales la angiostatina purificada fue capaz de inhibir específicamente la proliferación *in-vitro*, la angiogénesis tumoral *in-vivo*, y la metástasis tumoral. Las células endoteliales tratadas con angiostatina en la ausencia de factores de crecimiento, aumentaron su índice apoptótico, sin cambiar su índice de proliferación [62]. Sin embargo, la angiostatina pudo inhibir la proliferación de células endoteliales estimulada por células de tipo bFGF, pero no inhibió la proliferación de fibroblastos, células epiteliales, células musculares lisas o células tumorales [1]. La migración endotelial y la formación de tubos también es inhibida por la angiostatina.

La administración sistémica de angiostatina purificada de orina de ratón inhibió significativamente la angiogénesis en metástasis de pulmón y restringió su crecimiento a un tamaño microscópico [1].

❖ **Diferentes formas de angiostatina**

Los tumores generan angiostatina por una escisión enzimática gradual del plasminógeno circulante. El plasminógeno, es el precursor inactivo de la plásmine, la enzima, que es el catalizador principal de degradación de la fibrina, proteína que desempeña un importante papel en el proceso de coagulación. El plasminógeno se sintetiza en el hígado y está presente en una amplia variedad de tejidos y fluidos corporales, incluyendo la saliva, secreciones de las glándulas lagrimales, fluido de la vesícula seminal, y las secreciones de la próstata [63]. El plasminógeno humano es una gran glicoproteína de cadena única de un peso molecular relativo de 88 KDa que contiene 2% de carbohidratos. Existen dos variantes de glicosilación principales para el plasminógeno y se encuentran en cantidades aproximadamente iguales en el plasma humano. El plasminógeno 1 está glicosilado en dos sitios, Asn²⁸⁹ y Thr³⁴⁶, mientras que el plasminógeno 2 está glicosilado sólo en Thr³⁴⁶.

Se han reportado diferencias funcionales entre ambas variedades [64]. Se ha identificado un sitio de glicosilación adicional en la Ser²⁴⁹ que contiene un trisacárido

Capítulo 1

[64]. La estructura primaria del plasminógeno contiene 791 aminoácidos segregados en una activación terminal de dominio del péptido NH₂ (residuos Glu¹-Lys⁷⁷), una región que contiene cinco kringles (K1-K5; residuos Lys⁷⁸-Arg⁵⁴¹), y un dominio catalítico (residuos Val⁵⁶²-Asn⁷⁹¹) [64].

Cada uno de los cinco dominios kringle, contienen tres enlaces disulfuro característicos [64], estos dominios, existen en una gran variedad de proteínas que pueden contener de uno a varios dominios. La secuencia aminoacídica de los dominios kringle está compuesta por 80 aminoácidos aproximadamente. Poseen además, seis cisteínas conservadas con las que se forman los puentes disulfuro, y los aminoácidos flanqueantes a las cisteínas también se encuentran altamente conservados. En presencia de activadores de plasminógeno, se escinde para formar plásmine [65]. La plásmine se reduce en presencia de fosfoglicerato quinasa [66] y a continuación, se escinde para formar la angioestatina entre los kringles 1 - 4.5 por la plásmine u otras serin proteasas, para luego diferencialmente escindirse a cualquiera de las formas de angioestatina posible, ya sea la 1-3 o la 1-4 por la acción de diversas metaloproteasas [66-67]. El dominio kringle 4 contiene los dos sitios de glicosilación diferentes a los antes mencionados [67].

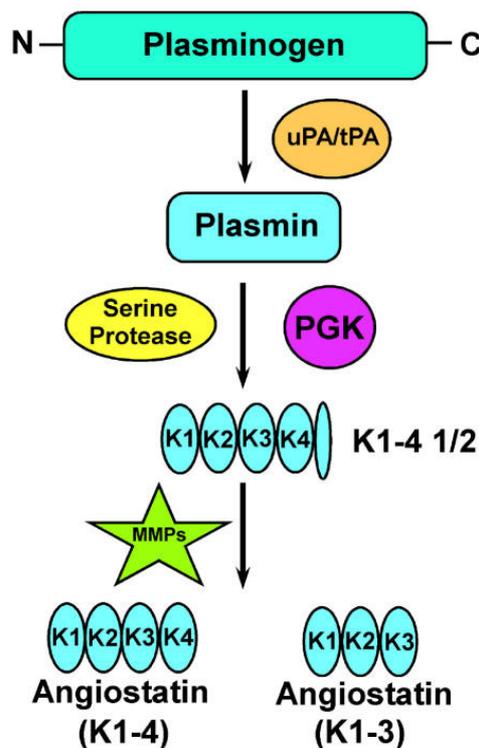


Figura 4: Vía para la generación de angioestatina a partir del plasminógeno (descrita por Geiger y Cnudde [2004]).

Capítulo 1

Se cree que *in-vivo* la angiostatina se genera a partir del plasminógeno mediante los siguientes pasos: u-PA (activador de plasminógeno uroquinasa) o t-PA (activador de plasminógeno tisular) escinde proteolíticamente el plasminógeno para generar plasmina y una reducción de los enlaces disulfuro (potencialmente por fosfoglicerato quinasa [PGK]) permite que una serin proteasa escinda proteolíticamente la plasmina, generando K1-4^{1/2}, seguida de una escisión proteolítica por las MMP para generar angiostatina (K1-4 o angiostatina K1-3).

Las diversas formas de angiostatina poseen diferentes niveles de actividad, poniendo en evidencia la complejidad de la biología de esta molécula ya que cada una de las variantes podría interactuar con diferentes moléculas conduciendo así a diferentes resultados biológicos. Al evaluarse la actividad antiangiogénica *in-vitro* de cada uno de los dominios kringle y de las diferentes variantes de angiostatina, se encontró que el dominio K5 posee un extraordinario efecto antiproliferativo sobre las células endoteliales comparado con los otros dominios kringles e incluso con la variante K 1-4 de angiostatina [68]. Por el contrario, el dominio K4 por sí solo no posee virtualmente ningún efecto sobre la proliferación endotelial. La evaluación de los posibles fragmentos de angiostatina mostró que la molécula compuesta por los tres primeros dominios (K1-3) es más activa que la constituida por (K1-4) en lo que a inhibición del crecimiento endotelial se refiere [69-70].

Diferentes receptores para angiostatina en la superficie celular endotelial

La angiostatina posee varios blancos moleculares y modos de acción para un mismo efecto. En este sentido no es diferente a su molécula parental, el plasminógeno, el cual posee una batería de moléculas blanco a los que puede unirse, ya sean ligados a la superficie celular, solubles o asociados a la matriz extracelular debido a los múltiples eventos en los que participa. Es de destacar que la presencia de dominios kringle contribuye a la regulación de esas uniones, ya que a medida que avanza el procesamiento del plasminógeno va cambiando la especificidad de sus sitios de unión. La diversidad de los fragmentos de angiostatina y los niveles de actividad de cada uno de ellos también contribuye a la complejidad de su biología, dificultando la extrapolación con los verdaderos eventos que ocurren *in vivo*. Por otro lado, no ha sido aún identificado un único blanco molecular que despliegue todos los efectos biológicos

Capítulo 1

que la angiostatina produce, como por ejemplo la inducción de la apoptosis, la inhibición de la proliferación, la migración, la invasión y los cambios producidos sobre la morfogénesis, el fenotipo y la expresión génica sobre las células endoteliales. Por estas razones, es lógico pensar que la angiostatina media sus acciones mediante múltiples blancos moleculares. Aunque, la angiostatina (kringles 1-4) fue descubierta originalmente como un fragmento interno de plasminógeno, su actividad no parece entrar en competencia con al plasminógeno en ensayos de actividad antiangiogénica *in-vitro* [1].

Recién en los últimos años se ha logrado profundizar en el conocimiento acerca del mecanismo de acción de la angiostatina. Varios grupos de investigación se han dedicado a identificar el blanco molecular al que se une en la superficie celular endotelial. Hasta el momento, se han descrito varios receptores específicos para angiostatina que son expresados en la superficie endotelial. En 1995, Moser y Pizzo iniciaron un sistemático estudio sobre los sitios de unión de la angiostatina sobre la superficie endotelial [71].

A continuación, se revisarán los mayores blancos de acción receptora de la angiostatina y sus posibles mecanismos de acción sobre la angiogénesis tumoral.

❖ **ATP sintasa**

En 1999, Moser y Pizzo informaron que la ATP-sintasa es un receptor de angiostatina en la superficie de las células endoteliales [71-73]. La ATP-sintasa se encuentra en la superficie de las células endoteliales, a pesar de que también se encuentra en la membrana mitocondrial interna. La proliferación de células endoteliales se inhibe por angiostatina cuando se une a la ATP-sintasa. Este hecho fue corroborado por que también se demostró la expresión de la ATP-sintasa en la superficie de algunas células tumorales [74], esas células en su gran mayoría eran endoteliales venosas, y especialmente donde los niveles de oxígeno y pH eran más bajos que la mayoría de las otras células en el cuerpo. Por lo tanto, la ATP-sintasa en la superficie de las células endoteliales puede tener un significativo valor para la supervivencia de las células endoteliales. Se ha descrito que el papel de la ATP-sintasa sobre la superficie endotelial estaría vinculado con la proliferación celular y la protección de la acidificación del ambiente intracelular [71].

La unión de la angiostatina a la porción F₁ de la enzima ATP-sintasa inhibe su actividad sobre la membrana endotelial, interrumpiendo así la síntesis de ATP y el transporte de

Capítulo 1

protones a través de la membrana. En presencia de un microambiente acidificado (pH 6.5) la asociación de angiostatina incrementa varias veces su actividad y produce además la muerte de la célula endotelial [75].

Se encontró que angiostatina tiene un efecto tóxico directo sobre diferentes variantes tumorales que expresaban en su superficie la enzima ATP-sintasa, debido a una disminución dramática en el pH intracelular. La unión de angiostatina inhibiría el bombeo de protones a través de la membrana celular mediado por la enzima ATP-sintasa (Chi y Pizzo) [76].

El pH extracelular promedio de células tumorales es entre 5.6 a 7.6, es más variable que en las células normales en las que toma valores entre 7.2 a 7.6, sin embargo, el pH intracelular promedio es normal [71] [77]. La angiostatina induce acidosis intracelular en las células endoteliales y la muerte celular *in-vitro*, cuando estas células se incuban a valores cercanos al límite inferior del rango de pH extracelular de los tejidos tumorales [75]. Las células endoteliales pueden mantener un pH intracelular relativamente normal, aunque el pH extracelular haya disminuido a condiciones similares a tumores de pH 6.5 [75]. Sin embargo, la adición de angiostatina a células incubadas en condiciones similares a tumores de pH ~ 6.5, causa una disminución significativa del pH intracelular y la muerte de estas células. En contraste, la angiostatina parece no ejercer un efecto perjudicial sobre las células endoteliales cultivadas a pH normal. Por lo tanto, se ha sugerido que la inhibición mediada por angiostatina de flujo de protones a través de F_1F_0 ATP-sintasa, puede ser un mecanismo importante del aumento de la sensibilidad de las células endoteliales al estrés pH en presencia de angiostatina [71].

❖ **Angiomotina**

La angiomotina es una proteína que fue descubierta en 2001 por Holmgren y sus colaboradores. La nombraron angiomotina porque facilita la movilidad, la invasión y los cambios morfogénicos de las células endoteliales asemejándose a aquellas en las cuales se encuentran en un ámbito tumoral [78].

La angiomotina se expresa preferentemente en las células endoteliales. En presencia de angiostatina, las células endoteliales que expresan angiomotina exhiben una reducción en la migración, así como una reducción en la formación de túbulos *in-vitro*. Estas observaciones son consistentes con la localización de la angiomotina en células migratorias. Por lo tanto, la angiostatina es un inhibidor de la angiomotina. La

Capítulo 1

evaluación de células transfectadas con angiostatina tratadas con angiostatina, mostraron una regulación de la actividad quinasa de adhesión focal (FAK) inhibiendo la migración endotelial y la formación de túbulos *in-vitro*. La migración y la formación de tubos también fueron bloqueadas mediante un anticuerpo específico para angiostatina recombinante [73] [79].

❖ $\alpha v \beta 3$ integrina y CD26

El efecto antiangiogénico de la angiostatina se ha atribuido también por su unión a $\alpha v \beta 3$ integrina [80] y CD26 [81]. CD26 es una glicoproteína de 110 kD de la superficie celular ampliamente distribuida con conocido de la dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV) la actividad en su dominio extracelular. Esta actividad es capaz de hidrolizar los polipéptidos en dipéptidos en posición amino terminal, ya sea con L-prolina o L-alanina en la penúltima posición.

Otro receptor descrito en la literatura es la integrina $\alpha v \beta 3$. Takada y colaboradores, encontraron que la angiostatina se une específicamente a la integrina $\alpha v \beta 3$ de células endoteliales de arteria bovina (BAE) y de células CHO [82]. Además, la plásmida, pero no la molécula intacta de plasminógeno, también resultó ser un ligando para esta integrina.

La presencia de plásmida indujo la migración endotelial pero el agregado de angiostatina revertió dicho efecto [83].

▪ *Otros potenciales receptores de angiostatina.*

Además de los blancos moleculares descritos anteriormente, numerosas son las moléculas que se encuentran en la literatura con un potencial papel en el reconocimiento de la angiostatina.

Recientemente, se postuló al receptor del factor de crecimiento hepatocitario (HGF) c-met como un potencial blanco de angiostatina. Wajih y Sane investigaron las similitudes de la angiostatina con HGF, encontraron que ambos poseen dominios kringle y una significativa homología de secuencia, además de que intervienen en la proliferación

Capítulo 1

endotelial y la migración, aunque de manera contraria [84]. La angiostatina bloquea la interacción HGF/C-met y reduce la fosforilación consecuente de *Akt*, una enzima ligada a la vía de señalización de C-met, conduciendo a la célula a la apoptosis y bloqueando el ciclo celular en fase S.

Por otro lado, el proteoglicano NG₂ sería capaz de reconocer todas las formas de angiostatina y plasminógeno. El NG₂ desempeña un papel en la estabilización de las interacciones célula-sustrato durante los primeros acontecimientos de la difusión de células de melanoma en la membrana basal, y se encuentra sobre-expresado en la vasculatura tumoral y aunque no parece mediar directamente las señales disparadas por angiostatina, podría tener un rol particularmente importante en la regulación extracelular de la actividad de la angiostatina sobre la vasculatura tumoral [85] [71].

La molécula Anexina II también ha sido postulada como un posible blanco, a la cual la angiostatina puede unirse de manera específica. Esta interacción fue encontrada utilizando células BAE y como resultado la angiostatina disparó un incremento en los niveles de calcio intracelulares inhibiendo la proliferación celular de las células endoteliales y favoreciendo la apoptosis [86].

Como se mencionó básicamente la angiostatina se une a glicoproteínas de la superficie celular, como ser la angiomotina [78], las integrinas [80] [87] [71], y la ATP-sintasa [71- 72] [76] [88-90]. Sus efectos son bien conocidos por promover la apoptosis [1] [40] [89-90] Inhibe el movimiento de los macrófagos [87] [89-91] [93-94], que normalmente son atraídos hacia el estroma de señalización mediante VEGFR-1 y VEGFR-2 [93], y que están involucrados en completar los circuitos vasculares mediante la vía VEGFR-3 [95]. Recientemente se ha demostrado que la angiostatina puede inhibir la migración y activación de los neutrófilos [96].

1.4.2 Perspectivas Terapéuticas Futuras

Actualmente las estrategias terapéuticas están dirigidas a buscar tratamientos prolongados, ya que las nuevas tendencias apuntan a considerar al cáncer como una enfermedad crónica. Mediante el uso de medicamentos no tóxicos dirigidos a blancos moleculares específicos que gobiernan el comportamiento anómalo de las células cancerosas y una nueva generación de vacunas oncológicas, sería posible combatir focos residuales de la enfermedad. Estas nuevas terapias, en conjunción con los métodos

Capítulo 1

convencionales han probado ser eficaces y hasta son las estrategias más prometedoras para el tratamiento del cáncer en los años venideros.

Una ventaja de la terapia antiangiogénica es la accesibilidad de las células endoteliales a los agentes antiangiogénicos circulantes, en contraste con la dificultad que supone el acceso de los agentes quimioterápicos a las células tumorales, debido a las elevadas presiones del líquido intersticial del tumor [97].

Existen evidencias cada vez más significativas que indican que la terapia antiangiogénica a través de compuestos con acción específica sobre los mecanismos de formación de nuevos vasos sanguíneos se podrá mejorar el abordaje terapéutico del cáncer, y también de otras patologías. La angiostatina constituye uno de los productos endógenos de mayor interés, con una marcada acción biológica sobre el endotelio vascular. No obstante, queda en claro que se requieren cantidades importantes del producto, tanto para la investigación y validación de la acción del producto en ensayos controlados, como para la producción de una formulación de un medicamento. En los inicios de las investigaciones de O' Reilly en 1994, la angiostatina fue generada por digestión proteolítica limitada del plasminógeno humano usando una enzima pancreática bovina purificada. La angiostatina se purificó en una única etapa mediante cromatografía de afinidad de Lisina-Sepharosa con casi 95% de homogeneidad. La fracción homogénea se reunió, se concentró, se dializó y se esterilizó por filtración [1]. En una reacción típica, el plasminógeno se escindió en dos fragmentos de aproximadamente 38 y 19 KDa.

Este proceso, cuando tiene éxito, es bajo en el rendimiento del compuesto activo, por lo que esta metodología es inadecuada para producir cantidades suficientes para los ensayos clínicos. Pequeñas cantidades de angiostatina también fueron aisladas y purificadas de la orina de ratones portadores de tumores [1]. La obtención de cantidades suficientes del producto biológicamente activo a través del clivaje del plasminógeno ha demostrado ser dificultosa, retrasando los ensayos clínicos. En este sentido, la producción de angiostatina purificada a partir de sistemas de expresión recombinante ofrece una alternativa atractiva para la investigación del producto, y resulta de enorme valor para el desarrollo posterior de terapias antitumorales.

La producción a mayor escala de angiostatina humana recombinante se produjo posteriormente en *E. coli* [98] y en la levadura (*Pichia pastoris*). El mayor avance en la producción de angiostatina en *Pichia pastoris* ha sido la adición controlada de metanol, como inductor, y la alimentación con glicerol como FCE, guiado por la detección del

Capítulo 1

oxígeno disuelto [99]. De esta manera, se han obtenido densidades celulares de hasta 150 g/L, sin embargo el rendimiento de angiostatina alcanzó 108 mg/L después de un periodo de expresión de 96 h. La productividad específica media de angiostatina mejoró a 0.02 mg / (g × h). El rendimiento celular aparente en metanol y glicerol fueron, respectivamente, 0.69 g / g y 0.93 g / g mayor que sin el uso de esta estrategia de alimentación.

Producción de proteínas recombinantes derivadas de la angiostatina				
Producto	Origen	Sistema de expresión	Rendimiento (mg/L)	Autor
<i>Kringle 1-5</i>	Humano	<i>E. coli</i>	5.8	[100]
<i>Kringle 1-4</i>	Humano	<i>E. coli</i>	ND	[97]
<i>Kringle 1-4</i>	Humano	<i>Pichia pastoris</i>	17.4	[101]
<i>Kringle 1-3</i>	Humano	<i>E. coli</i>	44.4	[102]
<i>Kringle 1-4</i>	Murino	Baculovirus	ND	[103]
<i>Kringle 1-3</i>	Humano	CHO	1.6	[104]
<i>Kringle 1-4</i>	Humano	CHO	1.0	[104]
<i>Kringle 1-4</i>	Humano	<i>Pichia pastoris</i>	108	[105]
<i>Kringle 1-4</i>	Humano	<i>Pichia pastoris</i>	18	[104]
<i>Kringle 1-4</i>	Humano	<i>E. coli</i>	-----	Esta tesis

Tabla. 1 Comparación de los rendimientos en la expresión de diferentes formas de Angiostatina en distintos sistemas de expresión.

Una amplia variedad de diferentes tumores ha sido tratada por angiostatina en animales. En dosis baja (100 ml por día de 0.1 mg/ml), pero no dosis alta (100 ml de 0.3 mg/ml) angiostatina efectivamente disminuye el número y el tamaño de las micrometástasis hepáticas para tres líneas diferentes de melanoma de ratón implantadas en el ojo [106]. La gráfica de dosis-eficacia para la angiostatina sigue una curva de forma bifásica, (forma de U) en la que las dosis más bajas son comúnmente más eficaces que dosis más altas [107]. La angiostatina también inhibió el crecimiento de carcinoma murino en células escamosas in vivo [108].

Recientes estudios, han mostrado producir condiciones de hipoxia necesaria para que los tumores dejen de crecer, pero solo para erradicar tumores pequeños de 0.1 cm de diámetro, por el momento solo retrasó el crecimiento de tumores mayores a 0.4 cm de diámetro. Por el contrario, la inyección programada de una combinación de

Capítulo 1

angiostatina y plásmidos HIF-1 α antisentido erradicó por completo los tumores EL-4 grandes en 2 semanas y evitó la regulación al alza de las vías inducibles por hipoxia inducidas por la angiostatina. Los datos indican que el bloqueo de las vías inducibles por hipoxia por HIF-1 α antisentido puede eludir la resistencia a los medicamentos inducida por hipoxia y, por lo tanto, aumentar la eficacia de las terapias antiangiogénicas [108].

La angiostatina puede ser administrada parenteralmente tanto en animales como a los pacientes, por una variedad de métodos diferentes. Se ha evaluado, por ejemplo, células encapsuladas en perlas de alginato que mantienen las células viables para producir y secretar angiostatina de forma continua [109].

Con la introducción de agentes antiangiogénicos en la clínica del tratamiento contra el cáncer se ha comenzado una nueva era. Aunque esta nueva clase de compuestos se introdujo muy recientemente en el ámbito clínico, el bevacizumab, ya se ha convertido en una parte estándar contra el cáncer colorectal.

Entre el 2013 y el 2015 se han añadido al arsenal terapéutico disponible frente al cáncer colorectal metastásico otros tres antiangiogénicos:

El Aflibercept es una proteína de fusión recombinante soluble. Se conoce como un “multiple angiogenic factor trap”, actúa deteniendo el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos. Se produce en un sistema de expresión mamífero en células CHO y está indicado en combinación de quimioterapia con irinotecan / 5-fluorouracilo/ácido folínico,

El Regorafenib, es un medicamento que pertenece a la familia de los inhibidores de la tirosina quinasa y ha sido autorizado para el tratamiento de pacientes afectados por cáncer de colon de evolución avanzada que no hayan respondido a otros tratamientos disponibles, como la cirugía y otros tipos de quimioterapia. Su forma farmacéutica es un comprimido recubierto que contiene 40 mg de Regorafenib, y por último,

El Ramucirumab, que es un anticuerpo IgG₁ monoclonal recombinante humano producido por células de ratón (NS₀), al igual que el primer mencionado, se trata de una solución para perfusión. Estos recientes lanzamientos ponen de manifiesto y prometen mucho para el futuro con respecto a todos los compuestos potentes en desarrollo.

Como se mencionó anteriormente, estos compuestos ofrecen la oportunidad de combinar con la quimioterapia clásica y, además, con otros compuestos biológicos, sin embargo, una conclusión que se puede sacar con seguridad es que el tratamiento del cáncer cambiará dramáticamente y rápidamente en un futuro próximo.

Capítulo 1

1.5 Expresión de Proteínas Recombinantes

1.5.1 Generalidades

Las hormonas, los factores de crecimiento, los anticuerpos y algunos tipos de proteínas con funciones específicas suelen encontrarse en los organismos vivos en concentraciones extremadamente bajas, lo cual hace muy costoso o directamente imposible su obtención por métodos extractivos, aun en los casos de que existieran donantes. Otras veces, la existencia de problemas relacionados la presencia de virus, priones y otros microorganismos infectivos suele hacer que muchas veces estos métodos sean directamente inviables.

La tecnología de DNA recombinante ha revolucionado la producción de proteínas, en especial aquellas de uso farmacéutico. Actualmente, estas proteínas se han convertido rápidamente en productos clave para las industrias farmacéuticas, pues las ventas globales para el 2020 se prevén de hasta 200 mil millones de dólares americanos. Hoy en día más de 150 proteínas terapéuticas se encuentran en el mercado y más de 400 se encuentran en pruebas clínicas, además de muchos otros en desarrollo. Entre las más vendidas se encuentran las proteínas hematopoyéticas (23%) y los anticuerpos monoclonales (20%). Otras proteínas que tienen también altos porcentajes de venta son las citocinas (19%), antitrombinas (11%), vacunas (11%), proteínas plasmáticas (6%) e insulina (5%). Una de cada cuatro drogas introducidas en el mercado es una proteína heteróloga terapéutica, y ese número tiende a crecer exponencialmente. La elección del microorganismo para expresar la proteína de interés generalmente depende en gran medida de las características fisicoquímicas de la proteína a producir.

Dentro de los sistemas de producción basados en la tecnología de DNA recombinante, existen diferentes posibilidades en cuanto al organismo huésped. Bacterias, levaduras, hongos, cultivos de células animales y organismos superiores pueden utilizarse como reactores de producción de proteínas.

A continuación se describen brevemente las principales características de los sistemas de expresión aplicados, en particular en la industria biofarmacéutica para la producción de proteínas recombinantes que han sido aprobadas para su aplicación terapéutica en humanos.

Capítulo 1

❖ Sistemas procarióticos

Para comenzar la descripción de los microorganismos, comenzaremos con las bacterias Gram-positivas. Generalmente son microorganismos fáciles de manipular genéticamente.

Producción de proteínas recombinantes en <i>Bacillus spp.</i>			
Proteína recombinante	Cepa de <i>Bacillus</i>	Rendimiento (mg/L)	Autor
α -amilasa (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	<i>B. subtilis</i>	1000-3000	Palva y col., (1982)
α -amilasa (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	<i>B. brevis</i>	3000	Udaka y col., (1983)
α -amilasa (humana)	<i>B. brevis</i>	60	Konishi y col., (1990)
Celulasa	<i>B. brevis</i>	100	Kashima y col., (2004)
Toxina colérica B	<i>B. brevis</i>	1400	Ichikawa y col., (1993)
Dextranasa (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	<i>B. megaterium</i>	n.d. (362 U/g)	Malten y col., (2005)
Gelatina	<i>B. brevis</i>	500	Kajino y col., (2000)
Factor epidérmico de crecimiento (humano)	<i>B. brevis</i>	240	Yamagata y col., (1989)
Factor epidérmico de crecimiento (humano)	<i>B. subtilis</i>	7	Lam y col., (1998)
Factor epidérmico de crecimiento (ratón)	<i>B. brevis</i>	50	Wang y col., (1993)
Fración Fab' humano/ratón	<i>B. brevis</i>	100	Inoue y col., (1997)
Interferón- $\alpha 2$ (humano)	<i>B. subtilis</i>	0.5-1.0	Palva y col., (1983)
Interleuquina-2 (humano)	<i>B. brevis</i>	120	Takimura y col., (1997)
Interleuquina-6 (humano)	<i>B. brevis</i>	200	Shiga y col., (2000)
Lipasa A	<i>B. subtilis</i>	600	Lesuisse y col., (1993)
Penicilina G acilasa	<i>B. subtilis</i>	n.d.	Yang y col., (2001)
Pepsinogeno (cerdo)	<i>B. brevis</i>	11	Udaka y Yamagata (1993)
PHA depolimerasa A (<i>Paucimonas lemoignei</i>)	<i>B. brevis</i>	1.9	Braaz y col., (2002)
Proinsulina	<i>B. subtilis</i>	1000	Olmos-Soto; Contreras Flores, (2003)
Disulfuro isomerasa	<i>B. brevis</i>	1100	Kajino y col., (1999)
Anticuerpo de cadena sencilla (scFv)	<i>B. subtilis</i>	10-15	Wu y col., (2002)
Stafiloquinasa	<i>B. subtilis</i>	337	Ye y col., (1999)
Streptavidina	<i>B. subtilis</i>	35-50	Wu y Wong (2002)
Tioredoxina (<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>)	<i>B. subtilis</i>	500	Anna y col., (2003)
Toxina A (<i>Clostridium difficile</i>)	<i>B. megaterium</i>	n.d.	Burger y col., (2003)

Tabla. 2 Producción de proteínas recombinantes en *Bacillus spp.*
[111]

Capítulo 1

En el caso de *B. subtilis*, su característica más notoria es de ser un microorganismo no-patogénico y libre de endotoxinas [110]. Debido a esto es reconocido como seguro (GRAS) y muy usado en obtención de enzimas de uso alimentario [111]. Las desventajas de este sistema básicamente es la inestabilidad de los plásmidos. Los vectores optimizados no son accesibles comercialmente, son de uso privado protegidos por patentes de las empresas que los desarrollaron. Sus niveles de expresión de proteínas heterólogas son moderados.

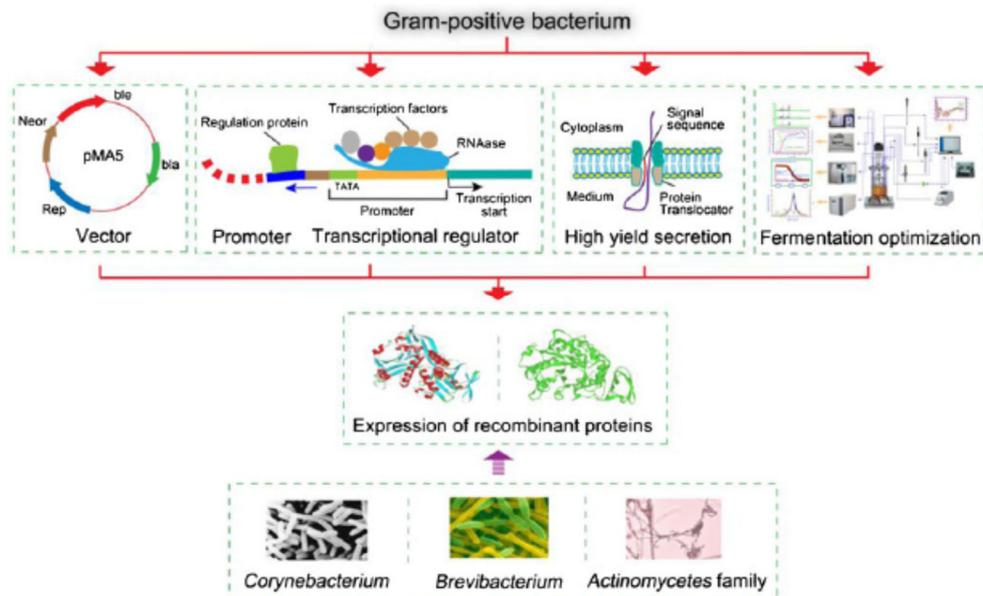
La siguiente tabla muestra algunos de los productos obtenidos en *Bacillus*.

Continuando con las bacterias Gram-positivas, *Streptomyces* es el género más extenso de las Actino bacterias. Las especies se caracterizan por poseer un metabolismo secundario complejo. Varias especies de este género son conocidas por la alta expresión de proteínas. Por otro lado, tiene la habilidad de secretar proteínas recombinantes correctamente plegadas (activas) en el medio de cultivo, lo que simplifica los pasos subsecuentes de purificación. Por otro lado *S. lividans* es como huésped una buena elección para la producción de proteínas heterólogas pues, si bien no posee un sistema de restricción-modificación muy desarrollado posee muy limitada actividad proteasas. Se conoce y se encuentra bien desarrollada sus condiciones y tecnologías de fermentación ya que se producen como metabolitos secundarios numerosos bactericidas y fungicidas desde hace varios años [112].

En *Streptomyces* se produce actualmente el factor estimulante de colonias de granulocitos o G-CSF, Leucotropin[®], que ha aprobado la fase clínica III. Si bien el mismo deriva del humano, el producto no es glicosilado.

Otras bacterias del grupo de las Gram-positivas utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes son *Corynebacterium* y *Brevibacterium spp.* Debido a la falta de actividad detectable en la hidrólisis extracelular, *Corynebacterium* y *Brevibacterium* se han convertido en huéspedes favorables y versátiles para la producción a escala industrial de proteínas heterólogas [113-114].

Capítulo 1



(Fig. 5) Esquema de clonado y expresión general en bacterias gram-positivas [175].

❖ Sistemas eucarióticos

Su utilización surge debido a la necesidad de solucionar los problemas que presentan los sistemas procariontes como ser, solubilidad de las proteínas heterólogas, modificaciones post-traduccionales, y actividad.

Estos sistemas, dependiendo del tipo a utilizar en general realizan algunas modificaciones post-traduccionales a las proteínas heterólogas aunque no hay sistema de expresión *in-vitro* que sea capaz de realizar todas las modificaciones exactas.

Los vectores de expresión eucarióticos poseen las mismas características que los de bacterias (origen de replicación, marcadores de selección, promotores, etc.). También hay vectores que comparten características junto con los vectores procariontes, estos últimos son por ejemplo, los vectores lanzadera o *shuttles vectors* donde los mismos intervienen en fenómenos de recombinación o integración sitio específica.

❖ Levaduras

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotas. Las mismas presentan las ventajas de ser organismos de fácil crecimiento y manipulación. Su entorno biológico

Capítulo 1

intracelular facilita el plegado de las proteínas. Pueden expresar proteínas y secretarlas al medio de cultivo, además presenta las ventajas de no producir endotoxinas. Pueden realizar ciertas modificaciones postraduccionales como ser glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, eliminación de la metionina inicial, procesamiento proteolíticos de precursores. Los procesos de fermentación son adaptables a gran escala y bajo costo. Al igual que *E. coli*, las levaduras pueden cultivarse de forma económica, rápida y en fermentaciones de alta densidad celular llegando en algunos casos a 130 g/L. Además poseen la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales complejas, no producen sustancias pirogénicas y son capaces de secretar proteínas de manera eficiente. Las especies que se establecieron en la producción industrial son *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris* y *H. polymorpha*.

Si bien *S. cerevisiae* sigue siendo genéticamente la levadura mejor caracterizada de todas, para la producción de proteínas recombinantes *P. pastoris* es en la actualidad la especie de levadura más frecuentemente utilizada aun sin ser considerada GRAS [115] y es considerada superior a cualquier otra especie de levadura conocida con respecto a su eficacia de secreción, permitiendo la producción de proteínas recombinantes con altos rendimientos [116]. A la fecha se han expresado más de 400 proteínas [116]. Su metabolismo es preferentemente respiratorio, lo que permite grandes densidades celulares y es metilo trófica, es decir que puede utilizar metanol como fuente de carbono y de energía, incluso lo puede utilizar como inductor de la expresión activando el promotor de la enzima alcohol oxidasa (AOX). El uso de este sustrato, altamente reducido usado para cultivar a grandes densidades celulares obligan a evaluar requerimientos tales como fermentadores de acero inoxidable debido a la necesidad de incorporar oxígeno puro para evitar la limitación del mismo.

Al manipular levaduras siempre resulta dificultosa su transformación debido a su baja eficiencia de transformación, que es más compleja que en bacterias (esferoplastos por remoción enzimática, utilización de sales de Litio, electroporación por mencionar algunas de ellas). En algunos casos puede darse el caso de hiper glicosilación de proteínas heterólogas aunque es menos frecuente que empleando *S. cerevisiae*.

Producción de proteínas terapéuticas en <i>S. cerevisiae</i> y <i>P. pastoris</i>			
Nombre comercial	Proteína recombinante	Compañía	Sistema de expresión
Actrapid	Insulina	Novo Nordisk	<i>S. cerevisiae</i>
Ambirix	Antígeno de superficie de virus de hepatitis B	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Comvax	Antígeno de superficie de	Merck	<i>S. cerevisiae</i>

Capítulo 1

	virus de hepatitis B		
Elitex	Urato oxidasa	Sanofi-synthelabo	<i>S. cerevisiae</i>
Glucagen	Glucagon	Novo Nordisk	<i>S. cerevisiae</i>
HBVAXPRO	Antígeno de superficie de virus de hepatitis B	Aventis Pharma	<i>S. cerevisiae</i>
Hexavac	Antígeno de superficie de virus de hepatitis B	Aventis Pasteur	<i>S. cerevisiae</i>
Infanrix-Penta	Antígeno de superficie de virus de hepatitis B	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Leukine	Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	Berlex	<i>S. cerevisiae</i>
Novolog	Insulina	Novo Nordisk	<i>S. cerevisiae</i>
Pediarix	Antígeno de superficie de virus de hepatitis B	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Procomvax	Antígeno de superficie de virus de hepatitis B	Aventis Pasteur	<i>S. cerevisiae</i>
Refuldan	Hirudina/lepirudina	Hoechst	<i>S. cerevisiae</i>
Regranex rh	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Ortho-McNeil Pharma (US), Janseen-Cilag (EU)	<i>S. cerevisiae</i>
Revasc	Hirudina/desirudina	Aventis	<i>S. cerevisiae</i>
Twinrix	Antígeno de superficie de virus de hepatitis B	GlaxoSmithKline	<i>S. cerevisiae</i>
Productos en etapas de desarrollo			
Producto	Indicación medica	Compañía	Sistema de expresión
Angiostatina	Factor antiangiogénico	CASI Pharmaceuticals	<i>P. pastoris</i>
Inhibidor elastásico	Fibrosis quística	Dyax	<i>P. pastoris</i>
Endostatina	Factor antiangiogénico	CASI Pharmaceuticals	<i>P. pastoris</i>
Factor de crecimiento epidérmico analógico	Diabetes	Transition Therapeutics	<i>P. pastoris</i>
Factor de crecimiento similar a la insulina-1	Deficiencia en factor de crecimiento similar a la insulina-1	Cephalon	<i>P. pastoris</i>
Seroalbumina humana	Estabilizar el volumen sanguíneo en quemaduras / shock	Mitsubishi Pharma	<i>P. pastoris</i>
Inhibidor de la calicreína	Angioedema hereditario	Dyax	<i>P. pastoris</i>

Tabla. 3 Producción de proteínas terapéuticas en *S. cerevisiae* y *P. pastoris* [116]

Durante el crecimiento a gran escala puede evidenciarse pérdida del plásmido, de manera que lo más seguro es intentar de incorporar los genes a expresar de manera estable.

En Diciembre de 2009 la FDA aprobó la primera proteína recombinante de uso terapéutico en humanos producida en *P. pastoris* KALBITOR® (una proteína de 60 Aa inhibidor de la calicreína) para el tratamiento de ataques agudos de angioedema hereditario (HAE).

Capítulo 1

❖ **Hongos filamentosos**

Los hongos filamentosos son más evolucionados que las levaduras y por consiguiente poseen un aparato de modificación postraduccional más complejo, y por tanto más similar a los mamíferos. Se han expresado complejas proteínas, tales como t-PA (activador tisular del plasminógeno) en *A. nidulans*, obteniendo un patrón de glicosilación muy similar al humano. Para la producción de proteínas recombinantes, se prefieren las especies que son ampliamente empleadas en la industria para la producción de enzimas, ácidos y los antibióticos y por lo tanto poseen estado GRAS, entre ellas se destacan *A. nidulans*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. awamori*, varias especies de *Fusarium* y de *Trichoderma*, *Penicillium chrysogenum* y *Acremonium chrysogenum* [115].

❖ **Cultivos de células de mamíferos y células de Insectos**

Los cultivos de células animales son los sistemas de más alta similitud con respecto al patrón de las modificaciones postraduccionales de las células humanas. Sin embargo, los sistemas de cultivo son más complejos y costosos. Entre los sistemas más conocidos, las células de insecto transformadas mediante báculo virus vienen en alza en popularidad comparable con *P. pastoris*. En 2007, la FDA aprobó la comercialización de Cervarix® (GlaxoSmithKline), una vacuna recombinante no infecciosa desarrollada para la prevención de la infección por los tipos 16 y 18 del virus del papiloma humano que causa cerca del 70 % de los casos de cáncer cervical. Fue la primera vacuna aprobada en humanos producida bajo este sistema de expresión. Mientras que la última aprobada fue la vacuna a subunidad denominada Flublok, para el Virus de la influenza aviar en 2013. Posteriormente, se aprobó una vacuna recombinante contra la influenza, Flublok Quadrivalent (cuatro ingredientes), está disponible durante la temporada de influenza 2020-2021. La FDA aprobó por primera vez la vacuna Flublok Quadrivalent en los Estados Unidos para su uso en adultos de 18 años de edad o más en el 2017. La versión trivalente anterior que fue aprobada en el 2013, pero luego fue reemplazada por la versión tetravalente.

Los baculovirus son un tipo de virus que infectan artrópodos, especialmente lepidópteros. En los últimos estadios del ciclo de infección de estos virus, las partículas virales se empaquetan en cuerpos de inclusión de forma poliédrica que se localizan dentro del núcleo celular y están compuestos mayoritariamente por una proteína denominada poliedrina, que se sintetiza en grandes cantidades al final del ciclo infeccioso (puede llegar hasta un 50 % de las proteínas totales de la célula). La formación de los

Capítulo 1

poliedros es necesaria para que el virus pueda pasar de un huésped a otro, pero no es requerida para mantener al virus en cultivos celulares. Por lo tanto, parte del gen que codifica la poliedrina puede ser reemplazado con el fin de expresar una proteína de interés en cultivos celulares bajo la regulación del promotor de la poliedrina (el promotor más fuerte que se conoce en la naturaleza). El genoma de los b́aculovirus es demasiado grande (aproximadamente 180 kbp) para ser manipulado directamente con las t́ecnicas convencionales de ingenieŕa genética, por lo tanto los vectores de expresi3n de este tipo generalmente se construyen por medio de alǵun evento de recombinaci3n hom3loga o sitio espećfica, como en el caso de sistema comercial *Bac to Bac*[®] (Invitrogen), en el que el DNA heter3logo inicialmente se inserta en un vector bacteriano de transferencia que es capaz de transponer el gen de inter3s a un vector de expresi3n b́aculoviral (b́acmido). La mayor ventaja de los sistemas de expresi3n derivados de b́aculovirus es que las proténas for3neas se expresan a alto nivel, experimentando modificaciones post-traduccionales similares a las producidas en c3lulas de mamíferos y en la actualidad, se ha logrado adaptar ĺneas celulares de insectos a algunos de los requerimientos habituales de la producci3n a gran escala.

Con respecto a la expresi3n en c3lulas de mamíferos, las ĺneas m3s utilizadas son las ya mencionadas CHO, las BHK (baby hamster kidney), Vero (riñ3n de mono verde), HeLa (c3ncer c3rvico-uterino humano). Estas 3ltimas son el linaje celular humano m3s antiguo. Estas c3lulas derivan de una muestra de c3ncer c3rvico-uterino obtenida el 8 de febrero de 1951 de una paciente llamada Henrietta Lacks (de alĺ el acr3nimo He {nrietta} La{cks}) quien falleci3 el 4 de octubre de ese mismo a3o debido al c3ncer.

Su utilizaci3n produce la interpretaci3n *in-vitro* m3s exacta de la proténa natural por lo que se las utiliza mucho para producir proténas en las cuales su actividad es pura y exclusivamente derivada de sus modificaciones postraduccionales, de manera que los costos de producci3n sean debidamente justificados. La mayoría crecen adheridas (en monocapa), algunas crecen en suspensiones o pueden crecer ancladas en microcarriers. Poseen tiempos de duplicaci3n generalmente lentos, entre 15 – 25 horas, sus requerimientos nutricionales son complejos, y son muy susceptibles a la contaminaci3n y muy sensibles al estr3s. Las c3lulas CHO son el hu3sped eucariota m3s com3nmente usado para la producci3n industrial de proténas recombinantes terap3uticas.

Las c3lulas CHO son el equivalente en mamíferos a *E. coli* para la investigaci3n y la producci3n biotecnol3gica. Se caracterizan por su relativamente r3pido crecimiento y porque se pueden cultivar en suspensi3n. Las c3lulas de mamífero se han utilizado para

Capítulo 1

producir más de la mitad de las proteínas de uso terapéutico y la mayoría de las moléculas glicosiladas comerciales se realizan en este sistema de expresión. Las células CHO y BHK han sido hasta el momento las más utilizadas para la producción industrial. Sin embargo, ningún sistema se puede considerar en general superior a cualquier otro. Para cada producto, se debe encontrar su sistema de expresión adecuado y el mismo debe ser optimizado individualmente, tanto en el ámbito genético como a escala fermentativa, pero teniendo en cuenta las propiedades del producto, el organismo y los vectores de expresión [117].

Para finalizar la sección, los criterios generales de decisión para la elección de un sistema de expresión para la producción farmacéutica es su perfil farmacológico de actividad producido en el contexto del patrón de las modificaciones postraduccionales requeridas, seguido luego de la rentabilidad y por último de la aceptación por el parte de las autoridades.

1.5.2 *Escherichia coli* como sistema de expresión

En la presente sección se tratarán aspectos básicos sobre la utilización de *E. coli* como sistema de expresión. Se repasarán aspectos de su fisiología y se profundizarán los aspectos que estarán vinculados, en el próximo capítulo, con las evaluaciones de las hipótesis de esta tesis. A la fecha, una innumerable cantidad de revisiones pueden encontrarse acerca de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*, algunos autores tratan sobre estrategias de estabilización de plásmidos, reducción en la producción de acetato, desviación de flujos metabólicos debido a la inducción de la expresión, carga metabólica, exportación de proteínas al medio de cultivo, y también estrategias de cultivo en alta densidad.

Sin duda aún hasta la fecha, es el hospedador bacteriano más importante desde que fue utilizado para producir la insulina humana recombinante de Eli Lilly en 1982, siendo esta la primera proteína recombinante aprobada para uso en humanos. Este fue uno de los aportes más importantes de la biotecnología moderna hasta la fecha.

Que sea hasta hoy en día uno de los sistemas más empleados posiblemente se deba a que es uno de los microorganismos más estudiados, su genética es bien conocida, es una bacteria muy sencilla de manipular, tiene una tasa de crecimiento elevada en medios mínimos, con escasos requerimientos nutricionales y en la actualidad existe una gran

Capítulo 1

disponibilidad de cepas y vectores, especialmente desarrollados para aumentar los niveles de expresión (que pueden alcanzar hasta un 30 % de las proteínas totales). Todo esto conlleva a la obtención de grandes cantidades de la proteína recombinante de manera sencilla y económica, lo que lo convierte en un sistema ideal para la obtención a gran escala [118].

Los numerosos estudios en los últimos 15 años han demostrado que pueden expresarse proteínas complejas de diferentes orígenes, algunas de ellas con múltiples puentes disulfuro donde generalmente no se pliegan correctamente en bacterias y se acumulan en gran medida como cuerpos de inclusión (IB). Existen numerosos ejemplos de proteínas comercialmente importantes que no pueden ser producidas inicialmente en forma activa, como diversos factores de crecimiento, de manera que inicialmente se obtienen de manera de IB y posteriormente se renaturalizan hasta obtener su forma activa. [119-123]. En muchos casos estas etapas de “renaturalización” se las considera como una etapa de más en el proceso de purificación dado a que el balance entre los costos de producción y rendimiento frente al alto valor agregado del producto final hacen que sea conveniente la utilización de sistemas bacterianos por sobre los costos de sistemas de células de mamíferos, este es uno de los motivos por el cual *E. coli* sigue siendo elegida como sistema heterólogo de expresión, a pesar de tener la tarea de producir incluso proteínas muy complejas.

A continuación, se describirán los aspectos más importantes a tener en cuenta en el desarrollo de un sistema de expresión.

Los tres factores influyen en la expresión de proteínas



Figura 6: Factores que influyen en la expresión de proteínas.
Tomado de [118]

- ***Vector de expresión***

Capítulo 1

Un vector de expresión contiene un conjunto de elementos genéticos configurado en forma óptima para modular los aspectos de la producción de proteínas. Además, la inclusión de un gen de resistencia a antibióticos facilita selección fenotípica del vector, y el ORI determina el número de copias del vector.

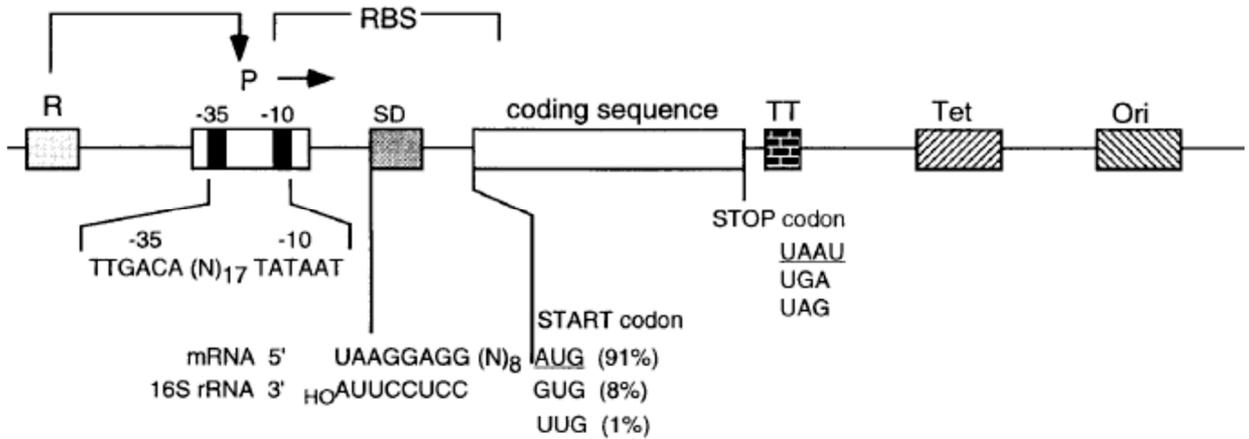


Figura 7 Representación esquemática de las características más destacadas y los elementos de secuencia de un vector de expresión procariótico. Tomado de Makrides [117].

❖ Promotores

Los promotores generalmente deben poseer las siguientes características, deben ser fuertes, capaz de producir la inducción en el momento requerido. Algunos de ellos pueden alcanzar entre 10-30% de la proteína celular total. En segundo lugar, el promotor debe exhibir un nivel basal mínimo de transcripción; es importante que el promotor sea reprimible particularmente para los casos en que la proteína de interés sea tóxica o perjudicial para el crecimiento de la célula huésped. Los promotores deben ser capaces de ser inducidos de una manera sencilla y rentable. En *E. coli* la inducción térmica y química son técnicas ampliamente utilizadas en gran escala. La producción de proteínas terapéuticas humanas por medio de la inducción química mediante IPTG a gran escala no es lo ideal debido a su toxicidad, su costo y su difícil eliminación de excedente en el medio de cultivo, es por ello que sustancias análogas como la lactosa o el suero lácteo mismo fueron evaluados como alternativas, aunque con un optimismo moderado. Los promotores que se inducen térmicamente pueden generar en el hospedador respuesta de choque térmico y por tanto el incremento concomitante de proteasas [130].

Capítulo 1

En este aspecto en esta tesis se evaluaron dos tipos de promotores, por un lado el mencionado inducibles por IPTG, un sistema comercial pET-22b / BL21 (DE3), y por otro lado el promotor de la fosfatasa alcalina inducible por la disminución en la concentración de fosfatos.

❖ Sistema de clonado y expresión proteica en el sistema pET-22b / BL21 (DE3)

Como se mencionó, la expresión de proteínas en sistemas procariotas es una herramienta muy utilizada para varios fines. Por ejemplo, es muy útil para la generación de anticuerpos, para hacer ensayos estructurales y de actividad, o por la utilidad comercial que puede revestir ese péptido en particular. Uno de los sistemas de más alta difusión es el formado por el plásmido pET-22b y la cepa de *Escherichia coli* BL21. La expresión de péptidos en este vector se realiza mediante la inducción de la expresión de la RNA polimerasa del fago T₇, que está bajo el promotor *lac* en el genoma de la bacteria. Los genes de interés son clonados en este plásmido bajo el control del promotor transcripcional del bacteriófago T₇. Para la producción de proteínas, el plásmido recombinante es transferido a cepas de *E. coli* cuyo genoma incluye un lisógeno del fago λ, DE3, que posee un marco de lectura codificante para la RNA polimerasa del fago (BL21-DE3). Por otro lado, el único promotor que dirige la transcripción del gen de la RNA polimerasa de T₇ es el promotor *lacUV5*, inducible por lactosa e inhibido por glucosa, permitiendo de esta manera controlar indirectamente la expresión de la proteína de interés por el agregado de un análogo de lactosa como el IPTG. La figura 7 muestra la cascada de inducción propuesta para este sistema. Además, este sistema nos permite clonar, si se desea, en marco continuo con la secuencia codificante para el péptido de localización al periplasma, *pelB*, y con la secuencia codificante para la cola de histidina, simplificando de esta manera el paso de purificación de la proteína.

Característica	Localización (bp)
Promotor de T ₇	361 – 377
Inicio de transcripción de T ₇	360
Secuencia codificante para <i>pelB</i>	224 – 289
MCS (<i>NcoI</i> – <i>XhoI</i>)	158 - 225
Secuencia codificante para His – Tag	140 - 157
Terminador de T ₇	26 - 72

Capítulo 1

Secuencia codificante para el represor <i>lacI</i>	764 - 1843
Origen de replicación pBR322	3277
Origen de replicación f_1	5027 - 5482
Resistencia a Ampicilina	4038 - 4895

Tabla. 4: Elementos que componen el plásmido pET-22b. Tomado de [130]

La figura 8 muestra el esquema de la cascada de inducción del sistema pET-22b (+) – *E. coli* BL21/DE3. La inducción con IPTG posibilita la generación de mRNA codificante para la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa transcribe el gen de interés clonado en el plásmido pET.

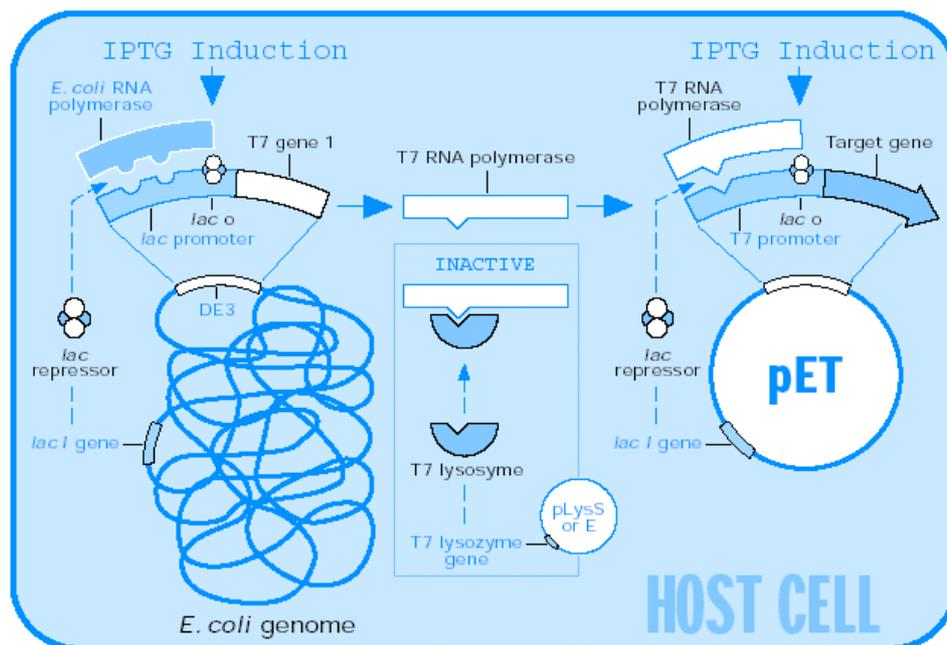


Figura 8: Esquema de la cascada de inducción del sistema pET-22b (+). Tomado [130]

Capítulo 1

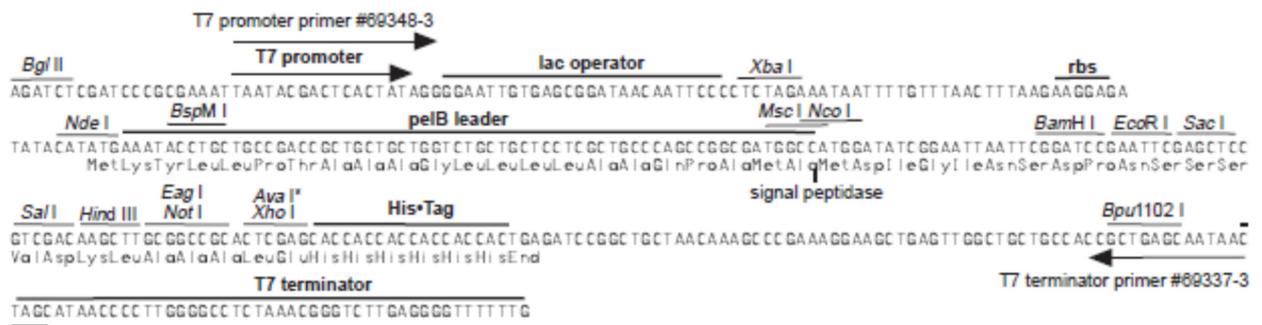


Figura 9: Detalle de la secuencia nucleotídica de la región de clonado del vector pET-22b(+)

❖ Sistema de expresión mediante el promotor de la fosfatasa alcalina (*phoA*)

El fosfato como ion constituye uno de los nutrientes más esenciales. El fósforo se encuentra en diversas biomoléculas, y tiene un importante papel en las vías de transducción de señales [131]. Su metabolismo se encuentra estrechamente relacionado con otros muy diversos como por ejemplo el de las rutas centrales del metabolismo del carbono [132]. Todas las células vivas regulan sofisticadamente la absorción de fosfato, con el objetivo de poder sobrevivir incluso bajo la condición de limitación de fosfato [133-134]. Cuando los niveles extracelulares de fosfato inorgánicos son bajos, se dispara una cascada de señalización mediante un sistema de traducción de señales la cual activa una cascada de fosforilación, que produce la inducción de muchos genes incluyendo, el gen que codifica la fosfatasa alcalina [133]. El objetivo de la misma es hidrolizar compuestos organofosforados para liberar ortofosfato y de esta manera obtener una fuente de fosfato [135]. La fosfatasa alcalina, no tiene un sustrato específico y se sabe que para su funcionamiento se requiere Zn^{2+} y Mg^{2+} como cofactores enzimáticos.

E. coli contiene aproximadamente 15 mg de fosfato por g (peso celular seco), el mismo puede ser acumulado en la forma de poli fosfatos en el interior de la célula, y a pesar de que se ha informado durante décadas, su papel aún no está claro. Los poli fosfatos han estado siempre implicados en el almacenamiento de energía y como fuente de fosfato dentro de la célula [132].

La región promotora de la fosfatasa alcalina de *E. coli* fue secuenciada y publicada por Y. Kikuchi y col en 1981 [136]. Básicamente se activa cuando el nivel de fosfato

Capítulo 1

inorgánico se encuentra por debajo de un umbral. Este será un punto a determinar en esta tesis. Según algunos autores, para *E. coli* ese valor rondaría los 4 μM . Por debajo de esa concentración, comienza la señalización causando cambios de conformaciones en el sistema compuesto por *PhoR* y *PhoB* (los principales componentes del regulón *Pho*), finalmente *PhoB* actúa como activador de la transcripción para el sistema del promotor de la fosfatasa alcalina [133]. El promotor de la fosfatasa alcalina, al igual que otros, es un promotor nutricional, y podría ser activado en fase estacionaria, algo de esperar que suceda en condiciones de limitación a expensas de haber alcanzado altas densidades celulares y es por ello que tiene un gran potencial en procesos biotecnológicos para la producción de proteínas heterólogas a gran escala. Por otra parte, la inanición de fosfato sería una forma relativamente barata para la inducción, y es por ello que el promotor *phoA* ha sido utilizado en la producción de numerosas proteínas recombinantes.

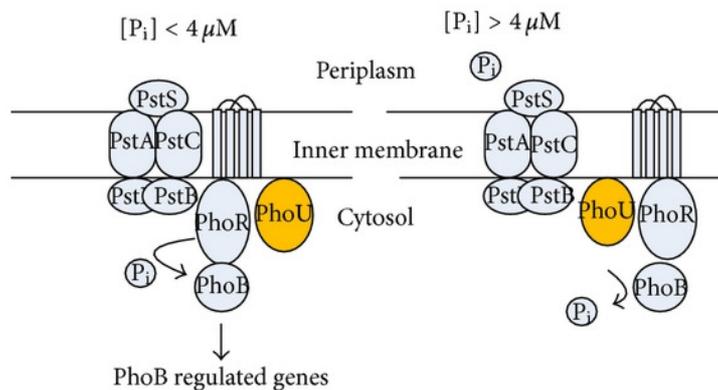


Figura 10 Esquema general de la cascada de activación del promotor de la fosfatasa alcalina. Tomado de [133].

Dentro de este sistema, la producción de una proteína recombinante puede realizarse en forma desnaturalizada mediante la formación de cuerpos de inclusión. Estos agregados proteicos insolubles se generan por un desbalance entre la síntesis de proteína y el proceso de plegado molecular para la obtención de la conformación tridimensional adecuada.

La obtención de cuerpos de inclusión de una proteína de interés presenta dos grandes ventajas de productividad, a saber: (a) se obtienen grandes cantidades de producto, (b) se logra un alto grado de purificación en pocas operaciones unitarias por la separación de la fracción soluble (proteínas y productos celulares) de la fracción insoluble compuesta por los cuerpos de inclusión y (c) los cuerpos de inclusión son resistentes al ataque de proteasas. Sin embargo, para que el producto final (proteína) sea activo, debe

Capítulo 1

poseer la estructura tridimensional adecuada. En el caso de las proteínas, esto significa realizar un proceso de renaturalización. Dentro de este proceso de renaturalización, resulta necesario entre otras cosas, la formación de puentes disulfuro entre residuos de cisteína los cuales existen naturalmente en la estructura natural de la proteína. En general, esta etapa es la limitante del proceso mencionado.

Algunas proteínas expresadas mediante el promotor de la fosfatasa alcalina de <i>E. coli</i>			
Proteína recombinante	Rendimiento (mg/L)	Cepa de <i>E. coli</i>	Autor
Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF)	0.2	C600 (pTA1522)	Oka y col. (1985)
Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF)	1.0	YK537 (pTA1522)	Oka y col. (1985)
Glutación S-transferasa S1 (GST)	12	DH5 α (pBAce)	L.-F. Liu y col. (2002)
Anticuerpo humanizado F(ab') ₂	1000 - 2000	25F2 (pAK19)	Carter P y col. (1992)
Hormona de crecimiento humano (hGH)	25	W3110 (pGH4L)	Chang y col. (1987)
Estimulador de linfocitos B (BLyS)	435	8D1(E. coli K-12 / W3110) (p2615)	Laird MW y col. (2005)
Activador tisular del plasminógeno (IV dominio)	n.d.	E15 (pSA514/F3)	Lübke C y col. (1995)
Hormona adrenocorticotropa (ACTH)	0.5	E15 (pSA186)	Daum, J y col. (1989)
Citocromo P-450 reductasa (hígado de ratón)	47	HB101 (pBAAtCPR)	Hayashi, S y col. (2003)
Ornitina descarboxilasa	15-30	S ϕ 606 (pBAce)	Craig y col. (1991)
Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	55-64	S ϕ 606 (pBAce)	Wang, C.C y col. (1991)
Adenosina Quinasa	20	RH (pBAce)	Roos, D.S y col. (1999)
HO-1 (hemo oxigenasa 1 humana)	35	DH5 α F' (pBAce)	Montellano, P.R.O y col. (1995)
rHO-1	13-30	JM109 (pBAce)	Noguchi. M y col. (1996;1998)
α -Amilasa de <i>Bacillus subtilis</i>	n.d	K12 LE392 (lac+) (pAMYA)	K.I. Tachibana y col. (1987)
Palidipina de <i>Triatoma pallidipennis</i>	0.08 - 0.86	E15 (pSB/pho) BL20 (pKK/cph)	B. Haendler y col. (1995)
Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF)	332	YK537 (pAET-8)	Y. Wang y col. (2005)
Factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF)	78.7-765	DA19 (pAET8)	Han Yun y col. (2007)
Activador tisular del plasminógeno	0.18	SF110 (pAP-stII-tPA)	Qiu y col. (1998)
Hormona de crecimiento	11	294 (pGH507)	Chang y col. (1985)

Capítulo 1

humano (hGH)			
Enterotoxina resistente al calor (tipo II)	400	27C7 (phGHI)	Simmons L C y col. (1996)
Endostatina humana	40	YK537 (pENM)	Xu R, y col. (2002)
Interferon α -Humano	n.d	C600 (pTA1504)	T. Miyake y col. (1985)
Angiostatina humana (K1-4)	Esta tesis.	BL21(DE3)	Esta tesis.
Angiostatina humana (K1-4)	Esta tesis.	DH5 α	Esta tesis.

Tabla. 5 Algunas proteínas expresadas empleando el promotor de la fosfatasa alcalina. Tomado de [133].

1.5.3 Factores que limitan la expresión en *Escherichia coli*.

Como se mencionó anteriormente, hasta la fecha *E. coli* sigue siendo el sistema de expresión más importante para la expresión de proteínas heterólogas. Para la producción a gran escala, los cultivos de *E. coli* de alta densidad celular, han sido objeto de numerosos estudios desde principios de 1970. Las investigaciones se han centrado en la mejora de las técnicas de cultivo, la manipulación de la fisiología de la bacteria (relación hospedador/DNA foráneo) o ambos. Estas estrategias de crecimiento, junto con la optimización de la composición del medio y la aplicación de métodos de biología molecular, hacen posible el cultivo de *E. coli* a densidades celulares de hasta 190 g/L (peso seco).

Sin embargo, la fuerte expresión de proteínas recombinantes en bacterias afecta el metabolismo de carbono y de energía lo que resulta en la inhibición del crecimiento y la formación de ácidos orgánicos. La producción de acetato bajo condiciones aeróbicas es un problema constante en los cultivos de *E. coli*. La producción de acetato es indeseable ya que representa un derroche de fuente de carbono, afecta el pH y el gradiente de protones transmembrana, entre otros efectos [137]. Uno de ellos es la disminución de copias de plásmido como muestra la figura 11, evidenciando por tanto una merma en el rendimiento de la producción de la proteína de interés, debido a la acumulación de acetato en el medio [138].

Capítulo 1

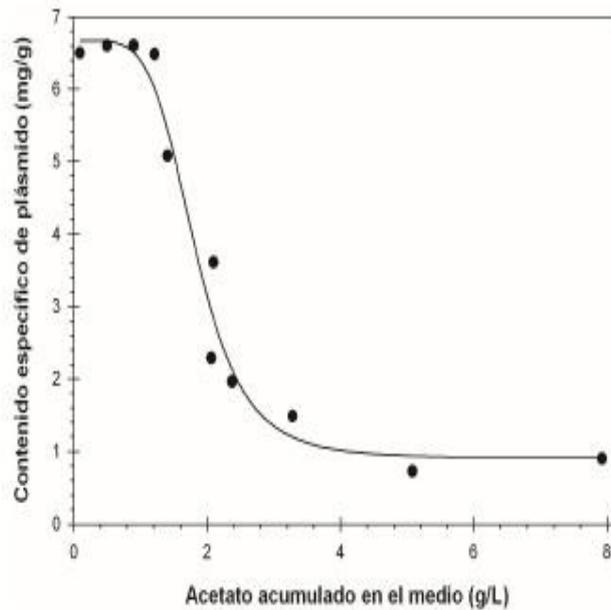


Figura 11 Contenido específico de plásmido en función del acetato acumulado en un cultivo de *E. coli* en batch bajo condiciones aeróbicas y a pH constante. Tomado de A. Lara, 2011

La producción de acetato bajo condiciones aeróbicas se atribuye a un desbalance entre los flujos de carbono proveniente de glucosa (la cual es transportada a través del sistema de fosfotransferasa) en la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo que conduce a una acumulación de acetil coenzima A, la cual se transforma a acetato que se transporta hacia afuera de la célula [138]. En la figura 12 pueden verse detalles de estos procesos metabólicos.

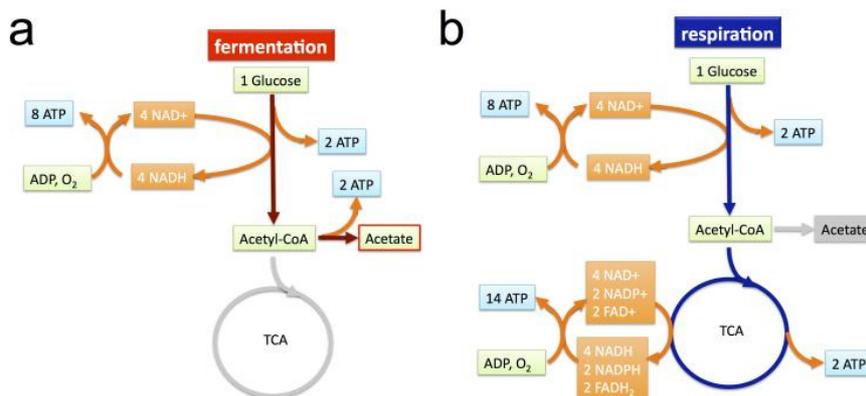


Figura 12: Vías de formación general de acetato fermentación (oxidativa), a y respiración, b. Tomado de Basan, 2015.

Este fenómeno de producción de acetato es conocido como sobre flujo metabólico. Aunque este fenómeno es bien conocido sus mecanismos de regulación aún no están claros y dependen del microorganismo hospedador. Una manera de evitar el sobre flujo

Capítulo 1

metabólico es restringir la velocidad de consumo de glucosa mediante la adición controlada de una solución concentrada al biorreactor. Esto puede hacerse mediante esquemas de alimentación constante, alimentación con incremento lineal, con incremento exponencial, o empleando algoritmos de control más sofisticados para controlar el consumo mediante efectos indirectos del metabolismo, como la variación de la tensión de oxígeno disuelto (DOT) o el pH.

La expresión de una proteína recombinante en una célula huésped utiliza una cantidad significativa de recursos, la eliminación de esos recursos del metabolismo eleva la carga metabólica, alterando dramáticamente la bioquímica y la fisiología del hospedador.

❖ **Causas de la carga metabólica**

Los primeros experimentos de ingeniería genética tendían a ser considerados exitosos una vez que se obtuviera un nivel aceptable de expresión del gen introducido. Sin embargo, esta perspectiva, en su mayor parte, ignora cualquier cambio fisiológico del organismo huésped que pudiera producirse como consecuencia de la introducción del DNA extraño. Actualmente, se sabe que la introducción y la expresión de DNA foráneo cambian el metabolismo de ese organismo en formas que pueden deteriorar el funcionamiento metabólico normal del organismo. Estos cambios se producen como consecuencia de la "carga metabólica" que se impone sobre el hospedador por el DNA que se ha introducido. La carga metabólica se puede definir como la porción de los recursos de la célula huésped - ya sean en la forma de energía tales como ATP o GTP, o materias primas tales como aminoácidos - que se requiere para mantener y expresar DNA extraño, ya sea como RNA o proteína, en la célula. Hay una variedad de razones por la introducción de DNA extraño en una célula huésped puede conducir a la imposición de una carga metabólica [139-140]. Por ejemplo, se requiere una cierta cantidad de energía celular para mantener la presencia del DNA exógeno recién introducido en una célula huésped, en donde el aumento del tamaño de plásmido requiere cantidades cada vez mayores de energía celular [141-143], por tanto se ha encontrado que al aumentar el tamaño del plásmido, la carga metabólica tiende a aumentar, como así también con el incremento del número de copias. Cuanto mayor sea el plásmido o el número de copias del plásmido, mayor es la cantidad de energía requerida para mantener que el DNA dentro de la célula huésped, y por lo tanto menor será la tasa de crecimiento específico relativo y el nivel de expresión de genes foráneos por plásmido [144-145].

Capítulo 1

La cantidad de oxígeno disuelto en el medio de crecimiento es a menudo insuficiente para tanto el metabolismo óptimo de la célula huésped, el mantenimiento del plásmido y la expresión [146-147]. Se observó que, siempre y cuando el medio de crecimiento celular contenga suficiente oxígeno disuelto, las células huésped de *E. coli* mantienen establemente un plásmido que expresa resistencia a ampicilina y tetraciclina, incluso en ausencia de cualquier presión selectiva [146]. Sin embargo, en cultivos en los cuales el nivel de oxígeno disuelto se reduce rápidamente, el número de células que contienen el plásmido se puede reducir incluso a menos del 1% de la población celular, incluso cuando la ampicilina estaba presente en el medio. Es bien sabido que es difícil de mantener un nivel elevado y uniforme de oxígeno disuelto a lo largo de un cultivo a gran escala, y pueden existir limitaciones de oxígeno transitoriamente a lo largo del mismo [147]. Cuando esto sucede, el plásmido introducido puede llegar a ser inestable reduciendo así el rendimiento de la proteína de interés. Esta es una consideración importante cuando i) el cultivo es grande y no puede ser mezclado de manera eficiente para proporcionar suficiente oxígeno a todas las células, especialmente a altas densidades o ii) la fermentación se lleva a cabo en forma de cultivo continuo y existe la posibilidad de que las células libres de plásmido pueden eventualmente dominar el cultivo.

La biosíntesis de proteínas es el proceso energéticamente más caro. Por ejemplo, varias moléculas de GTP se consumen para cada aminoácido que se agrega a una cadena peptídica en crecimiento y una molécula de ATP se hidroliza para cada aminoacil-tRNA que se forma. Por lo tanto, no es sorprendente que la sobreproducción de uno o más proteínas extrañas codificadas dentro del DNA introducido en la célula huésped deberían ser un debilitante de la célula huésped [148-149]. La sobreproducción de proteínas recombinantes puede causar una carga metabólica en la célula huésped, ya sea por el agotamiento de las reservas de algún aminoacil-RNA_t determinado (o incluso ciertos aminoácidos) o por una combinación de ambos, y a su vez por los factores antes mencionados.

La magnitud de la carga metabólica causada por la sobreproducción de una proteína depende de la medida en que la proteína recombinante se produce en exceso, el número de copias y el tamaño del vector de expresión, el estado metabólico de la célula, la composición del medio de cultivo y la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de crecimiento. Por definición, la expresión de cualquier proteína extraña en una célula

Capítulo 1

huésped utilizará parte de la energía y los recursos de la misma y por lo tanto causar cierta carga metabólica.

A pesar de que no entra en la definición antes mencionada, las actividades enzimáticas o las propiedades físicas de algunas proteínas pueden interferir con el funcionamiento de la célula huésped, por ejemplo mediante la conversión de un intermediario metabólico importante y necesario en un compuesto que es irrelevante, o incluso tóxico, para la célula [155-156].

❖ Los cambios fisiológicos a la célula huésped

La imposición de una carga metabólica puede causar una variedad de cambios en la fisiología y el funcionamiento de la célula huésped. Uno de los cambios más comúnmente observado es una disminución en la tasa de crecimiento de las células [157-158]. La carga metabólica hace que las células huésped portadoras del plásmido crezcan más lentamente que las células huésped no transformadas, también puede causar, en ausencia de presión selectiva, y que el plásmido introducido se pierda rápidamente [157] [159]. Cuando esto sucede, las células libre de plásmido compiten junto con las células que lo contienen con la consecuente disminución en la cantidad de plásmido codificada proteínas (objetivo) que se produce [160-161].

Dado que las células que crecen en presencia de una carga metabólica generalmente tienen un menor nivel de energía disponible para una variedad de funciones celulares, los procesos metabólicos intensivos en consumo de energía de la célula son, invariablemente, una de las primeras cosas que se verán afectados negativamente por una alta carga metabólica.

La mayoría, si no todos, los organismos tienen un mecanismo bioquímico que ayuda de manera coordinada hacer frente a una variedad de condiciones ambientales adversas, como puede ser la respuesta al choque térmico [162].

Generalmente cuando un sistema comienza a sobrellevar la carga metabólica las respuestas comienzan a ser muy diversas como la aparición de la respuesta de choque térmico, activando la síntesis de proteasas celulares. Otros fenómenos que suelen aparecer son las señales debido a el agotamiento de los nutrientes, o el agotamiento temporal de "bloques de construcción", tales como aminoácidos, que resulta del alto nivel de expresión de una proteína extraña [163]. Tal agotamiento de aminoácidos se puede producir como consecuencia simplemente de la síntesis de genes de resistencia a antibióticos codificados en el plásmido [163].

Capítulo 1

Los codones a utilizar, que dependen de la naturaleza del gen introducido, pueden no ser los mismos que los codones utilizados para sintetizar otras proteínas celulares [160]. El resultado neto es la inducción de la respuesta de choque térmico de la célula huésped con lo cual la proteína recombinante puede ser rápidamente degradada por las proteasas de la célula huésped.

❖ **Estrategias para evitar problemas asociados con carga metabólica.**

Una estrategia simple para disminuir la magnitud de la carga metabólica en una célula huésped es utilizar, vectores con bajo número de copias, en lugar de elevado número de copia [165].

Como se menciona, la expresión de muchos genes marcadores de resistencia a antibióticos junto con el gen foráneo en el vector plásmido es una de las principales causas de una carga metabólica. [164]. La estrategia de utilizar promotores fuertes y constitutivos, o por periodos prolongados desacoplados del crecimiento casi siempre resulta debilitante y, a veces letal – para el hospedador [166-167]. Los altos niveles de expresión podrían ser alcanzables a través del uso de promotores fuertes, pero regulables [153] [165] [168-169].

En el caso de una eventual estrategia de producción, el cultivo puede llevarse a cabo en dos etapas. Durante la primera, la etapa de crecimiento, el promotor que controla la transcripción del gen es "desactivado" bien sea por ausencia de inductor, bien sea por presencia de un represor. Durante la segunda, la etapa de inducción, el promotor es activado cambiando las condiciones del cultivo [171]. Esta estrategia puede ser eficaz en la reducción de la carga metabólica durante la primera fase de la fermentación [172]. A menudo es difícil de lograr altos niveles de expresión de genes foráneos y una alta densidad celular al mismo tiempo. Como se mencionó es así debido a la acumulación de productos de desecho nocivos, especialmente el de acetato, que puede inhibir tanto el crecimiento celular y la producción de proteínas.

Existen distintos sistemas apropiados para cultivar microorganismos. Para este fin se utilizará como sistema de producción el cultivo batch alimentado, el que ha demostrado ser el más apropiado para obtener proteínas recombinantes [137]. En este tipo de cultivo la alimentación puede diseñarse de acuerdo a ciertas pautas o bien puede controlarse automáticamente en función de alguna variable del cultivo, como el oxígeno disuelto o la concentración de fuente de carbono, entre otras, lo que le confiere una gran

Capítulo 1

versatilidad. En particular este sistema permite obtener grandes cantidades de biomasa, por lo que también se le conoce como cultivo de alta densidad.

Uno de los factores más importantes para la obtención de proteínas recombinantes es controlar la velocidad específica de crecimiento (μ) tanto para evitar el metabolismo de sobreflujo [4] como para permitir un correcto plegamiento de la proteína. Hellmuth y colaboradores [172] encontraron que la producción de aprotinina : : β -galactosidasa, una proteína de fusión, fue independiente del valor de μ , mientras que la actividad específica fue máxima a valores de $\mu = 0.13 \text{ h}^{-1}$, resultado que sugiere que el plegado fue dependiente de μ .

Finalmente uno de los aspectos a mencionar es la proteólisis puede ser otra de las razones para una escasa producción de proteínas recombinantes *E. coli*. La proteólisis tiene, desde el punto de vista fisiológico, dos finalidades, la primera es la inactivación de proteínas reguladoras de vida media corta y la segunda la degradación de proteínas incorrectamente sintetizadas o mal plegadas [173], que carecen de función biológica y eventualmente pueden ser tóxicas para la célula [174].

1.6 Bibliografía

- [1] O' Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. 1994. *Cell*; 79: 315-328.
- [2] Hoffman BJ, Broadwater JA, Johnson P, Harper J, Fox BG, Kenealy WR: Lactose fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3): process control yielding high levels of metal-incorporated, soluble protein. 1995. *Protein Expr. Purif*, 6: 646-654.
- [3] Neubauer P, Hofmann K: Efficient use of lactose for the lac promoter-controlled overexpression of the main antigenic protein of the foot and mouth disease virus in *Escherichia coli* under fed-batch fermentation conditions. 1994. *FEMS Microbiol Rev*. 14: 99-102.

Capítulo 1

- [4] L. Yee, H. W. Blanch: Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. 1993. *Biotechnology and Bioengineering*, 41 (8): 781-790.
- [5] Stouthamer, A.H. and van Verseveld, H.W.: Microbial energetics should be considered in manipulating metabolism for biotechnological purposes. 1987. *TIBTECH* 5: 149-155.
- [6] S.K. Bhattacharya, A. K. Dubey: Metabolic Burden as Reflected by Maintenance Coefficient of Recombinant *Escherichia coli* Overexpressing Target Gene. 1995. *Biotechnology Letters*, 17 (11): 1155-1160.
- [7] Sauer U, Lasko D. R., Fiaux J., Hochuli M., Glaser R., Szyperski T., Wüthrich K., Bailey J. E.: Metabolic Flux Ratio Analysis of Genetic and Environmental Modulations of *Escherichia coli* Central Carbon Metabolism. 1999, *J. Bacteriol.*, 181(21): 6679–6688.
- [8] Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. 1971, *N. Engle. J. Med.* 285: 1182-6.
- [9] Holash, J., Wiegand S. J. and Yancopoulos G.D. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. 1999, *Oncogene*, 18: 5356-62.
- [10] Yancopoulos, G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J. and Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. 2000, *Nature*, 407: 242-8.
- [11] Baeriswyl V, Christofori G., The angiogenic switch in carcinogenesis. 2009, *Semin. Cancer Biol.* 329-37.
- [12] Hori A., Sasada R., Matsutani E., Naito K., Sakura Y., Fujita T., and Kozai Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. 1991, *Cancer Res.* 51: 6180–6184.
- [13] Ehrmann RL, Knott M. Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. 1968, *J Natl Cancer Inst.*; 41(6):1329-41.
- [14] Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D. W. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. 1991, *Mol. Endocrinol.* 5: 1806-1814.
- [15] Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN and Yancopoulos GD. 1996, *Cell*, 87: 1171–1180.
- [16] In DeVita VT Jr, Hellman S, Rosemberg SA, Weidner N, Folkman J: Tumor vascularity as a prognostic factor in cancer. *Important advances in oncology*, Philadelphia. 1996, Lippincott-Raven.
- [17] Bergers, G. and Benjamin, L.E., Tumorigenesis and the angiogenic switch. 2003, *Nat. Rev. Cancer*, 3 (6): 401-410.
- [18] Gasparini G, Longo R, Toi M, Ferrara N. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. 2005, *Nat Clin Pract Oncol.* 2005, (11):562-77.
- [19] Siemann DW. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. 2011, *Cancer Treat Rev.* 2011 7(1): 63-74.

Capítulo 1

- [20] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. 2005, *Nature* 438: 967–974.
- [21] Hurwitz H. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. 2004, *N Engl J Med* 350: 2335–2342.
- [22] Kabbinavar F, Schulz J, McCleod M. Addition of bevacizumab to bolus 5FU/leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. 2005, *J Clin Oncol*; 23: 3697-705.
- [23] Antiangiogenesis in cancer therapy—endostatin and its mechanisms of action. 2006, *Experimental Cell Research*, 312: 594 – 607
- [24] Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?. 2007, *Nat Rev Drug Discov*; 6: 273-86.
- [25] Wahl M.L., D.J. Kenan, Gonzalez-Gronow, S.V. Pizzo, Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated, *J. Cell. Biochem.* 2005, 96: 242–261.
- [26] J. Folkman, Endogenous angiogenesis inhibitors, *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 2004, 112: 496–507.
- [27] P. Nyberg, L. Xie, R. Kalluri, Endogenous inhibitors of angiogenesis. 2005, *Cancer Res.* 65: 3967–3979.
- [28] Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically indistinguishable from a fragment of thrombospondin. 1990, *Proc Natl Acad Sci. U S A*, 87: 6624-6628.
- [29] O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C.C., and Folkman, J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. 1996, *Nature Med.* 2: 689–692.
- [30] Pike, S. E. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. 1998, *J. Exp. Med.* 188: 2349–2356.
- [31] O'Reilly M., Pirie-Shepherd S., Lane W., Folkman J. Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. 1999. *Science*, 285: 1926-1928.
- [32] Ramchandran R, Dhanabal M, Volk R, Waterman MJ, Segal M, Lu H, Knebelmann B, Sukhatme VP. Antiangiogenic activity of resin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 255: 735–739.
- [33] Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, Maeshima Y, Hopfer H, Takahashi K, Volk R, Zamborsky ED, Herman S, Sarkar PK, Ericksen MB, Dhanabal M, Simons M, Post M, Kufe DW, Weichselbaum RR, Sukhatme VP, Kalluri R. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.* 2000; 60: 2520–2526.
- [34] Kamphaus GD, Colorado PC, Panka DJ, Hopfer H, Ramchandran R, Torre A, Maeshima Y, Mier JW, Sukhatme VP, Kalluri R. Canstatin, A novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. 2000, *J. Biol. Chem.*; 275: 1209–1215.

Capítulo 1

- [35] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, Hopfer H, Xiao Y, Stillman IE, Kalluri R. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. 2000. *J. Biol. Chem.*; 275: 21340–21348.
- [36] Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science*. 1999; 284: 808–812.
- [37] Andreasen, P.A., Egelund, R., Petersen, H.H. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion and metastasis. 2000, *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 25–40.
- [38] Pia Nyberg, Liang Xie, and Raghu Kalluri, Endogenous Inhibitors of Angiogenesis, *Cancer Res.* 2005; 65: (10). 2005: 3967-3979.
- [39] Standker L, Schrader M, Kanse SM, Jurgens M, Forssmann WG, Preissner KT. Isolation and characterization of the circulating form of human endostatin. 1997, *FEBS Let.* 420: 129–133.
- [40] O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. 1997, *EXS.*79: 273–294.
- [41] Mundhenke C, Thomas JP, Wilding G, Lee FT, Kelzc F, Chappell R, Neider R, Sebree LA, Friedl A. Tissue examination to monitor antiangiogenic therapy: A phase I clinical trial with endostatin. 2001, *Clin. Cancer Res.* 7: 3366–3374.
- [42] Moulton KS, Heller E, Konerding MA. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999, 99:1726–32.
- [43] Skovseth D.K, M.J. Veuger, D.R. Sorensen, P.M. De Angelis, G. Haraldsen, Endostatin dramatically inhibits endothelial cell migration, vascular morphogenesis, and perivascular cell recruitment in vivo. 2005, *Blood* 105:1044–1051.
- [44] Eder JP Jr, Supko JG, Clark JW, Puchalski TA, Garcia-Carbonero R, Ryan DP, Shulman LN, Proper J, Kirvan M, Rattner B. Phase I clinical trial of recombinant human endostatin administered as a short intravenous infusion repeated daily. *J. Clin. Oncol.* 2002; 20: 3772–3784.
- [45] Thomas JP, Arzoomanian RZ, Alberti D, Marnocha R, Lee F, Friedl A, Tutsch K, Dresen A, Geiger P, Pluda J. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 223–231.
- [46] Clamp AR, Jayson GC. The clinical potential of antiangiogenic fragments of extracellular matrix proteins. *Br J Cancer.* 2005; 93: 967–972.
- [47] Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE. Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat.* 2005; 8: 59–74.
- [48] Ling Y, Yang Y, Lu N. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells. 2007, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 361: 79-84.

Capítulo 1

- [49] Lee TY, Tjin Tham Sjin RM, Movahedi S, Ahmed B, Pravda EA, Lo KM, Gillies SD, Folkman J, Javaherian K. Linking antibody Fc domain to endostatin significantly improves endostatin half-life and efficacy. 2008, *Clin. Cancer Res.*; 14:1487–1493.
- [50] Javaherian, K., Lee, T., Sjin, R., Parris, G. and Hlatky, L. Two Endogenous Antiangiogenic Inhibitors, Endostatin and Angiostatin, Demonstrate Biphasic Curves in Their Antitumor Profiles. 2010, *Dose-Response*, 9(3) 369-376.
- [51] Xu X, Mao W, Chen Q. Endostar, a modified recombinant human endostatin, suppresses angiogenesis through inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *PLoS ONE*. 2014; 9(9): e107463.
- [52] Jia H, Kling J. China offers alternative gateway for experimental drugs. 2006, *Nat Biotechnol* 24: 117–118.
- [53] Mohajeri A, Sarvin Sanaei, Farhad Kiafar, Amir Fattahi, Majid Khalili, Nosratollah Zarghami. The Challenges of Recombinant Endostatin in Clinical Application: Focus on the Different Expression Systems and Molecular Bioengineering. *Adv Pharm Bull*, 2017, 7(1), 21-34.
- [54] Ling Y, Yang Y, Lu N, You QD, Wang S. Endostar, a novel recombinant human endostatin, exerts antiangiogenic effect via blocking VEGF-induced tyrosine phosphorylation of KDR/Flk-1 of endothelial cells. 2007, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361: 79–84.
- [55] Ling Y, Lu N, Gao Y, Chen Y, Wang S. Endostar induces apoptotic effects in HUVECs through activation of caspase-3 and decrease of Bcl-2. 2009, *Anticancer Res* 29: 411– 417.
- [55a] Ling Y, Yang Y, Lu N, You QD, Wang S. Endostar Suppresses Invasion Through Downregulating the Expression of Matrix Metalloproteinase-2/9 in MDA-MB-435 Human Breast Cancer Cells. *Exp Biol Med (Maywood)* (2008) 233(8):1013–20.
- [56] Sugarbaker EV, Thornthwaite J, Ketchan AS. Inhibitory effect of a primary tumor on metastasis. In: DAY SB, Myers WPL, Stansly P, Gerattini S, Lewis MG, 1977. *Progress in Cancer Research and Therapy*, Raven Press, New York: 227–240.
- [57] Lange PH, Hekmat K, Bosl G, Kennedy BJ, Fraley EE. Accelerated growth of testicular cancer after cytoreductive surgery. 1980, *Cancer*; 45: 1498–1506.
- [58] Marie P, Clunet J. Fréquence des métastases viscérales chez les souris cancéreuses après ablation chirurgicale de leur tumeur. 1910, *Bull Assoc Franç l'Etude Cancer*; 3:19–23.
- [59] Bonfil RD, Ruggiero RA, Bustuoabad OD, Meiss RP, Pasqualini CD. Role of concomitant resistance in the development of murine lung metastases. 1988, *Int J Cancer*; 41: 415–422.
- [60] Prehn RT. Two competing influences that may explain concomitant tumor resistance. 1993, *Cancer Res*; 53: 3266–3269.
- [61] O'Reilly M, Rosenthal R, Sage EH, Smith S, Holmgren L, Moses M, Shing Y, Folkman J. The suppression of tumor metastases by a primary tumor. 1993, *Surg Forum*; XLIV: 474–476.

Capítulo 1

- [62] Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J. Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. 1998, *Proc Natl Acad Sci USA.*; 95: 5579–558.
- [63] Booth NA, Bachmann F. Plasminogen-plasmin system. In: Coleman RW, Marder VJ, Clowes AW, George JN, Goldhaber SZ, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 2006. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. 335–64.
- [64] Greer, J. P., *Wintrobe's clinical hematology*. Clinical hematology, 13th edition. 2014, ISBN: 9781451172683; Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins Health.
- [65] Gately S, Twardowski P, Stack MS, Patrick M, Boggio L, Cundiff DL, Schnaper HW, Madison L, Volpert O, Bouck N, Enghild J, Kwaan HC, Soff GA. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. 1996, *Cancer Res.* 56: 4887–4890.
- [66] Lay AJ, Jiang XM, Kisker O, Flynn E, Underwood A, Condrón R, Hogg PJ. Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature*. 2000, 408: 869–873.
- [67] Wahl ML, Kenan DJ, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. 2005, *J Cell Biochem.* 96: 242–261.
- [68] Cao Y., Richard W. J, Don Davidson, Johann Schaller, Daniel Marti, Sabine Söhndel, Stephen G. McCance, Michael S. O'Reilly, Miguel Llinás and Judah Folkman. kringle domains of human angiostatin: characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. 1996, *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 29461-29467.
- [69] Cao Y, Xue L. Angiostatin. *Semin Thromb Hemost.* 2004; 30: 83-93.
- [70] Geiger J. H, Cnudde S. E, What the structure of angiostatin may tell us about its mechanism of action. *J Thromb Haemost.* 2004; 2: 23-24.
- [71] Wahl M. L, Kenan D. J, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. 2005, *J Cell Biochem.* 96 (2): 242-61.
- [72] Moser TL, Stack MS, Asplin I, Enghild JJ, Hojrup P, Everitt L, Hubchak S, Schnaper HW, Pizzo SV. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. 1999, *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.*; 96: 2811–2816.
- [73] Moser TL, Kenan DJ, Ashley TA, Roy JA, Goodman MD, Misra UK, Cheek DJ, Pizzo SV. Endothelial cell surface F1F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 98: 6656–6661.
- [74] Arakaki N, Nagao T, Niki R, Toyofuku A, Tanaka H, Kuramoto Y, Emoto Y, Shibata H, Magota K, Higuti T. Possible role of cell surface H⁺ ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. 2003, *Mol. Cancer Res.*; 1: 931–939.
- [75] Wahl ML, Owen CS, Grant DS. Angiostatin induces intracellular acidosis and anoikis in endothelial cells at a tumor-like low pH. 2002, *Endothelium*, 9: 205–216.

Capítulo 1

- [76] Chi SL, Wahl ML, Mowery YM, Shan S, Mukhopadhyay S, Hilderbrand SC, Kenan DJ, Lipes BD, Johnson CE, Marusich MF, Capaldi RA, Dewhirst MW, Pizzo SV. Angiostatin-like activity of a monoclonal antibody to the catalytic subunit of F1F0 ATP synthase. 2007, *Cancer Res.*, 67: 4716–4724.
- [77] Yamagata M, Tannock IF. The chronic administration of drugs that inhibit the regulation of intracellular pH: in vitro and antitumour effects. 1996, *Br. J. Cancer.* 73: 1328–1334.
- [78] Troyanovsky B, Levchenko T, Mansson G, Matvijenko O, Holmgren L. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. 2001, *J Cell Biol.*; 152: 1247–1254.
- [79] Levchenko T, Aase K, Troyanovsky B, Bratt A, Holmgren L. Loss of responsiveness to chemotactic factors by deletion of the C-terminal protein interaction site of angiomotin. 2003, *J Cell Sci.*; 116: 3803–3810.
- [80] Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha (v) beta (3) in endothelial cells. 2001, *J Biol Chem.*; 276: 39562–39568.
- [81] Gonzalez-Gronow M, Grenett HE, Gawdi G, Pizzo SV. Angiostatin directly inhibits human prostate tumor cell invasion by blocking plasminogen binding to its cellular receptor, CD26. 2005, *Exp Cell Res.*; 303: 22–31.
- [82] Tarui T, Miles LA, Takada Y. Specific interaction of angiostatin with integrin alpha(v) beta (3) in endothelial cells. 2001, *J Biol. Chem.*; 276 (43): 39562-8.
- [83] Tarui T, Majumdar M, Miles LA, RUF W, Takada Y. Plasmin-induced migration of endothelial cells: A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. 2002, *J. Biol. Chem.*; 277: 33564–33570.
- [84] Wajih N and Sane DC. Angiostatin selectively inhibits signaling by hepatocyte growth factor in endothelial and smooth muscle cells. 2003, *Blood* 101: 1857-1863.
- [85] Goretzki, L., Lombardo, C.R., and Stallcup, W.B. Binding of the NG2 proteoglycan to kringle domains modulates the functional properties of angiostatin and plasminogen. 2000, *J. Biol. Chem.* 275, 28625-28633.
- [86] Tuszynski, G. P., Sharma, M. R. and Rothman, M. C. Angiostatin binds to the tyrosine kinase substrate annexin II through the lysine binding domain in endothelial cells. 2002, *Microvasc. Res.* 64, 448-462.
- [87] Chavakis T, Athanasopoulos A, Rhee JS, Orlova V, Schmidt-Woll T, Bierhaus A, May AE, Celik I, Nawroth PP, and Preissner KT. Angiostatin is a novel anti-inflammatory factor by inhibiting leukocyte recruitment. 2005. *Blood* 105: 1036-1043.
- [88] Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Kumagaya S, Taketani Y, Kamiya A, and Ando J. Involvement of cell surface atp synthase in flow-induced atp release by vascular endothelial cells. 2007, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293: H1646-1653.

Capítulo 1

- [89] Lee TY, Muschal S, Pravda EA, Folkman J, Abdollahi A, Javaherian K. Angiostatin regulates the expression of antiangiogenic and proapoptotic pathways via targeted inhibition of mitochondrial proteins. 2009, *Blood.*; 114: 1987–1998.
- [90] Lee TY, Tjin Tham Sjin RM, Movahedi S, Ahmed B, Pravda EA, Lo KM, Gillies SD, Folkman J, Javaherian K. Linking antibody Fc domain to endostatin significantly improves endostatin half-life and efficacy. 2008, *Clin. Cancer Res.*; 14: 1487–1493.
- [91] Dineen SP, Lynn KD, Holloway SE, Miller AF, Sullivan JP, Shames DS, Beck AW, Barnett CC, Fleming JB, and Brekken RA. Vascular endothelial growth factor receptor 2 mediates macrophage infiltration into orthotopic pancreatic tumors in mice. 2008, *Cancer Res.* 68: 4340-4346.
- [92] Chen P, Huang Y, Bong R, Ding Y, Song N, Wang X, Song X, and Luo Y. Tumor-associated macrophages promote angiogenesis 4 Dose-Response: An International Journal and melanoma growth via adrenomedullin in both paracrine and autocrine manners. 2011, *Clin. Cancer Res.*
- [93] C, Liu B, Dai Z, and Tao Y. Knockdown of VEGF receptor-1 (vegfr-1) impairs macrophage infiltration, angiogenesis and growth of clear cell renal cell carcinoma (crrc). 2011, *Cancer Biol. Ther.* 12.
- [94] Lin SL, Chang FC, Schrimpf C, Chen YT, Wu CF, Wu VC, Chiang WC, Kuhnert F, Kuo CJ, Chen YM, Wu KD, Tsai TJ, and Duffield JS. Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. 2011, *Am. J. Pathol.* 178: 911-923.
- [95] Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, Jakobsson L, Heinolainen K, Tvorogov D, Zheng W, Franco CA, Murtomaki A, Aranda E, Miura N, Yla-Herttuala S, Fruttiger M, Makinen T, Eichmann A, Pollard JW, Gerhardt H, and Alitalo K. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing notch signalling. 2011, *Nat. Cell. Biol.* 13: 1202-1213.
- [96] Aulakh GK, Balachandran Y, Liu L, and Singh B.. Angiostatin inhibits activation and migration of eutrophils. 2014. *Cell. Tissue. Res.* 355: 375-396.
- [97] Jie Ma and David J. Waxman. Combination of Anti-angiogenesis with Chemotherapy for More Effective Cancer Treatment. 2008, *Mol. Cancer Ther.* 7(12): 3670–3684.
- [98] M J Park., 1999. cDNA cloning and expression of angiostatin, an angiogenesis inhibitor, from human liver tissue mRNA. 1999, *J. Korean Cancer Assoc.*; 31(6): 1236-1245.
- [99] Xie JL, Zhou QW, Zhang L, Ye Q, Xin L, Du P, Gan RB. Feeding of mixed-carbon-resource during the expression phase in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* expressing angiostatin. 2003, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 19: 467–470.
- [100] Hou WH, Fang T, Chai YR, Wang TY, Wang JM, Xue LX. Expression of recombinant kringle 1-5 domains of human plasminogen by a prokaryote expression system. *Protein Expr Purif.* 2006 May;47(1):93-8.
- [101] Lin, J., Panigraphy, D., Trinh, L. et al. Production process for recombinant human angiostatin in *Pichia pastoris* . *J Ind Microbiol Biotech* 24, 31–35. 2000.

Capítulo 1

- [102] Weon-Kyoo You, Seung-Ho So, Young-Doug Sohn, Hyosil Lee, Doo-Hong Park, Soo-Il Chung, Kwang-Hoe Chung, Characterization and biological activities of recombinant human plasminogen kringle 1–3 produced in *Escherichia coli*, Protein Expression and Purification, Volume 36, Issue 1, 2004, Pages 1-10, ISSN 1046-5928.
- [103] R. Lucas, L. Holmgren, I. Garcia, B. Jimenez, S.J. Mandriota, F. Borlat, B.K.L. Sim, Z. Wu, G.E. Grau, Y. Shing, G.A. Soff, N. Bouck, M.S. Pepper; Multiple Forms of Angiostatin Induce Apoptosis in Endothelial Cells. Blood 1998; 92 (12): 4730–4741.
- [104] Takehiko Tarui, Lindsey A. Miles, Yoshikazu Takada, Specific Interaction of Angiostatin with Integrin $\alpha\beta 3$ in Endothelial Cells*, Journal of Biological Chemistry, Volume 276, Issue 43, 2001, Pages 39562-39568.
- [105] Xie, J., Zhang, L., Ye, Q. et al. Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources. Biotechnology Letters 25, 173–177. 2003.
- [106] Yang H, Akor C, Dithmar S, Grossniklaus HE. Low dose adjuvant angiostatin decreases hepatic micrometastasis in murine ocular melanoma model. 2004, Mol Vis.; 10 : 987–995.
- [107] Benelli R, Morini M, Brigati C, Noonan DM, Albini A. Angiostatin inhibits extracellular HIV-Tat-induced inflammatory angiogenesis. 2003, Int. J. Oncol. ; 22: 87–91.
- [108] Matsumoto G, Ohmi Y, Shindo J. Angiostatin gene therapy inhibits the growth of murine squamous cell carcinoma in vivo. 2001. Oral Oncol.37: 369–378.
- [109] Visted T, Furmanek T, Sakariassen P, Foegler WB, Sim K, Westphal H, Bjerkvig R, Lund-Johansen M. Prospects for delivery of recombinant angiostatin by cell-encapsulation therapy. 2003, Hum. Gene Ther.;14: 1429–1440.
- [110] Zhang XZ, Cui ZL, Hong Q, Li SP: High-level expression and secretion of methyl parathion hydrolase in *Bacillus subtilis* WB800. 2005, Appl. Environ. Microbiol, 71: 4101-4103.
- [111] Olmos-Soto J, Contreras-Flores R., Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. 2003, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, 62(4): 369-73.
- [112] Jozef Anné, Kristof Vrancken, Lieve Van Mellaert, Jan Van Impe, Kristel Bernaerts. Protein secretion biotechnology in Gram-positive bacteria with special emphasis on *Streptomyces lividans*. 2014, Biochimica et Biophysica Acta 1843, 1750–1761.
- [113] Itaya H, Kikuchi Y. Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by *coryneform* bacteria. 2008, Appl. Microbiol. Biotechnol. 78: 621-625.
- [114] Kikuchi Y, Itaya H, Date M, Matsui K, Wu LF. Production of *Chryseobacterium proteolyticum* protein-glutaminase using the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum*. 2008, Appl. Microbiol. Biotechnol. 78: 67-74.
- [115] Schmidt F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. Applied Microbiology and Biotechnology. 65 (4): 363-372. 2004.

Capítulo 1

- [116] Cregg J. M, Cereghino J. L. , Shi J., Higgins D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. 2000, 16(1): 23-52.
- [117] Sodayer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. 2004, BioDrugs. 18(1): 51-62.
- [118] Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. 1996, Microbiol. Rev. 60(3): 512-38.
- [119] Ji Qiu, James R. Swartz, and G. Georgiou. Expression of Active Human Tissue-Type Plasminogen Activator in *Escherichia coli*. 1998, Appl. Environ. Microbiol. 64 (12): 4891–4896.
- [120] Bardwell J C. Building bridges: disulphide bond formation in the cell. 1994, Mol. Microbiol. ; 14: 199–205.
- [121] Georgiou G, Valax P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. 1996, Curr. Opin. Biotechnol.;7 :190–197.
- [122] Gustafson M E, Junger K D, Wun T C, Foy B A, Diaz-Collier J A, Welsch D J, Obukowicz M G, Bishop B F, Bild G S, Leimgruber R M, Palmier M O, Matthews B K, Joy W D, Frazier R B, Galluppi G R, Grabner R W. Renaturation and purification of human tissue factor pathway inhibitor expressed in recombinant *Escherichia coli*. 1994, Protein Expr. Purif. 5: 233–241.
- [123] Hockney R C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. 1994, Trends Biotechnol.; 12: 456–463.
- [124] Joly J C, Swartz J R. Protein folding activities of *Escherichia coli* protein disulfide isomerase. 1994, Biochemistry. 33: 4231–4236.
- [125] Lu H S, Hsu Y R, Lu L I, Ruff D, Lyons D, Lin F K. Isolation and characterization of human tissue kallikrein produced in *Escherichia coli*: biochemical comparison to the enzymatically inactive prokallikrein and methionyl kallikrein. Protein. Exp. Purif. 1996; 8: 215–226.
- [126] Obukowicz M G, Gustafson M E, Junger K D, Leimgruber R M, Wittwer A J, Wun T C, Warren T G, Bishop B F, Mathis K J, McPherson D T, Siegel N R, Jennings M G, Brightwell B B, Diaz-Collier J A, Bell L D, Craik C S, Tacon W C. Secretion of active kringle-2-serine protease in *Escherichia coli*. 1990, Biochemistry. 29: 9737–9745.
- [127] Ostermeier M, Georgiou G. The folding of bovine pancreatic trypsin inhibitor in the *Escherichia coli* periplasm. 1994, J. Biol. Chem.; 269: 21072–21077.
- [128] Rudolph R, Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins. 1996, FASEB J.; 10: 49–56.
- [129] Wunderlich M, Glockshuber R. In vivo control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). 1993, J. Biol. Chem.; 268: 24547–24550.
- [130] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. 1999, Current Opinion in Biotechnology, 10: 411-421.

Capítulo 1

- [131] Wanner B. L., Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon, in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology, F. C. Neidhardt, I. I. I. Curtiss R, J. L. Ingraham. 1996, Eds. ASM Press 1357–1381.
- [132] T. Ishige, M. Krause, M. Bott, V. F. Wendisch, H. Sahm, The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. 2003, Journal of Bacteriology, vol. 185, no. 15, 4519–4529.
- [133] Van Dien S. J. and Keasling J. D. A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response. 1998, Journal of Theoretical Biology, vol. 190. 1, 37–49.
- [134] J. H. Baek and S. Y. Lee Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. 2006, FEMS Microbiology Letters, vol. 264, no. 1, pp. 104–109.
- [135] Wendisch V. F. Genetic regulation of *Corynebacterium glutamicum* metabolism. 2006, Journal of Microbiology and Biotechnology, vol. 16, 7; 999–1009.
- [136] Y Kikuchi, K Yoda, M Yamasaki, and G Tamura. The nucleotide sequence of the promoter and the amino-terminal region of alkaline phosphatase structural gene (*phoA*) of *Escherichia coli*. 1981, Nucleic Acids Res. 9(21): 5671–5678.
- [137] RiesenberG D and Guthke R. High – cell – density cultivation of microorganisms. 1999, Applied Microbiology and Biotechnology. 51: 422 – 430.
- [138] De Anda R, Lara AR, Hernández V, Hernández-Montalvo V, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT. Replacement of the glucose phosphotransferase transport system by galactose permease reduces acetate accumulation and improves process performance of *Escherichia coli* for recombinant protein production without impairment of growth rate. 2006, Metab. Eng. 8(3): 281-90.
- [139] Hoffmann F, Rinas U. Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. 2004, Adv. Biochem. Engin/Biotechnol, 89: 73–92.
- [140] Glick B. Metabolic Load and Heterologous Gene Expression. Biotechnology Advances. 1995, Vol. 13, No. 2, pp. 247-261.
- [141] Cheah, U.E., Weigand, W. and Stark, B.C. Effects of recombinant plasmid size on cellular processes in *Escherichia coli*. 1987, Plasmid 18: 127-134.
- [142] Ryan, W., Parulekar, S.J. and Starl, BC. Expression of β -lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes - Effects of pH, phosphate, and dissolved oxygen. 1989, Biotechnol. Bioeng. 34: 309-319.
- [143] Khosravi, M., Ryan, W., Webster, D.A. and Stark, B.C. Variation of oxygen requirement with plasmid size in recombinant *Escherichia coli*. 1990, Plasmid 23: 138-143.
- [144] Seo JH, Bailey JE. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. 1985, Biotechnol. Bioeng. 27(12): 1668-74.

Capítulo 1

- [145] Birnbaum, S. and Bailey, J.E. Plasmid presence changes the relative levels of many host cell proteins and ribosome components in recombinant *Escherichia coli*. 1991, *Biotechnol. Bioeng.* 37: 736-745.
- [146] Hopkins, DJ. Betenbaugh, M.J. and Dhurjati, P. Effects of dissolved oxygen shock on the stability of recombinant *Escherichia coli* containing plasmid pKN401. 1987, *Biotechnol. Bioeng.* 29: 85-91.
- [147] White, M.D., Glick, B.R. and Robinson, C.W. 1994. Bacterial yeast and fungal cultures: The effect of microorganism type and culture characteristics on bioreactor design and operation, pp. 1-34. In *Bioreactor System Design*, J.A. Asenjo and J. Merchuk (eds.), Marcel Dekker, Inc., New York.
- [148] Lee, S. W. and Edlin, G. Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. 1985, *Gene* 39: 173-180.
- [149] Bentley, W. E., Mirjalili, N., Andersen, D. C., Davis, R. H. and Kompala, D. S. Plasmid-encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. 1990, *Biotechnol. Bioeng.* 35: 668-681.
- [150] Katayama, T. and Nagata, T. Inhibition of cell growth and stable DNA replication by overexpression of the bla gene of plasmid pBR322 in *Escherichia coli*. 1990. *Molec. Gen. Genet.* 223: 353-360.
- [151] Wood, T.K. and Peretti, S.W. Effect of chemically-induced cloned-gene expression on protein synthesis in *E. coli*. 1991, *Biotechnol. Bioeng.* 38: 397-412.
- [152] Diaz-Ricci, J.C., Tsu, M. and Bailey, J.E. Influence of expression of the pet operon on intracellular metabolic fluxes of *Escherichia coli*. 1992, *Biotechnol. Bioeng.* 39: 59-65.
- [153] Kaprálek, F. and Jěcmen, P. The structural stability of an expression plasmid bearing a heterologous cloned gene depends on whether this gene is expressed or not. 1992, *Biotechnol. Lett.* 14: 251-256.
- [154] Hong, Y., Pasternak, J.J. and Glick, B.R. Transformation of the plant growth promoting *rhizobacterium Pseudomonas putida* GR12-2 with an exogenous β -glucosidase gene. 1995, *Can. J. Microbiol.*, in press.
- [155] Harrington, T.R., Glick, B.R. and Lem, N.W. Molecular cloning of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene of *Anabaena variabilis*. 1986, *Gene* 45: 113-116.
- [156] Sano, T. and Cantor, C.R. Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*. 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 87: 142-146.
- [157] Summers, D.K. The kinetics of plasmid loss. *Trends Biotechnol.* 1991, 9: 273-278.
- [158] Hong, Y., Pasternak, JJ. and Glick, B.R. Biological consequences of plasmid transformation of the plant growth promoting *rhizobacterium Pseudomonas putida* GR12-2. 1991a. *Can. J. Microbiol.* 37: 796-799.
- [159] Kyslik, P., Dobisova, M., Maresova, H. and Sobotkova, L. Plasmid burden in chemostat culture of *Escherichia coli*: Its effect on the selection for overproducers of host enzymes. 1993, *Biotechnol. Bioeng.* 41: 325-329.

Capítulo 1

- [160] Austin, S.J. Plasmid partition. 1988, *Plasmid* 20: 1-9.
- [161] Togna, A.P., Shuler, M.L. and Wilson, D.B. Effects of plasmid copy number and runaway plasmid replication on overproduction and excretion of β -lactamase from *Escherichia coli*. 1993, *Biotechnol. Prog.* 9: 31-39.
- [162] Neidhardt, F.C. and VanBogelen, R.A. Heat shock response, pp. 1334-1345. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, vol. 2, 1987, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- [163] Harcum, S.W. and Bentley, W.E. Response dynamics of 26-, 34-, 39-, 54-, and 80-kDa proteases in induced cultures of recombinant *Escherichia coli*. 1993, *Biotechnol. Bioeng.* 42: 675-685.
- [164] Ernst, J.F. Codon usage and gene expression. 1988, *Trends Biotechnol.* 6: 196-199.
- [165] Kumar PKR, Maschke HE, Friehs K, Schugerl K. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. 1991, *Trends Biotechnol.* 9: 279-84.
- [166] Glick, B.R. and Whitney, G.K. Factors affecting the expression of foreign proteins in *Escherichia coli*. 1987, *J. Ind. Microbiol.* 1: 277-282.
- [167] Glick, B.R., Brooks, H.E. and Pasternak, J.J. Physiological effects of plasmid DNA transformation on *Azotobacter vinelandii*. 1986, *Can. J. Microbiol.* 32: 145-148.
- [168] Seigel, R. and Ryu, D.D.Y. Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPLc23trpAI in *E. coli* using two-stage continuous culture system. 1985, *Biotechnol. Bioeng.* 27: 28-33.
- [169] Whitney, G.K., Glick, B.R. and Robinson, C.W. Induction of T4 DNA ligase in a recombinant strain of *Escherichia coli*. 1989, *Biotechnol. Bioeng.* 33: 991-998.
- [170] Park, T.H., Seo, J.H. and Lira, H.C.. Two-stage fermentation with bacteriophage K as an expression vector in *Escherichia coli*. 1991. *Biotechnol. Bioeng.* 37: 297-302.
- [171] Glick BR. Metabolic load and heterologous gene expression. 1995, *Biotechnol. Adv.*; 13 (2): 247-61.
- [172] K. Hellmuth, D.J. Korz, E.A. Sanders, W.D. Deckwer. Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. 1994, *Journal of Biotechnology*, 32(3) 289-298.
- [173] Gottesman S, Maurizi MR. Regulation by proteolysis: energy dependent proteases and their targets. 1992, *Microbiol. Rev.* 56: 592 – 621.
- [174] Maurizi MR. Proteases and protein degradation in *E. coli*. 1992, *Experientia* 48: 178 – 201.
- [175] Van Mellaert L., Anné J. Gram-Positive Bacteria as Host Cells for Heterologous Production of Biopharmaceuticals. In: Van Broekhoven A., Shapiro F., Anné J. (eds) *Novel Frontiers in the Production of Compounds for Biomedical Use*. 2001. *Focus on Biotechnology*, vol 1.

CAPITULO 2:

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis de Trabajo

Específicamente, esta tesis está dirigida a estudiar la producción de angiostatina, como proteína modelo, en cultivos de alta densidad. Para la producción de proteínas recombinantes, el principal desafío radica en maximizar el rendimiento de proteínas biológicamente funcionales. En esta tesis, la producción de angiostatina en *E. coli* se piensa evaluar en dos sistemas de expresión, y determinar cuales son los parámetros (composición de medio de cultivo, evaluación de FCE, determinación de concentraciones de inductor, tiempos y temperaturas de inducción, evaluación de FN, etc.) que optimizan la productividad y ver de qué manera impactan en el proceso de cultivo en dos sistemas de expresión de diferentes forma de inducción (Sección 1.5.2). Como se mencionó, a fin de obtener información sobre el crecimiento de la cepa portadora del gen de la angiostatina y de la cepa salvaje, se realizaran cultivos continuos a distintas velocidades de dilución D . La información obtenida permite realizar un análisis estequiométrico del proceso y, posteriormente, determinar parámetros de crecimiento como el rendimiento máximo en biomasa y el coeficiente de mantenimiento celular, en cada caso, a fin de detectar diferencias, si las hubiera. Por otro lado se puede detectar a que D se comienzan a detectar ácidos orgánicos, tanto en etapa de inducción como en ausencia de inducción, esta información permite asignar μ_{set} a la cual mantener constante en el modo de batch alimentado a caudal exponencial. De esta manera, podría obtenerse información si es que existe una relación entre la μ y la síntesis del producto exógeno, en este caso angiostatina [1]. Si bien es sabido, que en cultivos batch luego de la inducción, la μ varía inversamente con la concentración del inductor (muy común en casos donde la inducción es realizada mediante IPTG) y se alcanza el cese del crecimiento cuando la concentración relativa de la

Capítulo 2

proteína exógena alcanza un 30 % de las proteínas totales [2], no hay evidencias de este comportamiento para el sistema de expresión por depleción de fosfato.

La inhibición del crecimiento es evidente también por descenso de la velocidad de crecimiento acompañado de un incremento de la tasa de producción de CO₂ después de la inducción [3-4]. También puede observarse una deficiencia en la división celular, por ejemplo si se toman células provenientes de un cultivo bajo condiciones de inducción se observan dificultades en su habilidad de formar colonias en agar, en contraste a las células en condiciones de ausencia de inducción [5], fenómeno denominado fenotipo viable pero no cultivable. Estos últimos fenómenos son todos vinculados a los efectos de la carga metabólica [6].

Según la bibliografía (ver Capítulo 1), es sabido que la angiostatina posee al menos trece puentes disulfuro y según estudios en el mismo sistema de expresión con fines de caracterización [7], se demostró que la proteína retiene su actividad luego de solubilizar los cuerpos de inclusión con urea 8 M, de manera que la calidad del producto es una cuestión a estudiar, sobre todo en el sistema de expresión por limitación por fosfato donde la expresión sería más gradual que en el caso de la inducción por IPTG. Se sabe que la inducción mediante IPTG puede favorecer la expresión de las proteínas de choque térmico *IbpA* y *IbpB* y se ha encontrado una fuerte asociación con la producción de cuerpos de inclusión en numerosas proteínas recombinantes.

A la fecha se comercializan varios productos obtenidos mediante esta tecnología como ser factores de crecimiento (GCSF, GMCSF) interferones; etc. Estos ejemplos corresponden a moléculas de gran complejidad estructural, dado a que poseen puentes disulfuro y tienden a formar cuerpos de inclusión, sin embargo, el alto valor agregado de los productos obtenidos y la facilidad de obtener condiciones controladas de cultivo a escala industrial permite obtener un producto apto para su uso terapéutico [8].

La producción de angiostatina mediante el clivaje enzimático del plasminógeno ha demostrado ser dificultosa [9], retrasando las pruebas clínicas. Por tanto, si bien la producción de angiostatina no posee a corto plazo un impacto muy marcado sobre el sector productivo, la obtención de cantidades suficientes del producto biológicamente activo permitiría al menos iniciar los estudios clínicos necesarios. En este sentido, la producción a escala de laboratorio de angiostatina a partir de sistemas de expresión recombinante ofrece

Capítulo 2

una alternativa atractiva para la investigación del producto, y resulta de enorme valor para el desarrollo posterior de terapias antitumorales.

2.2 Objetivos

Esta tesis contempla tres objetivos específicos.

1. *Estudio del efecto de los componentes del medio de cultivo, del tiempo de inducción.*

Se partirá de medios sintéticos como el de Riesenberg [9], estudiando en este caso la concentración inductor necesaria según el caso, (concentración óptima de fosfatos tal que resulte limitante del crecimiento y se evaluará un rango óptimo de IPTG como inductor tal que se obtenga una buena señal de producto, pero que no sea lo suficientemente alto como para exacerbar el estrés celular debido a la expresión heteróloga de angiostatina). Se ajustará la concentración de medio al sistema de cultivo que se utilice, por ejemplo, para estudios en Erlenmeyer, como los que se utilizarán en esta etapa, se utilizará el medio a 1/5 de su concentración original (5 g/L de FCE), esto es a fines de evitar limitación por O₂. Este será el medio de referencia y a partir de él se estudiará:

- a) El tiempo de inducción en medio sintético de referencia.
- b) El efecto de distintas fuentes de carbono y de fuentes de nitrógeno complejas como peptonas o extracto de levadura sobre la producción de angiostatina (se tendrá en cuenta el fosfato que puedan aportar estas fuentes). Obviamente la hipótesis aquí es que la producción de angiostatina depende tanto de la naturaleza de la fuente de carbono como de la de nitrógeno, y que puede haber interacciones entre ellas.
- c) El efecto de la proteólisis: Se realizará sobre un cultivo con el medio seleccionado en el punto anterior.

Capítulo 2

2. Estudio de la cinética del proceso.

La cinética se estudiará empleando cultivo continuo (CC) a distintas velocidades de dilución, tanto en las cepas WT como con las cepas recombinantes obtenidas. Se analizarán los resultados obtenidos bajo dos condiciones:

- a) Limitación por fuente de carbono y energía
- b) Limitación por fosfato.

En las series de experimentos además de medir la angiostatina obtenida, como proteína, por gramo de biomasa, se evaluará de ser posible, la actividad biológica por gramo de biomasa ya que no necesariamente ambos valores podrían correlacionarse.

La información relevante que brindarán estos experimentos será: que limitación es más conveniente, fosfato o fuente de carbono y energía, y a que valor de μ deben hacerse los cultivos. Por otra parte también se obtendrá información sobre el rendimiento celular verdadero y el coeficiente de mantenimiento para esta construcción particular de *E. coli*. Estos parámetros serán necesarios al momento de diseñar la alimentación en los cultivos alimentados. Respecto a lo mencionado en 1.5.3, surge la hipótesis de una probable readaptación metabólica durante la limitación por fosfato, por tanto surge plantear si solo la μ previa a la limitación es la responsable excluyente de la re adaptación en el momento de la inducción de la expresión de angiostatina. Por otro lado permitiría evaluar el costo energético de mantenerse a una determinada μ .

3. Estudios sobre producción de angiostatina en cultivos de alta concentración celular (Alta Densidad).

A partir de la información obtenida en el punto anterior se realizarán cultivos alimentados exponencialmente fijando el valor de μ a un μ_{set} y bajo la limitación que resulte más conveniente según el estudio anterior. En los casos donde se pueda se intentará evaluar la angiostatina producida y la actividad biológica específica.

Capítulo 2

4. *Evaluar un proceso de purificación para la angiotatina para su posterior determinación de actividad biológica.*

2.2.1 Objetivos Particulares

Objetivo 1:

- a) Amplificar mediante PCR el gen que codifica para la angiotatina y clonar el gen de manera de evaluar la expresión, en primera instancia, en el sistema bacteriano pET 22b (+)/BL21 (DE3) de manera comparativa con el sistema de expresión pBAce / BL21 (DE3) – DH5 α . Sistema inducibles mediante la disminución de la concentración de fosfatos en el medio de cultivo.

Objetivo 2:

- a) Estudiar la producción de angiotatina y evaluar el impacto de las limitaciones en el bioproceso, en particular en cuanto al funcionamiento metabólico de las células huésped durante las etapas de inducción de la expresión en ambos sistemas de expresión.

2.2.2 Objetivos Complementarios

- a) Evaluar el estudio de las diferencias entre la cepa salvaje y la recombinante, en cuanto al mantenimiento, rendimiento en biomasa y producción de ácidos orgánicos, bajo distintas condiciones fisiológicas: En ausencia del plásmido, en presencia del plásmido y en condiciones de expresión para los dos sistemas propuestos.
- b) Determinación de la presencia de angiotatina en CC, bajo condiciones de limitación en fosfato y en carbono.

Capítulo 2

2.3 Bibliografía

- [1] Jensen EB, Carlsen S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. 1990, *Biotechnol. Bioeng.*; 36(1): 1-11.
- [2] Dong H., Nilsson L., Kurland C. G. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. 1995, *J. Bacteriol.* 177 1497–1504.
- [3] Hoffmann F, Rinas U. On-line estimation of the metabolic burden resulting from the synthesis of plasmid-encoded and heat-shock proteins by monitoring respiratory energy generation. 2001, *Biotechnol. Bioeng.* 76 (4):333-40.
- [4] Schmidt M, Viaplana E, Hoffmann F, Marten S, Villaverde A, Rinas U: Secretion-dependent proteolysis of heterologous protein by recombinant *Escherichia coli* is connected to an increased activity of the energy-generating dissimilatory pathway. 1999, *Biotechnol. Bioeng.* 66:61-67.
- [5] Andersson, L., Yang, S., Neubauer, P., Enfors, S.-O. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. 1996, *Journal of Biotechnology* 46, 255–263.
- [6] Schweder T, Lin HY, Jürgen B, Breitenstein A, Riemschneider S, Khalameyzer V, Gupta A, Büttner K, Neubauer P. Role of the general stress response during strong overexpression of a heterologous gene in *Escherichia coli*. 2002, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(3): 330-7.
- [7] Park M J. cDNA cloning and expression of angiostatin, an angiogenesis inhibitor, from human liver tissue mRNA. *J. Korean Cancer Assoc.* 1999; 31(6): 1236-1245.
- [8] Smith, H.E. Transcriptional response of *E. coli* to recombinant protein insolubility. 2007, *J. Struct. Funct. Genomics.* 8, 27–35.
- [9] Deutsch DG, Mertz ET. Plasminogen: Purification from human plasma by affinity chromatography. 1970, *Science*: 1095 – 1096.

CAPITULO 3:

MATERIALES Y METODOS

3.1 Cepas Bacterianas y Plásmidos

3.1.1 Cepas Bacterianas

Las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y DH5 α fueron amablemente proporcionadas por la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) y el IBBM. (Instituto de Biotecnología y Biología Molecular – CONICET La Plata - UNLP).

One Shot® TOP10 (Invitrogen): Cepa de clonado de *E. coli*. Utilizada con el vector pCR2.1-TOPO. Genotipo: F'*{proAB, lacIq, lacZ* Δ M15, Tn10 (TetR)}, *deoR, recA1, araD139, gal, rpsL*(StrR), *endA1, nupG* λ - Δ (*ara-leu*)7697*mcrA, \Delta*(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*. Al igual que las JM109, permiten la diferenciación de las colonias transformadas por el plásmido obtenido por la unión del producto de PCR con el vector pCR2.1.

BL21 (DE3) (Novagen): Cepa para expresión en *E. coli*. Genotipo: F⁻ *,dcm, ompT, lon, hsdS* (rB⁻ mB⁻), DE3{*lclts857, ind1, Sam7, nin5, lacUV5-T7*} Cepa lisógena del fago λ DE3 con la incorporación del gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5* (inducibles por IPTG). Es auxótrofa para tiorredoxina y resistente a kanamicina. Presenta deleciones en los genes *ompTK* y *lon* que disminuye la actividad proteolítica evitando la degradación de la proteína recombinante.

Capítulo 3

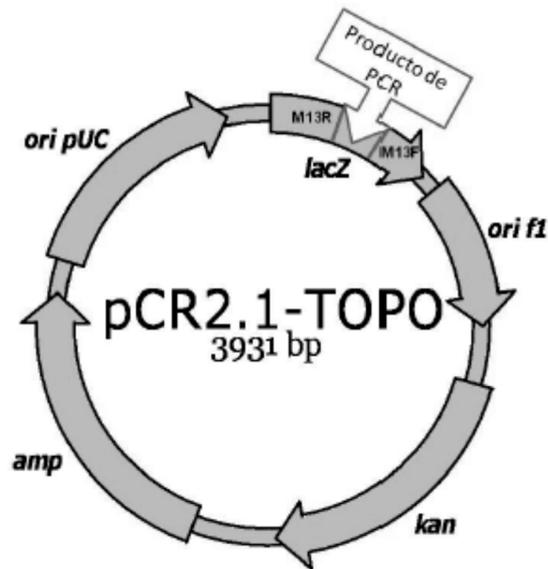
DH5 α : Cepa de clonado y expresión de *E. coli*. Genotipo: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*rK*⁻, *mK*⁺) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*. Como otras cepas DH5, la cepa α transforma con alta eficiencia. Al igual que otras posee características particulares, como ser, la mutación *endA1* inactiva una endonucleasa intracelular que degrada el DNA plásmidico en muchos métodos miniprep [1]. Posee la delección Δ (*lacZ*) M15, el cual es el alelo aceptor α que permiten la diferenciación de las colonias transformadas con muchos vectores basados *lacZ*.

JM109: Cepa de clonado. Genotipo *endA1, recA1 gyrA96, thi, hsdR17* (*rK*⁻, *mK*⁺), *relA1, supE44, \Delta* (*lac-proAB*), [F', *traD36, proAB, lacI*^qZ Δ M15]. La delección del gen *lacI*^qZM15 permite la α complementación con vectores *lac*⁺ que facilita la detección de los clones recombinantes (colonias azules y blancas) en presencia de X-Gal.

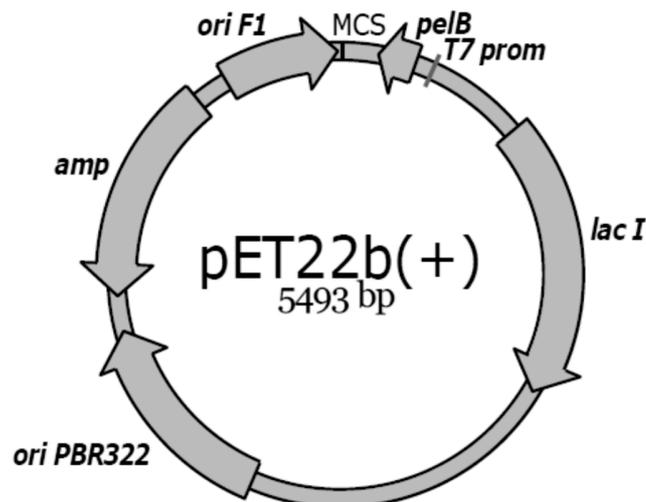
3.1.2 Plásmidos

pCR2.1TOPO (Invitrogen): Vector de clonación de 3.9 Kb, diseñado para el clonado rápido de productos de PCR utilizando la enzima DNA-Topoisomerasa I en lugar de la DNA-Ligasa convencional. La inserción del producto de PCR dentro del vector interrumpe el gen *lacZ* y por lo tanto las bacterias que posean estos plásmidos tendrán el fenotipo Lac⁻ y en presencia de un sustrato cromogénico como el X-Gal no desarrollaran color, mientras que las bacterias que hayan incorporado el plásmido vacío se verán azules, lo que facilita el *screening* de las colonias obtenidas. Además contiene dos orígenes de replicación: pUC y de *f1*; los genes *npI*II y *bla* que le confieren resistencia a kanamicina y ampicilina respectivamente y sitios de unión para primers universales de M13 que permiten verificar la presencia del inserto.

Capítulo 3



pET22b (+) (Novagen): Vector de expresión para *E. coli*. En este vector, el gen de interés se coloca bajo el control del promotor T₇ lac, al inducir con IPTG las bacterias BL21 (DE3) producen la enzima RNA polimerasa del fago T₇ que activa el promotor T₇lac permitiendo la expresión de la proteína recombinante. Este vector también contiene una secuencia de direccionamiento (*pelB*) que promueve la exportación de la proteína recombinante al espacio periplásmico de la bacteria y una secuencia que codifica para 6 histidinas en tándem (His-tag) que facilita la recuperación de la proteína de interés.

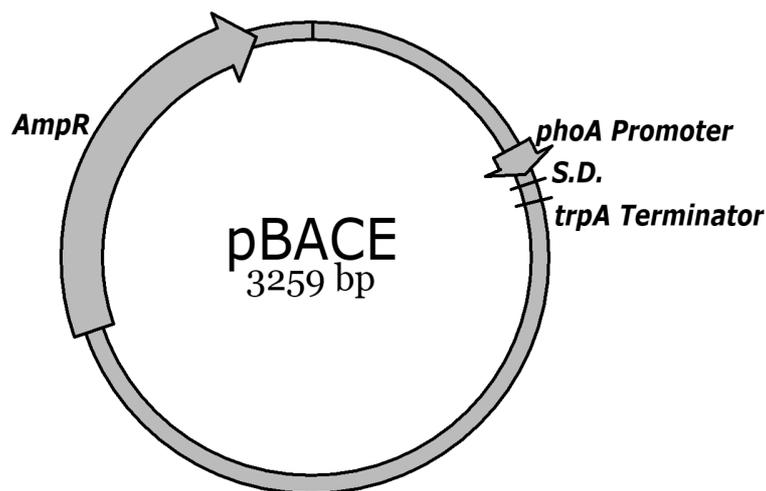


Capítulo 3

pBACE: Vector de expresión para *E. coli*. Posee el promotor del gen de la fosfatasa alcalina de *E. coli*. La expresión se logra por una limitación de fosfato en el medio de cultivo, condición bajo la cual se induce la cascada de señalización debido a un sistema de traducción de señales de membrana compuesto por las proteínas del sistema PhoR y PhoB [2] que activa los genes controlados bajo este promotor *phoA*. El vector carece asimismo de la secuencia señal del gen de la fosfatasa alcalina, con lo cual la localización del producto proteico es citoplasmática. El inserto se puede incorporar al plásmido por restricción del mismo mediante los sitios *NdeI* y *SalI*, ya que el vector posee un sitio *NdeI* adyacente al ATG y sitios únicos de restricción situados en el MCS. Posee un terminador de la transcripción (*trpA*) [3].

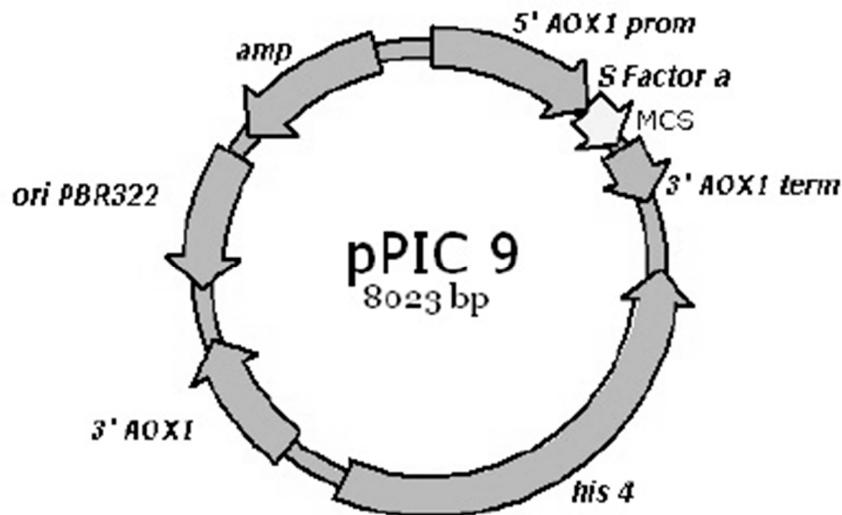
La resistencia a ampicilina se utiliza como factor de selección. Las secuencias del vector (a excepción del segmento entre *KpnI* y *SalI*) son originarias del vector pBlueScript KS⁺ [4]. El origen de replicación es del tipo pUC y da una replicación entre 150 a 200 copias del vector por célula.

El vector fue generosamente proporcionado por el profesor Ming F. Tam del Instituto de Biología Molecular de la Academia Sínica, Taiwán.



Capítulo 3

pPIC9 (Invitrogen): Vector de expresión de *P. pastoris*. Posee un péptido señal derivado del factor α de *S. cerevisiae* que al ser fusionado al gen de interés permite la secreción de la proteína al medio extracelular [5].



Una construcción en el plásmido pPIC9K contiene el cDNA del gen de angiostatina humana que codifica los aminoácidos 98 - 459 del plasminógeno humano con un sitio *SnaBI* en el extremo 5' y un sitio *NotI* en el 3'. El mismo fue proporcionado amablemente por Kashi Javaherian investigador del Hospital de Niños de Boston y la Escuela de Medicina de Harvard, Boston. [6].

3.2 Medios de Cultivo y Condiciones

3.2.1 Medios de Cultivo

Medio LB: Utilizado para el crecimiento y mantenimiento de cepas bacterianas y la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

Capítulo 3

Bacto-Triptona (Difco)	10 g/L
Extracto de levadura (Difco)	5 g/L
NaCl (Merck)	10 g/L

Para producir placas de LB sólido se agregan 15 g/L de Bacto-agar (Difco) antes de autoclavar. Para la selección con antibiótico, se dejar enfriar hasta 55 °C y luego agregar 50 µg/ml de ampicilina. Para la selección de colonias Lac⁻ agregar 0.5 mM de IPTG (Fermentas) y 80 µg/ml X-Gal (Promega).

Medio SOC: Utilizado para el crecimiento de cepas bacterias luego de la transformación.

Bacto-Triptona (Difco)	20 g/L
Extracto de levadura (Difco)	5.0 g/L
NaCl (Merck)	10 mM
MgSO ₄ (Merck)	10 mM
MgCl ₂ (Merck)	10 mM
Glucosa (WAKO)	20 mM

Medio Sintético: Utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Adaptado de Riesenberg y col. [7].

KH ₂ PO ₄ (Merck)	6.6 g/L
K ₂ HPO ₄ (Merck)	2.0 g/L
Ácido Cítrico (Merck)	1.7 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O (Merck)	2.2 g/L
Glucosa (WAKO)	25.0 g/L
Tiamina (SIGMA)	5.0 mg/L
Metales traza	5.0 ml/L

Solución de Metales traza (1000X)

Citrato férrico (Merck)	6.0 g/L
MnCl ₂ .H ₂ O (Merck)	1.5 g/L

Capítulo 3

Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O (Anedra)	800 mg/L
H ₃ BO ₃ (Merck)	300 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (Merck)	250 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O (Fisher)	250 mg/L
CuCl ₂ ·2H ₂ O (Merck)	150 mg/L
EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O (Merck)	840 mg/L

Medio Sintético Riesenbergr Modificado: Utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Adaptado para modo de cultivo en Batch en Erlenmeyer.

Glucosa (WAKO)	5.0 g/L
Ácido Cítrico (Merck)	500 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	6.0 g/L
K ₂ HPO ₄ (Merck)	1.7 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Merck)	1.2 g/L
Tiamina (SIGMA)	2.7 mg/L
Acido (3-(N-morfolino) propanosulfónico)- MOPS.	8.4 g/L

Composición de los micro elementos: FeSO₄ 4.14 mg/L, CoCl₂·6H₂O 2.67 mg/L, MnCl₂·4H₂O 16 mg/L, CuCl₂·2H₂O 1.51 mg/L, H₃BO₃ 16 mg/L, Na₂MoO₄·2H₂O 2.67 mg/L, SO₄Zn·7H₂O 11.0 mg/L, EDTA 4.96 mg/L. La solución se preparó al 1000X, se esterilizó por separado y se agregaron 1 ml por litro de medio de cultivo.

Los macro componentes del medio fueron preparados en dos soluciones por separado.

Solución A: Ácido cítrico 1.7 gr/L, (NH₄)₂SO₄ 6 gr/L, K₂HPO₄ 1.393 gr/L (8 mM, por ejemplo) para los cultivos limitados en carbono y K₂HPO₄ 0.522 gr/L para los cultivos limitados en fosfato, buffer MOPS 8.4 gr/L. Esta solución se llevó a pH 7.0, se esterilizó por separado a 121 °C durante 40 min y se integró en condiciones de esterilidad al medio conteniendo la fuente de carbono, de manera que la concentración de los componentes sea la antes citada.

Capítulo 3

Solución B: Glucosa 12 g/L (para los CC limitados en glucosa), o bien 40 g/L (para los limitados en fosfato), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g/L. Esta solución fue esterilizada por separado con el biorreactor (en el caso de ser el medio inicial para la etapa Batch), o en un botellón de 12 o 25 litros (en caso de ser el medio de alimentación). La esterilización se realizó a 121° C durante 1 hora.

Los metales traza se incorporan de manera proporcional.

Medio Sintético LP / XP: Utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* [8].

NaCl	4.7 g/L
KCl	1.5 g/L
NH_4Cl	1.1 g/L
Na_2SO_4	350 mg/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	200 mg/L
CaCl_2	29.0 mg/L
FeCl_3	0.5 mg/L
$\text{ZnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3 mg/L
Tris Base	12 g/L

El pH es ajustado a 7.0 (6.6 – 7.4) con HCl. Después de la esterilización 2.0 g/L de glucosa, 174.2 mg/L K_2HPO_4 (1 mM medio LP) o 1.742 g/L K_2HPO_4 (10 mM medio XP) se añaden según el caso. Las cantidades de fosfato son ilustrativas, en el caso que fueron variadas el medio se afecta proporcionalmente, a menos que se indique lo contrario.

3.2.2 Condiciones de Cultivo

3.2.2.1 Sistema Batch - Erlenmeyers Agitados

Los cultivos en Erlenmeyer agitados son utilizados ampliamente ya que, entre otras cosas, con pocos experimentos se pueden tomar decisiones en la detección de cuales son las cepas

Capítulo 3

de mayor producción adecuadas para la escala de producción, o que componentes pueden afectar el crecimiento. Sin embargo, se debe poner en especial atención la elección de medio (cantidad y tipo de FCE inicial), y la capacidad de transferencia de O₂ fundamentalmente (Volumen utilizado del Erlenmeyer, velocidad y amplitud de agitación), debido a que normalmente no se satisface los requisitos aeróbicos para el crecimiento irrestricto en este tipo de sistema podrían obtenerse resultados erróneos, por ejemplo una inhibición de crecimiento debido a un descenso de pH debido a la producción de ácidos orgánicos. Cuando *E. coli* se encuentra en un ámbito de limitación de oxígeno se dispara una respuesta en la expresión de más de 200 genes que dependen de la disponibilidad de oxígeno [7], por lo tanto es importante poder controlar la aireación [7]. Generalmente el medio de cultivo se encuentra amortiguado por un buffer (por ejemplo, TRIS o MOPS). Este sistema de cultivo ha sido utilizado para estimar cinética de crecimiento, tiempo de duplicación, relación densidad óptica peso seco, inducción, etc.

Para cultivos en Erlenmeyer, se utilizaron 100 ml de medio de cultivo en Erlenmeyer de 1000 ml a 37 °C y agitados a 180 – 200 r.p.m. en agitador rotatorio (New Brunswick-Scientific). El medio de cultivo se diluyó a la quinta parte para disminuir la demanda de O₂ y evitar la posible limitación por dicho nutriente.

Los inóculos, provienen de un repique, proveniente de un stock de glicerol a -70 °C de la cepa en un agar inclinado de medio LB con ampicilina. Luego de 48 horas a 37 °C se resuspenden los microorganismos en 5 ml de agua destilada estéril y se siembran a razón de 2 ml de suspensión por 100 ml de medio de cultivo en frascos Erlenmeyer de 1000 ml. En todos los casos, salvo aclaración, la densidad óptica (DO₆₂₅) inicial fue de alrededor de 0.12.

3.2.2.2 Sistema Batch - Biorreactor

Se utilizaron dos tipos de biorreactores, uno de 1.5 de capacidad máxima (Inceltech LH 210) y otro de 5 L de capacidad máxima BioFLO 310 (New Brunswick-Scientific). Ambos fermentadores poseen monitoreo y control automático de pH, T y O₂ disuelto.

La agitación fue creciente a lo largo del tiempo, controlado por la demanda de O₂, llegando a 550 r.p.m. hacia el final del cultivo y una aireación de 25 L/h. El pH fue mantenido en 7.0

Capítulo 3

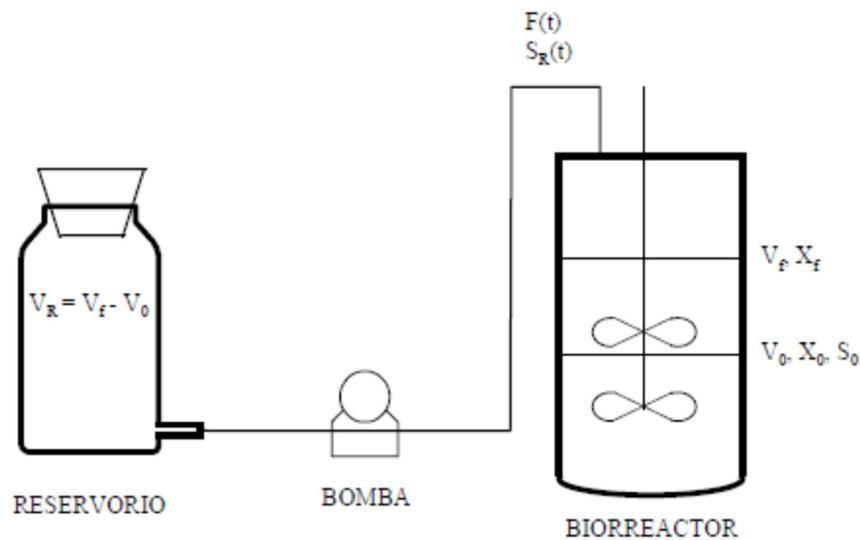
durante el crecimiento mediante la adición de NaOH 0.5 N o solución de Hidróxido de amonio 28-30% utilizando control automático. El fermentador fue esterilizado con el medio de cultivo (solución de FCE, sulfato de magnesio y micro elementos) en autoclave (40 min, a 121 °C). El resto del medio de cultivo fue esterilizado y se integró posteriormente bajo esterilidad junto con el resto de los componentes, vitaminas, antibióticos. Se utilizaron también medios complejos como los citados en la (Sección 3.2.1).

Se agregó antiespumante estéril durante el proceso con una bomba automática programable, a fin de evitar cambios de volumen. La inoculación de los microorganismos se lleva a cabo de manera similar a lo descrito en la (Sección 3.2.2.1) teniendo en cuenta que para 1 litro de cultivo se inoculan 20 ml de suspensión celular. Eventualmente, se prepara un inóculo con 12-16 horas de cultivo a 37° C en el medio que correspondiese y al día siguiente se incorpora la cantidad necesaria hasta llegar a la DO₆₂₅ requerida.

3.2.2.3 Sistema Batch Alimentado

Otro modo de operar un biorreactor es empleando la técnica de BA (Batch Alimentado), esta técnica se define como un cultivo en Batch donde se alimenta continuamente medio nutritivo fresco o alguno de sus componentes. Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento μ del microorganismo. El BA es particularmente útil en procesos en los que el crecimiento celular y/o la formación de producto es sensible a la concentración del sustrato limitante, es decir cuando el rendimiento celular o la productividad de la biomasa o del metabolito buscado se ven afectados. Así, este método se emplea cuando se quieren evitar fenómenos de inhibición por sustrato o metabolismo de sobre flujo y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa.

Capítulo 3



Donde $F(t)$: caudal de alimentación

$S_R(t)$: concentración de sustrato de la alimentación

V_f : volumen final de trabajo

V_0 : volumen al inicio de la alimentación

X_0 : concentración de biomasa al inicio de la alimentación

S_0 : concentración de sustrato limitante al inicio de la alimentación

El cultivo BA se inicia a partir de un cultivo en Batch, por lo que V_0 , X_0 y S_0 son las condiciones finales de dicho cultivo. Es posible elegir distintas condiciones de alimentación, ya sea mediante el empleo de caudales constantes, variables o bien mediante la variación de la concentración de sustrato limitante ($S_R = S_R(t)$).

En este caso, a partir de la información obtenida mediante los estudios en cultivos continuos (Sección. 3.2.2.4) la intención es que se realicen cultivos alimentados exponencialmente fijando el valor de μ y que este se mantenga constante a un μ_{set} tal que no se obtengan productos indeseables como ser acetato y bajo las condiciones de limitación que resulte más conveniente, es decir FCE, fosfato inorgánico.

A la fecha se encuentran una gran cantidad de trabajos en este sistema de cultivo utilizando cepas de *E. coli* inducidas por IPTG y por inductores alternativos como ser lactosa, suero de leche, etc. [9].

Capítulo 3

Como se mencionó, de los tres sistemas de cultivo clásicos, Batch, Batch alimentado y cultivo continuo, es el Batch alimentado el que ha demostrado ser el más apropiado para obtener proteínas recombinantes. En este tipo de cultivo la alimentación puede diseñarse de acuerdo a ciertas pautas (alimentación constante, exponencial, etc.) o bien puede controlarse automáticamente en función de alguna variable del cultivo, como el oxígeno disuelto o la concentración de fuente de carbono, entre otras, lo que le confiere una gran versatilidad. En particular este sistema permite controlar la μ mediante el control de la alimentación y además permite obtener grandes cantidades de biomasa (superiores a 50 g/L), por lo que también se le conoce como cultivo de alta densidad. [7].

3.2.2.4 Sistema Cultivo Continuo

De los tres métodos usuales para el cultivo de microorganismos, el sistema de cultivo continuo es el que ofrece mayores posibilidades de control. Por sus características especiales permite controlar el proceso a un valor de μ prefijado de manera muy simple. Este punto es de suma importancia ya que el comportamiento de la mayoría de los microorganismos se ve afectado por el valor de μ al que están creciendo. Por ejemplo, es común que a altos valores (cerca de $\mu_{m\acute{a}x}$) formen diversos productos, siendo la naturaleza de este dependiente del microorganismo, mientras que a bajos valores de μ no los formen. Mediante el cultivo continuo es posible estudiar el efecto sobre el proceso de variables como pH, la temperatura, la concentración de nutrientes, etc. manteniendo constante el valor de μ o bien, fijadas las anteriores, analizar el efecto de μ sobre el proceso. De este modo es posible separar los distintos efectos y obtener información valiosa para la mejora del proceso.

Independientemente de la condición a la que se realice un cultivo continuo, siempre se arranca el mismo a partir de un cultivo Batch y en un momento dado, normalmente cuando se agota el sustrato limitante, se comienza a alimentar el biorreactor con medio de cultivo fresco a un caudal F al mismo tiempo que parte del medio de cultivo sale del reactor al mismo caudal para mantener fijo el volumen (Fig. 11).

Capítulo 3

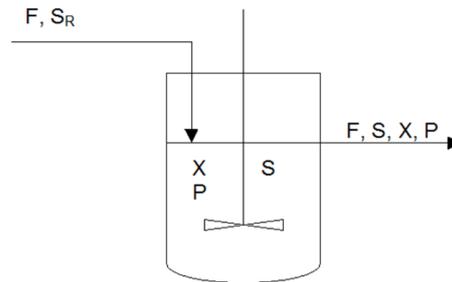


Figura 11 Esquema de balance de masa de los componentes de un CC.

El caudal de salida contendrá células, mientras que la concentración de nutrientes será menor que en el caudal de entrada debido a que en parte fueron consumidos por los microorganismos.

Una de las variables de operación fundamental en este tipo de cultivos es la velocidad de dilución, D que se define como la relación entre el caudal de alimentación, F , y el volumen de cultivo, V .

$$D = \frac{F}{V} \quad (1)$$

Teniendo en cuenta las unidades usuales de F ($L \cdot h^{-1}$) y de V (L), la de D será h^{-1} . El valor de D corresponde a las veces que se renueva el volumen del biorreactor por unidad de tiempo, así por ejemplo un valor de $D = 0.25 h^{-1}$ indica que en una hora se renovó un 25 % del volumen de cultivo, o bien que al cabo de 4 horas, se habrá renovado el volumen de cultivo. Podría pensarse que a estas alturas prácticamente ya no quedan microorganismos dentro del biorreactor, pero no es así ya que debe tenerse en cuenta que estos se están multiplicando activamente lo cual compensa las “perdidas” debidas a los microorganismos que son arrastrados fuera del biorreactor por el caudal de salida. Bajo ciertas condiciones, que analizaremos más adelante, ambos procesos se compensan de modo tal que la concentración de microorganismos se mantiene constante en el tiempo, es decir que se habrá alcanzado un estado estacionario. En estas condiciones también se mantendrán constantes en el tiempo las concentraciones de nutrientes, incluyendo la del sustrato limitante del crecimiento.

Balances de materia:

Capítulo 3

De acuerdo al esquema de la figura 11 podemos plantear los siguientes balances de materia para la concentración de microorganismos (X), de substrato (S) y de producto (P).

$$V \cdot \frac{dX}{dt} = V \cdot r_x - F \cdot X \quad (2)$$

$$V \cdot \frac{dS}{dt} = F \cdot S_R - F \cdot S - V \cdot r_s \quad (3)$$

$$V \cdot \frac{dP}{dt} = V \cdot r_p - F \cdot P \quad (4)$$

Cuando se alcanza el estado estacionario, X, S y P ya no varían con el tiempo, lo que equivale a igualar a cero las ec. (2), (3) y (4), de donde resulta:

$$r_x = D \cdot X \quad (5)$$

$$r_s = D \cdot (S_R - S) \quad (6)$$

$$r_p = D \cdot P \quad (7)$$

Donde X, S, P representan las respectivas concentraciones en estado estacionario. La Ec. (6) es válida para cualquier nutriente del medio de cultivo, sea el substrato limitante o no, ya que la misma surge de un balance de materia en el que no se ha hecho ninguna consideración con relación a la naturaleza del substrato considerado.

Lo primero que debe destacarse en este tipo de cultivo es que permite determinar experimentalmente y de modo muy simple las velocidades de crecimiento, consumo de substrato y de formación de producto, tal como se desprende de las ecuaciones. (5), (6) y (7). Del mismo modo permite calcular los rendimientos. Por Ej. Si suponemos que S representa a la fuente de carbono y energía o la concentración de fosfato, el rendimiento celular se calcula fácilmente:

$$Y_{x/s} = \frac{X}{(S_R - S)} \quad (8)$$

Capítulo 3

De modo similar puede calcularse $Y_{p/s}$, o bien las velocidades específicas. Por Ej. Para q_s será:

$$q_s = \frac{r_s}{x} = \frac{D \cdot (S_R - S)}{x} \quad (9)$$

Mientras que para la velocidad específica de crecimiento será:

$$\mu = \frac{r_x}{x} = \frac{D \cdot x}{x} = D \quad (10)$$

La ecuación (10) es de suma importancia pues significa que en estado estacionario es $\mu = D$, y como D es una variable operacional permite imponerle externamente a los microorganismos el valor de μ al que deben crecer independientemente de la composición del medio de cultivo y de las condiciones ambientales (T, pH, etc.).

Como se mencionó, cuando todas las variables del cultivo (X , S , P , concentración de O_2 disuelto y composición de la biomasa) no varían en el tiempo, se considera que se ha alcanzado el estado estacionario, el mismo suele alcanzarse luego de fijado el D al menos $4 \cdot t_R$, donde t_R se conoce $t_R = 1 / D$. Por tanto si se fija un valor de $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$, habrá que esperar 26.7 horas para suponer que se ha alcanzado el estado estacionario, lo que deberá ser corroborado experimentalmente midiendo las concentraciones de X , S , P hasta observar que no varían con el tiempo. A los fines prácticos en general la toma de muestra se realiza transcurridos $5 \cdot t_R$.

3.2.2.5 Obtención y Procesamiento de los datos en Cultivo Continuo

Para los cultivos continuos, se tomaron las muestras registrando r.p.m. del biorreactor, número de botellón de medio de cultivo, volumen de la fase líquida, temperatura, pH, y la DO_{625} . Se calculó el flujo de medio tomando como datos el tiempo que tardó en obtenerse un volumen medido proveniente del rebalse. También se midieron la composición de los gases en la entrada y en la salida del biorreactor y se calculó el flujo de aire en la fase gaseosa, mediante medida cronometrada en un caudalímetro a burbuja, de volumen conocido.

Balances de Carbono, de grado de reducción y de nitrógeno.

Capítulo 3

Se calcularon los balances de carbono y de grado de reducción, a partir de las siguientes expresiones.

$$\text{BalC} = \frac{\tilde{X}}{(S_R - \tilde{S})} + \frac{r_{CO_2}}{D(S_R - \tilde{S})} + \frac{\tilde{P}_1}{(S_R - \tilde{S})}$$
$$\text{Bal}\gamma_i = \frac{\gamma_x \tilde{X}}{\gamma_s (S_R - \tilde{S})} + \frac{4r_{O_2}}{\gamma_s D(S_R - \tilde{S})} + \frac{\gamma_p \tilde{P}_1}{\gamma_s (S_R - \tilde{S})}$$

Donde X es la concentración de biomasa en el estado estacionario (en C-mol/litro), S_R y \tilde{S} son las concentraciones de glucosa en el reservorio y en el seno del biorreactor respectivamente (expresadas en C-mol de glucosa/L), \tilde{P} es la concentración en estado estacionario del producto i (en C-mol/L). El grado de reducción, γ_i , definido como el número de electrones que se transfieren al O_2 cuando 1 C-mol de un compuesto dado es oxidado hasta un nivel de referencia dado.

El nivel de referencia utilizado para los cálculos fue: CO_2 , H_2O , NH_3 ; en este caso el valor del grado de reducción para un compuesto tipo $CH_aO_bN_c$ está dado por $\gamma = 4 + a - 2b - 3c$

Para estos cálculos se supuso biomasa estándar ($CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$, sales 5%), por lo que el valor de un C-mol equivale a 25.8 g. [10]. El balance de nitrógeno se calculó como la relación entre el nitrógeno que es destinado a la biomasa ($0.2 \times r_X$) y el nitrógeno consumido en los cultivos $r_N = D \times (N_R - \tilde{N})$. Según la composición de la biomasa estándar un C-mol de biomasa contiene 0.2 moles de nitrógeno

$$BN = \frac{0.2 \times D \times \tilde{X}}{D \times (N_R - \tilde{N})}$$

N_R representa la concentración de amonio o nitrógeno en el reservorio (molN/lh) y \tilde{N} representa esta concentración en el seno del biorreactor.

3.3 Métodos Generales

Capítulo 3

3.3.1 Ensayo de la angiogénesis in vitro

El Matrigel es una matriz artificial de membrana muy eficaz para el anclaje de células de tipos normales y transformados. Entre ellas se incluyen neuronas, células endoteliales vasculares, hepatocitos, etc. Puede ser utilizada para estudios de metabolismo y toxicología, y es la base para varios tipos de invasión en ensayos de células tumorales. El Matrigel proporciona el sustrato necesario para el estudio de la angiogénesis tanto in vitro como in vivo. Las células endoteliales HUVEC son capaces de formar estructuras tubulares in vitro cuando son incubadas sobre Matrigel® (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA). Usualmente se utilizan placas de 24 pocillos y se recubren con Matrigel® (150 µl por pocillo) y se deja gelificar a 37°C durante 30 minutos. Luego, se siembran 3×10^4 células en cada pocillo y se incuban en presencia o ausencia de los extractos a evaluar, en este caso serían muestras conteniendo angiostatina (5 o 10 µg) durante 20 horas en la estufa de cultivo. La formación de cordones endoteliales es fotografiada a una magnificación de 40X y 100X en un microscopio invertido de campo claro y posteriormente se procede a la cuantificación de las estructuras tubulares por campo. Los resultados se analizan mediante ANOVA contrastado con test de Dunnet. Esta prueba se realiza calculando una estadística t-de Student para cada grupo de tratamiento, donde la estadística compara el grupo de tratamiento con un solo grupo de control.

3.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Todas las reacciones de PCR fueron efectuadas en tubos de 200 µl de pared delgada con un volumen total de 25 µl de una mezcla de reacción preparada de la siguiente manera:

Molde	(entre 25 y 250ng)
Primer R (10 µM)	0.5µl
Primer F (10 µM)	0.5µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5µl
10X Buffer	2.5µl

Capítulo 3

dNTPs (mix)	0.75µl
Taq-DNApol (Promega)	0.25µl
Agua	c.s.p 25µl

(Tabla. 6) Mezcla típica de reacción de PCR.

La secuencia de los primers utilizados para el desarrollo de este trabajo se halla detallada en la siguiente tabla:

Primer	Secuencia del primer (5'->3')
FW (ANG)	CGCC ATATG GTGTATCTCT CAGAGTGC <i>NdeI</i> HPLG cDNA
RV (ANG)	ACACCG GTCGACTT ACTACGCTTCTGTTC <i>SalI</i> Stop

(Tabla. 7) Secuencia de primers diseñados para amplificar el cDNA de la angiostatina para su posterior inserción en los vectores de expresión para *E. coli*.

Sobre la base del trabajo de Lin [6] se comenzó el diseño de primers para amplificar mediante PCR el gen que codifica para la fracción del plásmidgeno conocida como angiostatina (kringles 1-4). El molde fue el plásmido pPIC9K que contiene HPLG cDNA (ATCC, Manassas, VA, USA). En todas las reacciones de PCR se incorporó un tubo de control de contaminación, sin el agregado de molde y, en el caso de contar con ellos, también se utilizaron controles positivos de la reacción. El ciclado fue llevado a cabo utilizando un termociclador MasterCycler Gradient (Eppendorf). Los productos de PCR fueron utilizados inmediatamente luego del ciclado o conservados a -20 °C hasta su uso. En los casos en que la reacción de amplificación se produjo a partir de colonias (bacterias) éstas fueron picadas con puntas estériles, resuspendidas en 10 µl de agua libre de nucleasas, y hervidas durante 10 minutos, añadiéndose directamente 5 µl de la suspensión como molde en tubo de PCR.

3.3.3 Transformación de bacterias competentes

Para la obtención de cada una de las diferentes bacterias químicamente competentes utilizadas, 1 ml de medio LB fue inoculado de forma estéril con una colonia correspondiente y se dejó crecer toda la noche a 37 °C con agitación. Al día siguiente se realizó una dilución del cultivo con LB fresco (50 µl de cultivo más 4550 µl de medio) en

Capítulo 3

un tubo Falcón de 15 ml, la mezcla resultante se dejó crecer nuevamente a 37 °C en agitación durante aproximadamente 2.5 horas hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5. Transcurrido ese tiempo se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 5min a 4 °C; luego de descartar el sobrenadante las bacterias fueron resuspendidas en 500 µl de una solución 100 mM de MgCl₂ e incubadas en hielo durante 15 min. A continuación se volvió a centrifugar la suspensión de bacterias, en las mismas condiciones anteriormente empleadas y se incubaron en hielo durante 15 min en 500 µl de una solución 100 mM de CaCl₂. Por último, se centrifugó una vez más y se resuspendió el pellet bacteriano en 1 ml de una solución mixta conteniendo partes iguales de MgCl₂ 100 mM y CaCl₂ 100 mM. Las bacterias químicamente competentes obtenidas fueron utilizadas en el momento para la transformación o almacenadas en alícuotas de 100 µl con 15% de glicerol durante un mes a -70 °C.

Para realizar las transformaciones en las distintas cepas de *E. coli* se utilizaron de 100 a 200 ng de los productos de ligación (o plásmidos) correspondientes que fueron colocados en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml conteniendo 100 µl de la suspensión de bacterias químicamente competentes. La mezcla fue incubada durante 10 minutos en hielo, luego se sometió a un choque térmico de 42 °C durante 90 segundos y se pasó rápidamente a hielo durante otros 10 minutos. Finalmente se añadieron 900 µl de medio SOC y se incubaron durante 2 horas con agitación suave a 37 °C. Transcurrido ese tiempo se sembraron 100 µl del cultivo en placas con medio sólido (selectivo y/o diferencial) correspondiente que fue incubada a 37 °C hasta la aparición de colonias con un tamaño adecuado.

El mantenimiento a corto plazo de las cepas bacterianas y los clones recombinantes se realizó en placas de LB a 4 °C durante un período máximo de un mes y medio, mientras que para el mantenimiento a largo plazo se utilizaron cultivos líquidos en medio LB a los que luego se les agregó un 15% de glicerol y fueron congelados a -70 °C.

3.3.4 Extracción de DNA plasmídico

En todos los casos, la extracción de DNA plasmídico se realizó a partir de 5 ml de un cultivo líquido de bacterias (con el correspondiente antibiótico), utilizando un protocolo ligeramente adaptado sobre la base de la técnica original de Birnboim & Doly [1]. Los 5 ml

Capítulo 3

cultivo fueron centrifugados a 5000 r.p.m. durante 10 min, el pellet de bacterias se resuspendió con pipeta en 100 µl de Solución I, a continuación se añadieron 200 µl de la Solución II mezclando suavemente por inversión (4 o 5 veces). La mezcla resultante fue mantenida en hielo durante 5 min, posteriormente se añadieron 150 µl de la Solución III agitando por inversión y se incubó otros 5 min en hielo. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 15 min a 4 °C. Aproximadamente 400 µl del sobrenadante, conteniendo el DNA plasmídico, se transfirieron a un tubo limpio en el que se añadieron 2 volúmenes y medio (1 ml) de etanol absoluto (frío). Luego se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 20 min a 4 °C y se hizo un lavado con 500 µl de etanol al 70 % frío y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente, por último DNA plasmídico se resuspendió en 30 µl de agua tridestilada estéril. En algunos casos el DNA obtenido por el método de la lisis alcalina fue tratado con RNasa A de páncreas bovino (Promega) a una concentración de 100 µg/ml durante 30 min a 37 °C.

Solución I 50 mM glucosa 25 mM TrisHCl (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0).

Solución II 0.2 N NaOH 1% SDS.

Solución III 60 ml de 5 M acetato de potasio (pH 4.8) 11.5 ml de ácido acético glacial.
28.5 ml de agua.

3.3.5 Purificación y cuantificación de DNA

Dependiendo del caso en particular se emplearon diferentes procesos de purificación.

Purificación de productos de PCR

Se realizó con Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). El método se basa en presencia de una resina que une el DNA. La resina se aplica a una mini columna y luego de dos lavados con isopropanol, el DNA se eluye con agua mediante centrifugación. Para fragmentos de entre 1000 bp el método tiene una recuperación mayor al 92%.

Purificación de productos de reacciones de digestión enzimática

En el caso de llevar a cabo reacciones de digestión de DNA que implique el recambio de un buffer o en el caso de reacciones de tipo múltiple posteriormente a las mismas, se llevó a cabo una extracción fenol: cloroformo para purificar el DNA. Las muestras se llevaron por

Capítulo 3

lo general a 200 µl, con buffer TE pH 8, se agregó a cada reacción de digestión un volumen de la solución fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1), se mezcló por agitación hasta la formación de emulsión, posteriormente se centrifugo, se tomó la fase acuosa y se le agregaron 200 µl de éter etílico anhidro, este paso se realizó tres veces. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le agrego 2.5 volúmenes de etanol 99% frío y 120 µl (10% del volumen de resuspensión) de acetato de sodio 3M. Se incubo a -70 °C durante media hora se centrifugo 10 min a 15000 r.p.m., luego el sedimento se lavó con 200 µl de 70% de etanol, agitando por inversión y centrifugando 10 min. a 15000 r.p.m. y se secó a 50 °C por 5 a 15 min. Finalmente, el DNA se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada estéril. [18].

Purificación de DNA en alta pureza

En aquellos casos en los que se necesitó que el DNA plasmídico fuera de gran pureza (secuenciación) se utilizó el kit comercial Wizard® Plus SV Mimiprep (Promega) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Para la cuantificación todas las medidas de absorbancia fueron obtenidas en un espectrofotómetro SmartSpec™ 3000 (Bio-Rad) con cubetas de cuarzo de 1 cm, utilizando agua tridestilada como blanco. La cuantificación de ácidos nucleicos fue realizada por medida directa de la absorbancia a 260 nm (A_{260}). La concentración de la muestra analizada se obtuvo por medio del producto del valor de A_{260} multiplicado por el factor de dilución (D) y por el coeficiente de extinción correspondiente ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para el DNA De este modo la concentración de ácidos nucleicos en ng/µl estará dada por las siguientes expresiones: $[\text{DNA}] = A_{260} \cdot 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot D$ $[\text{RNA}] = A_{260} \cdot 40 \text{ ng}/\mu\text{l} \cdot D$

En cada caso el grado de pureza de las muestras analizadas, se estimó mediante el cociente de absorbancia A_{260}/A_{280} . De acuerdo a este criterio una relación cercana a 1.8 indica que una muestra de DNA se encuentra pura, mientras que para el RNA el valor del cociente debería ser cercano a 2. En el caso que estos valores den por debajo de 1.6 se presume que la muestra se halla contaminada, generalmente con proteínas, y los valores de concentración calculados no son confiables [19]

3.3.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Capítulo 3

Las muestras de DNA fueron analizadas mediante electroforesis en minigeles horizontales (5 x 6.5 cm) de agarosa D1-LE (Biodynamics) a una concentración de 0.7 al 2% (en función del tamaño de los fragmentos a analizar) en Buffer TBE 0.5X: 45mM Tris (Invitrogen), 45 mM ácido bórico (Invitrogen), 1 mM EDTA (Merck), pH 8. Las muestras fueron cargadas en el gel luego de agregarle un 20 % del volumen original de buffer de carga (10 mM Tris-HCl - pH 7.6; 0.03 % de azul de bromofenol y 60 % de glicerol). Se emplearon distintos marcadores de peso molecular: λ HindIII (Promega), λ EcoRI-HindIII (Promega), 100 bp Marker (Promega) o 1Kb Marker (Promega), de acuerdo al tamaño del fragmento analizado. La electrofóresis se llevó a cabo utilizando una cubeta horizontal MUPID-2 (Cosmo-Bio) cargada con Buffer TBE 0.5X a voltaje constante (100V) durante 40 a 60 min. Para visualizar el DNA, después de la electrofóresis, se realizó una tinción por difusión pasiva sumergiendo el gel durante 15 a 30 min en una solución 0.1 μ g/ml de bromuro de etidio (SIGMA). Los geles fueron observados por medio de un transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.7 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Los experimentos de electroforesis de proteínas fueron realizados siguiendo los lineamientos generales del método original de Laemmli [11], todas las corridas fueron realizadas en sistema vertical con un gel separador de 5x8 cm con una concentración de acrilamida entre 10 y 12.5% y un gel de apilamiento de 1.5x8 cm con un 5% de acrilamida:

	Gel separador		Gel de apilamiento	
	10%	12,5%		5%
Acril-Bis	10ml	12,5ml	Acril-Bis	660 μ l
Tris HCl pH 8.8	7,5ml	7,5ml	Tris HCl pH 6.8	1,25ml
Agua	12ml	9,5ml	Agua	2,97ml
10% SDS	300 μ l	300 μ l	10% SDS	50 μ l
10% APS	200 μ l	200 μ l	10% APS	75 μ l
Temed	20 μ l	20 μ l	Temed	5 μ l

(Tabla. 8) Esquema de cantidades de reactivos para preparar el gel de SDS – PAGE con un rango adecuado para la resolución de la angiotatina.

Capítulo 3

La electrofóresis fue llevada a cabo en una cuba Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 40 V (un gel) o 60 V (dos geles) con una corriente de 20-40 mA durante 4 -5 horas. Luego de la corrida electroforética los geles fueron teñidos durante toda la noche en una solución al 0.025% de Comassie Brilliant Blue R250 (SIGMA); al otro día los geles fueron desteñidos en una solución al 40% de metanol y 10 % de ácido acético durante un mínimo de 3 horas hasta que las bandas de las proteínas fueran claramente visibles.

Reactivos:

Acril-Bis: 30 g de acrilamida más 0.8 g de Bis-acrilamida en 100 ml de agua desionizada.

Buffer Tris HCl 1.5 M pH 8.8: 18.5 g de Tris-Base (Invitrogen) en aproximadamente 50 ml de agua, ajustar el pH a 8.8 con HCl y llevar a 100 ml con agua desionizada.

Buffer Tris HCl 0.5M pH 6.8: 6 g de Tris-Base (Invitrogen) en aproximadamente 50 ml de agua desionizada, ajustar el pH a 6.8 con HCl y llevar a 100 ml con agua desionizada.

10% SDS: 10 g de SDS (WAKO) en 100 ml de agua desionizada.

10% APS: 10 mg de persulfato de amonio (Gibco) en 1ml con agua desionizada.

Temed: solución comercial de N,N,N,N'-Tetrametiletildiamina. (AppliChem).

0.1% BB: 10 mg de azul de Bromofenol (SIGMA) en 10ml de agua desionizada.

Buffer de reservorio: 0.302 g/L de Tris-Base (Invitrogen), 1.44 g/L de glicina y 0.1 % de SDS.

Buffer de carga: 1.25 ml de Tris-HCl pH 6.8 más 2 ml de SDS 10 % más 2 ml de glicerol y 100 µl de 0.1 % BB. Luego agregar agua desionizada hasta un volumen final de 10 ml.

3.3.8 Western Blot

Para la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa se utilizó el sistema de sándwich semi-húmedo Trans-blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad), una vez finalizada la corrida electroforética, se cortó un rectángulo de nitrocelulosa de 5x8 cm y

Capítulo 3

6 piezas de papel secante de igual tamaño. Luego se procedió a la formación del sándwich sobre la placa correspondiente al polo positivo del equipo de transferencia de la siguiente manera: 3 rectángulos de papel secante, la membrana de nitrocelulosa, el gel de corrida y otros 3 rectángulos de papel secante (todos previamente humedecidos en buffer de transferencia).

La transferencia se llevó a cabo a 15 V durante media hora, una vez finalizada se retiró la membrana de nitrocelulosa y se la dejó sumergida en solución de bloqueo a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados de la membrana de 5 minutos cada uno, en agitación con solución de lavado. Luego se incubó la membrana a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (dilución 1/1000 para los anticuerpos monoclonales), la incubación se realizó durante 90 min con agitación suave. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizaron otros tres lavados de la membrana y se la incubó por otros 90 min con una dilución 1/1000 del anticuerpo secundario anti-especie conjugado con peroxidasa correspondiente (anti-ratón – SIGMA). Finalmente se realizaron otros tres lavados y se incubó la membrana con la solución de revelado durante unos 10 o 15 minutos, hasta la aparición de las bandas.

Los anticuerpos utilizados fueron: M: MoAb 91 Santa Cruz sc-73708 angiostatin (4958-1), human, mouse monoclonal IgG2a. (1/100) C: anticuerpo conjugado anti – ratón.

Reactivos:

Buffer de Transferencia: Tris-Base 5.82 g glicina 2.93 g 10 % SDS 3.75 ml Metanol 200 ml Ajustar a 1L con agua desionizada.

Solución de Bloqueo: PBS 100 ml Tween-20 0.1ml Leche en Polvo 5 g.

Solución de Lavado: PBS 100 ml Tween-20 0.1 ml.

Solución de Revelado: PBS 100 ml DAB 30 mg H₂O₂ 30 µl.

3.3.9 Dot – Blot

El presente procedimiento ha sido utilizado para una rápida detección de muestras bajo condiciones de inducción, sólo para confirmar la presencia o ausencia de angiostatina. La membrana se activa con buffer blotting (puede ser con metanol). Se siembran alrededor de 3 µl de muestra. Se incuban 30 minutos en estufa a 37 °C. Posteriormente se incubó la membrana en estufa a 37 °C con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, se

Capítulo 3

repite el mismo procedimiento incubando con el anticuerpo secundario y el revelado. La técnica permite evaluar la funcionalidad del anticuerpo conjugado (C) y del anticuerpo monoclonal (M). La falta de aparición de bandas en alguno de los controles implica la falla de alguno de los anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron: M: MoAb 91 Santa Cruz sc-73708 angiostatin (4958-1), human, mouse monoclonal IgG2a. (1/100) C: Anticuerpo conjugado anti – ratón.

3.4 Métodos Analíticos

3.4.1 Concentración Celular – Biomasa

Para la determinación del peso seco se tomaron 10 mL del cultivo recién cosechado del biorreactor (2 ml si la muestra proviene de Erlenmeyer), mantenido en hielo, y se centrifugaron a 10000 r.p.m. durante 10 min. Se separó el sobrenadante y se lo guardó a -20 °C, debidamente rotulado. Se resuspendió el precipitado con agua destilada y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante de lavado y se resuspendió cuantitativamente el precipitado, llevando a un peso filtro (crisol) previamente tarado. Los pesos filtro se colocaron en una estufa a 105 °C hasta peso constante y se obtuvo la biomasa por diferencia de pesadas, una vez seco y frío.

Se realizó esta operación por triplicado cada vez que se tomó una medida de biomasa. Para la determinación de angiostatina se guardaron pellets a -20 °C.

En promedio, 1 g/L de biomasa seco dio lugar a una OD₆₀₀ de 1.9 ± 0.1 ($X = 0.116 + 0.466 \cdot OD_{600}$ $R^2 = 0.996$)

Densidad óptica (OD). El crecimiento de los cultivos fue seguido por la medición de la densidad óptica a 600 / 625 nm por medio de un espectrofotómetro. Se utilizó como referencia solución de NaCl [0.9% (w / v)]. Si la absorbancia superaba 0.8 la muestra se diluyó con 0.9% (w / v) solución de NaCl.

Unidades formadoras de colonias (UFC). Las unidades formadoras de colonias se analizaron mediante siembra de al menos tres diluciones y cada una de estas replicas en las

Capítulo 3

placas del medio correspondiente, posteriormente se incubaron durante uno a tres días a 37 °C.

3.4.2 Análisis de los componentes del medio

3.4.2.1 Determinación de glucosa

Se midió glucosa por el método enzimático de la glucosa oxidasa GOD/POD (Wiener, Argentina; Bergmeyer y Bernt, 1977). La reacción es lineal hasta 5 g/L. Para valores superiores, se diluyen las muestras 1:2. Se realizaron diluciones 1:10 para muestras cercanas a 10 g/L de glucosa. La figura 12 muestra una típica curva estándar para el análisis de la concentración de la glucosa.

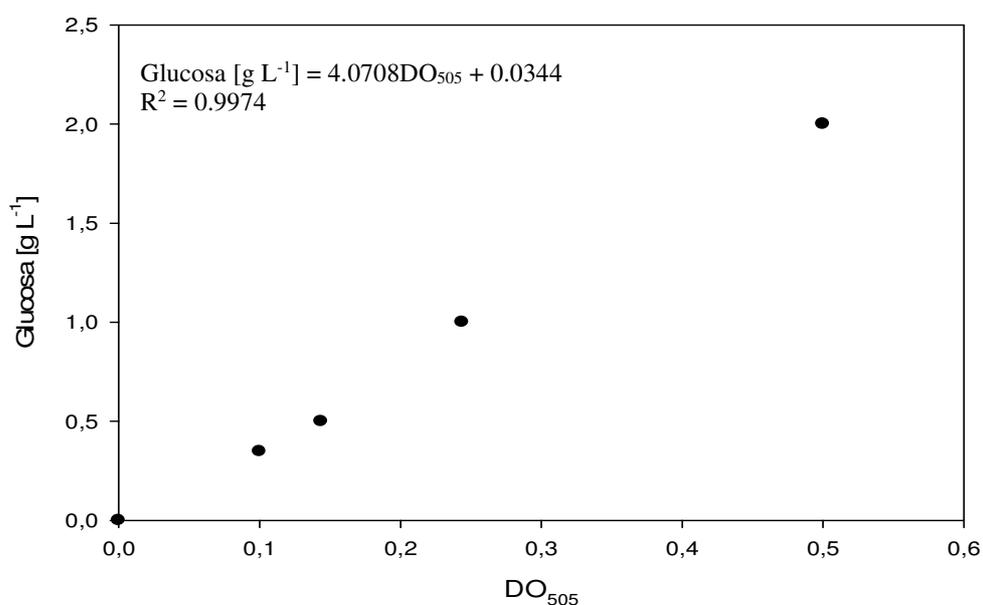


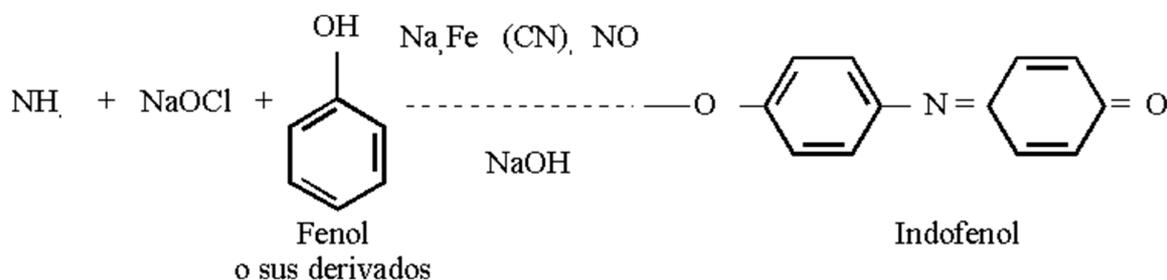
Figura 12 Gráfica típica de cuantificación de glucosa. La glucosa de la muestra, es oxidada a ácido glucónico por acción de la glucosa oxidasa. El producto liberado H₂O₂ en esa reacción, en presencia de peróxidasa, 4-aminofenazona (4-AF) y fenol, forma una quinona con un pico de absorción a 505 nm.

3.4.2.2 Determinación de amonio

El amonio reacciona con fenol e hipoclorito de sodio en medio alcalino produciendo azul de indo fenol, que se determina colorimétricamente. Las mediciones se pueden realizar a

Capítulo 3

540 nm o a 630 nm. A 540 nm se extiende el rango de concentraciones, entre 630 – 625 nm el método resulta más sensible, aún para pequeñas cantidades, porque la absorptividad molar aumenta a más del doble. El método se basa en que un compuesto de color azul intenso, indofenol, que se forma por la reacción del amonio, con el fenol favorecido por el ion hipoclorito en condiciones alcalinas, catalizada por el nitroprusiato de sodio (nitroferrocianuro sódico) el cual favorece la intensidad del color en la reacción [12].



Reactivos:

Solución A: Fenol sólido 5 g, Nitroprusiato de Sodio 2-H₂O 28.500 mg. Se lleva a 500 ml con H₂O bidestilada.

Solución B: NaH₂PO₄ 17.340 g, HONa 10 g, NaClO 5 ml. Se lleva a 500 ml con H₂O bidestilada.

Solución patrón: Se secan en estufa a 60 °C durante 48 horas SO₄(NH₄)₂ de calidad analítica. Se prepara una solución con 0.9438 g en un litro de H₂O bidestilada. Se diluye perfectamente esta solución en una relación 1:10. Almacenar la misma a 4 °C. Es recomendable no almacenar esta solución por más de 30 días. La solución de referencia, corresponde al punto más alto de la curva que es de 20 mg/L. A partir de esta solución, se realizan diluciones para obtener valores de 2 / 4 / 8 / 12 / 16 y 20 mg/L. Estas soluciones pueden ser almacenadas en freezer a -20 °C.

Ensayo: En tubos de Khan, se colocan 0.080 ml de muestra, 1 ml de solución A y 1 ml de solución B. Se agita mediante vortéx o de manera enérgica y se incuban 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se toman lecturas en espectrofotómetro, a 625nm. La curva de calibración se realiza paralelamente a las muestras con cada determinación. La (Fig. 13) muestra una típica curva estándar para el análisis de la concentración de amonio.

Capítulo 3

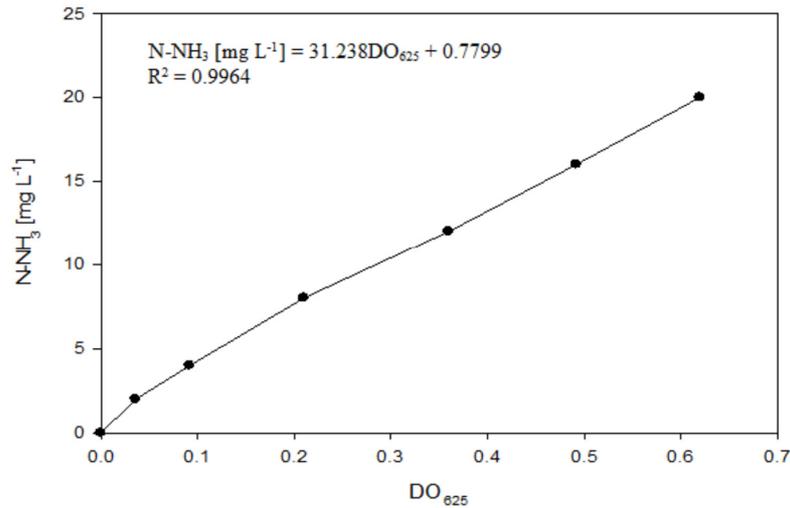


Figura 13 Grafica típica de cuantificación de amonio.

3.4.2.3 Determinación de fosfato

Para el estudio cuantitativo del fósforo, uno de los métodos colorimétricos más utilizados es su determinación mediante la reacción de producción de azul de molibdeno. El fósforo inorgánico es transformado en un complejo fosfomolibdico [13] que, por ulterior reducción da un complejo coloreado [14-16] estimable coloriméricamente. Se realizó una adaptación de la técnica de Fiske y Subbarow (1925) [17].

Se puso a punto el método mediante la realización de una curva de calibración. Los iones fosfato reaccionan con el molibdato de amonio en medio ácido para producir el complejo fosfomolibdato de amonio, el cual en presencia de un agente reductor produce un complejo heteropolimérico de color azul, azul de molibdeno, de estructura compleja, cuya absorbancia se mide a 660 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de fosfato de la muestra. El azul de molibdeno es un heteropoliácido y posee una estructura basada en la estructura de *Keggin*. El color azul surge porque el anión, casi incoloro, puede aceptar más electrones (en este caso del ácido ascórbico) es decir, se reduce para formar un complejo de color azul intenso. El proceso de reducción es reversible y debe estar estandarizado para evitar fluctuaciones experimentales. Se lo emplea para determinar trazas, a causa de su gran sensibilidad, pero su uso presenta algunos inconvenientes. No es

Capítulo 3

un compuesto estequiométrico y su espectro de absorción depende del modo como ha sido preparado. Sus soluciones son coloidales y varían con el tiempo, precipitando eventualmente, de modo que las lecturas espectrofotométricas deben tomarse antes de una o dos horas de prepararse la mezcla. Otro motivo para efectuar la lectura de la intensidad del color al cabo de un periodo de tiempo fijo y relativamente corto es que el exceso de molibdato de amonio también sufre reducción, sí bien mucho más lentamente que el heteropoliácido. Por este motivo se realizó la validación de la técnica.

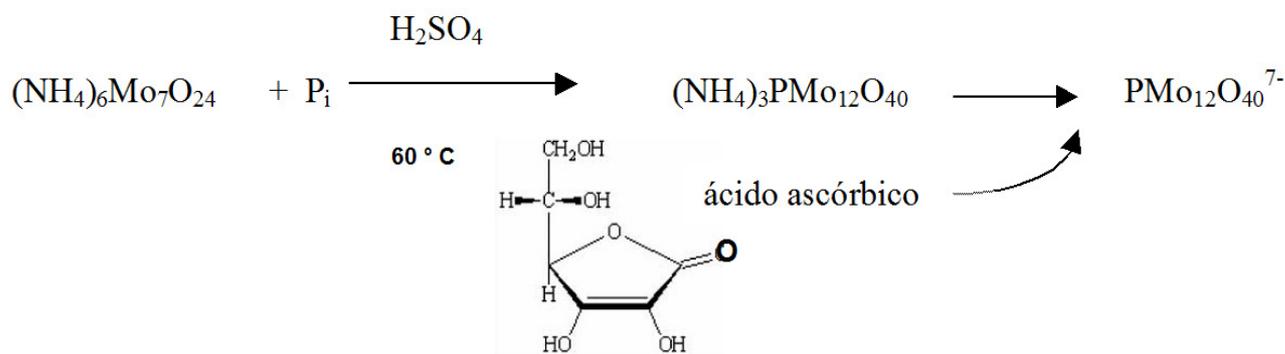


Figura 14 Esquema general de la reacción química. El método Fiske-Subbarow consiste en medir el complejo fosfomolibdato formado por la interacción de fosfato y molibdato de amonio en presencia de ácido sulfúrico.

Metodología:

Reactivos:

Solución estándar de fosfato: Se utilizó fosfato di potasio (K_2HPO_4) de grado analítico secado previamente en estufa a 60°C durante 48 horas.

Solución A: Acido ascórbico (DSM Lote: TL00601506) 1.76 g, Acetona (Anedra) 2.5 ml, se lleva a volumen final de 100 ml con agua bidestilada.

Solución B: 1 g de Heptamolibdato de amonio (Baker Lote: 57150) en 50 ml de agua bidestilada, posteriormente se incorporan 6.2 ml de H_2SO_4 y se lleva a volumen final de 100 ml con agua bidestilada.

Capítulo 3

Solución C: 0.5 ml de solución A combinado con 0.5 ml de solución B. (**Nota:** se debe preparar en el momento, las soluciones A y B pueden ser preparadas de manera proporcional a la mitad de volumen).

Ensayo:

En tubos tipo eppendorff de 1.5 ml, se toman 0.5 ml de Solución C y se combinan con 0.25 ml de mezcla de solución a evaluar. Se agita mediante vortéx o de manera enérgica incubándose durante 10 minutos a 60 °C. Posteriormente se colocan las muestras durante 3 minutos en hielo de manera de estabilizar el complejo y luego se toman lecturas en espectrofotómetro, a 660 nm. La curva de calibración se realiza paralelamente a las muestras con cada determinación.

Curva de calibración:

Referencia 1: Se toman 25 ml de la solución Referencia 2 y diluir a 50 ml con agua (concentración final aproximada de 0.0174 mg/ml – 0.01 mM).

Referencia 2: pesar 0.035 mg y diluir a 1000 ml con agua (concentración final aproximada de 0.02 mM).

Referencia 3: pesar 0.070 mg y diluir a 1000 ml con agua (concentración final aproximada de 0.04 mM).

Referencia 4: pesar 0.104 mg y diluir a 1000 ml con agua (concentración final aproximada de 0.06 mM).

Referencia 5: pesar 0.139 mg y diluir a 1000 ml con agua (concentración final aproximada de 0.08 mM).

Referencia 6: pesar 0.174 mg y diluir a 1000 ml con agua (concentración final aproximada de 0.1 mM).

Capítulo 3

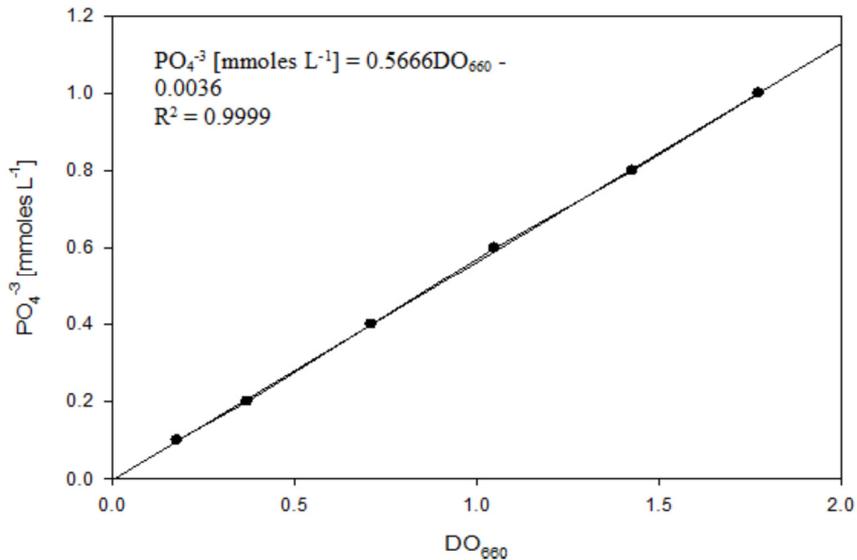


Figura 15 Gráfica típica de cuantificación de fosfato. Se observa un alto grado de sensibilidad del método.

La figura muestra una típica curva estándar para el análisis de la concentración de fosfato inorgánico.

El método es sensible, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos para cada evaluación realizada. Los coeficientes de variación siempre se encontraron en los mismos órdenes de magnitud. Sobre un promedio de cinco determinaciones individuales la ordenada arroja una desviación estándar de ± 0.04 .

Para la lectura de las medidas de concentraciones cercanas a 1 mM se realizaron diluciones de las muestras 1:3, cuando las lecturas a realizar eran del orden de 10 mM, las diluciones fueron de 1:50.

3.4.2.4 Determinación de ácidos orgánicos por HPLC

La identificación y cuantificación de los productos metabólicos que se formaron, se realizó mediante la técnica de HPLC. La columna fue específica para ácidos orgánicos. La misma es de fase reversa, con una fase estacionaria de poli estiren-divinilbenceno sulfonados, de 150 mm de longitud. Esta columna separa bien ácidos tartárico, málico, cítrico, láctico, acético y succínico, con valores de factor de retención de soluto ($k' = (V_r - V_o)/V_o$) incrementándose, a un pH de fase móvil dado, para un ácido más débil con respecto a uno

Capítulo 3

más fuerte. (Dan P. Lee y col. 1992). Por ejemplo de esta forma el ácido láctico (pKa 3.9) eluye antes que el ácido acético (pKa 4.8). La fase móvil fue ácido sulfúrico en agua, H₂SO₄ 0.1 M, teniendo un pH de 1.6 aproximadamente. De esta forma se asegura que los ácidos a separar estén protonados en su mayor proporción y pueda incrementarse la resolución de los picos.

Sistema Cromatográfico

Equipo: cromatógrafo de fase líquida de alta resolución (Waters), con detector Waters 2996 de arreglo de diodos.

Columna: columna Hamilton PRP-X300 (150 x 4.6 mm).

Fase móvil: 0.1 M H₂SO₄ (pH 1.6)

Caudal: 2 ml/minuto.

Detección: Arreglo de diodos. Lectura al UV: 209 – 210 nm.

Inyección: 20 µL.

Temperatura: 25°C.

Cuantificación: medición de áreas.

Tiempo de corrida: 2 veces el tiempo de retención del ácido láctico (aproximadamente 6 minutos).

Software: Empower.

Ensayo: Se prepararon patrones de acético, acético/láctico, málico, fumárico, succínico, oxálico, fórmico, todos a 1 mg/mL y se llevaron a pH ~ 1.6 con Las muestras se filtraron directamente mediante filtros Millipore de 0.45 y 0.22 µm y se acidificaron posteriormente a pH ~1.6 con H₂SO₄.

Se realizó una curva de calibración con patrones de láctico/acético, para la cuantificación de los mismos en las muestras. Estos ácidos generalmente son los más típicos en aparecer tanto en metabolismo de sobre flujo como en estado netamente oxidativo en *E. coli*.

Para la cuantificación se realizó una regresión donde a y b = coeficientes de la recta de regresión obtenida a partir de las referencias, del tipo: *Señal = a + b. Concentración.*

Capítulo 3

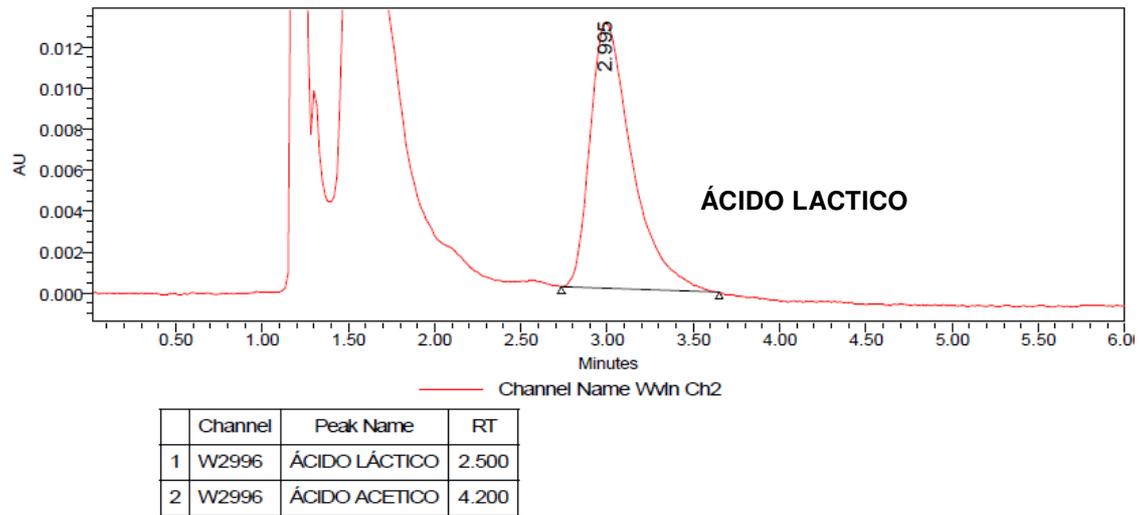


Figura 16 Grafica típica del perfil de elusión del patrón de ácido láctico

3.4.2.5 Determinación de etanol

Se evaluó mediante un kit enzimático Boehringer Mannheim, que utiliza las reacciones de las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, determinando la formación de novo de NADH y cuantificando el mismo mediante medidas espectrofotométricas a 340 nm.

3.4.2.6 Determinación de la estabilidad de plásmido

La cantidad de células que contienen plásmidos se determinó plaqueando muestras de los cultivos del biorreactor en placas con el medio de cultivo correspondiente con o sin los antibióticos apropiados. La estabilidad del plásmido se registró como el porcentaje de células resistentes al antibiótico correspondiente. Por otro lado, el factor crucial que determina el número de copias de plásmido es el sistema de replicación. La mayoría de los sistemas de replicación en uso hoy en día pertenecen generalmente a un pequeño número de diferentes orígenes similares a ColE1, incluidos pUC, pBR322 (también llamado pMB1). El origen pBR322 es el prototipo de la clase, mientras que el origen pUC lleva una mutación puntual en el RNA del cebador de iniciación que estabiliza el complejo de cebado, lo que da como resultado un mayor número de copias.

Capítulo 3

El número de copias de plásmido por célula se basa en el cálculo del peso molecular del plásmido el peso molecular medio de una base es 309 g mol^{-1} [22-23] en relación con el número de células estimado por microscopia o peso seco. Para ello previamente debemos cuantificar el plásmido mediante el kit comercial Wizard® Plus SV Mimiprep (Promega).

Contenido de plásmido cP_1 [$\mu\text{g mL}^{-1}$ cultivo] = $(\epsilon\text{DNA} \times E260 \times V\text{Eluido}) / (\text{OD}_{600})$

Contenido específico de plásmido cP_2 [$\mu\text{g mg}^{-1}$ peso seco] = cP_1 / X

Número de copias de plásmido cP_3 [numero por célula] = $(cP_1 / \text{PMplásmido}) / N_{\text{células}}$

Ver Tabla.11.

3.4.3 Mediciones y cálculos *On-line*

3.4.3.1 Medida de gases

Para los distintos cultivos continuos y en Batch en biorreactor se midió la composición de fase gaseosa.

Para la determinación del contenido en O_2 y en CO_2 de los gases de salida se utilizó un detector de tipo paramagnético (Servomex Serie 1100, UK) y de un detector infrarrojo (Horiba Pir 2000, Japón), respectivamente.

Para los cultivos en biorreactor (Inceltech LH 210) se tuvo en cuenta el siguiente cálculo propio del equipo $K_{La} = 0.000265 * \text{r.p.m}^{(2.098)}$. Esta ecuación fue determinada experimentalmente para ese reactor en particular luego de realizar sendas experiencias. El coeficiente de correlación de la misma fue de $R^2 = 0.970$. Los valores de r.p.m. pueden variar entre 200 y 1200.

La gran ventaja de esta ecuación es que permite predecir si un cultivo se encuentra o no limitado en oxígeno.

Son muchos los productos cuyo rendimiento está ligado a un buen suministro de O_2 , por ejemplo: biomasa, antibióticos, aminoácidos, etc. La solubilidad del O_2 en agua es muy baja y debe reponerse constantemente a medida que es consumido por el cultivo. Por tal motivo es de suma importancia contar con un criterio para evaluar la capacidad de suministrar O_2 del biorreactor donde se realizará el bioproceso.

Capítulo 3

3.4.3.2 Datos respiratorios

Las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ fueron calculadas mediante un balance en fase gaseosa, que resulta en las siguientes ecuaciones:

$$r_{O_2} = - \frac{F}{V} \times 0.79 \times \frac{T^\circ}{T} \times \frac{1}{22.4} \left(\frac{\%O_2salida}{100 - \%O_2salida - \%CO_2salida} - \frac{\%O_2entrada}{100 - \%O_2entrada} \right)$$
$$r_{CO_2} = \frac{F}{V} \times 0.79 \times \frac{T^\circ}{T} \times \frac{1}{22.4} \left(\frac{\%CO_2salida}{100 - \%O_2salida - \%CO_2salida} \right)$$

F es el caudal de aire, expresado en litro de aire/ hora, V es el volumen de la fase líquida, T° es 298 K, y T es la temperatura ambiente 310 K, los % de entrada y de salida son los medidos en los analizadores de O₂ y CO₂.

El coeficiente respiratorio (CR) se calculó como la relación entre la velocidad de formación de CO₂ (rCO₂) y la velocidad de consumo de O₂ (rO₂).

3.4.4 Preparación y cuantificación de proteínas

3.4.4.1 Método de Bradford

El método de Bradford [20] se basa en la formación de complejos no covalentes fuertemente coloreados en el visible entre distintas cadenas laterales y un colorante. Este método es más sensible que el de Lowry, a baja concentración de proteínas pero es más difícil de estandarizar correctamente. El colorante interactúa fuertemente con el plástico y el cuarzo, lo que obliga a usar celdas de plástico descartables o placas de fosas múltiples con lectores automáticos tipo ELISA. El método de Bradford tiene una respuesta marcadamente no lineal y debe hacerse una curva de calibración cada vez que se usa.

Estándar: Se utilizó BSA stock: 1.4 mg/ml. Concentración de BSA de trabajo: dilución 1:10 (0.14 mg/ml de BSA)

Rango de linealidad de Bradford: 8 - 80 µg/ml.

Ensayo: Básicamente, las proteínas extracelulares se analizaron de acuerdo con el método descrito por Bradford. Brevemente, 0.1 ml de muestra se mezcló con solución de reactivo 0.9 ml [que contiene 100 mg/L de Coomassie - Brilliant- Azul G-250, 50 ml/L de etanol

Capítulo 3

(95 %), 100 ml/L de ácido fosfórico (85 % w / v), se filtró] y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 595 nm. La figura 17 muestra una típica curva estándar para el análisis utilizando BSA como estándar.

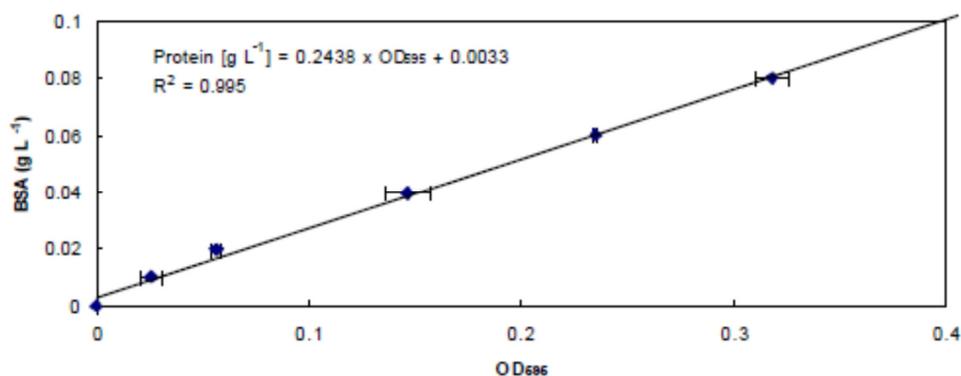
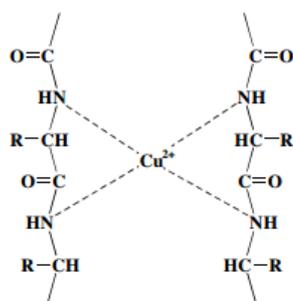


Figura 17 Gráfica típica de cuantificación de BSA.

3.4.4.2 Método de Biuret

Se basa en la formación de un complejo coloreado entre el Cu^{2+} y los grupos NH de los enlaces peptídicos en medio básico. 1 Cu^{2+} se acompleja con 4 NH (Fig.18). La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de proteínas (enlaces peptídicos) y la reacción es bastante específica, de manera que pocas sustancias interfieren. La sensibilidad del método es relativamente baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (por ejemplo en extractos iniciales de ruptura de biomasa por prensa). La reacción produce un compuesto de color violeta, debido a la formación de un complejo de coordinación entre los iones Cu^{2+} y los pares de electrones no compartidos del nitrógeno que forma parte de los enlaces peptídicos presentando un máximo de absorción a 550 nm.



Capítulo 3

Figura 18 Esquema general de la reacción química.

Ensayo: Reactivo de Biuret Reactivo preparado del siguiente modo. Se disuelven 3.8 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6.7 g NaEDTA en 700 ml de H_2O . Mientras se agita añadir 200 ml de NaOH 5N y luego 1 g de KI como estabilizante. Debe almacenarse en un frasco de plástico. Cabe mencionar que las concentraciones altas de sales de amonio y glicerol interfieren con la reacción. Se utiliza BSA como estándar. Básicamente deben diluirse las muestras con el buffer adecuado y preparar diluciones en un rango que vayan de 1 a 10 mg/ml, puede estimarse los mismos mediante A_{280} se utiliza 1 ml de muestra con 9 ml de reactivo, se agita enérgicamente se deja reposar 20 minutos y posteriormente se lee a A_{550} junto con la curva de calibración. La figura 19 muestra una típica curva estándar.

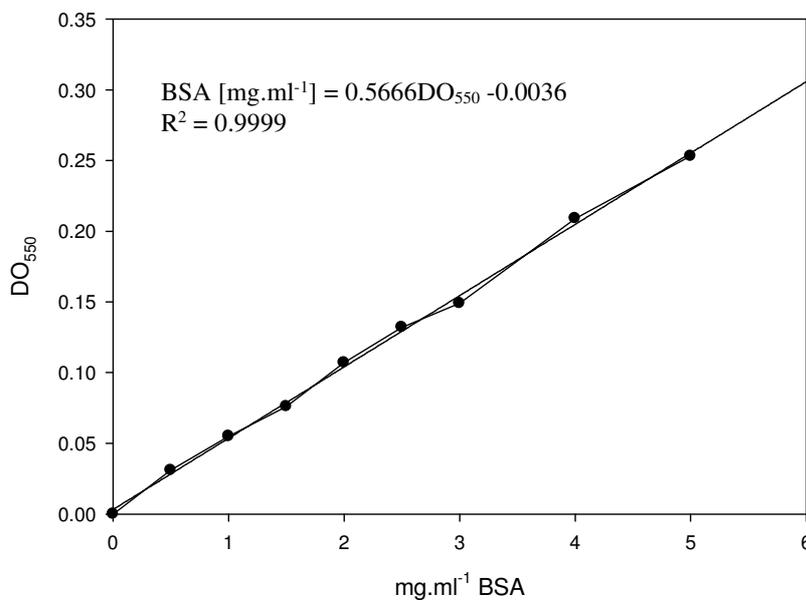


Figura 19 Grafica de determinación de proteínas por el método Biuret.

3.4.4.3 Preparación de Cuerpos de Inclusión

Luego de llevar a cabo el cultivo líquido se centrifugó a 15000 r.p.m. durante 10 min., el pellet de células (también puede provenir de un almacenamiento a -70°C) fue lavado dos veces con buffer PBS y tratado con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lisozima y se incubó durante 15 min. en hielo con agitación constante. A fin de completar la lisis celular, la mezcla fue sonicada con

Capítulo 3

una amplitud de 30 % durante 5 ciclos de 30 segundos, se centrifugó a 10000 r.p.m durante 10 min. a 4 °C y se separó el sobrenadante (fracción soluble) del pellet (fracción insoluble). El pellet fue tratado manteniéndolo en PBS a 4 °C con agitación constante durante 2 h. Las proteínas del pellet dependiendo del tratamiento fueron tratadas de acuerdo a cada apartado.

3.4.4.4 Ruptura celular mediante Prensa Francesa

La prensa francesa es un equipo de ruptura celular que funciona mediante el pasaje de las células a gran presión por un pequeño orificio a una cámara con presión baja, lo cual ocasiona la ruptura de las células por descompresión. El volumen apropiado de extracción en una prensa francesa es de 10 a 30 ml.

El procedimiento general fue el siguiente, se resuspendió el pellet (generalmente proveniente de tres Erlenmeyer de una misma condición o en todo caso ese mismo volumen proveniente de cultivo en biorreactor) en 25 ml de 50 mM Buffer fosfato pH 7.5. Se le adiciono al buffer 30 µl de PMSF. El rango de trabajo de la prensa es de KN (0 – 100 – 200 – 300 - 400) 10 KN 1 Ton. Por ejemplo, si inicialmente la concentración promedio del cultivo fue de 1.21 g/L de biomasa, por tanto en 800 ml de cultivo, habría 0.972 g/L. Al resuspender en 25 ml se obtiene una concentración celular de 38.9 g de biomasa en 25 ml. Se realizaron tres pasajes obteniendo una resistencia máxima de 100 KN. Entre pasaje se congelo la muestra por un lapso de 20 minutos a –22 °C (etanol). Con excepción de la primera incubación previa al primer pasaje que fue de 40 minutos. La presión realizada sobre el área efectiva aproximadamente arroja un valor de 18234.5 psi (1 Pa; 0.000145 psi). El producto obtenido se almaceno para futuros análisis.

3.4.4.5 Cromatografía de Afinidad

La técnica cromatográfica mediante una columna de Sefarosa asociada al aminoácido lisina como ligando, ha sido utilizada desde hace varios años debido a que une la angiostatina de una manera muy selectiva y facilita su purificación O'Reilly y col [21]. Ha sido utilizada

Capítulo 3

también para el aislamiento de plasminógeno y activadores del plasminógeno. La matriz se encuentra activada con CNBr y se suministra liofilizada en presencia de aditivos. Se pesa la cantidad necesaria de polvo (1 g de polvo liofilizado sobre 3.5 ml de volumen final de medio) y se resuspenden en HCl 1 mM. El medio se hincha inmediatamente y posteriormente debe lavarse durante 15 minutos con HCl 1 mM sobre un filtro de vidrio sinterizado (porosidad G3). Se utilizan 200 ml de HCl 1 mM aproximadamente por gramo de polvo liofilizado, añadido en varias alícuotas.

Ensayo: Inicialmente se prepara el buffer de acoplamiento del ligando: 0.1 M NaHCO₃ pH 8.3 conteniendo 0.5 M NaCl. Se utilizaron 1.5 g de resina y se lavaron con 8 ml de buffer de acoplamiento. Previamente se lavó cuatro veces con 50 ml de HCl 1 mM (buffer de lavado) en tubo falcon de 50 ml. Luego del proceso el volumen de matriz hidratada fue de aproximadamente 5 ml. Se adicionaron para esa cantidad de matriz 15 mg de lisina HCl (Anedra) la cantidad se corrigió por título como base. Se disolvió en la cantidad apropiada de buffer de acoplamiento la mezcla permaneció toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se homogeneizó la preparación mediante resuspensión por vortéx y centrifugación a 10000 r.p.m. a 4 °C. Se procedió con el protocolo de lavado utilizando cinco volúmenes de buffer de lavado. Finalmente se resuspendió la resina en 1 ml de PBS y se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

Protocolo de incubación: Se incubó la muestra con la matriz activada durante sesenta minutos con agitación a temperatura ambiente y luego la mezcla permaneció toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se centrifugó la preparación a 10000 r.p.m. a 4 °C durante quince minutos con el fin de eliminar proteínas no absorbidas. El remanente del sobrenadante se almacenó como “proteínas no retenidas”. Posteriormente se lavó tres veces con PBS pH 7.4 con 0.5 ml de buffer. El procedimiento consistió en mezclar por inversión entre cinco y seis veces y luego centrifugar la preparación a 10000 r.p.m. a 4 °C durante un minuto. Esta muestra de sobrenadante se rotuló como muestra “Muestra lavado 2”. Luego se incubó la matriz con 0.2 ml de NaCl 0.5 M con el fin de despegar proteínas inespecíficas. Se incubó por agitación rotacional durante treinta minutos luego se puso a centrifugar la preparación a 10000 r.p.m. a 4 °C durante un minuto. Esta muestra de sobrenadante se rotuló como muestra “Muestra NaCl 3”. Para finalizar, se lavó tres veces con 0.5 ml de PBS pH 7.4 , esta muestra de sobrenadante se rotuló como muestra “Muestra lavado 4”.

Capítulo 3

Protocolo de elución: Se incubo la matriz colocada previamente en una jeringa de 5 ml. Se sembró la totalidad de la muestra mediante bomba peristáltica con un caudal de 0.5 ml por minuto, fue necesario incorporar 2 ml de PBS pH 7.4 para arrastrar la muestra retenida en la manguera. Comenzó a llevarse a cabo el proceso de elución con de ácido ϵ - Amino caproico 200 mM. Aproximadamente cada cinco minutos se tomaron muestras y se efectuaron medidas a A_{280} como control del proceso. Las muestras de cada etapa del proceso se almacenaron según el caso para futuras determinaciones.

Nota: Debido a la escala evaluada y generalmente a la escasa cantidad de muestra y a los efectos de dilución que las mismas podrían ser sometidas, se trabajo a una única condición de flujo de elución. No fue realizado experimento de sobrecarga de columna.

3.5 Bibliografía

- [1] Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. 1979, Nov 24; 7(6), Nucleic Acids Res.: 1513-23.
- [2] Makino K, Shinagawa H, and Nakata A. Cloning and Characterization of the Alkaline Phosphatase Positive Regulator Gene (phoB) of *Escherichia coli*. 1982, 187, Mol Gen Genet: 181-186.
- [3] Christie, G. E., Farnham, P. J. & Platt, T. Synthetic sites for transcription termination and a functional comparison with tryptophan operon termination sites in vitro. 1981, 78, Proc. Natl. Acad. Sci.: 4180-4184.
- [4] Yuan, L., S. P., Craig, y col. The hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase of *Schistosoma mansoni*. Further characterization and gene expression in *Escherichia coli*. 1990, 265(23), J Biol Chem: 13528-13532.
- [5] Brankamp, R.G., y col. Expression of a Synthetic Gene Encoding the Anticoagulant-Antimetastatic Protein Ghilanten by the Methylotropic Yeast *Pichia pastoris*, 1995. 6, Protein Expression and Purification: 813-820.
- [6] J Lin, D., Panigraphy, LB., Trinh, J Folkman and J Shiloach. Production process for recombinant human angiostatin in *Pichia pastoris*, 2000. 24, J Ind Microbiol Biotechnol.: 31–35.
- [7] Riesenber D., M. K., Schulz V., Veith G., Zuber G, Knorre W. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1, 1990. 34, Appl Microbiol Biotechnol.: 77-82.

Capítulo 3

- [8] Daum, J., Donner. P., Geilen, W., Hiibner-Kosney, G., Isemhagen, M. Scheidecker. H., Seliger, H., Boidol, W. and Siewert. G. Production of human adrenocorticotropin by cleavage of alkaline- phosphatase-derived fusion proteins containing repetitive recognition sequences for collagenases. 1999. 185, Eur. J. Biochem.: 347-354.
- [9] Donovan RS., Robinson CW., and Glick BR. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. 1996. 16, J Ind Microbiol Biotechnol.: 145-154.
- [10] Roels, JA., Energetics and kinetics in biotechnology. 1983a. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- [11] Laemmli., U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. 1970. 227, Nature. : 680 – 685.
- [12] Chaney A. L., Marbach E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. 1962. 8, Clin Chem.:130-2.
- [13] Taylor, A.E. & Miller, C.W. On the estimation of phosphorus in biological materials. 1914. 18, J. Biol. Chem.: 215-224.
- [14] Berendblum, J. & Chain, E. Studies on colorimetric determination of phosphate. 1938. 32, Biochem. J.: 286-295.
- [15] Fontaine, T.D. Spectrophotometric determination of phosphorus. 1942. 14, Industr. Eng. Chem., Anal. Ed.: 77-78.
- [16] Woods, J.T. & Mellon, M.G. The molybdenum blue reaction, Indutr. 1941. 13, Eng. Chem., Anal. Ed.: 760-764.
- [17] Fiske, C.H. & Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. 1925. 66, J. Biol. Chem.: 375-400.
- [18] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [19] Davis LG, Kuehl WM, Battey JF. 1994. Basic Methods in Molecular Biology. 2nd ed. Norwalk: Appleton & Lange.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye binding. 1976. 72, Anal Biochem.: 248-54.
- [21] O'Reilly, M. S., L. Holmgren, y col. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. 1994. 79(2) Cell.: 315-328.
- [22] Paliy O, Gunasekera TS. Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Jan;73(5):1169-72. doi: 10.1007/s00253-006-0554-8. Epub 2006 Aug 30. Erratum in: Appl Microbiol Biotechnol. 2006 Dec;73(4):968. PMID: 16944129.

Capítulo 3

[23] Nyström T, Neidhardt FC. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 1992 Nov;6(21):3187-98. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb01774.x. PMID: 1453957.

CAPITULO 4:

CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES

DE CLONADO Y EXPRESIÓN

4.1 Vector de clonado

4.1.1 Diseño de primers

Como se mencionó en la introducción, originalmente se contó con una construcción plasmídica (el plásmido pPIC9K) que contiene el cDNA del gen de angiostatina humana (kringle 1-4). El mismo fue obtenido gracias al aporte del grupo del Dr. Kashi Javaherian del Hospital de Niños de Boston y la Escuela de Medicina de Harvard, Boston, MA.

Sobre ese material se realizó el diseño de los primers para la amplificación del segmento de interés con el siguiente detalle, ambos vectores de expresión para *E. coli* poseen los mismos sitios de inserción *NdeI* y *Sall*. El sitio de la primera enzima de restricción introduce forzosamente una metionina inicial justo antes del segundo aminoácido (V), este mismo corresponde al aminoácido número 78 si se lo considera desde la expresión original del plasminógeno. Anterior al segundo sitio de clonado se introdujo una señal de STOP (TTA) para dar fin a la expresión del ORF. Como puede verse en la figura 20 la M (*en negrita*) vendría a reemplazar el primer aminoácido original. El primer aminoácido original del primero de los kringles se trata de Val⁷⁸ (Sección. 1.4.1)

MVYLSECKTGN GKNYRGTMSK TKNGITCQKW SSTSPhRPRF SPATHPSEGL EENYCRNPDN DPQGPWCYTT DPEKRYDYCD
ILEC^EEE^ECMH CSGENYDGKI SKTMSCLECQ AWDSQSPHAH GYIPSKFPNK NLKKNYCRNP DRELRPWCFT TDPNKRWELC
DIPR^CTTPPP SSGPTYQ^CCLK GTGENYRGNV AVTVSGHTCQ HWSAQTPHTH NRTPENFPCK NLDENYCRNP DGKRAPW^CHT
TNSQVRWEY^C KIPSCDSSPV STEQLAPTAP PELTPVVQDC YHGDGQSYRG TSSTTTTGKK CQSWSSMTPH RHQKTPENYP
NAGLTMNY^CR NPDADKGPWC FTTDPSVRWE YCCNLK^CCSG TEA

Figura 20 Secuencia de aminoácidos de los dominios kringles 1- 4 de la angiostatina humana. La secuencia de aminoácidos se representa como una cadena de letras, siguiendo el código de 1 letra. Los residuos de cisteína involucrados en enlaces disulfuro se muestran en amarillo.

Capítulo 4

En ambos casos, una vez obtenidas las secuencias de primers, las mismas fueron analizadas mediante el software Vector NTI Advance (TM) 11.0 para confirmar la estabilidad termodinámica, la ausencia de posibles estructuras secundarias y la formación de dímeros. Los primers diseñados se muestran en (Sección 3.3.2) Tabla. 7.

4.1.2 Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR para la amplificación del fragmento con el fin de introducir sitios de restricción para su posterior subclonado, se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo Standard (Sección 3.3.2). Se evaluaron sendas diluciones de la muestra inicial para ajustar la reacción en función de la concentración del molde a amplificar. Una reacción estuvo constituida por DNA sin diluir y el resto con diluciones 10, 100 y 1000. Se utilizaron como molde 1 μ l del DNA previamente obtenido en un volumen final de 25 μ l. El perfil de ciclado empleado para cada reacción de PCR se detalla en la siguiente tabla:

PCR de amplificación de la angiostatina usando pPIC9k como molde (Sección 3.1.2)		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94 °C	2 minutos	1
94 °C	30 segundos	30
55 °C	30 segundos	
72 °C	1 minuto	
72 °C	5 minutos	1

Tabla. 9 Condiciones de ciclado de PCR.

Para confirmar los resultados obtenidos, 5 μ l del producto de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Sección 3.3.6).

4.1.3 Ligación en el vector pCRTPO2.1

Capítulo 4

Luego de verificar que el producto de PCR tuviera el tamaño esperado, aproximadamente unos 1100 pb, el amplicon fue purificado tal cual lo detallado para productos de PCR (Sección 3.4.2.6). Una vez puro, el producto fue clonado en el vector pCRTOPO2.1 (Invitrogen). La reacción de ligación se llevo a cabo a partir de 3 μ l (~80 ng) del producto de PCR al que se le agregó 1 μ l de una solución 1.2 M de NaCl y 1 μ l de una mezcla conteniendo 10 ng del vector, el buffer de reacción adecuado y la enzima Topoisomerasa I. Las mezclas de ligación fueron incubadas a 25 °C durante 15 minutos y se utilizaron inmediatamente para transformar bacterias químicamente competentes (*E. coli* cepa: TOP10) por shock térmico que luego fueron sembradas en placas de LB Amp con IPTG y X-Gal (Sección 3.3.3).

4.1.4 Análisis de las colonias

Para confirmar la presencia del inserto, 10 colonias blancas tomadas al azar de cada una de las construcciones fueron analizadas mediante previo crecimiento en medio líquido y posterior extracción de DNA plasmídico seguido del tratamiento mediante enzimas de restricción.

Se inocularon en tubos eppendorf en medio líquido LB 750 μ l, con ampicilina 100 μ g/ml, a 37 °C y 200 r.p.m., para efectuar miniprep a partir de cultivo líquido. Todo por duplicado para realizar glicerol *stock*.

Se procedió a realizar la extracción de DNA plasmídico (Sección 3.3.4). Se resuspendió en un volumen de 20 μ l con agua purificada libre de nucleasas.

El plásmido posee la particularidad de liberar el inserto si se lo digiere con la enzima *EcoRI*. Se llevó a cabo la digestión del vector nombrado como pCR2.1KI-IV con *EcoRI*, para chequear la presencia del gen de angiostatina.

Una vez hallados los clones adecuados para utilizar en los subsiguientes pasos de clonado fueron almacenados a -70 °C en glicerol hasta su uso.

Capítulo 4

4.2 Vectores de expresión pET 22b (+) / pBAce

Como se menciona en la introducción, la propuesta de utilizar dos sistemas de expresión totalmente diferentes tiene dos objetivos, por un lado la manifestación de la expresión de angiostatina de acuerdo a los antecedentes utilizando el sistema pET [1-3] y por otro lado el sistema empleando la inducción mediante limitación de fosfato inorgánico, lo cual permitiría contrastar la asociación de la expresión a una hipotética inducción gradual y sus implicancias metabólicas luego de la misma respecto del sistema de expresión comercial.

4.2.1 Caracterización de los vectores de expresión

El objetivo de esta etapa fue caracterizar los vectores de expresión mediante enzimas de restricción de manera de poder aseverar que los perfiles corresponden a los mismos puros sin evidenciar errores (tamaño inespecífico, perfil de restricción diferencial, etc.).

Para comenzar esta etapa el DNA de los plásmidos fue obtenido previa transformación bacteriana, cultivo en medio líquido y posterior purificación de los mismos.

Se cuenta con la secuencia completa de los mismos y los perfiles de restricción fueron analizados previamente con el programa Clone Manager Ver. 4.01.

Los procedimientos iniciales que se describen para la obtención del material solamente se efectuaron para el plásmido pBAce, dado que el pET 22b se encuentra como stock ya que es de uso habitual en el laboratorio. Se procedió tal cual lo comentado en (Sección 3.3.3) en este caso se transformaron 0.1 ml de bacterias *E. coli* TOP 10 con 2 µl de plásmido pBAce las cuales fueron sembradas en placas de Petri manteniendo la presión de selección.

A las 24 horas se seleccionó un clon aislado y se realizó un cultivo líquido de 5 ml en medio LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml, a 37 °C y 200 r.p.m., para efectuar una purificación del DNA de alta calidad y concentración (Sección 3.4.2.6).

Se realizó un almacenamiento en glicerol al 15% a – 70°C del clon *E. coli* TOP 10 / pBAce.

Capítulo 4

La enzima de restricción seleccionada para efectuar el mapeo de restricción del vector pBAce fue *PvuII*, la misma arroja dos fragmentos bien diferenciales entre sí, uno de 2513 y otro de 746 bp.

Revelada la identidad de los vectores puros se procedió al clonado direccionado del producto de PCR clonado en el vector PCR2.1 denominado pCR2.1KI-IV (Sección 4.1.4) se obtuvieron de 2 clones de 10, denominados clon 4 y clon 5 en los vectores de expresión pBAce y pET22b.

Para tal fin se realizaron las siguientes actividades:

- Digestión enzimática del inserto (pCR2.1KI-IV clon 4) y del vector pBAce con las enzimas de restricción *NdeI* y *SalI*.
- Digestión enzimática del inserto (pCR2.1KI-IV clon 4) y del vector pET22b con las enzimas de restricción *NdeI* y *SalI*.
- Aislamiento y purificación de los productos de digestión.
- Ligación del gen de la angiostatina a los vectores de expresión.
- Transformación bacteriana en cepas de expresión *E. coli* BL21 (DE3).

Para las digestiones de los productos, vector / clon 4 (inserto) la reacción fue la siguiente:

Reacción de Digestión Enzimática	Cantidad (µl)
Vector / inserto (clon 4)	25
Buffer 10X (O)	4
<i>NdeI</i> (Fermentas)	1.5
<i>SalI</i> (Fermentas)	1.5
Agua Purificada c.s.p	40

Tabla. 10 Reacción de digestión enzimática general para los dos fragmentos de DNA.

La reacción se llevo a cabo durante toda la noche a 37 °C. Para la purificación de los fragmentos se realizo previamente una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE con la totalidad del producto de digestión. Luego se efectuó la purificación de los ácidos nucleicos (Sección 3.3.5), se realizó con Wizard® Gel-PCR Preps DNA Purification System (Promega). Aislados los fragmentos se procedió a cuantificar los productos para formular las reacciones de ligado. Previamente se efectuó una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE con 5 µl de inserto y 5 µl de vector

Capítulo 4

para estimar su concentración a modo comparativo con el marcador de 100 bp de Promega. La ligación se realizó según especificaciones del fabricante de acuerdo al protocolo Part# 9PIM180 Promega. Las reacciones se adaptaron según el caso del vector utilizado.

4.2.1.1 Transformación bacteriana / Análisis de las colonias

Para el caso del sistema de expresión basado en el vector pBAce las condiciones fueron las siguientes, se utilizaron 4 µl de mezcla de ligado. Previamente se detuvo la reacción incubando la mezcla 10 min a 70 °C. Se transformaron 100 µl de células competentes de *E. coli* BL21 (Invitrogen). La mezcla se incubó 10 min en baño de hielo y 45 seg a 42° C, retornando el tubo inmediatamente al hielo. Luego se agregaron 700 µl de medio LB se incubó 60 min. a 37° C con agitación y se plaquearon alícuotas de 100 µl en placas de Petri con agar LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml.

Para el caso del sistema pET22b el procedimiento fue muy similar. También se utilizaron 100 µl de células competentes de *E. coli* BL21. Se utilizo medio LB para el repique y se plaquearon alícuotas de 150 µl en placas de Petri con agar LB con ampicilina 100 µg / ml.

4.2.1.2 Digestión mediante enzimas de restricción

El DNA de los clones obtenidos en cada caso fue purificado exhaustivamente (Sección 3.3.5), para posteriormente verificar la identidad de los vectores de expresión obtenidos.

En el caso del sistema de expresión basado en el vector pBAce se eligió la siguiente enzima para su caracterización (Sección 4.2.1) *NotI* y para el sistema de expresión pET22b la enzima de restricción elegida fue *HincII*.

Nuevamente para este fin se analizo la secuencia nucleotídica del plásmido obtenido basado en el vector pBAce mediante el programa Clone Manager Ver. 4.01.

4.2.1.3 Chequeo de los clones obtenidos por PCR

Capítulo 4

Se utilizó la técnica de PCR como un complemento de los estudios realizados mediante enzimas de restricción. El procedimiento fue detallado en (Sección 4.1.2).

Como moldes se utilizaron las muestras obtenidas de los clones de ambos sistemas de expresión según lo descrito en el punto anterior a diferencia que se incluyó como control positivo de la reacción de PCR el producto original obtenido (Sección 4.1.2). Debido a que sólo se intentó determinar la presencia del fragmento de la angiostatina, el número de ciclos de la reacción de PCR se disminuye a 20, y el tiempo de extensión final a 72 °C se redujo de 5 a 2 minutos.

4.2.1.4 Chequeo de clones mediante secuenciación

Para verificar la/s construcciones obtenidas del sistema de expresión basado en el vector pBAce, se diseñaron los siguientes *primers* Fw 5' CTGTCATAAAGTTGTCACGG 3' y Rv 5' AAAAAAAGCCCGCTCTTAGG 3'.

<u>GGTACCGGGC</u>	<u>CATCGAATTC</u>	TCATGTTTGA	CAGCTTATC	<u>ATCGATGGATA</u>	50	
KpnI	EcoRI			ClaI		
AGCATGAATA	TCGGCTTCGC	GGTCACAGAC	CGCAATCAG	TTCCTCATCA	100	
TGCTGCCCAT	GCGTAACCGG	CTAGTTGCGG	CCGCTGCCAG	CCATTTGCCA	150	
CTCTCCTTTT	CATCCGCATC	GGCAGGGTCA	TCCGGGCGCA	TCCACCACTC	200	
CTGATGCAGT	AATCCTACGG	TGCGGAATGT	GGTGGCCTCG	<u>AAATTCTGTC</u>	250	
<u>ATBAAGTTGT</u>	<u>CACGGCCGAG</u>	<u>ACTTATAGTC</u>	GCTTTGTTT	TATTTTTTAA	300	
-35		-10				
TGTATTTGTA	<u>CATGGAGAAA</u>	<u>ATCATATGGC</u>	<u>AATCGAT</u>	<u>GATAATC</u>	<u>GTCGAC</u>	349
	S.D.]	NdeI	ClaI	EcoRV	SalI	
<u>CTGCAGCCCG</u>	CCTAAGAGCG	GGCTTTTTTT	<u>TCTAGA</u>			385
PstI	trpA terminator		XbaI			

Figura 21 Región del MCS del vector pBAce.

Tomado de Craig y col. (1991). El primero de ellos es directamente la región conocida como “*phosphate box*” de la región promotora de la fosfatasa alcalina [4]. En la figura anterior aparece recuadrada. El otro primer es la secuencia complementaria de la región terminadora del operón triptófano. Lo que permitiría secuenciar esta región es determinar el correcto posicionamiento del marco de lectura de la angiostatina insertado posteriormente en el sitio *NdeI* y antes de la región terminadora sitio *SalI*. Se recuerda que el cebador original posee un codón de STOP antes de dicho sitio.

Capítulo 4

Para el caso del sistema pET22b se utilizaron *primers* disponibles de la región promotora y terminadora, con lo cual también nos permitiría determinar si la construcción se encuentra en el marco de lectura correcto.

Las muestras se remitieron al Departamento de Ecología, Genética y Evolución. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

4.3 Resultados

Para la expresión de la angiostatina se armaron dos vectores de expresión. Para conseguir esto, el plásmido conteniendo el cDNA de la angiostatina fue utilizado como molde para la amplificación, mediante PCR, del gen de la angiostatina, introduciendo además dos sitios adicionales de restricción (*NdeI* y *SalI*). El producto amplificado debe tener unos 1100 bp.

Posteriormente se procedió al clonado en el vector pCR2.1 mediante el sistema TOPO y se subclonó el producto obtenido en el vector de expresión pET 22b, obteniéndose finalmente como producto el vector de expresión pEKI-IV. Análogamente, se subclonó el inserto en el vector de expresión pBAce para obtener el vector pBKI-IV. Esto fue logrado dado a que el vector conteniendo el gen pCR2.1KI-IV fue digerido con las enzimas *NdeI* y *SalI*. Simultáneamente, como control de los vectores se realizó la digestión del vector de expresión pET22b (+) y del vector de expresión pBAce con los mismos pares de enzimas. Los fragmentos resultantes de la digestión enzimática fueron purificados a partir de un gel de agarosa y posteriormente ligados de manera tal de mantener una relación molar de 3:1 entre el inserto y el vector. A continuación cada una de las mezclas de ligación fueron empleados para transformar bacterias competentes BL21 (DE3) que luego se sembraron en placas de Petri conteniendo medio LB con ampicilina, lográndose alrededor de 20 colonias en la placa correspondiente a la construcción pEKI-IV y solamente 2 colonias en la placa del pBKI-IV.

Capítulo 4

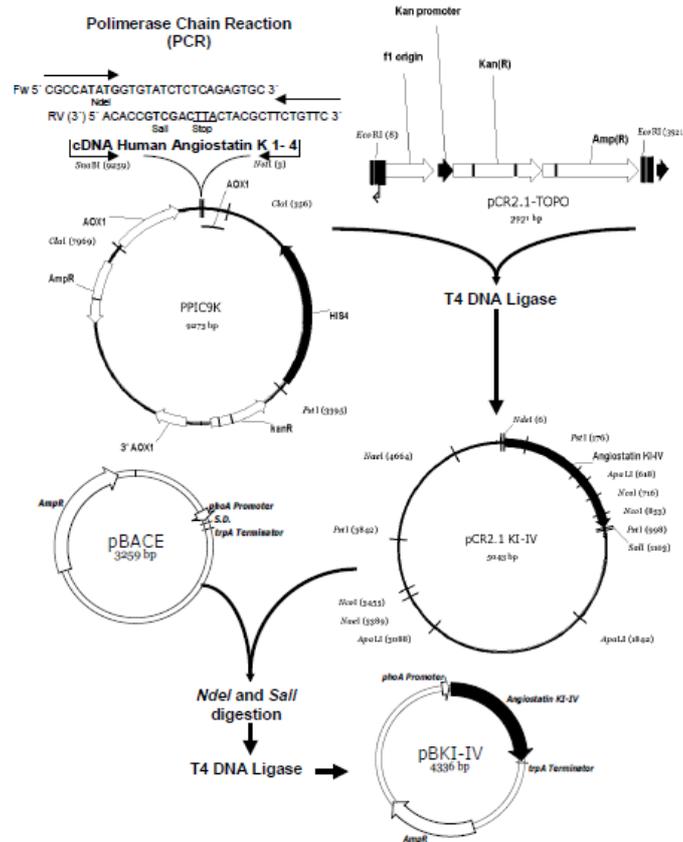


Figura 22 Esquema general de la estrategia de clonado en el vector de expresión pBACE.

La figura 22 muestra el esquema general de la estrategia de clonado. Tomado de Niosi y col. 2009⁴. Una estrategia idéntica fue llevada a cabo con el vector pET22b arrojando el vector denominado pEKI-IV de un tamaño de 6483 bp.

Como se mencionó al comienzo de la presente sección, con el fin de lograr la correcta expresión del fragmento, se incorporó un codón de inicio en el extremo 5' del primer FW, también se agregaron sitios de reconocimiento para las enzimas *NdeI* y *SalI* en los primers FW y RW respectivamente. Los resultados de la reacción de PCR fueron los siguientes:

⁴ Expresión de Angiostatina humana recombinante en *Escherichia coli*. Jornada; X Jornadas de Farmacia y Bioquímica Industrial; 2009.

Capítulo 4

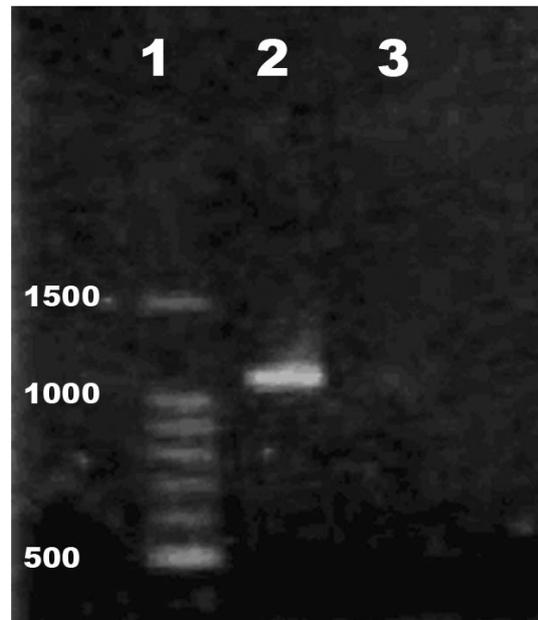


Figura 23 Resultados de la amplificación del producto de PCR.
(Sección. 4.1.2).

La figura 23 muestra los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de los vectores de plásmidos que contienen el cDNA pPICK9 de angiostatina después de la PCR. Calle 1: Marcador de peso molecular de DNA de 100 bp (Promega) Catálogo # G2101. Calle 2: Producto de amplificación de angiostatina (sin diluir). Calle 3: Control negativo. Luego de verificar que el producto de PCR tuviera el tamaño esperado, el producto fue purificado (Sección 3.4.2.6) y el amplicón fue directamente clonado en el vector pCRTPO2.1 (Sección 4.1.3).

Una vez llevada a cabo la transformación bacteriana y a fin de confirmar el fenotipo de las colonias obtenidas, un total de 10 colonias claramente blancas de la ligación, fueron repicadas a una *nueva* placa con IPTG y X-Gal para su verificación (Sección 4.1.4).

Para confirmar la presencia del inserto, 10 colonias blancas tomadas al azar de la construcción fueron analizadas. Para eso, el DNA plasmídico de las colonias positivas fueron chequeadas nuevamente por PCR (Sección 3.3.2) extraído por miniprep y posteriormente digerido con enzimas de restricción, *EcoRI* (Promega)

Capítulo 4

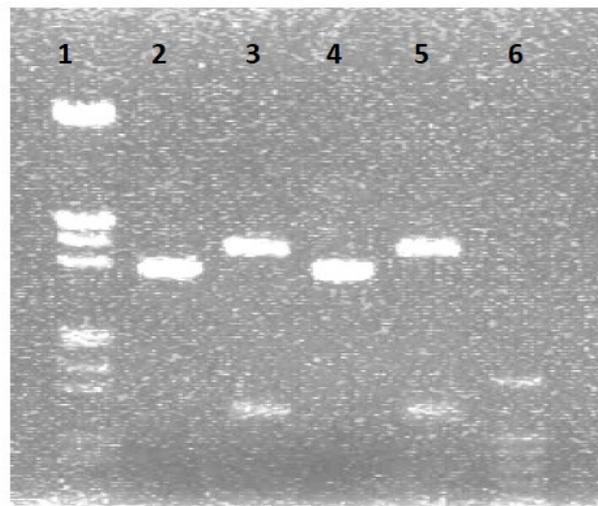


Figura 24 Digestión de los productos de ligación obtenidos mediante el vector pCRTOP02.1

La figura 24 muestra el resultado de la electrofóresis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE de los clones de plásmidos que contienen el cDNA de angiostatina después de clonar el producto de PCR en el vector pCRTOP02.1. Calle 1: Marcador de peso molecular de DNA del fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* de (Promega) Catálogo # G1731. Calle 2: Clon 4 (sin digerir). Calle 3: Clon 4 (digerido). Calle 4 Clon 5 (sin digerir). Calle 5 Clon 5 (digerido). Calle 6: DNA de 100 bp (Promega) Catálogo # G2101.

Se sembraron 10 μ l de lambda *EcoRI* y *HindIII* y 5 μ l del marcador de 100 bp de (Promega). En la corrida se aprecian las bandas del tamaño correcto y esperado.

Por este motivo, se realizara una doble digestión para escindir el fragmento clonado con los sitios introducidos *NdeI* y *Sall*. A partir de aquí se empleo el clon 4 como referencia.

Para verificar la integridad del vector de expresión pBAce el mismo fue digerido con la enzima de restricción *PvuII* (Sección 4.2.1).

Se disponía con anterioridad de 50 μ l de DNA del vector pBAce previamente obtenido mediante QUIAPrep Spin Miniprep Kit® Cat N° 27104; Lote: 11878455. Como reservorio del mismo se partió de *E. coli* TOP 10 / pBAce.

Se utilizaron 4 μ l de muestra y 2 μ l de enzima *PvuII* (Boehringer). La cantidad de Buffer 10X fue de 2 μ l (Buffer M) y la cantidad final de agua purificada de la reacción fue de 20 μ l. Se incubo 120 min. a 37° C. Se efectuó una corrida electroforética en gel de agarosa

Capítulo 4

1% en buffer TAE con la totalidad del producto de digestión. Los resultados fueron los siguientes:

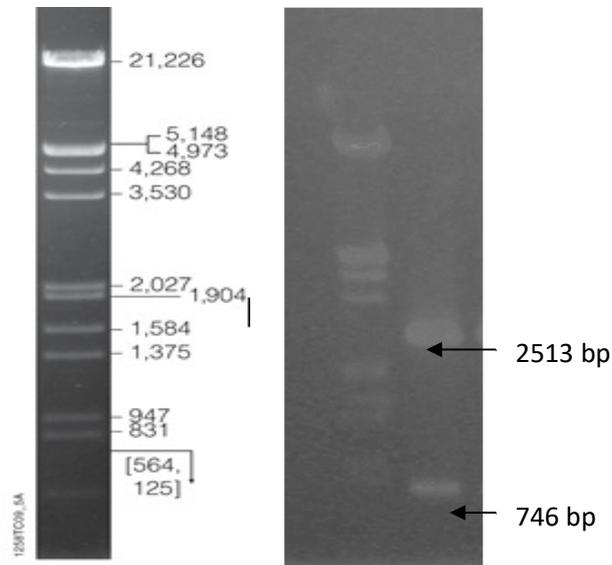


Figura 25 Verificación de la integridad del vector pBAce mediante digestión enzimática

El marcador de peso molecular es el DNA del fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* de (Promega) Catálogo # G1731. En la corrida se aprecian las bandas del tamaño correcto y esperado. Por este motivo, se realizara una doble digestión para ligar con el fragmento clonado con los sitios introducidos *NdeI* y *SalI*.

Para la construcción del vector derivado del sistema pET22b se siguió el siguiente protocolo. En primer lugar se realizó la digestión del vector pET22b y el plásmido pCR2.1KI-IV con las enzimas de restricción *NdeI* y *SalI* de la firma Fermentas en buffer O. La cantidad de producto a digerir fue de 25 μ l.

A continuación, el volumen total de cada una de las digestiones (40 μ l) fue sembrado en un gel de agarosa al 1% y se los separó por electrofóresis a 100 V durante 50 min. (Sección 3.3.6). Las bandas correspondientes a cada uno de los vectores e insertos fueron recobradas del gel por medio del kit comercial con Wizard[®] Gel-PCR Preps DNA Purification System (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cantidad de DNA en cada una de las muestras fue cuantificada, midiendo de la absorbancia a 260 nm (Sección 3.4.2.6) y

Capítulo 4

sobre la base de los resultados obtenidos se procedió a la ligación del vector y el inserto, para ello se usaron: 10 µl del vector (~100 ng), 6 µl del inserto correspondiente (~10 ng, 0.5µl (1U) de T₄DNA Ligasa (Promega), 2 µl de Buffer de reacción 10X y 1.5 µl de agua. Luego se incubo toda la noche a 4 °C, se tomaron 4 µl de la mezcla de ligación que fue empleada para transformar bacterias químicamente competentes mediante shock térmico (*E. coli* cepa: BL21DE3) que posteriormente fueron sembradas en cajas de Petri conteniendo LB con 100 µg/ml de ampicilina e incubadas a 37 °C durante 16 horas como se menciono anteriormente.

Luego de este tiempo, se observó el crecimiento de tres colonias. El DNA plasmídico de las mismas fue extraído por miniprep y luego se realizó una digestión enzimática con *HincII* (Promega) de acuerdo al protocolo convencional para verificar la presencia del inserto dentro del vector. Finalmente se realizaron stock en glicerol por triplicado a partir de los tres clones positivos de cada una de las construcciones que fueron almacenadas a -70 °C hasta su uso.

Se esperan dos fragmentos bien definidos de 3000 bp y 1300 bp. Para el otro caso luego de la digestión con *HincII* se espera que aparezcan fragmentos de 4054 bp y 2429 bp respectivamente.

Se utilizaron 5 µl de DNA de cada clon previamente purificado (Sección 3.3.5), 1 µl (0.1U) de *HincII* (Promega), 2 µl de Buffer de reacción 10X y 12 µl de agua purificada.

Se incubo durante 16 horas a 37° C en estufa y se efectuó una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE con la totalidad de los productos de digestión.

Capítulo 4

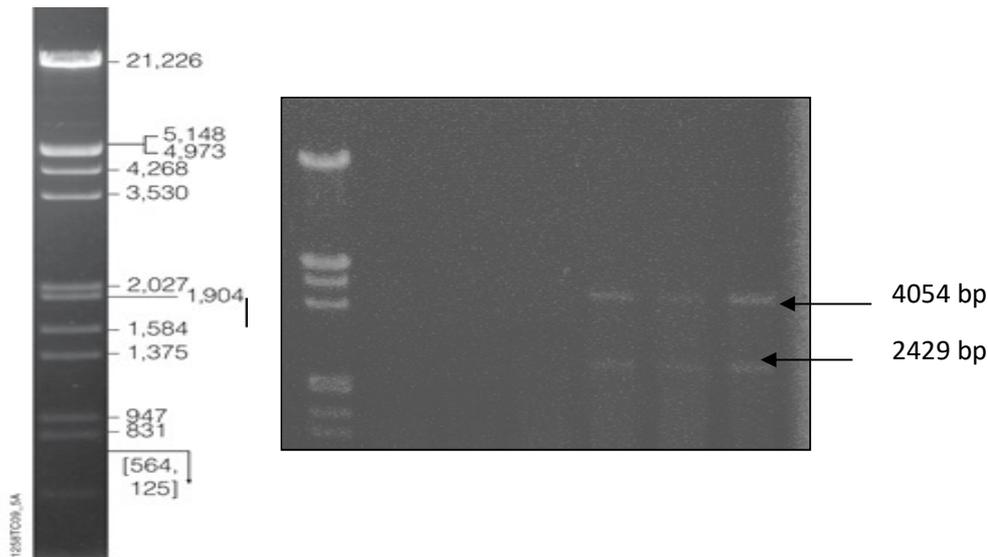


Figura 26 Digestión enzimática de los vectores de expresión obtenidos como pEK 1- 4 (1) / (2) / (3).

Como marcador de peso molecular se utilizó el DNA del fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* de (Promega) Catálogo # G1731. En la corrida se aprecian las bandas del tamaño correcto y esperado. Los vectores fueron bautizados como pEK 1- 4 (1) / (2) / (3).

El protocolo utilizado para el sistema pBAce fue similar, como se menciona en la Sección 4.2, se midió la concentración de DNA del vector (~10 ng). Por este motivo la ligación se lleva a cabo en idénticas condiciones que para el caso anterior, colocando 3 μ l de vector, 10 μ l de inserto (~10 ng), 0.5 μ l (1U) de T₄ DNA Ligasa (Promega), 1.5 μ l de Buffer de reacción 10X y 5 μ l de agua. Luego se incubó toda la noche a 4 °C.

Nuevamente, se tomaron 4 μ l de la mezcla de ligación que fue empleada para transformar bacterias químicamente competentes mediante shock térmico (*E. coli* cepa: BL21DE3) que posteriormente fueron sembradas en placas de Petri conteniendo LB con 100 μ g/ml de ampicilina e incubadas a 37 °C durante 16 horas de incubación como se menciona anteriormente. Luego de la incubación se observó el crecimiento de sólo dos colonias, de morfología regular y pura. Dichos clones fueron nombrados pBKI-IV(1) y pBKI-IV(2) respectivamente. Se realizaron dos cultivos líquidos de dichos clones en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina 100 μ g/ml, a 37° C y 200 r.p.m. creciendo durante 16 horas de incubación como fue habitual en tubos cónicos Falcón de 15 ml.

Capítulo 4

Se realizó la extracción de DNA de acuerdo a (Sección 3.3.5), y se llevó a cabo una reacción de digestión enzimática con *NotI* para determinar la presencia de fragmentos característicos que manifiesten su identidad de manera correcta. Para este fin se analizó la secuencia nucleotídica del plásmido mediante el programa Clone Manager Ver. 4.01. Se esperan dos fragmentos bien definidos de 3000 bp y 1300 bp. El volumen de DNA fue de 26 µl, se colocaron 3 µl de Buffer (3) 10X, 1 µl de enzima *NotI* (Invitrogen) y 5 µl de agua purificada. Se incubó durante 16 horas a 37° C en estufa. Se efectuó una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE con la totalidad de los productos de digestión.

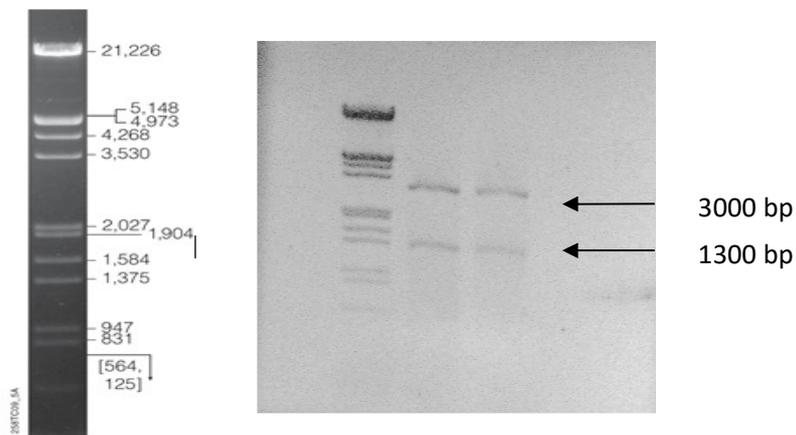


Figura 27 Verificación de la integridad de pBKI-IV(1) y pBKI-IV(2) mediante digestión enzimática con *NotI*.

Como marcador de peso molecular se utilizó el DNA del fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* de (Promega) Catálogo # G1731. En la corrida se aprecian las bandas del tamaño correcto y esperado. Los vectores se denominaron como pBK1- 4 (1) / (2).

Como se detalló en (Sección 4.2.1.3) se verificó mediante PCR la totalidad de los clones. Se utilizó 1 µl de molde de cada muestra en las condiciones habituales establecidas en un volumen final de 25 µl. Se efectuó una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE con la totalidad de los productos de amplificación.

Capítulo 4

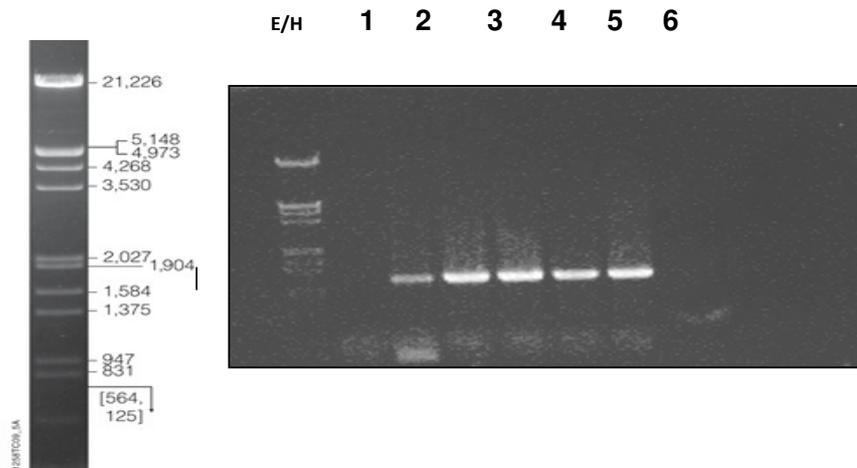


Figura 28 Clones de plásmidos que contienen el cDNA de angiostatina

La figura 28 muestra los resultados de la electrofóresis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE de los clones de plásmidos que contienen el cDNA de angiostatina. Marcador de peso molecular de DNA del fago λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* de (Promega) Catálogo # G1731. Calle 1: Control positivo (PCR pPIC9K). Calle 2: Clon 1 pBK1-4. Calle 3 – 5: Clones pEK1-4 (1); (2); (3) Calle 6: Control negativo. Se sembraron 10 μ l de lambda E/H. En la corrida se aprecian las bandas del tamaño correcto y esperado. Las mismas se ubican por debajo de la banda del marcador de 1375 y por encima de la de 947 bp.

Se recuerda que los ensayos de expresión en el sistema pET se realizarán para poder determinar fehacientemente la funcionalidad del gen de la angiostatina de manera de independizarse de la incertidumbre ante un posible nulo resultado en el sistema de expresión propuesto.

Capítulo 4

Con estos resultados se obtuvieron las dos construcciones de interés:

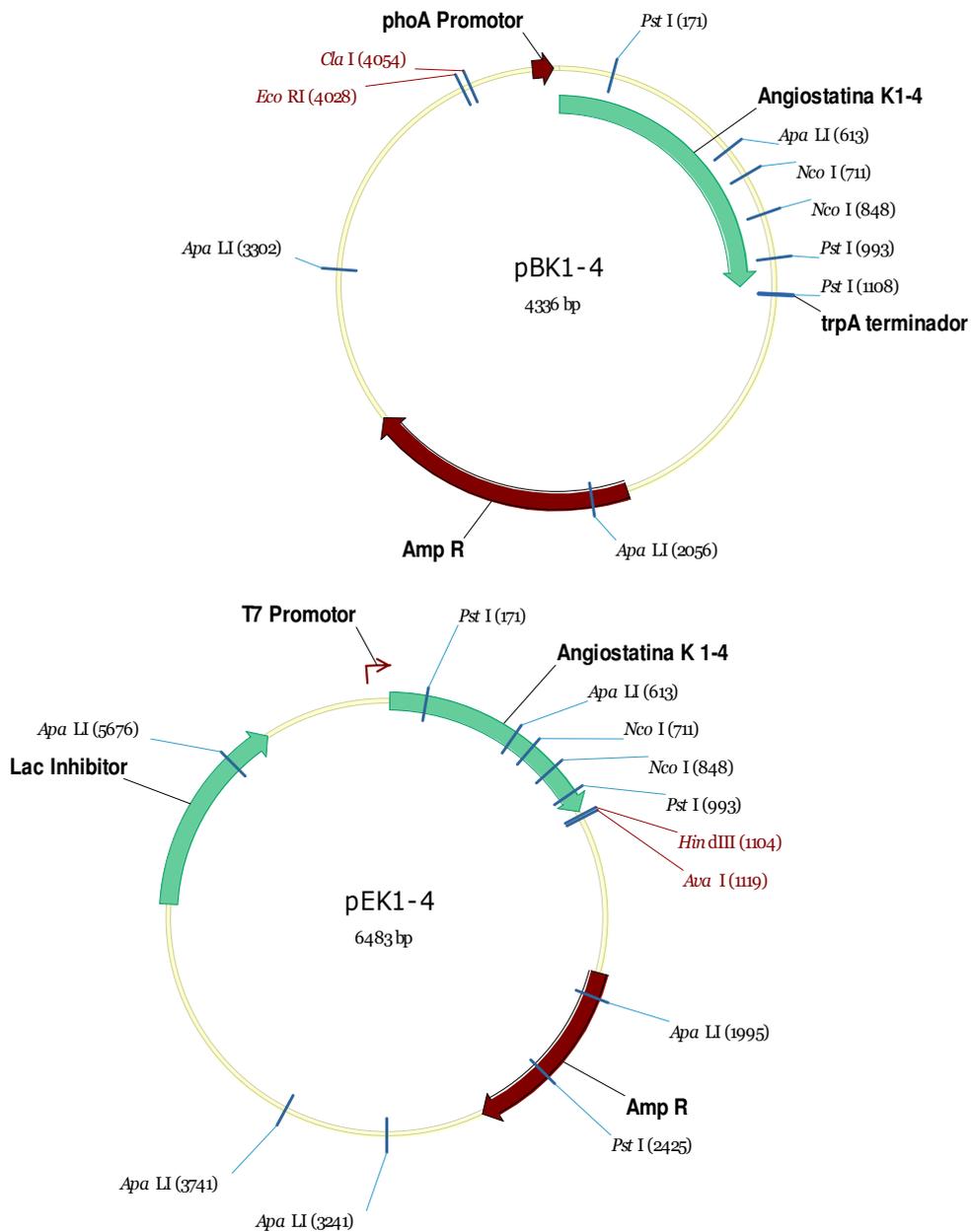


Figura 29 Esquema de los vectores obtenidos para la expresión de angiotatina en dos sistemas de expresión diferentes.

Capítulo 4

Los resultados logrados mediante los estudios de secuenciación, confirmaron que la posición del inserto era la misma que se había determinado por digestión enzimática. En el caso del fragmento de la angiotatina, la secuencia obtenida fue la siguiente:

		Section 1			
		(1) 1	10	20	39
2007-10-26_PB1_FW_A10	(1)	-----	NNNNNNNNNNNN	TT	NNNNNNNNT TTTTATGN
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(1)	NNNNNNN	NNNNNNNNNNNN	NC	TAGAAATAA TTTTGTITABC
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----	-----	-----	-----
ang	(1)	-----	-----	-----	-----
Consensus	(1)		NNNNNNNNNNNN	T	N TTTT T A
		Section 2			
		(40) 40	50	60	78
2007-10-26_PB1_FW_A10	(34)	TTGTAC	ATGGAGAA	AATCATATGGTGTATCTCT	NNNNNNN
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(40)	TTTAA	GAGGAGAT	TACATATGGTNTNNN	NNNAGAGT
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----	-----	-----	-----
ang	(1)	-----	-----	-----	-----
Consensus	(40)	TT A A	GGAGA A	CATATGGTGTATCTCT	NAGAGT
		Section 3			
		(79) 79	90	100	117
2007-10-26_PB1_FW_A10	(73)	NNNN	GANTGGGAATGGAAAGA	ACTACAGAGGGAC	NATGT
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(79)	GCAAGACTGGGAATGGAAAGA	ACTACAN	AGGGACGATGT	
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----	-----	-----	-----
ang	(20)	GCAAGACTGGGAATGGAAAGA	ACTACAGAGGGACGATGT		
Consensus	(79)	GCAAGACTGGGAATGGAAAGA	ACTACAGAGGGACGATGT		
		Section 4			
		(118) 118	130	140	156
2007-10-26_PB1_FW_A10	(112)	NCAAAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTT			
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(118)	CCAAAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTT			
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----	-----	-----	-----
ang	(59)	CCAAAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTT			
Consensus	(118)	CCAAAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAAAAATGGAGTT			
		Section 5			
		(157) 157	170	180	195
2007-10-26_PB1_FW_A10	(151)	CCACTTCTCCCCACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACAC			
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(157)	CCACTTCTCCCCACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACAC			
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----	-----	-----	-----
ang	(98)	CCACTTCTCCCCACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACAC			
Consensus	(157)	CCACTTCTCCCCACAGACCTAGATTCTCACCTGCTACAC			
		Section 6			
		(196) 196	210	220	234
2007-10-26_PB1_FW_A10	(190)	ACCCCTCAGAGGGACTGGAGGAGA	ACTACTGCAGGAATC		
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(196)	ACCCCTCAGAGGGACTGGAGGAGA	ACTACTGCAGGAATC		
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----	-----	-----	-----
ang	(137)	ACCCCTCAGAGGGACTGGAGGAGA	ACTACTGCAGGAATC		
Consensus	(196)	ACCCCTCAGAGGGACTGGAGGAGA	ACTACTGCAGGAATC		

Capítulo 4

	(235)	235	240	250	260	273
2007-10-26_PB1_FW_A10	(229)	CAGACAACGATCCGCAGGGGCCCTGGTGCTATACTACTG				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(235)	CAGACAACGATCCGCAGGGGCCCTGGTGCTATACTACTG				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----				
ang	(176)	CAGACAACGATCCGCAGGGGCCCTGGTGCTATACTACTG				
Consensus	(235)	CAGACAACGATCCGCAGGGGCCCTGGTGCTATACTACTG				
						Section 8
	(274)	274	280	290	300	312
2007-10-26_PB1_FW_A10	(268)	ATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGCGACATTCTTGAGT				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(274)	ATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGCGACATTCTTGAGT				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----				
ang	(215)	ATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGCGACATTCTTGAGT				
Consensus	(274)	ATCCAGAAAAGAGATATGACTACTGCGACATTCTTGAGT				
						Section 9
	(313)	313	320	330	340	351
2007-10-26_PB1_FW_A10	(307)	GTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACATG				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(313)	GTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACATG				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----				
ang	(254)	GTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACATG				
Consensus	(313)	GTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACATG				
						Section 10
	(352)	352	360	370	380	390
2007-10-26_PB1_FW_A10	(346)	ACGGCAAATTTCCAAAACCATGTCTGGACTGGAATGCC				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(352)	ACGGCAAATTTCCAAAACCATGTCTGGACTGGAATGCC				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(1)	-----NNN				
ang	(293)	ACGGCAAATTTCCAAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCC				
Consensus	(352)	ACGGCAAATTTCCAAAACCATGTCTGGACTGGAATGCC				
						Section 11
	(391)	391	400	410		429
2007-10-26_PB1_FW_A10	(385)	AGGCCTGGGACTCTCAGAGCCCAACAGCTCATGGATACA				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(391)	AGGCCTGGGACTCTCAGAGCCCAACAGCTCATGGATACA				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(4)	NNGCNNNGGA--NNTCAGAGCCCN--NNGNTCANGGANNCA				
ang	(332)	AGGCCTGGGACTCTCAGAGCCCAACAGCTCATGGATACA				
Consensus	(391)	AGGCCTGGGACTCTCAGAGCCCAACAGCTCATGGATACA				
						Section 12
	(430)	430	440	450		468
2007-10-26_PB1_FW_A10	(424)	TTCTTCCAAA--TTTCAAACAAGAACCTGAAGAAGAAT				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(430)	TTCTTCCAAA--TTTCAAACAAGAACCTGAAGAAGAAT				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(42)	TTNONTNCNAAATNNNCAAACAANN--NGAAGAAGAAT				
ang	(371)	TTCTTCCAAA--TTTCAAACAAGAACCTGAAGAAGAAT				
Consensus	(430)	TTCTTCCAAA TTTCAAACAAGAACCTGAAGAAGAAT				

Capítulo 4

					Section 13	
	(469)	489	480	490	507	
2007-10-26_PB1_FW_A10	(462)	TACTGTCGTAACCCCGATAGGGAGCTGCGGCCTTGGTGT				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(468)	TACTGTCGTAACCCCGATAGGGAGCTGCGGCCTTGGTGT				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(79)	TACNNNNGTAACCCCGATAGGGAGCTGCGGCNTTGGTGT				
ang	(409)	TACTGTCGTAACCCCGATAGGGAGCTGCGGCCTTGGTGT				
Consensus	(469)	TACTGTCGTAACCCCGATAGGGAGCTGCGGCCTTGGTGT				
					Section 14	
	(508)	508	520	530	548	
2007-10-26_PB1_FW_A10	(501)	TTCACCACCGACCCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGCGAC				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(507)	TTCACCACCGACCCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGCGAC				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(118)	TTCNCCACCGACCCCNACAAGCGCTGGGAA-NNNGCGAC				
ang	(448)	TTCACCACCGACCCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGCGAC				
Consensus	(508)	TTCACCACCGACCCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGCGAC				
					Section 15	
	(547)	547	560	570	585	
2007-10-26_PB1_FW_A10	(540)	ATCCCCGCTGCACAACACCTCCACCATCTCTIGGTCC				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(546)	ATCCCCGCTGCACAACACCTCCACCATCTCTIGGTCC				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(156)	ATCCCCGNTGCACANACNTCCAGNNNNNTCTIGGTNCC				
ang	(487)	ATCCCCGCTGCACAACACCTCCACCATCTCTIGGTCC				
Consensus	(547)	ATCCCCGCTGCACAACACCTCCACCATCTCTIGGTCC				
					Section 16	
	(586)	586	600	610	624	
2007-10-26_PB1_FW_A10	(579)	ACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAAA-CTATCG				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(585)	ACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAAA-CTATCG				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(195)	ACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAAAA-CTATCG				
ang	(526)	ACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAAA-CTATCG				
Consensus	(586)	ACCTACCAGTGTCTGAAGGGAACAGGTGAAAA CTATCG				
					Section 17	
	(625)	625	630	640	650	663
2007-10-26_PB1_FW_A10	(617)	CGGGAAATGTTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCA				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(623)	CGGGAAATGTTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCA				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(234)	CGGGAAATGTTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCA				
ang	(564)	CGGGAAATGTTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCA				
Consensus	(625)	CGGGAAATGTTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCA				
					Section 18	
	(664)	664	670	680	690	702
2007-10-26_PB1_FW_A10	(656)	GCACTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGAC				
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(662)	GCACTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGAC				
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(273)	GCACTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGAC				
ang	(603)	GCACTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGAC				
Consensus	(664)	GCACTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGAC				

Capítulo 4

		Section 19					
		(703)	703	710	720	730	741
2007-10-26_PB1_FW_A10	(695)	ACCAGAAA	ACTT	CCCTGCA	AAAAAT	TTGGATG	AAAACTA
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(701)	ACCAGAAA	ACTT	CCCTGCA	AAAAAT	TTGGATG	AAAACTA
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(312)	ACCAGAAA	ACTT	CCCTGCA	AAAAAT	TTGGATG	AAAACTA
ang	(642)	ACCAGAAA	ACTT	CCCTGCA	AAAAAT	TTGGATG	AAAACTA
Consensus	(703)	ACCAGAAA	ACTT	CCCTGCA	AAAAAT	TTGGATG	AAAACTA
		Section 20					
		(742)	742	750	760	770	780
2007-10-26_PB1_FW_A10	(734)	CTGCCG	CAAT	CCTGAC	GGAAAA	GGGCC	CCCATGGTGCCA
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(740)	CTGCCG	CAAT	CCTGAC	GGAAAA	GGGCC	CCCATGGTGCCA
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(351)	CTGCCG	CAAT	CCTGAC	GGAAAA	GGGCC	CCCATGGTGCCA
ang	(681)	CTGCCG	CAAT	CCTGAC	GGAAAA	GGGCC	CCCATGGTGCCA
Consensus	(742)	CTGCCG	CAAT	CCTGAC	GGAAAA	GGGCC	CCCATGGTGCCA
		Section 21					
		(781)	781	790	800		819
2007-10-26_PB1_FW_A10	(773)	TACAAC	CAAC	CAGCCA	AGTGCG	GGTGGG	GAGTACTGTAAGAT
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(779)	TACAAC	CAAC	CAGCCA	AGTGCG	GGTGGG	GAGTACTGTAAGAT
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(390)	TACAAC	CAAC	CAGCCA	AGTGCG	GGTGGG	GAGTACTGTAAGAT
ang	(720)	TACAAC	CAAC	CAGCCA	AGTGCG	GGTGGG	GAGTACTGTAAGAT
Consensus	(781)	TACAAC	CAAC	CAGCCA	AGTGCG	GGTGGG	GAGTACTGTAAGAT
		Section 22					
		(820)	820	830	840		858
2007-10-26_PB1_FW_A10	(812)	ACCGT	CCTGT	GACTC	CCTCCC	CAGTAT	CCACGGGAACAAT
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(818)	ACCGT	CCTGT	GACTC	CCTCCC	CAGTAT	CCACGGGAACAAT
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(429)	ACCGT	CCTGT	GACTC	CCTCCC	CAGTAT	CCACGGGAACAAT
ang	(759)	ACCGT	CCTGT	GACTC	CCTCCC	CAGTAT	CCACGGGAACAAT
Consensus	(820)	ACCGT	CCTGT	GACTC	CCTCCC	CAGTAT	CCACGGGAACAAT
		Section 23					
		(859)	859	870	880		897
2007-10-26_PB1_FW_A10	(851)	GGCT	CCCAC	AGCACC	ACCTG	AGCTA	AACCCCTGTGGTCCN
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(857)	GGCT	CCCAC	AGCACC	ACCTG	AGCTA	AACCCCTGTGGTCCN
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(468)	GGCT	CCCAC	AGCACC	ACCTG	AGCTA	AACCCCTGTGGTCCA
ang	(798)	GGCT	CCCAC	AGCACC	ACCTG	AGCTA	AACCCCTGTGGTCCA
Consensus	(859)	GGCT	CCCAC	AGCACC	ACCTG	AGCTA	AACCCCTGTGGTCCN
		Section 24					
		(898)	898	910	920		936
2007-10-26_PB1_FW_A10	(890)	NA -	CTGCT	ACC	TGGT	GATGG	ACAGAGCTACCGAGGCNN
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(896)	GN	CTGCT	ACC	TGGT	GATGG	ACAGAGCTACCGAGGCAC
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(507)	GG	CTGCT	ACC	TGGT	GATGG	ACAGAGCTACCGAGGCAC
ang	(837)	GG	CTGCT	ACC	TGGT	GATGG	ACAGAGCTACCGAGGCAC
Consensus	(898)	GG	CTGCT	ACC	TGGT	GATGG	ACAGAGCTACCGAGGCAC

Capítulo 4

		Section 25					
	(937)	937	950	960	975		
2007-10-26_PB1_FW_A10	(928)	ATCCTCCACCA	CCACCACAGGAAA	NAAGTGTCA	NTCTTG		
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(935)	ATCCTCCACCN	CCACCACAGGAAA	GAANTGTCA	GTCNTG		
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(546)	ATCCTCCACCA	CCACCACAGGAAA	GAAGTGTCA	GTCCTG		
ang	(876)	ATCCTCCACCA	CCACCACAGGAAA	GAAGTGTCA	GTCCTG		
Consensus	(937)	ATCCTCCACCA	CCACCACAGGAAA	GAAGTGTCA	GTCCTG		
		Section 26					
	(976)	976	990	1000	1014		
2007-10-26_PB1_FW_A10	(967)	NTCATCTATG	NNACCNCA	-CCGGC	CCAGAAANCCCAN		
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(974)	GTCATCTATG	ACACNNNN	CCGGC	CCAGAAAN-CCCCN		
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(585)	GTCATCTATG	ACACACA	-CCGGC	CCAGAAAGACCCCG		
ang	(915)	GTCATCTATG	ACACACA	-CCGGC	CCAGAAAGACCCCG		
Consensus	(976)	GTCATCTATG	ACACCNCA	CCGGC	CCAGAAANACCCCAN		
		Section 27					
	(1015)	1015	1020	1030	1040	1053	
2007-10-26_PB1_FW_A10	(1005)	AAAACCTACCC	CAAAATG	CGNGGCCT	NNNNNTGAA	CNNNNGNA	
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(1012)	NAAAACCTACC	NNAAANG	GCTGGN	-NTGAA	NANGAACTACTGNA	
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(623)	AAAACCTACCC	CAAAATG	GCTGGCCT	GACAA	GAACTACTGCA	
ang	(953)	AAAACCTACCC	CAAAATG	GCTGGCCT	GACAA	GAACTACTGCA	
Consensus	(1015)	AAAACCTACCC	CAAAATG	GCTGGCCT	GACNAT	GAACTACTGNA	
		Section 28					
	(1054)	1054	1060	1070	1080	1092	
2007-10-26_PB1_FW_A10	(1044)	GNA	NNN	---	---	---	
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(1050)	GNA	INC	-ANATGNC	NATAANNCC	CNNNGGNGT	TTTNCNNN
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(662)	GGAA	CCAGAT	GCCGATA	AAAGGCC	CCTGGT	GTTTTACCA
ang	(992)	GGAA	CCAGAT	GCCGATA	AAAGGCC	CCTGGT	GTTTTACCA
Consensus	(1054)	GNAAT	CCAGAT	GCCGATA	AAAGGCC	CCTGGT	GTTTTACCA
		Section 29					
	(1093)	1093	1100	1110	1120	1131	
2007-10-26_PB1_FW_A10	(1050)	-----	-----	-----	-----	-----	
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(1088)	NNNN	CCNNCGNN	CGNNGGN	NNNNNNNNNN	NANNCNNNA	
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(701)	CAGACCCC	CAGCGT	CAGGTGGG	AGTACTG	CAACCTGAAAA	
ang	(1031)	CAGACCCC	CAGCGT	CAGGTGGG	AGTACTG	CAACCTGAAAA	
Consensus	(1093)	CAGACCCC	CAGCGT	CAGGTGGG	AGTACTG	CAACCTGAAAA	
		Section 30					
	(1132)	1132	1140	1150	1160	1170	
2007-10-26_PB1_FW_A10	(1050)	-----	-----	-----	-----	-----	
2007-10-26_pET2_PETPR_G09	(1127)	AA	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	NNNNNNNN	TNNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	
2007-10-26_pET2_PETTE_F09 rc	(740)	AATGCT	CAGGAAC	CAGAAGCGT	AGTAAGT	CGACAAGCTTG	
ang	(1070)	AATGCT	CAGGAAC	CAGAAGCGT	-----	-----	
Consensus	(1132)	AATGCT	CAGGAAC	CAGAAGCGT			

Las secuencias de cuatro dominios kringle se alinearon de acuerdo con sus cisteínas conservadas y con referencia al plasminógeno homólogo.

El análisis del resultado de la secuenciación se realizó mediante el software Vector NTI Advance (TM) 11.0.

Capítulo 4

	CANTIDAD DE PARES DE BASES (BP)	TAMAÑO DE UNA CADENA DE PLÁSMIDO [DA] ^a	ORIGEN DE REPLICACIÓN	PESO MOLECULAR POR PLÁSMIDO
pBK1-4	4336	1.34×10^6	pBluescript ~300-500 copias	$1.83 \times 10^{-12} \mu\text{g}$
pEK1-4	6483	2.00×10^6	pBR322, f1 ~15-20 copias	$4.08 \times 10^{-12} \mu\text{g}$

a: 1 Unidad de masa atómica [Da] = 1.66×10^{-24} g (Stryer, 1996)

Tabla 11 Datos de pesos moleculares de las construcciones obtenidas.

4.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que la identidad del gen amplificado del plásmido base original pPIC9K es la correcta. El clonado en los sucesivos pasajes en los vectores de expresión pBAce y pET22b arrojó resultados satisfactorios por todos los medio evaluados. Las reacciones de secuenciación dieron como resultado un 91.6% de homología con la secuencia registrada en el GenBank (PLG NM_000301 Human cDNA ORF Clone), de la angiostatina endógena humana dentro de los aminoácidos 93 - 470 del plasminógeno humano nativo (kringle 1- 4) [5-7]. Por otra parte las evaluaciones bioinformáticas empleando ExPASy ProtParam tool arrojaron los siguientes valores predictivos, que la composición de aminoácidos a expresar es de 363 y que el peso molecular estimado es de 41221.6 Da, con un punto isoeléctrico de 7.69. Por otro lado, según estudios realizados mediante el software On-line de la Facultad de Química, Biológica, e Ingeniería de Materiales de la Universidad de Oklahoma⁵ se determinó que, basándose en la secuencia obtenida (11 Alanine (A), 19 Arginine (R), 18 Aspartate (D), 25 Asparagine (N), 26 Cysteine (C), 13 Glutamine (Q), 22 Glutamate (E), 23 Glycine (G), 13 Histidine (H), 6 Isoleucine (I), 13 Leucine (L), 23 Lysine (K), 6 Methionine (M), 5 Phenylalanine (F), 36 Proline (P), 30 Serine (S), 36 Threonine (T), 11 Tryptophan (W), 18 Tyrosine (Y), 9 Valine (V)), para la expresión en *E. coli* tiene nulas posibilidades de obtenerse de manera soluble de manera que todo indicaría la obtención de cuerpos de inclusión [8].

⁵ <http://biotech.ou.edu/>

Capítulo 4

Estos resultados permitieron aseverar la integridad del gen y comenzar a evaluar condiciones promisorias de expresión en ambos sistemas.

4.5 Bibliografía

- [1] Luo JX, Lu WJ, Li WQ, Luo XB. Cloning, sequencing of human angiostatin gene and its expression in *E. coli*. 1999. *Progress in Natural Science* 9(9): 672-677.
- [2] M J Park. cDNA cloning and expression of angiostatin, an angiogenesis inhibitor, from human liver tissue mRNA. 1999, *J. Korean Cancer Assoc.*; 31(6): 1236-1245.
- [3] Hou WH, Fang T, Chai YR, Wang TY, Wang JM, Xue LX. Expression of recombinant kringle 1-5 domains of human plasminogen by a prokaryote expression system. 2006, *Protein Expr Purif.*; 47(1): 93-98.
- [4] Craig S.P, Yuan Ling, Kuntz D.A, McKerrow J.H, Wang C.C. High level expression in *Escherichia coli* of soluble, enzymatically active schistosomal hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase and trypanosomal ornithine decarboxylase. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 88: 2500-2504.
- [5] O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H. y Folkman, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. 1994, *Cell.* ; 79, 315–328.
- [6] Sim, B.K.L., O'Reilly, M.S., Liang, H., Fortier, A.H., HE, W., Madsen, J.W., Lapceovich, R. and Nacy, C.A. A recombinant human angiostatina protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. 1997, *Cancer Res.*; 57, 1329–1334.
- [7] Wu, Z., O'Reilly, M.S., Folkman, J. and Shing, Y., Suppression of tumor growth with recombinant murine angiostatin. 1997, *Biochem. biophys. Res. Comm.*; 236, 651–654.
- [8] Wilkinson, D.L. and R.G. Harrison. Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. 1991, *Biotechnology.* 9, 443-448.

Capítulo 4

Capítulo 5

CAPITULO 5:

EXPRESIÓN DE ANGIOSTATINA

HUMANA RECOMBINANTE

A la fecha de hoy, *E. coli* permanece a la vanguardia de los sistemas de expresión

utilizados para la producción de proteínas recombinantes. A pesar de que es incapaz de realizar modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación y poseer una capacidad limitada de secreción, el 69% de los biofármacos comercializados para terapias antitumorales, se producen en *E. coli* frente a sólo el 26% producido en células de mamíferos [1]. Fue por esta razón que se seleccionó a esta bacteria como modelo de expresión en esta tesis.

Luego de verificar la integridad de las construcciones (Sección 4.2.1.4), el siguiente paso consistió en verificar la funcionalidad de las mismas, evaluando la expresión de sus productos. Para ello, se evaluó el crecimiento de las cepas hospedadoras en diferentes medios (complejos y sintéticos) tanto en cultivos en batch en erlenmeyer agitado y en fermentadores. En ambos casos se evaluaron aspectos como la fuente de carbono, la cantidad de inductor y el tiempo de inducción de manera de poder estudiar qué impacto generaba la expresión de angiostatina debido a la carga metabólica asociada a cada condición impuesta por el plásmido (Sección 2.2). Una de sus consecuencias suele ser la acumulación de acetato, que para *E. coli* es considerado tradicionalmente como una limitación importante al potencial biotecnológico de este microorganismo [1-2]. Además,

Capítulo 5

bajo condiciones de crecimiento aeróbico, también se puede dar la producción de lactato y otros ácidos orgánicos debido al metabolismo de sobre flujo [2] (Sección 2.1).

5.1 Expresión utilizando la construcción BL21 (DE3)/pEKI-IV (2)

Inicialmente se detallarán los experimentos y los resultados del sistema control pEKI- IV (2) / BL21 (DE3) inducibles por medio de IPTG [3] (Sección 2.2). El nombre pEKI- IV (2) corresponde al clon *número dos* del banco maestro (MCB). El MCB fue derivado de un único clon. El mismo fue previamente caracterizado (Sección 4.2.1.4) para garantizar la identidad genética del mismo y de la cepa demostrando también que el banco de células está libre de contaminantes.

Los estudios inicialmente se realizaron a escala de erlenmeyer agitados. Este tipo de sistema ha demostrado ser una herramienta estándar invaluable en el trabajo biotecnológico práctico, una de las razones es, entre otras, su facilidad de manejo [4]. La ventaja técnica de esta práctica es que en un espacio relativamente reducido se pueden evaluar tres o cuatro condiciones experimentales con un gasto mínimo de material y sin necesidad de sistemas de control de los cultivos. Este tipo de sistema se usa en las primeras etapas de detección del trabajo de desarrollo biotecnológico.

5.1.1 Evaluación de la Densidad Óptica y concentración de inductor en medio complejo LB.

El medio de cultivo complejo LB soporta el crecimiento de *E. coli* hasta una DO_{600} aproximadamente de 7. Sin embargo, luego de alcanzar la fase estacionaria la biomasa puede disminuir incluso hasta llegar a una DO_{600} de 0.3 debido principalmente al metabolismo endógeno.

En un cultivo en batch, el crecimiento se detiene básicamente por falta de una fuente de carbono utilizable. La FCE que utiliza *E. coli* en el medio LB es fundamentalmente

Capítulo 5

aminoácidos dado que el medio no contiene una cantidad apreciable de azúcares. Es por eso que se evaluó dicho medio incorporando $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa como FCE [2-3]. Se evaluaron en paralelo la cepa BL21 (DE3)_{WT} y el clon BL21 (DE3) / pEKI- IV (2).

Las primeras variables estudiadas fueron la DO₆₀₀ previa a la inducción y la concentración de IPTG, con el propósito de hallar la condición óptima para la expresión de angiostatina. Se realizaron diversos ensayos en medio LB conteniendo $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa induciendo a distintas densidades ópticas (0.3; 0.5 y 1) con una concentración de inductor variable (0.5 a 1.0 mM de IPTG) de una manera similar a lo sugerido en manual del pET 11ed [3].

El protocolo general fue el siguiente: 100 microlitros de un stock celular guardado en glicerol se inocularon en 2 - 5 ml de medio LB con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina. Se incubó en un agitador orbital termostatzado New Brunswick a 37 °C y 200 r.p.m. durante toda la noche (ON). A partir de estos cultivos se realizó una dilución 1/200 (500 μl del cultivo ON en 100 ml de LB con ampicilina) en erlenmeyers de 1000 ml que fueron crecidos en iguales condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0.3; en ese momento se transfirió, en esterilidad bajo flujo laminar, 1 ml de muestra a un tubo tipo eppendorf, se centrifugó por 3 min. a 14000 r.p.m., se desechó el sobrenadante y se almaceno el pellet celular a -20 °C. Este fue considerado como “t₀” de la inducción. Posteriormente el cultivo fue inducido con IPTG (Fermentas) a la concentración final a evaluar y se lo dejó crecer entre 2 - 5 horas más a 37 °C con agitación. Paralelamente se realizaron dos controles negativos de la expresión. Un cultivo de la cepa BL21 (DE3)_{WT} en iguales condiciones de temperatura y agitación (pero sin el agregado de ampicilina e IPTG) y un cultivo del mismo clon pero sin inducir.

El paso siguiente fue evaluar dos métodos de ruptura celular de manera de determinar el método extractivo más eficiente. Se sabe que la localización de los productos de la expresión es citoplasmática (Sección 4.4) por lo que un adecuado método de ruptura celular es esencial para el éxito del protocolo. Se evaluaron dos métodos diferentes. En un caso se adaptó el trabajo de Demchick y col. [5] en el cual se reporta una forma rápida y sencilla de obtener proteínas de enterobacterias, y el segundo método se realizó según el manual del pET 11ed [3].

Capítulo 5

5.1.2 Resultados

5.1.2.1 Efecto de la DO de inducción sobre el crecimiento celular.

El efecto de la DO₆₀₀ a la cual se realizó la inducción con 0.5 mM de IPTG sobre su cinética de crecimiento celular se presenta en la Tabla. 12. El crecimiento de las cepas inducidas y sin inducir se comparó determinando su velocidad específica de crecimiento $\mu_{m\acute{a}x}$. (Fig. 30). La concentración celular total (Fig. 31) fue casi la misma para las DO₆₀₀ de 0.5 y 1.0 al finalizar todo el experimento. En el estado no inducido, se observó una menor cinética de crecimiento.

Cepa / Condición	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	
	Valor	R ²
	Valor \pm S.D. <i>n</i>	Valor \pm S.D. <i>n</i>
BL21 (DE3) WT	0.639 \pm 0.03 2	0.975 \pm 0.07 2
BL21 (DE3) S.I	0.260 \pm NA 1	0.984 \pm NA 1
BL21 (DE3) DO ₆₀₀ = 0.3	0.642 \pm NA 1	0.982 \pm NA 1
BL21 (DE3) DO ₆₀₀ = 0.5	0.612 \pm NA 1	0.865 \pm NA 1
BL21 (DE3) DO ₆₀₀ = 1.0	0.508 \pm NA 1	0.896 \pm NA 1

Tabla. 12 Valores de la velocidad específica de crecimiento en las condiciones evaluadas.

La Tabla. 12 muestra los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ obtenidas de las gráficas de ln (DO₆₀₀) vs tiempo de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial ya que los mismos deben representar al cultivo en dicha fase. La forma logarítmica $\ln DO = \ln DO_0 + \mu_{m\acute{a}x} \cdot t$, fue utilizada para la gráfica y obtener $\mu_{m\acute{a}x}$ de la pendiente.

Capítulo 5

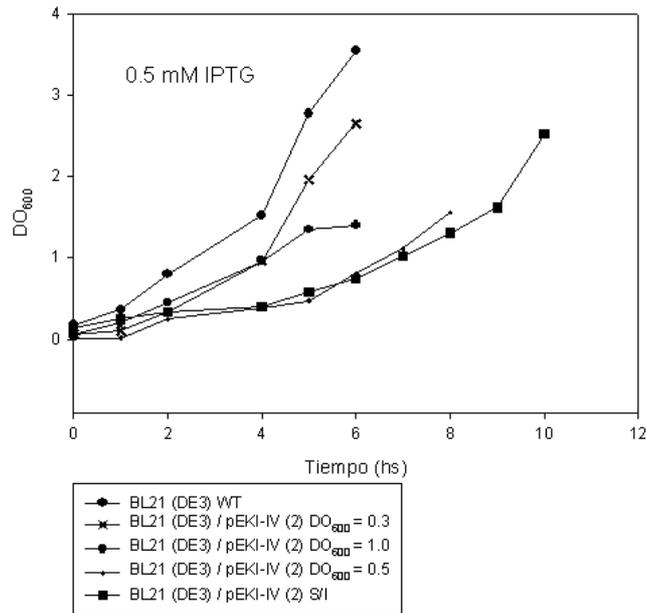


Figura 30 Gráfica de la cinética de crecimiento de las cepas evaluadas para una concentración de 0.5 mM de IPTG.

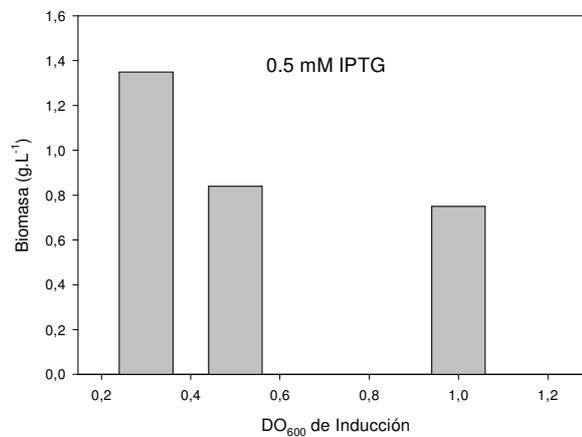


Figura 31 Gráfica de la biomasa final obtenida a diferentes DO₆₀₀ de inducción.

La inducción a mayor densidad óptica en la fase exponencial dio como resultado menores rendimientos celulares, por lo tanto se evaluara si los mismos indican que se podría lograr una mayor expresión de angiostatina utilizando DO₆₀₀ superiores a 0.50 para la inducción dado que el crecimiento a altas densidades celulares es esencial para proporcionar una mayor producción de proteínas heterólogas.

Capítulo 5

5.1.2.1 Evaluación del método de ruptura celular

En comparación con otros sistemas de expresión, como células animales, levaduras o bacterias Gram-positivas, *E. coli* constituye un caso especial dado a que es una bacteria Gram-negativa, su envoltura celular está formada por una membrana interna, el periplasma que contiene la capa de peptidoglicano y la membrana externa [6]. El entorno oxidativo del periplasma permite el correcto plegamiento de proteínas que contienen puentes disulfuro [7]. Al realizar el análisis de la secuencia de los productos obtenidos (Sección. 4.3) se encontró que en el sitio 771 existía un sitio de corte para la enzima *NcoI*. Esta enzima es la utilizada para fusionar cualquier proteína a la secuencia de exportación a periplasma *pelB* (Sección. 3.1.2) por tanto se desistió de cualquier intento por generar una construcción para lograr la exportación.

En esta sección se describen dos de los mecanismos propuestos para la recuperación de la angiostatina. Los mismos consistieron de uno o dos pasos básicos en los métodos de permeabilización. El método de Demchick [5] implica básicamente el tratamiento de las células con acetona seguido de la extracción de proteínas celulares con SDS. La metodología se ha aplicado con éxito a la extracción de proteínas de una amplia variedad de bacterias, incluidos patógenos y se ha revelado que la composición proteica de los extractos preparados mediante este método eran comparables a la de los extractos preparados mediante métodos establecidos como la sonicación. El otro método utilizado es el establecido según el manual del pET 11ed [3]. Para tal fin, las muestras procesadas fueron los dos tiempos de inducción bajo la condición de 0.5 mM de IPTG con una DO_{600} 0.90 ~ 1. Se eligió esta muestra debido al claro “planchado” en el crecimiento respecto de las condiciones anteriores probablemente a la inducción de la expresión de angiostatina a una densidad óptica mayor que en el resto de los casos (Fig. 30). Algunos autores incluso postulan como la condición más apropiada para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes [8].

Capítulo 5

5.1.2.2 Resultados

La Tabla 13 muestra el proceso de concentración de las muestras para normalizar y alcanzar la DO₆₀₀ requerida. Para tal fin las muestras fueron centrifugadas a 15000 r.p.m durante 10 mín. a 4° C; luego de descartar el sobrenadante, el pellet bacteriano fue re suspendido en los volúmenes citados 6.5 y 24 ml respectivamente en agua destilada. Estos fueron los volúmenes originales que se mencionan al comienzo del procedimiento de Demchick, pero esas mismas también fueron sometidas para ser fraccionadas según lo establecido en el manual del pET 11ed [3]. Entre paréntesis figuran los porcentajes de concentración de las muestras. Para el procedimiento de Demchick, los restos de células se suspendieron en 10 ml de acetona helada (grado analítico), se dejó reposar en hielo durante 5 min, y se centrifugo a 15000 r.p.m. La acetona residual se eliminó bajo corriente de nitrógeno, y luego se extrajeron las proteínas incubando con 1.0 ml de SDS al 1% durante 2 min.

	Tiempo de inducción = 1.0 hr.	Tiempo de inducción = 2.0 hr.
DO ₆₀₀	1.35	1.38
Volumen (ml)	10	35
FC Vol. (ml)	6.5 (1.53 %)	24 (1.46%)
DO ₆₀₀ Final	2.07	2.01

Tabla 13 Condiciones finales evaluadas del cultivo.

Luego, cada una de las fracciones obtenidas en el proceso de purificación fueron sembradas en SDS-PAGE al 12.5 % (ver Sección 3.3.7) para corroborar la presencia de la proteína y estimar su peso molecular. Las muestras se prepararon en relación 1:1 con el buffer sin reductor (25 µl). La figura 32 muestra el revelado mediante WB (Sección 3.3.8), con MoAb 91 Santa Cruz sc-73708 angiostatin (4958-1), human, mouse monoclonal IgG2a.

Capítulo 5

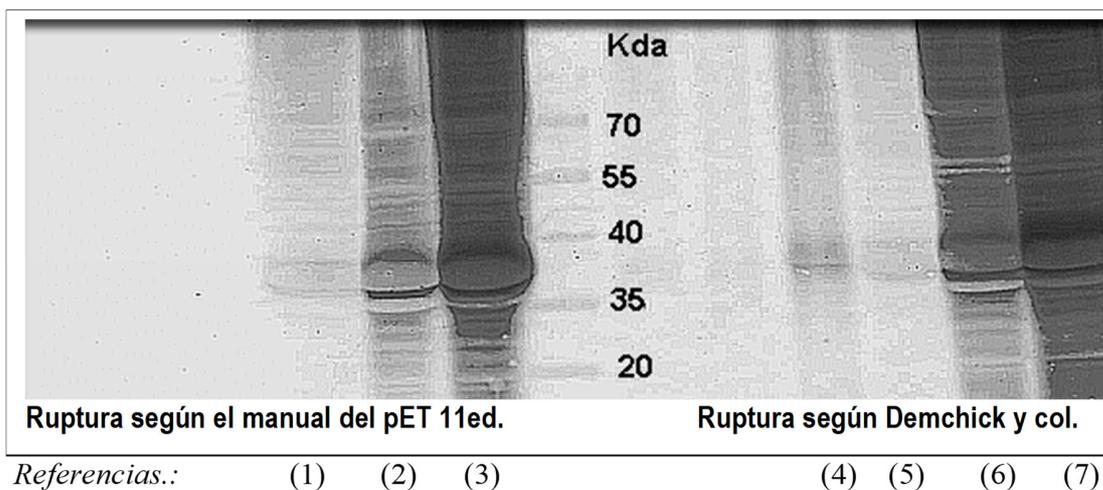


Figura 32 Revelado mediante WB de dos procesos diferentes de ruptura celular. Las referencias son las siguientes: (1) Muestra sobrenadante tiempo 2; (2) pellet tiempo 1; (3) pellet tiempo 2. (4) Muestra sobrenadante tiempo 1, (5) Muestra sobrenadante tiempo 2; (6) pellet tiempo 1; (7) pellet tiempo 2.

Este ensayo corresponde la primera evidencia de expresión de angiostatina para el sistema control y por ende de la integridad de su funcionalidad génica. Puede verse un tamaño correcto para el producto en buena proporción. Los métodos de ruptura revelan que el producto se encuentra en la fracción insoluble como IB. Esta situación se corrobora con los resultados de otros investigadores [9]. Se observa una señal, *leve* en la fracción soluble de cada tiempo.

Para futuras determinaciones se eligió finalmente la técnica de Demchick por sobre la técnica del manual del pET22b principalmente por ser un método económico, rápido y reproducible para preparar las muestras y por ser fácilmente adaptable a la escala de trabajo. Los rendimientos oscilaron entre los 150 – 200 mg de proteína /g de peso seco.

Manifestada la expresión mediante el sistema de expresión pET22b se revelaron el resto de las muestras por medio del método de acetona - SDS donde se hallan los IB de todas las condiciones de cultivos evaluadas.

Capítulo 5

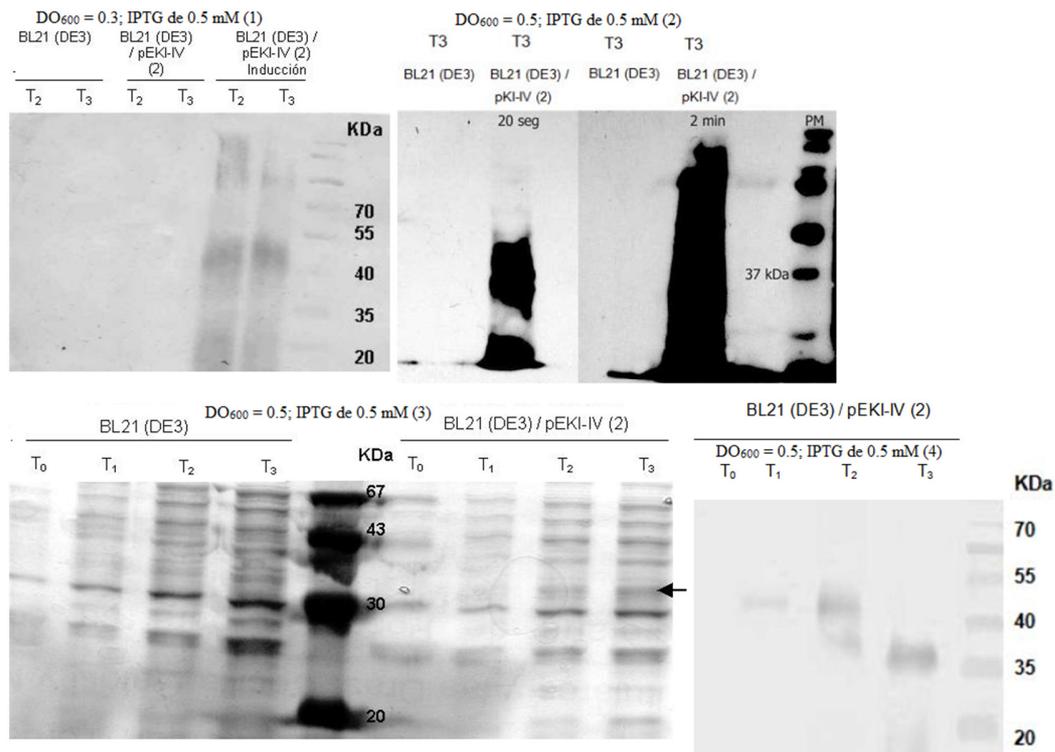


Figura 33 Revelado de las muestras de los cultivos (Sección. 5.1.1) mediante SDS – PAGE 12.5 % (3) (Sección 3.3.7) y WB (1; 2; 4) mediante el método de Demchick (acetona – SDS).

La Figura 33 muestra el análisis SDS-PAGE de las fracciones insolubles (cuerpos de inclusión) producidas a partir de expresiones en pequeña escala. La angiostatina recombinante producida en *E. coli* se expresó típicamente a 37 ° C durante 3 – 4 h y se demostró que con 0.5 mM IPTG fue suficiente para desactivar el represor *LacI* y manifestar la expresión. Esta condición fue suficiente para obtener IB insolubles. La determinación analítica (Sección. 3.4.3.1) arrojó un valor de proteínas totales de 0.89 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ en los geles previo al WB.

Ciertos autores [10], manifiestan que esta proteína migra como una única banda alrededor de 52 kDa en condiciones reductoras. Sin embargo, bajo una variedad de condiciones (incluyendo la congelación y descongelación), se degrada en especies más pequeñas, incluyendo un doblete a alrededor de 42 kDa, que conserva la actividad de angiostatina. De los resultados obtenidos podemos establecer que el sistema pET22b expresa el producto

Capítulo 5

con un tamaño correcto en un amplio rango de densidades ópticas sin afectar la viabilidad celular.

Debido a que se manifestó expresión de angiostatina, se evaluaron alternativas a escala de biorreactor por varios motivos. El más importante, es que debido a que generalmente el rango de expresión de proteínas recombinantes es del orden de mg/L, la cantidad de angiostatina recuperada de los IB podría ser escasa o incluso indetectable.

Los autores Park y col. [9] (Sección. 1.4.2) con un sistema de expresión similar obtuvieron luego de purificar los IB una concentración de angiostatina de aproximadamente 100 ng/mL.

5.1.3 Sistema Batch – Biorreactor

5.1.3.1 Evaluación de crecimiento en Medio LB

A pesar de que existe una amplia cantidad de información de crecimientos de varias cepas de *E. coli* en diferentes medios complejos [2] [8] es sabido que la composición del mismo afecta la velocidad de crecimiento y que la misma tiene influencia en la cinética de pérdida de plásmido y su número de copias [11] por otro lado, cabe mencionar que la complejidad génica de la proteína a expresar también tiene un alto impacto [12].

Debido a la degeneración del código genético, la mayoría de los aminoácidos pueden estar codificados por múltiples codones sinónimos o equivalentes. Estos se encuentran naturalmente con diferentes frecuencias en diferentes organismos. La base de datos está disponible en hive.biochemistry.gwu.edu/review/codon. Por último, en caso de requerir mayores cantidades de angiostatina (suponiendo que este sistema de expresión funcione mejor que el inducible mediante el promotor de la fosfatasa alcalina) sería conveniente poseer al menos el parámetro de velocidad específica de crecimiento máxima con los fines de futuros diseños. Además, como se mencionó, se sabe que este parámetro es muy importante debido a que afecta la síntesis de proteína recombinantes [13].

Capítulo 5

5.1.3.2 Resultados

Con la idea de obtener mayor información en medio complejo (Sección 3.2.1), se realizó un cultivo en batch a escala de biorreactor. Se inocularon 20 μl de cultivo del stock a -70°C en 50 ml medio LB con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina en erlenmeyer de 150 ml y se incubó con agitación durante 16 horas a 37°C (cultivo semilla). El biorreactor se esterilizó con 900 ml de medio LB s/antibiótico y, una vez frío, se dejó durante 16 horas con circulación de aire de manera de polarizar el electrodo de oxígeno. El reactor se inoculó con 45 ml del cultivo semilla, el antibiótico y agua estéril en cantidad necesaria para completar 100 ml generando una DO_{600} inicial de 0.07. El cultivo se realizó en modo cascada. Dicho modo, proporciona un sofisticado control del proceso mediante la alteración de una o más variables (en este caso, Agitación-r.p.m- y $-\text{DO}\%-\text{O}_2$), en función del valor de cualquier otra. El caudal de aire utilizado fue de 0.7 L / min.

Por otro lado se repitió el mismo procedimiento incorporando al medio una concentración de FCE (Glucosa) de $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pEK I-IV (2).	
	LB	LB _{Gluc}
$\mu_{\text{máx}}$	0.706 ($R^2 = 0.87$)	0.720 ($R^2 = 0.97$)
$\text{DO}_{600\text{ Final}}$	1.35	3.0
X ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.35	0.75

Tabla. 14 Valores finales obtenidos. La biomasa final fue el parámetro más notorio en las dos condiciones evaluadas.

Estos resultados son los esperados ya que, en medio LB sin suplemento de glucosa, el crecimiento se detiene al llegar a una DO_{600} de alrededor de 2, que corresponde a aproximadamente 0.6 g de *E. coli* (peso seco) por litro. La razón, tal cual se indicó anteriormente, es que, a pesar de la alta carga orgánica que aportan la peptona y el extracto de levadura, el medio aporta un bajo contenido de hidratos de carbono y otras fuentes de carbono asimilables.

Capítulo 5

De los datos obtenidos se observa que el clon posee un $\mu_{m\acute{a}x}$ de 0.7 lo que resulta en un valor típico para *E. coli* creciendo en un medio complejo. El presente resultado se considera como valor de referencia para futuros experimentos.

5.1.3.3 Evaluación de crecimiento y expresión en MR

Una de los objetivos planteados en este trabajo fue estudiar el crecimiento de las distintas cepas, tanto las WT como las recombinantes obtenidas (Sección.2.2), empleando cultivo continuo (CC) a distintas velocidades de dilución. Es conocido que para el diseño de CC se debe tener conocimiento de la velocidad específica máxima de crecimiento, la cual es una de los parámetros de control más importantes de un proceso. Sin embargo, este parámetro varía según las condiciones del cultivo, es decir, el crecimiento y está influenciada por factores como la naturaleza de los sustratos, medio de crecimiento, temperatura, pH y suministro de oxígeno.

Como una introducción al estudio de este parámetro se estudió el sistema control en el MR planteado para tal fin de manera de determinar la $\mu_{m\acute{a}x}$ y realizar una inducción de la expresión de la angiostatina para comparar la expresión respecto de los ensayos en erlemneyers agitados. En general, la expresión se puede optimizar en relación a diferentes parámetros del cultivo tales como medios de cultivo, cepa, condiciones de inducción como el tiempo y la temperatura de inducción y la concentración de inductor [14]. Sin embargo, ya en una escala de cultivo mayor como en un biorreactor se requiere una consideración especial debido a los efectos significativos de los niveles de oxígeno, aireación y velocidad de agitación. Se ha demostrado que la adecuada agitación y aireación también son factores importantes en el éxito de la expresión de proteínas recombinantes [15]. Debemos tener en cuenta que debido a que la mayoría de la angiostatina expresada es como IB, la productividad (y la productividad específica) será proporcional a la densidad celular final.

5.1.3.3 Resultados

Se realizó un experimento similar a lo evaluado con el medio complejo LB en un biorreactor BioFlo 310 utilizando el MR (Sección 3.2.1). Se realizó una inducción con 1

Capítulo 5

mM de IPTG debido a los buenos signos de expresión evidenciados en la Figura 33. Con los resultados obtenidos de este primer cultivo se calcularon los parámetros cinéticos y los rendimientos celulares.

<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pEK I-IV (2)		
	Antes de inducción	Post inducción
$\mu_{máx}$	0.445 ($R^2 = 0.98$)	0.306 ($R^2 = 0.97$)
DO ₆₀₀	1.46	4.15 (*)
X (g.L ⁻¹)	1.35	2.80
RQ	0.98	0.81 (**)
Y(X/S) g/g	0.234	0.394 (**)

Tabla. 15 Parámetros obtenidos durante el cultivo previo y post inducción. Referencia: (*) DO₆₀₀ final del cultivo. (**) Final del cultivo.

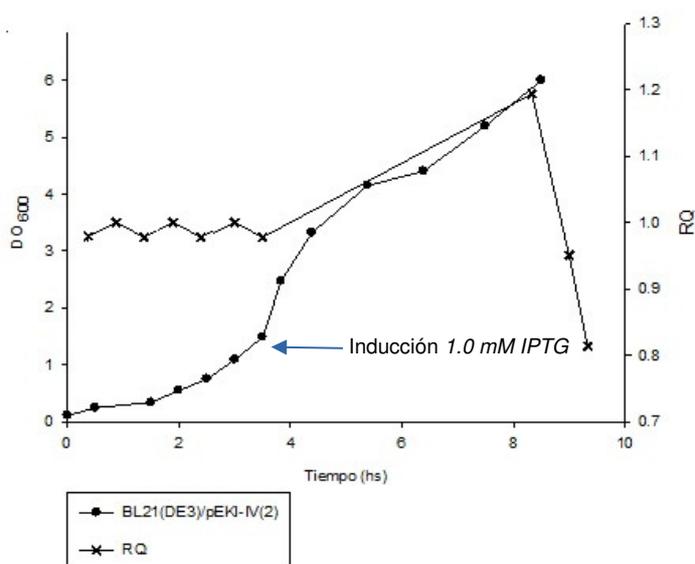


Figura 34 Cinética de crecimiento en MR. El gráfico -(x)- representa la variación de coeficiente respiratorio RQ.

La presente figura muestra la cinética de crecimiento. La inducción se realizó a una DO₆₀₀ de 1.485 ~ 1.5. Sólo se tomaron tres muestras durante el transcurso de la misma, el control y los últimos dos puntos.

Se observa una marcada disminución de la velocidad específica de consumo de glucosa luego de la inducción lo cual es razonable ya que, para este tipo de sistema de expresión, es

Capítulo 5

observado el fenómeno de inhibición de la captura de sustrato luego de la inducción [16]. La fuerte expresión de angiostatina podría afectar el metabolismo de la FCE inhibiendo fuertemente las capacidades máximas de absorción específicas para la glucosa y la respiración. Estos efectos de inhibición están bien descritos mediante la inclusión de la cinética de la formación de producto en un modelo dinámico recientemente publicado [17]. Si bien este fenómeno es bien conocido, no será estudiado en sus consecuencias para el sistema de expresión formado por la cepa *E. coli* BL21 (DE3)/pEKI-IV (2).

A partir de las muestras obtenidas post-inducción, la expresión fue analizada mediante electroforesis seguido de un WB. La Figura 35 muestra los resultados obtenidos mediante el revelado por ECL con peroxidasa y el anticuerpo monoclonal anti-angiostatina (Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate). Las muestras corresponden únicamente al periodo de inducción.

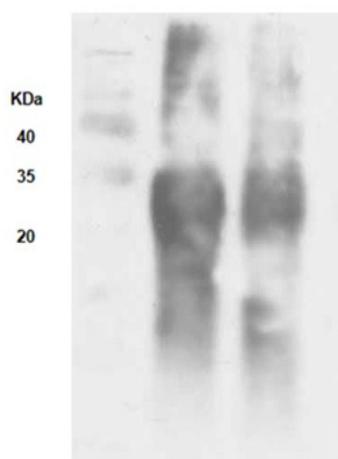


Figura 35 Análisis de WB de un SDS-PAGE al 12.5% de las fracciones insolubles (IB) producidas luego de la inducción con 1.0 mM de IPTG. El marcador utilizado fue Thermo Scientific™ PageRuler™. Las muestras sembradas son dos muestras finales entre las 6 y 8 horas de cultivo.

Se observa una buena señal de expresión de angiostatina junto con el marcador. Las muestras corresponden a los últimos dos tiempos de inducción sin contar los últimos dos puntos de la cinética de crecimiento. Dado que el producto se expresa en forma de IB, las condiciones de siembra fueron de ruptura total. A 50 µl del pellet celular (normalizado a 1 ml de $DO_{600} = 1$) se le agregaron 50 µl de buffer de muestra 2X con reductor luego se hirvió durante 10 min., y luego se adiciono 50 µl de agua, se re suspendió y se centrifugó

Capítulo 5

durante 15 min. Se sembró el gel con 20 μ l de cada muestra en un gel al 12.5% de SDS-PAGE para hacerlo comparativo (Fig. 33).

En esta etapa, se obtuvo un procedimiento general, similar a las estrategias actuales para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, y se determinó que el sistema de control de la expresión de angiostatina muestra resultados satisfactorios (rango de tamaño correcto, detección adecuada mediante diferentes tipos de WB, etc.).

Se hace especial hincapié en el sistema de control de la expresión de angiostatina por dos razones fundamentales, en primer lugar, para comprender mejor cómo podría actuar el sistema de expresión mediante el promotor de la fosfatasa alcalina de *E. coli*. En segundo lugar, se ha demostrado que los niveles obtenidos permitirían aislar la angiostatina para utilizarla como control en futuros ensayos de detección y evaluación de su actividad biológica. El hecho de poder determinar que el peso obtenido sea correcto nos da suponer la integridad en cuanto a la composición de aminoácidos de los cuatro kringles.

El hecho de ser la angiostatina una proteína humana compleja, y que hayamos verificado que su expresión arroje un peso molecular dentro de los límites correctos, no es algo menor sino esencial para verificar que el sistema de expresión control ha funcionado de manera correcta.

Por otro lado, su expresión no ha tenido impactos negativos sobre el hospedador como ser muerte celular o defectos graves durante el cultivo como ser un elevado mantenimiento durante la fase de crecimiento. Estos últimos aspectos si serán evaluados en detalle cuando se estudie el sistema de inducción mediante el promotor de la fosfatasa alcalina. Como se mencionó, la complejidad de la proteína es clave para el éxito de su expresión, pero no del todo relevante a su futura funcionalidad. Un claro ejemplo de proteínas complejas expresadas en *E. coli* es el hIFN- γ , una proteína glicosilada con un tamaño molecular total de 25 kDa. Sin embargo, hIFN- γ recombinante (rhIFN- γ) expresado en *E. coli* no está glicosilado y tiene un peso molecular de 17 kDa, pero sigue siendo fisiológicamente activo [18]. El conocimiento obtenido indudablemente servirá para el desarrollo de nuevas herramientas para la producción de angiostatina en este sistema bacteriano.

5.2 Expresión utilizando la construcción BL21 (DE3)/pBKI-IV

(1)

Capítulo 5

En la sección anterior pudo demostrarse que el sistema considerado como control expresa angiostatina de una manera esperada en forma de IB. En la presente sección se describe el sistema de expresión para angiostatina de mayor interés y motivo de esta tesis. Cabe mencionar que a la actualidad no existen evidencias publicadas de expresión de angiostatina utilizando un vector de expresión con el promotor de la fosfatasa alcalina de *E. coli*.

Probablemente al utilizar este sistema de expresión puede ocurrir, como se mencionó (Sección Resumen), que exista una adaptación gradual en el tiempo a medida que se va limitando el fosfato y de manera paralela se lleve a cabo la inducción, o bien que las células crezcan, y la energía, los recursos nutricionales a menudo sean dirigidos hacia la producción de biomasa hasta quedar en estado de no crecimiento (latente), debido a la limitación de fosfato pero que sean metabólicamente activas y capaz de producir angiostatina en niveles más altos.

Este último concepto fue desarrollado por Rowe y Summers, quienes encontraron que en ese estado *E. coli* posee una productividad específica mayor debido a la disminución de la expresión de genes cromosómicos, favoreciendo la expresión del gen codificado por el plásmido [19-21].

Análogamente a lo realizado en el sistema control, debieron ajustarse condiciones de crecimiento en diferentes medios, pero por sobre todas las cosas, debió estudiarse la concentración de fosfato inorgánico inicial y el seguimiento del curso de su consumo dado que esto nos dará idea del comienzo de la inducción de la expresión [22]. Para establecer condiciones óptimas para la inducción, muchos experimentos tienen que ser llevado a cabo en cultivos paralelos para determinar el mejor contenido de fosfato del medio y el tiempo óptimo de inducción y para esta tarea de campo inicial la herramienta más adecuada resultó, nuevamente, los experimentos en erlenmeyer agitados.

Como sucedió anteriormente los trabajos iniciales se llevaron a cabo utilizando el MR.

5.2.1 Sistema Batch - Erlenmeyer Agitado

Capítulo 5

5.2.1.1 Evaluación de cinética de crecimiento en MR

En la mayoría de los casos, la producción de proteínas recombinantes en alto nivel conduce indefectiblemente en una inhibición del crecimiento celular [8] [16].

Cuando se comenzó a trabajar en los primeros ensayos con el sistema de control pET básicamente se siguieron los procedimientos sugeridos por el la bibliografía [3].

En la Sección. 5.2 se menciona que para la expresión de angiostatina, no se requería un medio de cultivo apto para un rendimiento óptimo de crecimiento, puesto que en la etapa anterior el objetivo era realizar un análisis cualitativo y manifestar que el gen es expresado en forma correcta, en cambio el objetivo de esta etapa, con el sistema de expresión principal de esta tesis, es lograr obtener la angiostatina en una concentración que permita su correcta detección como el sistema de expresión anterior, con lo cual es necesario ajustar el medio de cultivo establecido, y se deben analizar variables intrínsecas del microorganismo a utilizar con respecto a su cinética de crecimiento a escala de fermentación y lograr que no se produzca un decaimiento en el rendimiento global del proceso.

En una primera etapa se deben determinar los parámetros básicos tales como el μ_{max} y el rendimiento celular, datos que son necesarios para el diseño de un hipotético sistema de cultivo de batch alimentado tal que se evite la producción de metabolitos indeseados como el acetato. Los medios definidos o sintéticos, son los más utilizados para obtener cultivos de alta densidad, ya que la concentración de nutrientes es conocida y pueden ser controlados durante el proceso.

Similarmente a lo estudiado para el sistema de expresión pET, inicialmente se realizó la evaluación de diferentes FCE utilizando el MR. Este estudio permitió establecer el ajuste de la FCE necesaria para poder asegurar un consumo total de fosfato, y el ajuste del resto de los componentes como ser el MOPS, factor muy importante como buffer del medio, etc.

Bajo estas condiciones experimentales luego se centró el objetivo en estudiar los efectos de la limitación de fosfato en el crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) en el cual el objetivo fue obtener rendimientos de biomasa obtenida respecto de la glucosa y el fosfato inorgánico consumido.

5.2.1.2 Resultados

Capítulo 5

Se ensayaron las siguientes fuentes de carbono y energía: glucosa (testigo), glicerol, manitol, sorbitol y piruvato de sodio. En cada caso, se puso la cantidad equivalente en carbono a $5.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa, $0.167 \text{ C}\cdot\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}$. La concentración de fosfato inorgánico inicial fue de 0.9 mM . El tiempo de cultivo total fue de 24 hr . Los resultados se indican en la (Tabla. 16).

FCE	T = 0 hr.		T = 24 hr.		
	pH	DO ₆₂₅	pH	DO ₆₂₅	PS (g/L)
Glucosa ($\eta = 4$)	7.40 ± 0.05	0.14 ± 0.01	4.76 ± 0.27	2.41 ± 0.05	1.25 ± 0.09
Glicerol ($\eta = 2$)	7.42 ± 0.02	0.13 ± 0.01	6.91 ± 0.01	2.17 ± 0.05	1.33 ± 0.06
Manitol ($\eta = 2$)	7.40 ± 0	0.13 ± 0	6.81 ± 0.08	2.18 ± 0.01	1.24 ± 0.04
Sorbitol ($\eta = 2$)	7.42 ± 0	0.13 ± 0.01	6.90 ± 0.01	2.28 ± 0.04	1.36 ± 0.01
Piruvato ($\eta = 2$)	6.52 ± 0	0.15 ± 0	7.87 ± 0.04	1.09 ± 0.01	0.99 ± 0.04

Tabla. 16 Evaluación de crecimiento en medio mínimo complementado con las correspondientes fuentes de carbono. Se realizaron cuatro ($\eta=4$) con glucosa y el resto se realizó por duplicado.

De la Tabla 16 se desprenden que para una misma cantidad de C-moles de FCE se observan similares rendimientos respecto a la biomasa final, excepto para el piruvato de sodio. Al no disponer de todos los métodos para cuantificar la cantidad de FCE remanente no se incluyeron los datos, pero para la glucosa, cabe notar que se consumió totalmente en los ensayos. En base a ese resultado y a la biomasa final obtenida pudo calcularse un rendimiento celular de 0.260 g/g valor que indica que se está formando algún producto. Es llamativo el caso del piruvato en dos aspectos, el primero el cual es un metabolito

Capítulo 5

importante del metabolismo central, y puede absorberse y excretarse en *E. coli*, sin embargo, el conocimiento sobre el transporte de piruvato en las bacterias es escaso [23], en segundo lugar, la relación de biomasa y DO₆₀₀ es casi lineal. La glucólisis convierte la glucosa en piruvato, que luego se procesa en vías alternativas; por ejemplo, el piruvato se puede convertir en etanol (fermentación) o se puede metabolizar a través del ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa (respiración). La fermentación y la respiración se regulan antagónicamente en respuesta a la glucosa o a factores fisiológicos. En este caso puntual, el nodo de piruvato-oxalacetato implica un conjunto de reacciones, que inicialmente consumen ATP (generando probablemente más mantenimiento) y que interceptan las principales vías del metabolismo del carbono, por lo tanto, es responsable de la distribución del flujo de carbono entre el catabolismo, el anabolismo y el suministro de energía de la célula que trae como consecuencia una elevación del pH del medio de cultivo. Debido a estos resultados, para los experimentos subsiguientes basado en el costo y en la facilidad para determinar su concentración, la glucosa fue elegida como el sustrato en forma de FCE.

5.2.1.3 Evaluación de la concentración inicial de fosfato inorgánico

Para determinar la concentración inicial de fosfato inorgánico, se realizaron cultivos en medio MR bajo las condiciones indicadas en la Sección 3.2.2.1 variando la concentración inicial a 4, 2, 1.6, 0.9, 0.5, 0.4, 0.2 y 0.01 mM manteniendo constante en 0.167 C-moles.L⁻¹ la concentración inicial de glucosa.

Las bacterias recombinantes se cultivaron en modo batch en erlenmeyers agitados de 1 L de capacidad conteniendo 100 ml de medio de cultivo sintético conteniendo MOPS como sistema buffer según Neidhardt y col. [24]. Todos los cultivos se llevaron a cabo por duplicado, con 100 µg/ml de ampicilina. La DO₆₀₀ inicial fue siempre de 0.14.

Las muestras se incubaron con agitación a 180 r.p.m a 37° C. Se tomaron muestras en forma periódica para la determinación peso seco, glucosa remanente, fosfato y amonio. Para la determinación de la presencia de angiostatina en las muestras tomadas se realizaron ensayos por electroforesis en (SDS-PAGE) 12.5% en condiciones no reductoras y WB.

5.2.1.4 Resultados

Capítulo 5

En este aspecto, a diferencia del sistema anterior, lo que se desea lograr es un auto inducción estrictamente controlada, desencadenada por el agotamiento de fosfato. El método se basa en que la expresión de angiostatina se induce al entrar en la fase estacionaria. El tiempo de la inducción, momento en el que se agota el fosfato inorgánico dependerá fuertemente de la concentración inicial de biomasa y de la velocidad de crecimiento del cultivo por lo que será un factor clave a determinar y que seguramente estará vinculado a la actividad metabólica en la fase en la cual el cultivo comienza a estar limitado en fosfato.

BL21(DE3)/pBKI-IV(1)								
MR								
PO ₄ ⁻³ (mmoles.l ⁻¹)	0.01	0.2	0.4	0.5	0.9	1.6	2.0	4.0
pH	6.2	5.32±0.17	4.90±0.03	5.6	4.84±0.52	4.74±0.08	4.98±0.30	5.53±0.76
DO ₆₀₀	0.24	0.85	1.46	1.71	2.12±0.09	2.97	2.08±0.64	2.53
Gluc (g.L ⁻¹)	NA	2.53±0.50	2.42	0	1.74±0.66	0.32±0.43	1.58±0.24	0.55±0.75
PO ₄ ⁻³ (mmoles.l ⁻¹)	0	0	0	0	0.30	0.37	0	2.43
X (g.L ⁻¹)	0.259	0.49±0.03	0.78±0.02	0.91	1.20±0.11	1.50±0.02	1.24±0.10	1.32±0.24
Y _{X/S} (gg ⁻¹)	NA	0.15±0.02	0.22±0.08	0.18	0.37±0.04	0.33±0.04	0.37±0.06	0.27±0.01
Acetato (gl ⁻¹)	NA	0.32	NA	2.14	NA	NA	1.92	4.2
Lactato (gl ⁻¹)	NA	0	NA	0	NA	NA	0	0
ΔGluc/ΔPO ₄ ⁻³	NA	15.6	9.15	10	4.49±0.29	4.13±0.60	1.74±0.08	2.77±0.10

Tabla. 17 Evaluación de la concentración de fosfato inorgánico inicial.

La Figura 36 muestra los resultados de la biomasa final a cada concentración inicial de fosfato inorgánico, y la última fila de la Tabla. 17 la relación de glucosa consumida por cada mili mol de fosfato consumido. Esta última relación permitiría estimar la cantidad de FCE necesaria para agotar el fosfato y por lo tanto comenzar la inducción y podría considerarse un parámetro de diseño para futuros cultivos.

Capítulo 5

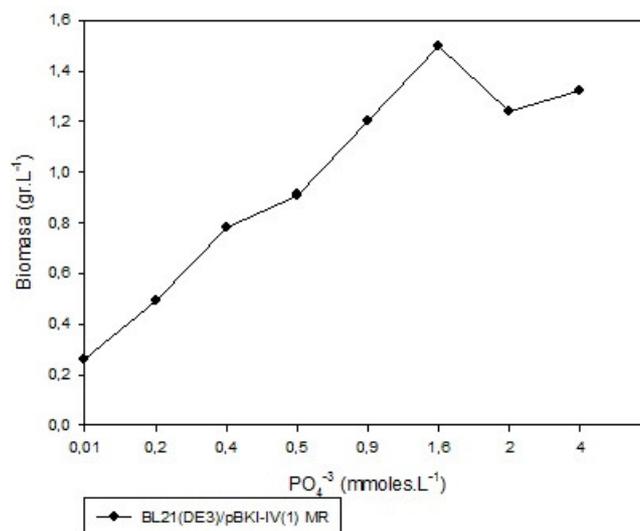


Figura 36 Análisis gráfico de los valores de la biomasa final respecto de la concentración inicial de fosfato inorgánico.

La Figura 36 muestra el peso seco obtenido en función de la concentración inicial de fosfato. Se observa que por encima de 0.9 – 1.6 mM no hay un incremento sustancial en la biomasa. Este será el rango de concentración de base que será utilizado como partida para realizar los cultivos en modo batch.

La productividad específica de angiostatina se podría optimizar eligiendo el tiempo de inducción con la concentración inicial de fosfato inorgánico. Como se observa en la Tabla 17, una reducción en la acumulación de biomasa podría indicarnos una mejor formación del producto, debido a que seguramente el crecimiento es menor debido a estar limitado en fosfato.

Para estudiar bien el efecto de la limitación de fosfato y la inducción, se plantearon sendas experiencias evaluando diferentes concentraciones iniciales de fosfato en el medio de cultivo para ver su impacto sobre el crecimiento celular, consumo de FCE y síntesis de angiostatina. El objetivo de los ensayos fue determinar en qué momento, luego de agotarse el fosfato inorgánico, comenzaría la expresión de angiostatina, para ello se realizó una cinética de crecimiento para las muestras entre 0.2 – 2.0 mM.

Inicialmente, el efecto de las diferentes concentraciones iniciales de fosfato en el medio de cultivo sobre el crecimiento celular fue determinado mediante DO_{600} paralelamente se

Capítulo 5

midió el consumo de fosfato y glucosa y posteriormente se determinó la expresión de angiostatina de las muestras a diferentes tiempos.

La figura 37 muestra la evolución temporal de la biomasa en función de la concentración inicial de fosfato en un medio de cultivo que contiene 0.2, 0.4, 0.9 y 1.8 mmoles de fosfato por litro. Los cultivos se inocularon con una suspensión al 1% proveniente de un cultivo ON previamente lavado con el mismo volumen con medio de cultivo fresco.

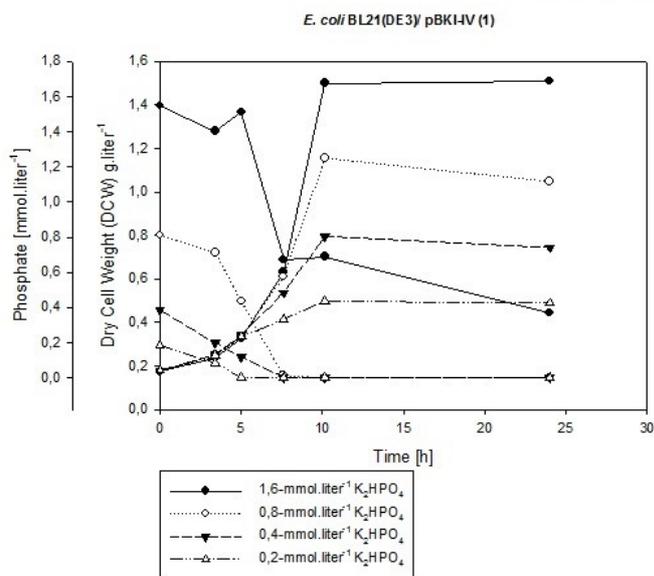
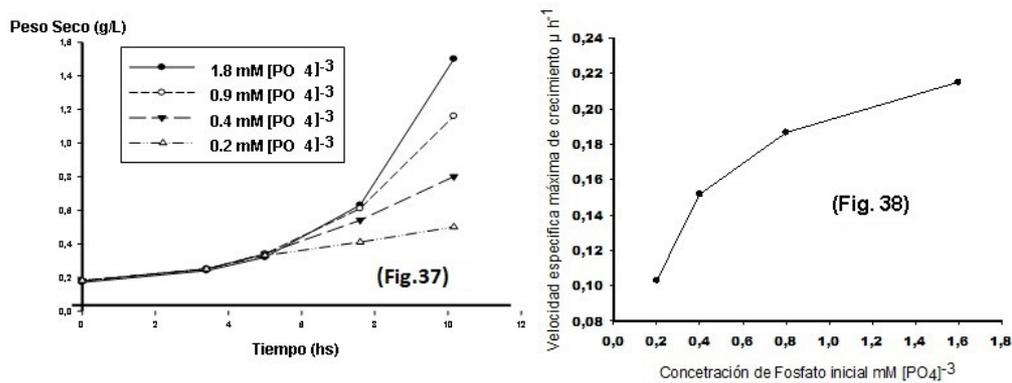
En la figura 37 se aprecia un comportamiento diferencial en el crecimiento a partir de las 7.6 hr. Aproximadamente momento en el cual se evidencia un consumo total de fosfato para las muestras conteniendo 0.4 y 0.2 mM de fosfato inicial.

Las DO_{600} donde se produjo una limitación de fosfato (0.4; 0.2 mM), siguió en aumentó constantemente después de que el fosfato se agotó. Esto es sorprendente, porque esperábamos que la falta de fosfato restringiera el crecimiento celular.

En el caso del cultivo con 0.2 mM de fosfato se obtuvo un muy bajo rendimiento celular evidenciado por la formación de acetato Tabla.17.

En Tabla.17, también en la última fila, podemos ver con la relación de consumo de glucosa / fosfato inorgánico, lo notable que a medida que se disminuye el fosfato inicial, la tasa de consumo de glucosa aumenta significativamente lo cual podría ser debido a la demanda de ATP causada por la limitación de fosfato. Una de las claves para el diseño de futuros ensayos consiste en determinar la relación óptima de estos dos nutrientes de manera de poder ajustar el momento de comenzar una alimentación de glucosa en un BA limitado en fosfato, por ejemplo.

Capítulo 5



(Fig. 39)

Figura 37 Cinética de crecimiento respecto de la concentración inicial de fosfato inorgánico.

Figura 38 Grafica de $\mu^{-1}_{m\acute{a}x}$ respecto de la concentración inicial de fosfato inorgánico.

Figura 39 Cinética de crecimiento respecto de la Cinética de consumo de fosfato inorgánico.

La baja concentración celular también podría ser causada por una menor producción de ATP a medida que las muestras parten con menor concentración de fosfato inorgánico.

Riesenberg y col. [25] demostraron un control adicional para varias cepas de *E. coli* (B, TG1, DH5, etc.) del regulón PHO que es P_i independiente que no requiere de las vías convencionales. Este control se regula por una ruta de dos pasos en el metabolismo del carbono en el que la acetil coenzima A, P_i , y ADP se convierten en acetato, coenzima A, y ATP a través de las enzimas fosfotransacetilasa (PTA) y acetato quinasa (ACKA). La regulación responde a la síntesis de acetil fosfato, un intermediario que conduce a la

Capítulo 5

incorporación de P_i en ATP, que es el donante de fosforilo principal en el metabolismo, que codifica genes para la absorción de P_i , y genes para las enzimas en el metabolismo central de incorporación de P_i en ATP y viceversa.

En teoría *E. coli* contiene alrededor de 15 mg de fosfato inorgánico por gramo de biomasa seca [26] esto es alrededor de 0.086 mmoles expresados como mmoles de K_2HPO_4 , con lo cual incluso con para la concentración de 0.02 mM podría esperarse, en teoría una cantidad de $1.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa. La composición elemental de la biomasa de *E. coli* ($CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}$) se deriva de la literatura [27-8]. Los cultivos se realizaron por duplicado. El tiempo de cultivo total fue de 24 hs.

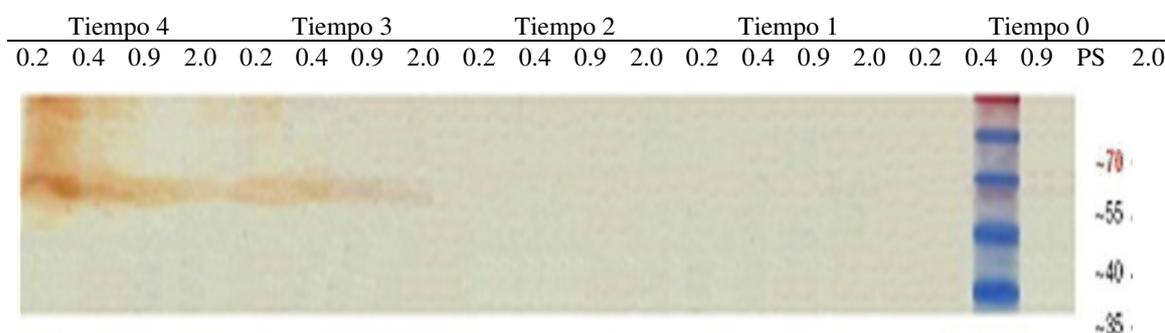


Figura 40 Análisis mediante WB de la cinética de crecimiento de la figura 37.

Se observa que a los tiempos 3 y 4 hay una alta inducción del promotor de la fosfatasa alcalina. La mayor cantidad de señal corresponde a las muestras que estuvieron con mayor cantidad de tiempo limitados en fosfato.

Se analizaron todas las muestras cuyo consumo de fosfato fue total. Se procedió de la misma manera a lo expuesto en (Sección 5.1.3.4) respecto al procesamiento de las muestras.

En la figura 40 puede observarse a una banda de aproximadamente 38 kDa que se corresponde con el tamaño de la angiostatina. Las muestras se ajustaron según la DO_{600} . T_0 representa la muestra inicial, $T_1= 3.4$ hr., $T_2= 5$ hr., $T_3= 7.6$ hr. y $T_4= 10.16$ hr. La formación de producto se manifestó luego de las 7.6 hr especialmente para las muestras con 0.9; 0.4 y 0.2 mM de fosfato inicial. Cabe destacar que con 0.2 mM de fosfato inicial el cultivo sufrió una depleción de fosfato a las 5 hr. y sin embargo no hay una señal de

Capítulo 5

producto. Es decir que para esta muestra se cuenta con 2.6 hr más de inducción que el resto que comienza a expresar a T₃ con 7.6 hr. A 10 hr. y con 2.6 hr. de inducción se encuentran todas las muestras con una señal importante de producto formado. Se observa que comienza a verse expresión para todas las muestras a cercanas a 8 horas de cultivo, excepto para la muestra de 2.0 mM que en ese punto posee un remanente de [PO₄]³⁻ de 0.67 mM con lo cual no sería suficiente bajo para inducir el promotor (Sección 1.5.2).

Estos resultados preliminares demuestran que la angiostatina puede ser producida por el sistema de expresión inducible mediante limitación por fosfato incluso a baja velocidad específica de crecimiento. De las muestras sembradas en el presente WB solo la de 0.2 mM muestra una cantidad de 0.32 g·L⁻¹ de ácido acético. Del presente ensayo se obtiene un umbral de concentración limitante podría bien ser los 0.2 mM.

Los presentes datos confirman que el promotor *pho A* puede ser utilizado de manera eficiente para la expresión controlada de angiostatina en *E. coli*. Este sería el primer antecedente para este sistema de expresión. La concentración real de fosfato requerida para la inducción del promotor *pho A* está por debajo de 0.05 mM. Por lo tanto, se deberá alcanzar una cierta densidad celular, en este caso limitada seguramente por el tipo de experimento (erlenmeyer agitados), para que pueda producirse la inducción de angiostatina y poder ser detectada. En el fermentador se podría lograr utilizando una gran cantidad de células en el inóculo. Sin embargo, a diferencia de los cultivos en fermentador, generalmente los cultivos recombinantes en erlenmeyer con agitación están asociados con mayores limitaciones que cultivando cepas WT, lo que limita aún más los rendimientos de biomasa y proteína [29].

5.2.1.6 Sistema Batch - Biorreactor

5.2.1.6.1 Evaluación de cinética de crecimiento en MR

En base a los objetivos propuestos, se plantea en esta etapa la evaluación del sistema de expresión en cultivos en batch con el MR. Se propone estudiar el metabolismo de la cepa de producción mencionada profundizando de esta forma el conocimiento obtenido sobre la misma en los sistemas en batch de erlenmeyers agitados.

Capítulo 5

Se sabe que la velocidad específica de crecimiento es un patrón de referencia de mucha importancia en el estudio de cinéticas microbianas. En particular permite determinar los rangos óptimos de crecimiento por los cuales se puede evitar la producción de intermediarios metabólicos indeseados como el ácido acético, el producto metabólico que más efectos adversos produce durante el estudio de cepas recombinantes [30].

De los resultados obtenidos con el sistema de expresión de interés hasta aquí sabemos que hemos logrado expresar angiostatina pero en la escala evaluada no pudimos establecer con que rendimiento.

Se realizaron ensayos en modo batch en fermentador de la cepa evaluada junto con la cepa BL21 (DE3)_{WT}, para estudiar la cinética de consumo de oxígeno, la velocidad específica de crecimiento, y cantidad de fosfato inorgánico para obtener una determinada biomasa a fin de verificar si dichos parámetros son los mismos en condiciones de fermentación controladas que en los cultivos en erlenmeyer agitado (Sección. 5.2.1.4). También se evaluó la pérdida de plásmido a lo largo del tiempo (Sección. 2.2.2).

En base a la información de los sistemas de cultivo en batch realizados en erlenmeyer agitados, se evaluarán dos concentraciones de glucosa inicial y dos concentraciones de fosfato inicial, con el objetivo de obtener datos de μ_{max} y $Y_{x/s}$ para un posible diseño de un BA.

Las medidas del contenido en O₂ y en CO₂ de los gases de salida del reactor fueron realizadas mediante un detector de tipo paramagnético (Servomex, UK) y un detector infrarrojo (Horiba Pir 2000, Japón), respectivamente. Con estos datos y el valor del caudal de aire se determinaron las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂, en condiciones normales de presión y temperatura, mediante las ecuaciones que surgen de balances de materia en fase gaseosa y líquida, planteadas por Cooney y col. [31] (Sección. 3.4.4.2).

$$r_{O_2} = -\frac{F_a}{V} \cdot 0.79 \cdot \frac{T_0 P}{T P_0} \cdot \frac{60}{22.4} \left(\frac{(X_{O_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2} - \frac{(X_{O_2})_1}{1 - (X_{O_2})_1 - (X_{CO_2})_1} \right)$$

Capítulo 5

$$r_{CO_2} = \frac{F_a}{V} \cdot 0.79 \cdot \frac{T_0 P}{T P_0} \cdot \frac{60}{22.4} \left(\frac{(X_{CO_2})_2}{1 - (X_{O_2})_2 - (X_{CO_2})_2} - \frac{(X_{CO_2})_1}{1 - (X_{O_2})_1 - (X_{CO_2})_1} \right)$$

Dónde: r_{O_2} y r_{CO_2} son las velocidades volumétricas de consumo de O_2 y producción de CO_2 respectivamente (en moles/l.h).

F_a es el flujo de aire a la entrada.

0.79 es la fracción molar de N_2 en el aire

V es el volumen de medio

T , P , T_0 y P_0 son la presión y temperatura en las condiciones de trabajo y en CNPT

X_{O_2} y X_{CO_2} son las fracciones moles de O_2 y CO_2 en los gases de entrada (1) y salida (2)

22.4 es el volumen molar de un gas en CNPT.

5.2.1.6.2 Resultados

La (Tabla. 21) muestra los valores de los parámetros estequiométricos del cultivo y los resultados de los balances de carbono y grado de reducción (Sección. 3.2.2.5), aplicados a cultivo en batch. Los que permiten determinar si se formó algún producto y si hubo consistencia interna en los resultados experimentales obtenidos. Los valores de grado de reducción se determinaron como es habitual considerando NH_3 como nivel de referencia.

Capítulo 5

Cepa de <i>E. coli</i>	Glucosa inicial (g.l ⁻¹)	PO ₄ ⁻³ inicial (mmoles.l ⁻¹)							
BL21	12.5	1.60	Parámetros estequiométricos						
(DE3) _{WT}	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)		O ₂ total (moles)	CO ₂ total (moles)	y ^{x/s} (C-mol) †	yc _{o2} /s *	b **	Bal. C	Bal. γ
MR	0.380 R ² = 0.98		0.130	0.140	0.369 ± 0.057	0.395	0.366	0.753	0.750
Cepa de <i>E. coli</i>	Glucosa inicial (g.l ⁻¹)	PO ₄ ⁻³ inicial (mmoles.l ⁻¹)							
BL21	12.5	1.60	Parámetros estequiométricos						
(DE3) / pBKI-IV	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)		O ₂ total (moles)	CO ₂ total (moles)	y ^{x/s} (C-mol)	yc _{o2} /s *	b **	Bal. C	Bal. γ
(1) MR	0.429 R ² = 0.99		0.086	0.086	0.252 ± 0.018	0.600	0.604	0.856	0.850
Cepa de <i>E. coli</i>	Glucosa inicial (g.l ⁻¹)	PO ₄ ⁻³ inicial (mmoles.l ⁻¹)							
BL21	30.0	5.0	Parámetros estequiométricos						
(DE3) / pBKI-IV	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)		O ₂ total (moles)	CO ₂ total (moles)	y ^{x/s} (C-mol) †	yc _{o2} /s *	B **	Bal. C	Bal. γ
(1) MR	0.431 R ² = 0.98		0.052	0.121	0.298 ± 0.015	0.313	0.117	0.613	0.370

Tabla. 21 Parámetros estequiométricos de los cultivos realizados. † Valor promedio obtenido de forma global y mediante regresión de ajuste a la línea recta. Bal. C: balance de carbono. Bal. γ : balance de grado de reducción. *(molCO₂/C-molFCE) **(molO₂/C-molFCE)

Capítulo 5

Una forma de evidenciar la carga metabólica impuesta por el plásmido o la expresión angiostatina, es evaluando el coeficiente de mantenimiento (m_s), para las distintas situaciones: cepa WT, cepa portadora del plásmido sin el inserto codificante o en condiciones de ausencia de inducción (o inducción basal) y cepa con plásmido e inserto, en condiciones de expresión de la proteína recombinante. Para la determinación de los m_s debemos realizar estudios en CC limitados en FCE (glucosa) y fosfato inorgánico, por ello es que antes debimos estudiar preliminarmente la cepa de estudio en cultivo en batch que es el paso previo a la realización del cultivo continuo. Como primer dato exploratorio a evaluar fue la determinación de un $\mu_{m\acute{a}x}$ real que nos permitirá después encontrar la cota superior de D sin provocar el "lavado" de los CC (Sección. 2.2).

Bhattacharya y Dubey [32], calcularon el coeficiente de mantenimiento m_s a partir de CC para una cepa de *E. coli* recombinante inducible por IPTG bajo las tres condiciones mencionadas y obtuvieron valores de mantenimiento de 0.12; 0.17 y 0.32 c-mol / (c-mol.h⁻¹) respectivamente, reflejando el gasto metabólico correspondiente a cada situación. Sería interesante estudiar dicho fenómeno con el sistema de inducción por fosfato, dado que para el mismo no existe ningún tipo de antecedentes de este tipo.

Los resultados obtenidos y mostrados en la (Tabla. 21) indican que, en todas las condiciones de crecimiento, hubo generación de producto carbonado diferente a la biomasa y CO₂ incluso en la cepa control. Similares resultados fueron informados en su momento por otros autores [33], los valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ hallados para la cepas de *E. coli* BL21 (DE3) fueron similares a los reportados por Riesenber y col. [34], por tanto a partir de estos valores hallados podemos establecer para futuros CC un rango de velocidades de dilución entre $0.02 < D < 0.4 \text{ h}^{-1}$.

Para analizar en detalle los resultados de la cepa WT podemos ver la siguiente (Fig. 47) donde se presentan las respectivas velocidades de consumo de O₂ (r_{O_2}) y formación de CO₂ (r_{CO_2}), en el transcurso del cultivo. Como puede observarse, los picos de las velocidades de consumo de O₂ y producción de CO₂ se obtuvieron alrededor de las 8 hr. y luego disminuyeron al consumirse totalmente la glucosa.

Las curvas de r_{O_2} y r_{CO_2} muestran un comportamiento similar, manteniendo un CR cercano a 1 durante todo el tiempo de fermentación, de hecho durante las 10 horas de

Capítulo 5

cultivo arrojó un valor promedio de 0.98 ± 0.13 valor razonable para un metabolismo completamente respiratorio.

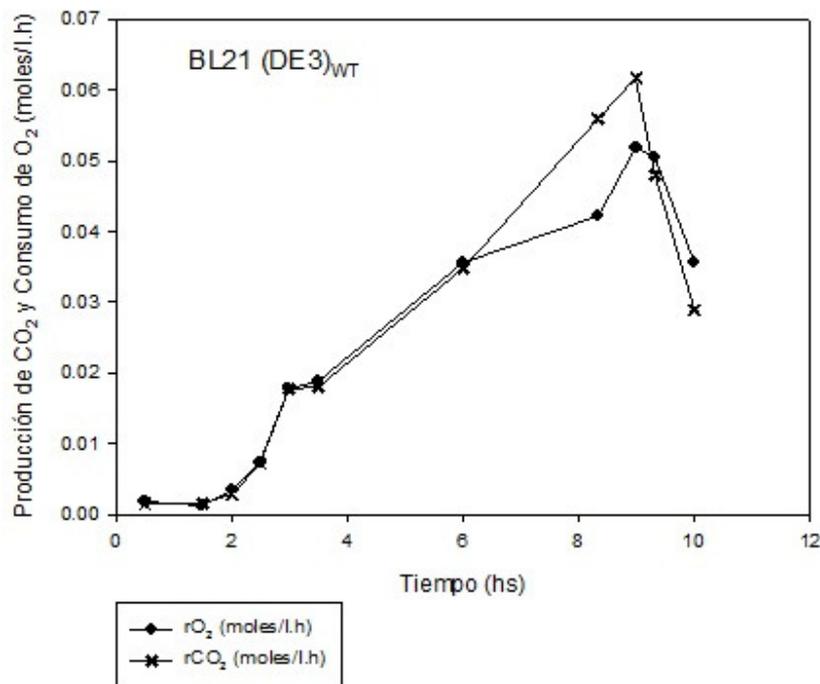


Figura 47 Velocidad de consumo de O_2 (r_{O_2}) y velocidad de formación de CO_2 (r_{CO_2}) durante el cultivo de la cepa BL21 (DE3) WT.

Una inspección de los valores de la Tabla 21 de los balances de carbono y grado de reducción para la cepa WT nos permitiría a *modo de ejemplo*, estimar el direccionamiento de la glucosa. Como ser, utilizando glucosa como FCE, amonio como fuente de nitrógeno y asumiendo biomasa estándar de *E. coli* ($CH_{1.77}O_{0.49}N_{0.24}$) Andersson y col. [35], podemos representar mediante la siguiente ecuación estequiométrica, el crecimiento de *E. coli* en general (expresada en C-mol):



Para la cepa WT se observó un consumo total de 0.26 C-moles de glucosa durante las casi 9 horas de cultivo. Los gramos de carbono de la glucosa transferidos a la biomasa fueron calculados, de acuerdo a la ecuación:

$$0.26 \text{ C-moles de gluc} \times 0.369 \times 12 \text{ g C} = 1.151 \text{ g de C de biomasa}$$

Análogamente para el C del CO_2 obtenido:

Capítulo 5

$0.26 \text{ C-moles de gluc} \times 0.395 \times 12 \text{ g C} = 1.235 \text{ gr de C en el CO}_2 \text{ obtenido.}$

Totalizando de esta manera 2.384 gr de C total. Ahora bien, si queremos saber estos gramos de C que cantidad de glucosa consumida representa sería: $2.384 \text{ gr de C total} \times 180 \text{ gr de gluc} / 12 \times 6 \text{ gr de C}$, con lo cual obtenemos el valor de 5.960 gr de glucosa consumida es decir el 76% del total consumido cerca de 8 gr totales, por tanto el faltante restante fue derivado a la producción de algún producto, el cual por diversas razones no pudo ser cuantificado en estos ensayos.

De haber sido muy probablemente acetato, el mismo debió ser poca cantidad dado a que el crecimiento básicamente se detuvo al consumirse totalmente la glucosa, por tanto al no haber efecto de inhibición del crecimiento su concentración podría estar por ejemplo, entre $1- 8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ por encima de la misma si se podría inhibir el crecimiento Xu y col. [36] cualquier valor entre ese rango claramente explicaría el faltante de carbono.

Prosiguiendo con los análisis restantes cabe mencionar que existieron dos hipótesis de simulación, una básicamente cuya finalidad era ver marcadamente la disminución en el consumo de glucosa a expensas del mantenimiento del plásmido pBKI-IV y de una eventual expresión de manera de poder comparar con los resultados con la (Tabla. 17).

Como se mencionó anteriormente (Tabla.16), uno de los parámetros de diseño de los experimentos es la relación Glu/PO_4^{-3} es decir, que cantidad de FCE debo agregar para asegurar el consumo de fosfato y consecuentemente la inducción del sistema. Para estudiar este comportamiento se planearon los dos experimentos subsiguientes uno donde el fosfato se colocó en 1.6 mM ídem cepa WT y el otro donde tanto en fosfato (5.0 mM) y la glucosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) estuvieran en exceso y no se esperara una limitación de fosfato. Se recuerda que la glucosa puede ser inhibidora del crecimiento a una concentración mayor a $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Riesenber y col. [37].

Las figuras 48 y 49 muestran los resultados obtenidos durante la experiencia concentración de biomasa, glucosa y fosfato en el tiempo ($12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de gluc. 1.6 mM PO_4^{-3}). Se observa que el fosfato se agota cerca de las 8 horas, momento en el cual comenzaría la fase estacionaria. Los valores de $r\text{O}_2$ y de $r\text{CO}_2$ difieren hacia el final notándose un incremento en esta última coincidente con el momento en que se agota el fosfato.

Capítulo 5

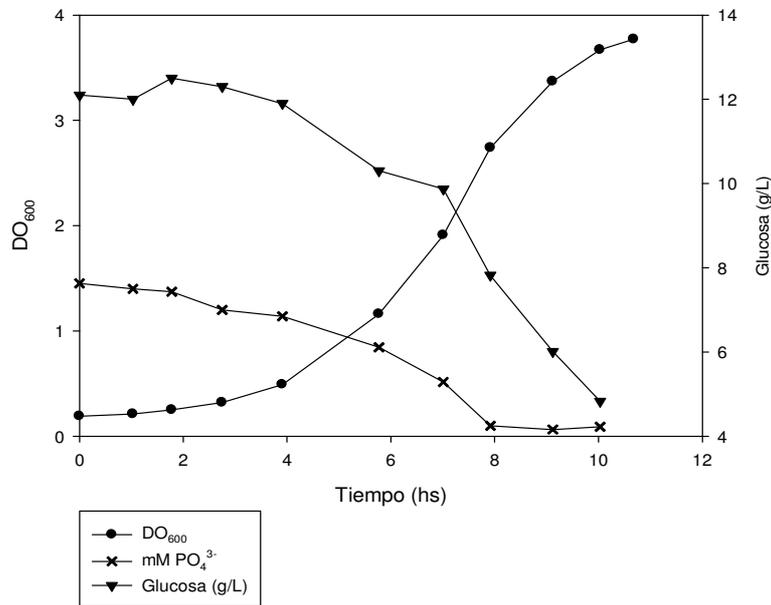


Figura 48 Evolución del cultivo de BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) (12 g·L⁻¹ de gluc. 1.6 mM PO₄³⁻).

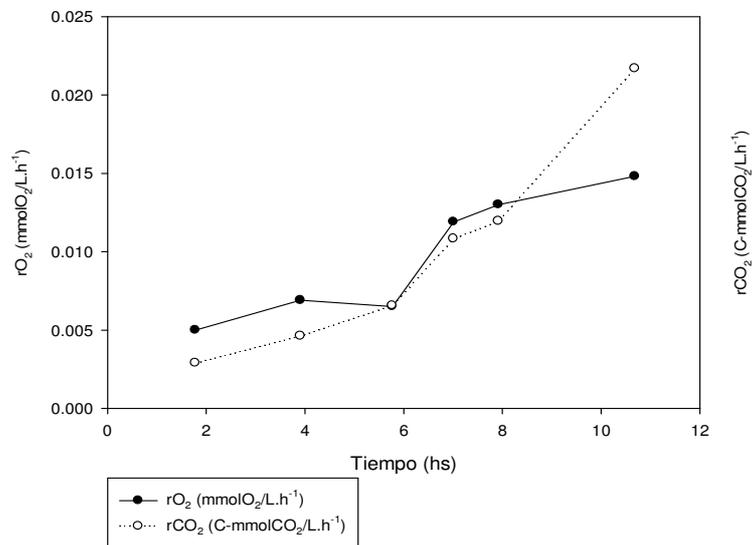


Figura 49 Velocidad de consumo de O₂ (rO₂) y velocidad de formación de CO₂ (rCO₂) durante el cultivo.

En la figura 48 puede verse que en el momento que se produce la limitación de fosfato, y por ende la inducción de la expresión de angiostatina hay un remanente de 7.8 g·L⁻¹ de glucosa. Luego de dos horas, ya totalmente limitado en fosfato, no se evidencia un

Capítulo 5

crecimiento celular significativo y si un consumo $3.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa. Esto se refleja en el bajo rendimiento celular. Como se mencionó uno de las relaciones a establecer es la cantidad de glucosa por cantidad de fosfato de manera de poder predecir la cantidad de FCE a formular en el medio, evitando colocar cantidades que limiten el crecimiento, para lograr alcanzar la inducción del promotor. Por lo evidenciado, en el momento, o llegado el caso que comienza a limitarse en fosfato, también se incrementa la tasa de consumo de glucosa reflejado en un incremento de $r\text{CO}_2$ (Fig. 49). Resultados similares fueron obtenidos por Marzan [33].

Similarmente a lo evaluado en la cepa WT, del análisis de la estequiometría del proceso se estimó un valor en promedio de γ_p en promedio de 3.5 ± 0.45 valores esperados para ácidos orgánicos como ser láctico y acético por ende los $y^{p/s}$ estimados varían 0.560 entre ± 0.10 . La producción de acetato en forma aeróbica generalmente ocurre cuando la captura de glucosa es mayor que la velocidad de su conversión en biomasa y CO_2 .

En este caso por lo que vemos esto está relacionado también con la cantidad de fosfato inicial. La siguiente (Fig. 50) muestra la relación de ello a lo largo de la evolución del cultivo para $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de gluc. 1.6 mM PO_4^{3-} .

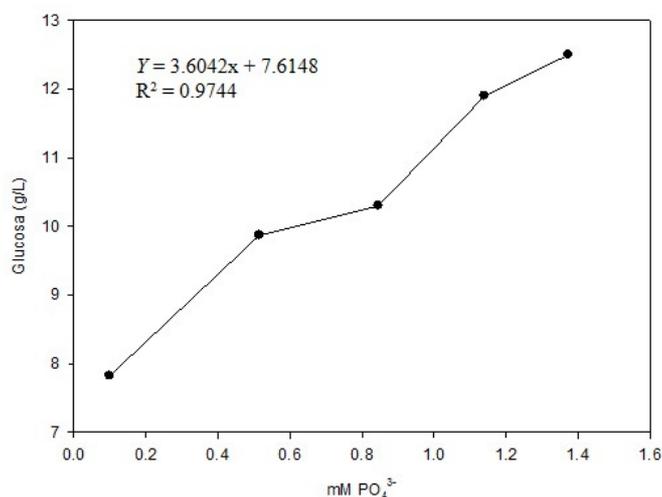


Figura 50 Relación de consumo de glucosa respecto de la concentración de fosfato inorgánico.

Los resultados están entre los valores obtenidos en erlenmeyers agitados (Tabla.17) para concentraciones entre $1.2 - 2.0 \text{ mM}$ de fosfato inorgánico.

Capítulo 5

El aumento de la velocidad de consumo de glucosa puede ser debido a la demanda de ATP causada por la limitación de fosfato, consecuentemente la baja concentración celular también puede ser causada por una menor producción de ATP a medida que el sistema se encuentra con menor concentración de fosfato inorgánico.

Riesenberg y col. [25] demostraron un control adicional del regulón PHO que es P_i independiente y no requiere de las vías convencionales (Sección 1.5.2). Este control es regulado mediante dos pasos de la ruta principal del metabolismo del carbono en el que la acetil coenzima A, P_i , y ADP se convierten en acetato, coenzima A, y ATP a través de las enzimas fosfotransacetilasa (PTA) y acetato quinasa (ACKA). La regulación responde a la síntesis de acetil fosfato, un intermediario que conduce a la incorporación de P_i en ATP, que es el donante de fosforilo principal en el metabolismo.

Debido a que como se mencionó estas variables están íntimamente relacionadas, es interesante vincular ambas velocidades de consumo de glucosa y fosfato a lo largo de la evolución de los dos cultivos evaluados como, de hecho es frecuente que las velocidades específicas varíen durante el cultivo. Por tanto dichos parámetros puede verse en la (Tabla. 22) para las dos condiciones evaluadas de crecimiento (Tabla.21).

Utilizando un modelo de crecimiento simple con las variables de consumo de glucosa y fosfato obtenemos, $q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}}$ además $\mu = q_s \cdot Y_{X/S}$ y $Y^{X/S}$ es una constante, o también $q_s = (dS / dt) / X$.

Las cepas se cultivaron durante el proceso a 37 ° C, a pH 7.0 con una velocidad de agitación de 350 r.p.m para garantizar una concentración de oxígeno disuelto del 35-40% saturación para mantener la condición aeróbica de crecimiento.

BL21 (DE3) / PBKI-IV (1) MR		
Parámetros de Crecimiento	Glucosa inicial (g·L ⁻¹)	PO ₄ ⁻³ inicial (mmoles.l ⁻¹)
		12.5
r_s (C-mol _{Gluc} /L.h) ^(*)	0.0193 R ² = 0.94	
r_s (mM PO ₄ ⁻³ /L.h) ^(*)	0.1711 R ² = 0.93	
	Glucosa inicial (g·L ⁻¹)	PO ₄ ⁻³ inicial (mmoles.l ⁻¹)
	30.0	5.0

Capítulo 5

r_s (C-mol _{Gluc} /L.h) ^(*)	0.0433 $R^2= 0.86$
r_s (mM PO ₄ ⁻³ /L.h) ^(*)	0.2634 $R^2= 0.92$

Tabla. 22 Velocidades de consumo de glucosa y fosfato inorgánico en las dos condiciones evaluadas. (*) Valores registrados entre las 6 - 8 hr. de cultivo.

Más abajo se observan los resultados obtenidos para la siguiente condición: 30 g·L⁻¹ de glucosa; 6 g·L⁻¹ de FN; 5 mM de fosfato inorgánico. MOPS a 1:5 de la proporción original y ácido cítrico 0.1 g·L⁻¹.

La siguiente figura 51 muestra los resultados obtenidos durante la experiencia concentración de biomasa, glucosa y fosfato en el tiempo.

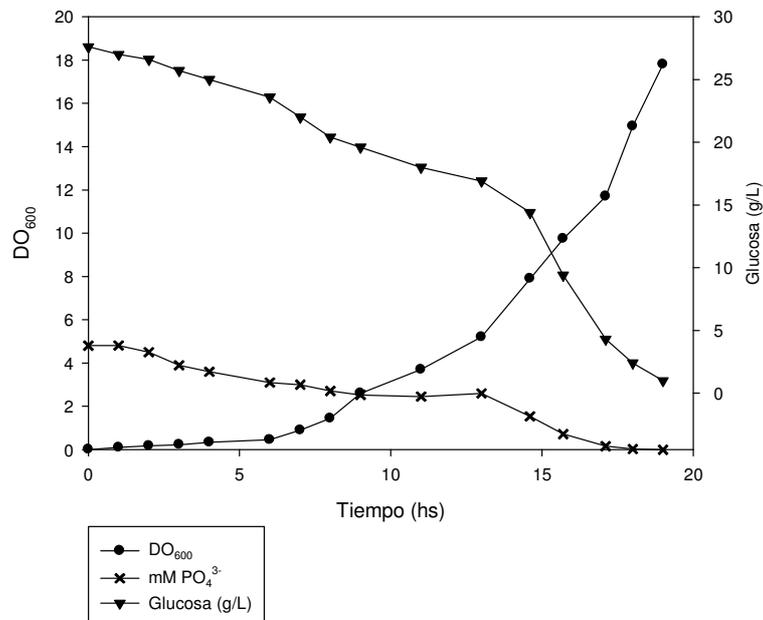


Figura 51 Evolución del cultivo de BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) (30 g·L⁻¹ de gluc. 5.0 mM PO₄⁻³).

Capítulo 5

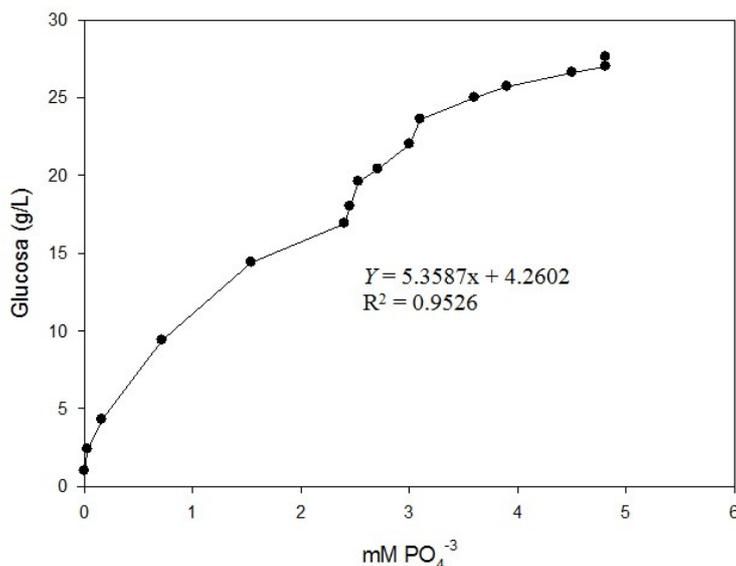


Figura 52 Relación de consumo de glucosa respecto de la concentración de fosfato inorgánico.

De la figura 51 puede observarse que cuando el sistema no se encuentra limitado en fosfato, la razón entre la biomasa y el fosfato consumido arroja un valor de 1.53 ($R^2 = 0.86$) con lo cual muestra que el sistema es más ineficiente que cuando se encuentra limitado. En cambio cuando el cultivo fue formulado con $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa y 1.6 mM de fosfato dicha razón fue de 1.0 ($R^2 = 0.95$), sin embargo entre las 13 y las 16 hr. de cultivo el valor fue el mismo que para el cultivo formulado con $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa y 5.0 mM de fosfato, evidenciando una serie de adaptaciones por parte de los microorganismos. No se observan diferencias significativas en cuanto los valores de la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento celular (Tabla.21).

En la figura 52 se observa una alta relación entre la glucosa consumida y el fosfato. En este sistema no estuvo limitado en fosfato en ningún momento salvo al finalizar el cultivo. Por tanto como se mencionó anteriormente, el sistema es más ineficiente y consume más glucosa por cada mol de fosfato.

Capítulo 5

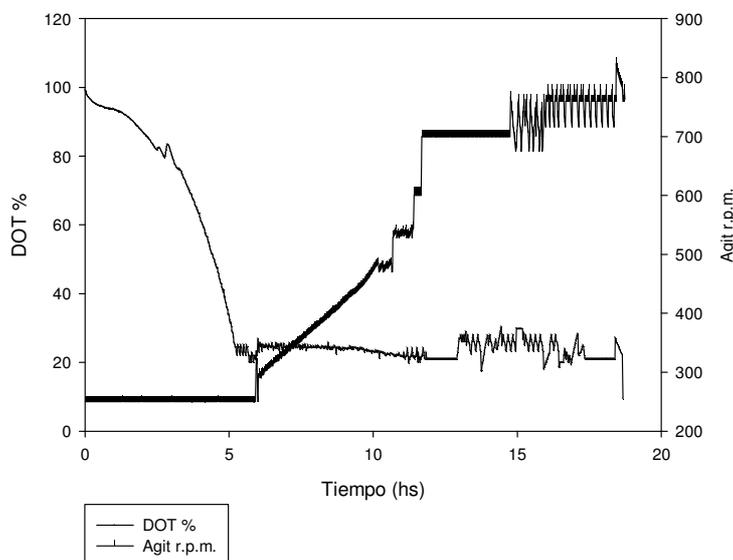


Figura 53 Relación de oxígeno disuelto mediante cascada de agitación BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de gluc. 5.0 mM PO_4^{3-}).

Para evitar la limitación de oxígeno, el nivel de oxígeno disuelto se estabilizó a una saturación superior al 30% utilizando la velocidad de agitación. Se eliminó la formación de espuma mediante la adición de 0.5 ml de antiespumante (PPG 2000, Sigma Aldrich) por litro de medio.

5.2.1.6.3 Segregación celular y estabilidad del plásmido durante el cultivo.

La estabilidad de plásmidos en células bacterianas ha sido motivo de estudio como un aspecto fundamental de la biología y como base necesaria para la explotación de las técnicas actuales de biología molecular. Los resultados publicados hasta la fecha indican que la persistencia de un plásmido puede verse afectada por una gran cantidad de factores, incluidas las condiciones de cultivo y las características propias tanto del plásmido como del huésped.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue investigar la estabilidad de plásmidos durante la fermentación. Los cultivos por lote anteceden al próximo paso que será evaluar los parámetros de crecimiento de las cepas de *E. coli* recombinantes obtenidas en medios mínimos mediante CC, y justamente los mismos proporcionan un ambiente constante para

Capítulo 5

investigar la pérdida de plásmidos, por ello antes evaluamos la presencia de los mismos mediante extracción plasmídica durante los estadios de los cultivos en batch como una aproximación al próximo estudio a realizar.

Se almacenaron 5 ml de muestra de cada punto de sus respectivas cinéticas de crecimiento para evaluación de plásmido. Se realizaron diluciones de la biomasa ajustando la DO_{600} de manera de tener 5 ml de una DO de 2. Se almaceno 1 ml de cultivo tal cual para evaluación de presencia de angiostatina. Se procedió a realizar la extracción de DNA plasmídico (Sección 3.3.4). Se resuspendió en un volumen de 40 μ l con agua purificada libre de nucleasas. Se efectuó una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE con la totalidad del producto.

Sólo se evaluó la condición de 12 $g \cdot L^{-1}$ de glucosa y 1.6 mM de fosfato dado a que llego a limitarse en fosfato durante casi tres horas.

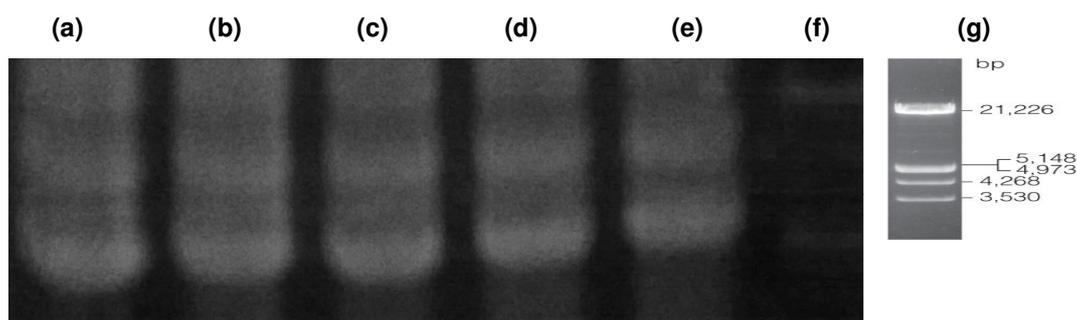


Figura 54 Preparación de plásmidos de muestras del cultivo 12 g/L de glucosa y 1.6 mM de fosfato. Sin inducción (a) 3.0 h y (b) 5.0 h. Con inducción (c) 7.0 h. (d) 8.0 h. (e) 10.0 h. (f) Marcador de peso molecular. λ Lambda digerido con *EcoR* I / *Hind* III. (g) Referencia.

Se observa una buena proporción de plásmido. La cantidad de biomasa es en todas las calles provenientes de una concentración de 1.0 $g \cdot L^{-1}$. La intención de esta evaluación es observar si existe un incremento en el número de copias de plásmido debido al estrés producido por la inducción debido a la expresión (Sección 1.5.3). Probablemente el tiempo que estuvo el cultivo sin fosfato fue poco como para ver el efecto si es que existe para esta situación. No se produjo una amplificación significativa después de la inducción, solo una ligera disminución en la cantidad de plásmido. Esa cierta atenuación en la señal para una misma cantidad de muestra podría evidenciar indicios de inestabilidad.

Capítulo 5

Como se mencionó anteriormente, en ambos cultivos, la presencia de angiostatina fue negativa. No se evaluó la presencia de ácidos orgánicos. Con estos resultados se comenzó una serie de ensayos tendientes a estudiar el impacto metabólico de crecer a una velocidad de crecimiento determinada y para ello se realizaron cultivos continuos.

5.2.3 Sistema de Cultivo Continuo

5.2.3.1 Cultivo Continuo de BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) limitado en FCE

El objetivo en esta etapa fue estudiar la cepa BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) en un sistema de cultivo continuo, inicialmente limitado en FCE.

El cultivo continuo proporciona un ambiente con condiciones constantes, ideal para el estudio de parámetros fisiológicos, entre ellos la herencia de plásmidos. Particularmente esta característica, ha sido ampliamente estudiada con varios plásmidos de *E. coli* [7] [11-12].

Como se mencionó, la denominada "carga metabólica" (Sección. 1.5.3) también puede causar efectos perjudiciales sobre la estabilidad y calidad del plásmido, ya que la maquinaria celular podría en algún momento ya no ser capaz de mantener un metabolismo activo. Generalmente el número promedio de copias de un plásmido, rara vez puede determinarse mediante métodos corrientes y por tanto la estabilidad rara vez se conoce con precisión, por tanto es un factor crucial caracterizar nuestro sistema en este aspecto y las respuestas al estrés provocadas por el propio mantenimiento del plásmido que también puede causar un aumento de su inestabilidad. La inestabilidad del plásmido generalmente se origina a partir de una inestabilidad estructural causada por propios cambios en el plásmido en sí, tales como mutación puntual, una delección, inserción o re ordenamiento en el ADN del plásmido; o simplemente una inestabilidad o segregación causada por una división defectuosa entre los plásmidos y las células durante la división celular (Kumar y col.) [38], el número de copias del plásmido, sus patrones de replicación, el tipo de sustrato, la composición del medio, antecedentes del huésped y las condiciones de cultivo (Summers) [19].

Capítulo 5

Tomando la información recabada de los sistemas de cultivo en batch, se evaluaron diferentes velocidades de dilución D (h^{-1}) por debajo del valor de $\mu_{m\acute{a}x}$.

En un CC, luego de aproximadamente $4t_R$ es alcanzado el estado estacionario (EE), momento a partir del cual, las variables de proceso se mantienen constantes. En esta condición, se verifica que $\mu = D$; donde D es una variable operacional fijada a través del caudal F por el operador (Sección 3.2.2.4) de esta manera se fuerza a que los microorganismos crezcan con una velocidad de crecimiento determinada. Como complemento del experimento de cultivo continuo, y aprovechando las condiciones controladas del entorno, pH y μ . De esta manera, se intentara determinar si hay diferencias en el patrón de expresión a diferentes μ antes de la inducción del sistema de expresión debido a la depleción de fosfato en el medio de cultivo (Sección. 2.2). De esta manera para la cepa recombinante se podría estimar un rango de velocidad específica de crecimiento “óptima” en la cual se detecte la aparición de producto, y será una información de vital importancia para el momento de diseñar el sistema de BA. Para el estudio, se tomara un volumen de cultivo en forma aséptica y se trasvasara a un erlenmeyer en el cual se le adicionara glucosa y eventualmente MOPS y una fuente de aminoácidos compleja para favorecer la producción de producto. Se espera contar con que la concentración de fosfato alcanzado el EE se encuentre cercana a 1.0 mM y de esta manera se induzca el sistema con el fosfato remanente en la etapa batch. La velocidad específica de crecimiento se extrajo de la pendiente de la parte lineal de las gráficas de LN (DO_{600}) versus tiempo y nos dio un valor de $\mu_{m\acute{a}x} 0.42 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$.

En base a este valor, se ensayaron velocidades de dilución en el rango desde 0.05 a 0.30 h^{-1} con el fin de obtener información sobre el crecimiento de la cepa portadora del gen de la angiostatina y de la cepa salvaje. La información obtenida permitirá realizar un análisis estequiométrico del proceso y, posteriormente, determinar parámetros de crecimiento como el rendimiento verdadero y el coeficiente de mantenimiento celular, en cada caso, a fin de detectar diferencias, si las hubiera.

Metodología empleada:

Capítulo 5

- Se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo basados en las experiencias en cultivo batch: concentración de glucosa en el reservorio $S_R = 12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. (Idéntica concentración utilizada en el cultivo batch); concentración de fosfato en el reservorio $F_R = 6.0 \text{ mM}$ ⁶, concentración de N-NH₃ $2.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como (NH₄)₂SO₄ para $12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa⁷.
- Para la elaboración del cultivo en batch previo al CC, se partió de un cultivo líquido (100 ml) en medio LB con ampicilina. El inoculo provenía de un clon en glicerol stock de pBKI-IV (1). Dicho inoculo fue chequeado mediante extracción de ADN plásmidico para constatar la presencia de plásmido previo al cultivo en batch⁸.

La cinética de crecimiento microbiano describe la relación entre μ y la concentración de uno o más sustratos limitantes del crecimiento. Desde tiempo atrás, se ha propuesto que μ aumenta con el sustrato en una dependencia de tipo "saturación" hasta que los microorganismos alcancen su velocidad de crecimiento específica máxima. El modelo de Jacques Monod es hasta hoy la relación empírica más utilizada para describir la cinética de crecimiento microbiano (Monod) [39]. El éxito del modelo Monod se debe en parte a su simplicidad, y la similitud con la bien establecida cinética de Michaelis-Menten, y la interpretación biológicamente significativa de las constantes del modelo $\mu_{m\acute{a}x}$ y K_s , junto con su accesibilidad experimental. Posteriormente, como una extensión del modelo Monod, se desarrolló el concepto de mantenimiento microbiano el cual puede cuantificarse y describirse mediante un coeficiente de mantenimiento propuesto por Pirt [40].

A bajas velocidades de crecimiento, el m_s podría tener un papel importante afectando la viabilidad de los microorganismos [41-42] y seguramente más aún en un microorganismo recombinante que gobierna la expresión mediante un promotor nutricional como lo es el promotor de la fosfatasa alcalina. Por lo tanto, probamos si el modelo es capaz de predecir el resultado de los comportamientos de los experimentos que se detallaran a continuación utilizando los mismos valores para los parámetros cinéticos K_s y $\mu_{m\acute{a}x}$ como en el caso de la simulación mostrada en la (Fig. 55).

⁶ La concentración de fosfato en el reservorio BTH(1) fue de 6.0 mM PO_4^{-3} , luego dado que quedaba en EE cerca de 3.0 mM se disminuyó en BTH (2) a 4.5 mM PO_4^{-3} . Luego comenzaron unos fenómenos de lisis celular, por este motivo se incrementó a 6.0 mM PO_4^{-3} .

⁷ A partir de las primeras experiencias (Sección 5.3.1.1.2) se incrementa él (NH₄)₂SO₄ a $6 \text{ gr}\cdot\text{L}^{-1}$.

⁸ El cultivo en batch se elabora de acuerdo a las experiencias anteriores.

Capítulo 5

Al inicio de este trabajo se plantearon algunos objetivos, entre los cuales la evaluación de parámetros fisiológicos como el mantenimiento y el rendimiento verdadero eran interesantes ya que nos permitía comparar si había un gasto energético extra debido a la expresión de los genes foráneos (Sección. 2.2).

La forma de evaluar el coeficiente de mantenimiento consiste en la extrapolación de la ecuación de Pirt:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}^{\max}} + \frac{q_{pi}}{Y_{p/s}^{\max}} + m_s$$

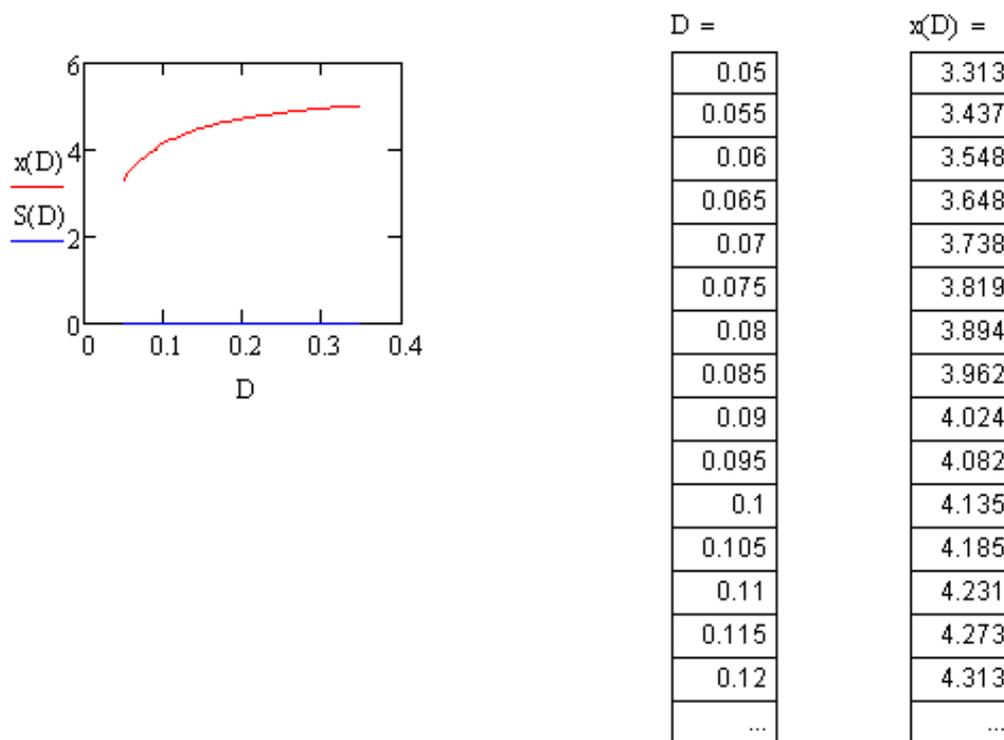


Figura 55 Esquema de simulación del crecimiento de *E. coli* en cultivo continuo.

La figura 55 muestra un esquema de un modelo teórico de crecimiento considerando un μ_{\max} de 0.42, un m_s de 0.06 g.gr.h⁻¹; $y^{x/s}$ 0.55 g.gr⁻¹ y un $S_0 = 10$ gr.L⁻¹. La simulación se basó en la recopilación de trabajos anteriores sobre el crecimiento de *E. coli* en cultivo de quimios tato limitado en glucosa a 37 °C (J. A. Roels) [28].

Capítulo 5

Para los cálculos matemáticos y la modelización, se utilizó el programa MATLAB R2012b (the MathWorks).

En la etapa inicial de la experiencia se tomaran una serie de puntos de los diferentes estados estacionarios de manera de extrapolar el valor del coeficiente m_s mediante la gráfica de Pirt. Que podemos reordenarla de manera que nos quede:

$$D \frac{(S_1 - \bar{S})}{\bar{X}} = \frac{D}{Y_{x/s}} + m_s$$

No obstante al no cerrar los balances de materia y grado de reducción es muy probable que en los cálculos debiera ser incluida la siguiente modificación en forma general:

$$r_s = \frac{r_x}{Y'_{x/s}} + \frac{r_p}{Y'_{p/s}} + m_s \bar{X}$$

5.2.3.2 Resultados

D F/V (h ⁻¹)	0.056	0.110	0.173	0.222	0.272	0.282
\bar{S}_p (mM)	4.0	3.4	3.2	3.0	2.9	2.9
Biomasa (gr.L ⁻¹)	3.27	3.81	3.87	3.87	3.86	4.02
Biomasa c-mol/L	0.127	0.148	0.150	0.150	0.150	0.156
r_{o_2} (mmol/Lh)	0.0116	0.0207	0.0400	0.0384	0.0390	0.0500
r_{CO_2} (mmol/Lh)	0.0113	0.0196	0.0350	0.0364	0.0380	0.0450
CR	0.97	0.94	0.88	0.95	0.97	0.90
BC	0.830	0.820	0.740	0.760	0.700	0.810
B γ	0.860	0.870	0.820	0.800	0.736	0.884
r_s (c-mol/Lh)	0.022	0.044	0.082	0.091	0.112	0.109
$Y_{x/s}$ (c-molx/c-mols)	0.320	0.370	0.320	0.360	0.360	0.400
q_s	0.185	0.343	0.484	0.579	0.718	0.730
q_{o_2} (mol/Lh c-molx)	0.0915	0.1402	0.2667	0.2560	0.2607	0.3209
q_{CO_2} (mol/Lhc-molx)	0.0892	0.1327	0.2333	0.2427	0.2540	0.2888
BN	0.56	0.63	0.63	0.64	0.65	0.69

Tabla. 23 Resultados obtenidos de los respectivos EE.

Capítulo 5

Al comparar la figura 55 con los dos primeros puntos de la tabla 23 podemos observar que incluso a bajas velocidades de dilución el modelo se ajusta razonablemente bien. Seguramente la formación de algún producto permite que los balances no cierren. Los valores hallados estimados en el grado de reducción de los productos^{9;10}, son similares a los de ácidos orgánicos, acético, láctico, málico, fumárico y glucónico [43].

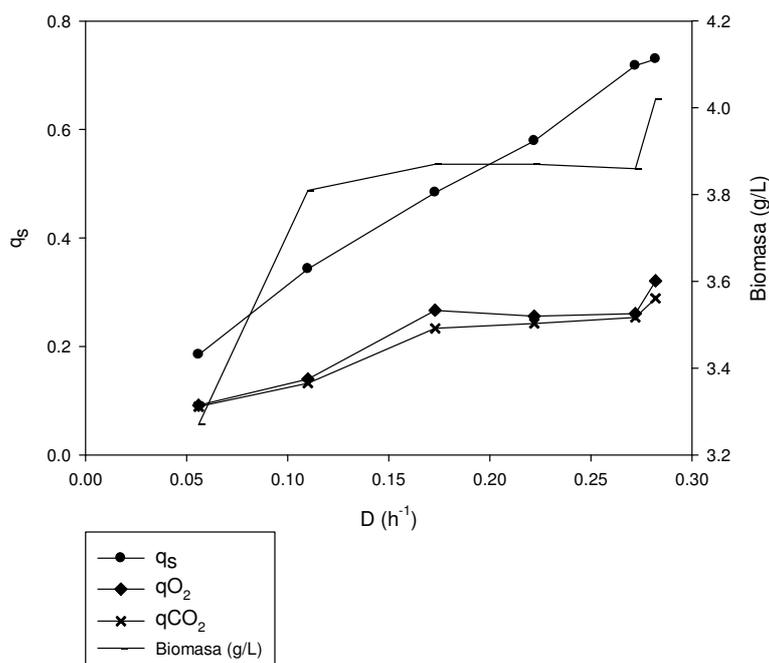


Figura 56 Parámetros cinéticos de los cultivos continuos de BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) limitado en FCE.

Considerando como referencia ciertos valores teóricos para *E. coli* [28] pueden establecerse estimaciones probables desde una serie de puntos de los diferentes estadios de crecimiento de manera de extrapolar el valor del coeficiente de mantenimiento celular mediante la gráfica de Pirt [40].

Cabe mencionar que es muy llamativo el leve incremento de biomasa con los incrementos de D. Por lo tanto, parecería ser que el consumo de ingreso de FCE en *E. coli* apenas puede

⁹ Calculado como $\gamma_p = (y^{p/s})^{-1} \cdot (\gamma_s - \gamma_x y^{x/s} - 4b)$

¹⁰ $b = r_{O_2} / r_s$

Capítulo 5

acceder a suficiente FCE para satisfacer sus necesidades energéticas de mantenimiento sin estar limitado en fosfato.

Nuevamente considerando el valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ de 0.42 para la cepa recombinante y asumiendo los valores de bibliografía para m_s , $y^{x.v}$ de 0.06 g.g.h⁻¹ y 0.55 g/g respectivamente, y una concentración de FCE de 10 gr.L⁻¹, fue utilizado como modelo teórico.

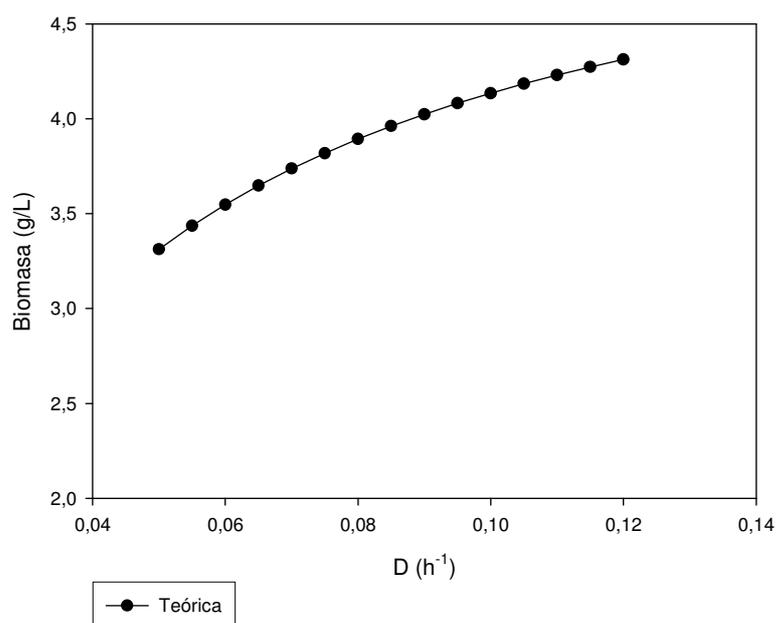


Figura 57 Gráfica del modelo teórico definido con los parámetros de diseño propuestos.

Para los cultivos continuos recombinante limitados en FCE, pudieron obtenerse los siguientes resultados:

D (h ⁻¹)	X (C-mol.L ⁻¹)	Sr (g.L ⁻¹)	SEE (g.L ⁻¹)	q _s (C-mol/C-mol x/h)
0.056	0.121	12.010	0.025	0.185
0.110	0.147	13.788	0.023	0.343
0.173	0.152	12.793	0.019	0.484
0.222	0.152	12.000	0.014	0.579
0.282	0.156	12.000	0.017	0.730

Tabla. 24 Resumen de los resultados obtenidos.

Capítulo 5

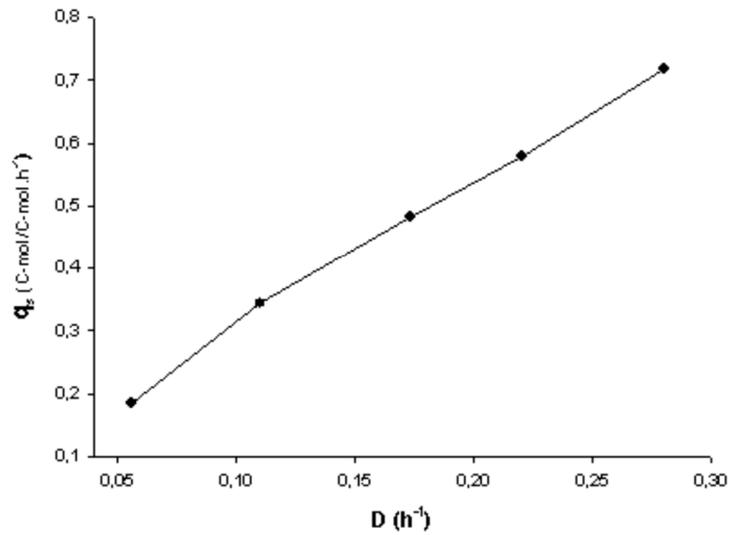


Figura 58 Gráfica con los parámetros experimentales. El ajuste de la misma arroja la siguiente ecuación $Y = 2.3353X + 0.0698$ $R^2 = 0.996$.

De la gráfica se obtienen los valores para $Y^{x/s}$ y m_s siendo los mismos $0.428 \text{ C-mol/C-mol}$ y $0.069 \text{ C-mol/C-mol X. h}^{-1}$. El valor obtenido para el mantenimiento es similar al valor teórico supuesto en el modelo.

D (h ⁻¹)	r_{O_2}/r_s (moles $O_2 \cdot L^{-1}$ /c-mol gluc)	$y^{p/s}$ (c-mol/c-mol) valor teórico	γ_P
0.056	0.121	0.1670	3.6
0.110	0.147	0.1900	3.0
0.173	0.152	0.2040	3.0
0.222	0.152	0.2200	3.2
0.280	0.156	0.2100	3.6

Tabla. 25 Valores estimados del grado de reducción de los productos.

Los valores estimados del grado de reducción del producto, son similares a los de ácidos orgánicos acético, láctico, fórmico, succínico, todos posibles metabolitos de la cepa huésped.

Capítulo 5

La evaluación de etanol dio resultados negativos para varias muestras del cultivo limitado en carbono, por lo que la búsqueda fue orientada hacia los ácidos orgánicos mencionados.

No se pudo llegar a cerrar los BC y se evidenció la presencia de picos no identificados en el análisis por HPLC de los productos del metabolismo.

Cultivo y Condición	$Y_{máx}^{X/S}$ (C-mol/C-mol)	$Y_{máx}^{P/S}$ (C-mol/C-mol)	m_s (C-mol/C-mol)
BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) limitado en FCE	0.53	0.63	0.03

Tabla. 26 Resultados finales obtenidos.

Los valores obtenidos de $Y_{p/s}^{max}$ son razonables y las variaciones en este número para los distintos CC pueden deberse a las distintas proporciones de los productos formados no identificados como ya se explicó. El valor de mantenimiento se asemeja a los valores de bibliografía 0.045 c-mol / (c-mol. h) [28]

Junto al metabolismo del carbono, el metabolismo de la fuente de nitrógeno es también importante en la comprensión de la regulación metabólica. En *E. coli*, la asimilación de N como amoníaco / amonio (NH_4^+) se realiza utilizando la α -KG (alfa-cetoglutarato) en la síntesis de glutamato y glutamina. Estos dos aminoácidos son los precursores de la síntesis de prolina uno de los aminoácidos más preponderantes de la angiostatina.

La hipótesis propuesta (Sección. 2.2) supone que la velocidad a la que crece el microorganismo en cultivo continuo en condiciones de ausencia de inducción puede afectar de alguna forma la capacidad de las bacterias para expresar angiostatina cuando son transferidas a un medio de inducción (limitado en fosfato).

Para los diferentes valores de dilución se tomaron muestras en EE, se transfirieron asepticamente y se cultivaron de manera batch en erlermeyers agitados de manera habitual recomponiendo en cada caso los nutrientes necesarios, se completó con FCE necesaria para consumir el fosfato inorgánico proveniente de la condición de EE (glucosa 5 gr.L⁻¹ y MOPS 9 gr.L⁻¹, llevado a pH 7.5), al final del cultivo se agotó totalmente el fosfato y la FCE, logrando mantener el pH en 7.

Capítulo 5

D (h ⁻¹)	pH final	DO ₆₂₅ inicial	DO ₆₀₀ final	PO ₄ ⁻³ mM inicial	PO ₄ ⁻³ mM final	Glucosa (gr.L ⁻¹) inicial	Glucosa (gr.L ⁻¹) final
0.056	7.01	0.90	2.4	0.5	0	5.0	ND
0.110	6.82	1.15	2.3	0.5	0	5.0	0.011
0.173	6.44	1.20	2.4	0.5	0	5.0	0.011
0.222	7.03	1.19	2.3	0.5	0.13	5.0	0.010
0.280	7.00	1.23	2.4	0.5	0	5.0	0.010

Tabla. 27 Resultados finales obtenidos.

Se analizaron tanto las muestras provenientes de los ensayos de expresión y como así también muestras tomadas a la salida del biorreactor para cada D, de manera de comparar la expresión de angiostatina en cada caso. Como control positivo se utiliza al pellet (P) del cultivo de bacterias (ver Fig. 42) que expresa angiostatina (A₄). La expresión de angiostatina resultó ser muy débil y no difirió entre los cultivos obtenidos directamente del continuo y los obtenidos de los ensayos de inducción en erlenmeyer para el cultivo continuo limitado en carbono. Esto llevó a pensar que, de haberse perdido el plásmido durante el cultivo continuo, la baja señal observada debiera ser por la baja cantidad de plásmido presente también en los ensayos de inducción en erlenmeyer. Por otra parte podría ser que la situación de inducción ya se hiciera presente en el continuo limitado en fuente de carbono, donde la concentración de fosfato es de alrededor de 2.0 mM, es decir que a esa concentración de fosfato ya se induzca el promotor debido a las condiciones de crecimiento, ya que la señal de angiostatina, aunque muy débil, está presente en estas muestras.

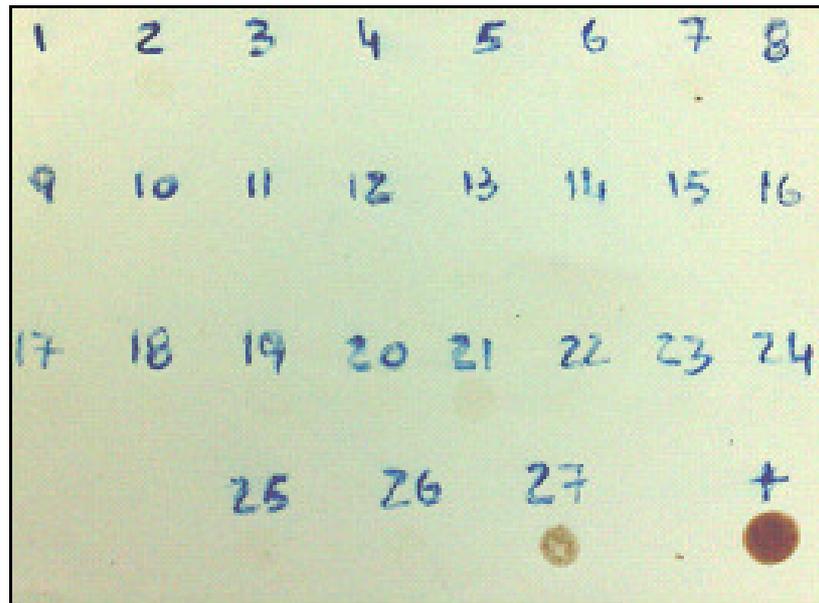
Capítulo 5

Figura. 59 Evaluación de DB de los ensayos de expresión en batch.

Referencias: Se tomaron muestras a la salida del biorreactor y al final del cultivo en batch de inducción. Muestras en batch desde la 1 a la 16, tomadas a las 24 hs del cultivo de inducción. Muestras en batch desde la 17 a la 25, tomadas a las 48 hs del cultivo en inducción. **(1, 17)** $D = 0.056 \text{ h}^{-1}$ salida del biorreactor en EE; **(2,18)** $D = 0.056 \text{ h}^{-1}$ batch; **(3, 19)** $D = 0.11 \text{ h}^{-1}$ salida del biorreactor en EE **(4, 20)** $D = 0.11 \text{ h}^{-1}$ batch; **(5, 21)** $D = 0.17 \text{ h}^{-1}$ salida del biorreactor en EE; **(6, 22)** $D = 0.17 \text{ h}^{-1}$ batch; **(7, 23)** $D = 0.22 \text{ h}^{-1}$ salida del biorreactor en EE; **(8, 24)** $D = 0.22 \text{ h}^{-1}$ batch; **(9, 25)** $D = 0.28 \text{ h}^{-1}$ batch; **(26)** $D = 0.063 \text{ h}^{-1}$ **(27)** Control Positivo; **(+)** Control del anti-ratón.

Debido a estos resultados se volvió a reevaluar la hipótesis de inestabilidad del plásmido pBK1-4 en la D evaluada.

Capítulo 5

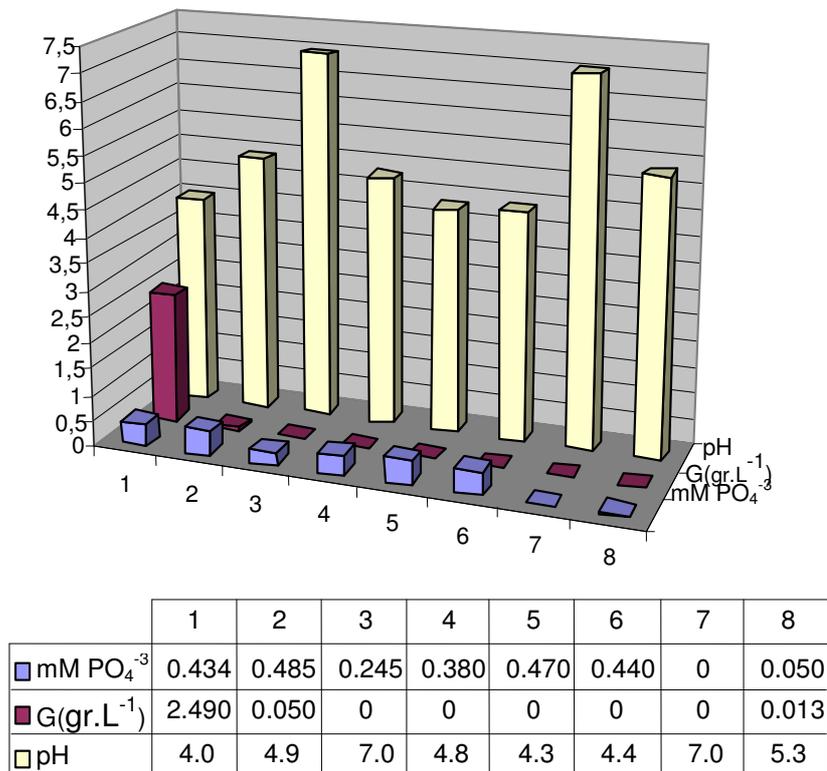


Figura 60 Resultados finales de los cultivos en batch de inducción.

Los resultados publicados hasta la fecha (Sección.1.5.2) indican que la persistencia de un plásmido puede verse afectada por un número de factores, incluidos las condiciones de cultivo y las propiedades tanto del plásmido como del hospedador.

En este estadio del estudio se tiene como objetivo investigar la influencia de la segregación del plásmido pBK1-4(1) en cultivo continuo limitado en glucosa. El análisis anterior sugiere que la principal fuente de error en la medición de pérdida de plásmidos proviene de la acumulación exponencial de células libres de plásmidos después de los eventos iniciales, incluso en la etapa temprana en modo batch. Este proceso inicial implica al menos un crecimiento del inóculo durante unas 10 hr.

Capítulo 5

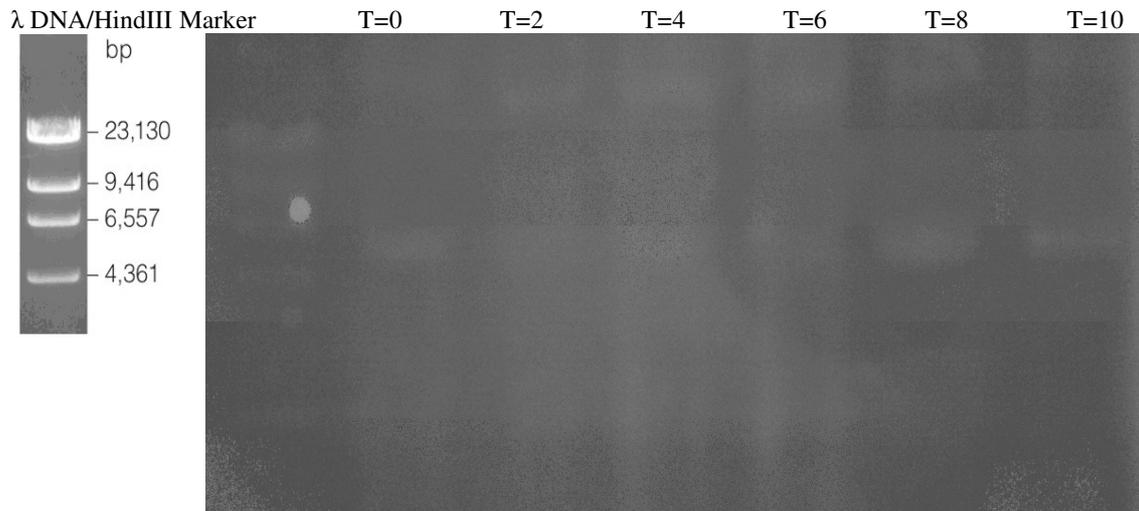


Figura 61 Evaluación de pérdida del vector pBK1-4 en etapa batch previo a CC.

Un análisis similar al efectuado con los estudios en batch previos (ver Fig.54) fue realizado para despejar esta cuestión. La evaluación realizada sobre al menos 10 hr. de cultivo de fase batch no muestra una disminución en la señal del plásmido. Los resultados obtenidos hasta aquí apoyarían el hallazgo de que la inestabilidad del vector pBK1-4(1) se vería forzada debido a su crecimiento en modo de CC con un umbral de fosfato cercano a los 2 mM en EE, además como se mencionó esto estaría influenciado en este caso no por el tamaño del vector sino tal vez por el número de copias (ver Fig.11).

Análogamente se llevó a cabo el análisis de las muestras en sus estadios de EE a diferentes D arrojando los siguientes resultados. (Fig.62).

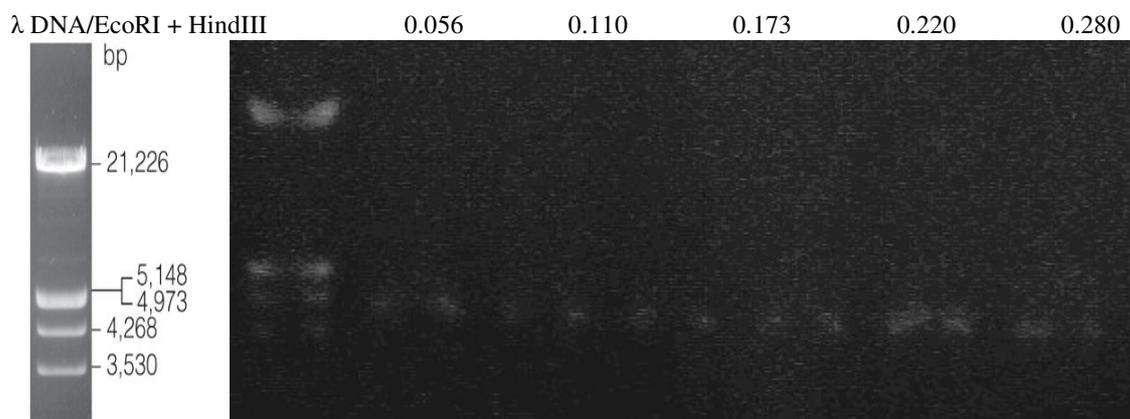


Figura 62 Visualización de ADN plasmídico en lisados celulares de los diferentes EE evaluados.

Capítulo 5

En el ensayo de cultivo batch después de la inducción con D de preinducción como parámetro, esperábamos que el número de copias de plásmido hubiese sido afectado por variación de la D en nuestro sistema, sin embargo no es así al menos bajo limitación de FCE, claramente esta situación podría ser muy diferente en el caso de que la limitación sea por fosfato inorgánico, como se analizara a continuación.

5.2.3.3 Cultivo Continuo de BL21 (DE3)/ pBKI-IV (1) limitado en fosfato

Durante el CC limitado en fosfato las muestras se tomaron directamente desde el biorreactor, ya que bajo la condición de inducción estuvo presente en el mismo CC. Se tomaron muestras y se evaluó la presencia de angiostatina mediante DB. En este caso el tiempo de inducción dependió del tiempo de residencia de la célula en el biorreactor, el cual posee una distribución y puede estimarse mediante la expresión $1/D = t_r$. Para un cultivo a $D= 0.3$ el t_r daría aproximadamente 3.3 hr. y para una $D= 0.05$ unas 20 hr. La operatoria fue análoga al CC anterior con los ajustes en la cantidad de FCE (glucosa) inicial para agotar el fosfato, cuya dependencia vario demasiado tal lo observado en las etapas de cultivos batch tanto en erlrmeyer como en biorreactor. Como se mencionara anteriormente, la relación de FCE/PO_4^{-3} es uno de los puntos más críticos de ajustes (Sección. 5.2.5.1.1).

5.2.3.3.1 Resultados

De manera similar a las experiencias anteriores la siguiente (Tabla. 28) muestra los resultados obtenidos.

D F/V (h ⁻¹)	0.066	0.067	0.074	0.135	0.169	0.223	0.294
Biomasa (gr.L ⁻¹)	3.29	2.85	3.37	4.52	4.36	4.27	4.30
Biomasa (c-mol/L)	0.130	0.110	0.131	0.175	0.168	0.165	0.166
ro ₂ (mmol/Lh)	0.0263	0.0275	0.0300	0.0570	0.0627	0.0616	0.0581
rCO ₂ (mmol/Lh)	0.0205	0.0233	0.0247	0.0490	0.0587	0.0553	0.0561
CR	0.78	0.85	0.82	0.86	0.94	0.90	0.97
BC (sin producto)	0.351	0.445	0.422	0.513	0.627	0.641	0.670
B _γ (sin producto)	0.426	0.511	0.493	0.578	0.666	0.698	0.699
r _s (c-mol/Lh)	0.083	0.069	0.081	0.142	0.139	0.144	0.157

Capítulo 5

$Y_{x/s}$ (c-molx/c-mols)	0.102	0.107	0.118	0.167	0.206	0.257	0.313
q_s (c-mol/Lh)	0.647	0.624	0.623	0.808	0.823	0.869	0.942
q_{O_2} (mol/Lh c-molx)	0.206	0.249	0.230	0.325	0.371	0.372	0.349
S_p (mM)	0.47	0.39	0.45	0.207	0.211	0.219	0.209
r_n (mol N/Lh)	0.0026	0.0026	0.0034	0.0095	0.0089	0.0138	0.0174
q_{CO_2} (mol/Lhc-molx)	0.161	0.211	0.189	0.280	0.347	0.334	0.337
Láctico (gr.L ⁻¹)	ND	ND	2.755	0.290	ND	1.926	1.570
Láctico (c-mol/L)	ND	ND	0.092	0.001	ND	0.064	0.052
Ácético (gr.L ⁻¹)	ND	ND	4.650	1.750	ND	2.135	1.680
Ácético (c-mol/L)	ND	ND	0.155	0.060	ND	0.072	0.056
BC (con producto)	ND	ND	0.640	0.580	ND	0.850	0.870
B γ (con producto)	ND	ND	0.720	0.640	ND	0.910	0.900

Tabla. 28 Resultados obtenidos de los respectivos EE.

Se investigó el efecto de la concentración de fosfato en EE sobre el metabolismo de *E. coli* en términos de los parámetros cinéticos de los cultivos. Para los CC aeróbicos a un $\mu > 0.1 \text{ h}^{-1}$ la producción de acetato aumento significativamente, sin embargo no se ve reflejado en una mayor velocidad específica de consumo de glucosa, lo que podría deberse a que la demanda de ATP bajo la limitación de fosfato.

Al inicio de este capítulo se mencionaron algunos de los objetivos (Sección. 2.2), entre los cuales la evaluación de parámetros fisiológicos como el mantenimiento y el rendimiento verdadero eran interesantes ya que nos permitía comparar si había un gasto energético extra debido a la expresión de los genes foráneos en particular el de la angiostatina.

Comparando los resultados mostrados en la (Tabla. 28) con los de la (Tabla. 23), se observa que para todas las velocidades de dilución ensayadas tanto el rendimiento celular como los BC y B γ son inferiores.

Esto se debe a que la limitación es por fosfato y el exceso de glucosa en el medio es transformado a productos metabólicos. Por otra parte se ve que el BC va creciendo a medida que D aumenta. Esto es consistente con una síntesis de productos metabólicos por sobre flujo y es un ejemplo del hecho que las bacterias no siempre regulen precisamente, de acuerdo a sus necesidades, la velocidad de consumo de fuente de carbono, con lo cual a distintas D la fuente de carbono en exceso es metabolizada a velocidades similares y la

Capítulo 5

fracción de productos e intermediarios secretados al medio es mayor entonces a bajas D , resultando en un menor BC. Además, como se mencionó (Sección. 1.5.2) el metabolismo del fosfato está estrechamente relacionado con las rutas centrales de metabolismo y todas las células vivas regulan de forma sofisticada la absorción de fosfato y sobreviven incluso en condiciones de limitación de fosfato.

En general, en los cultivos que se realizaron hasta aquí los balances de carbono fueron de aproximadamente 0.8 para los limitados en FCE y de entre 0.35 y 0.70 para los limitados en fosfato, razón por la cual fue de esperar la aparición de algún producto en el medio de cultivo.

Un punto importante es que en el caso de los cultivos continuos limitados en fosfato, los BC y BN no se relacionan igual que en los limitados en carbono sino que mientras que el BC es creciente el BN es constante, lo que hace pensar que si el nitrógeno faltante se destinara a producto, no se trataría de los productos que se sintetizan en exceso en el cultivo continuo limitado en fosfato.

En los CC limitados en fosfato se realizó el DB a partir de pellet obtenido directamente a la salida del biorreactor. Estos ensayos de DB arrojaron señales que fueron muy débiles para todas las D , incluyendo los valores de D bajos en los que el tiempo de inducción promedio es más que suficiente para haber expresado angiostatina. Este resultado parece confirmar la suposición de la pérdida de plásmidos en cultivo continuo.

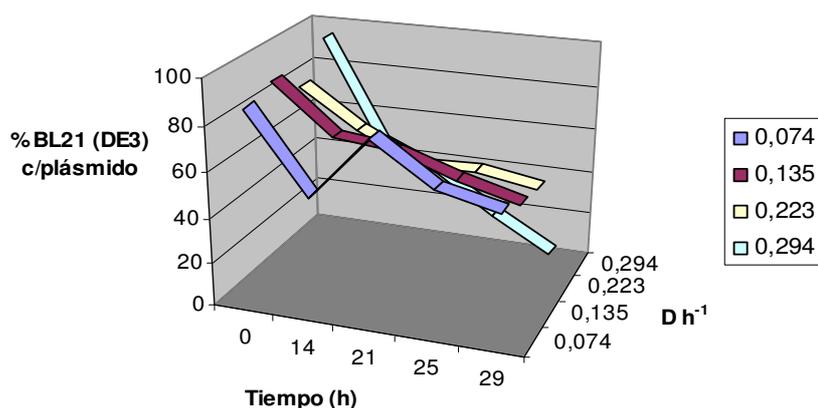


Figura 63 Efecto de la velocidad de dilución y el tiempo en el porcentaje de bacterias que contienen el vector pBK1-4 durante los cultivos continuos limitados en fosfato inorgánico.

Capítulo 5

La figura 63 muestra los resultados donde puede verse la variación de la población de BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) como varía a diferentes velocidades de dilución. Tal como se observa, el contenido plasmídico disminuyó con el aumento de D. Similares resultados fueron reportados por Bailey [44]. En este caso la determinación se realizó por paqueo selectivo (Sección. 3.4) y el resultado se expresó como porcentaje de células resistentes a ampicilina. Esta hipótesis implicaría que el nivel de expresión total de angiostatina caiga consecuentemente hasta que no de una señal apreciable por el ensayo de detección utilizado DB. En la (Tabla. 28) se observa que la S_p concentración de fosfato es del orden de 0.4 - 0.2 mM suficiente para inducir la expresión de angiostatina.

De los ensayos en batch en MR de la cepa recombinante BL21 (DE3) se manifestó sobre el final una disminución en el contenido de plásmido, con lo cual cabe pensar que si a posterior se evalúa un cultivo continuo a varias velocidades de dilución, es probable que el mismo arranque con una baja proporción de células sin plásmido más aún en un cultivo limitado en fosfato inorgánico. Por esta razón no fue evaluada la propuesta planteada de realizar estudios de la estabilidad de los plásmidos en CC mediante por ejemplo el método de Immanaka y Aiba [45].

Determinación del coeficiente de mantenimiento celular:

Similarmente a los estudios realizados con los cultivos limitados en FCE, suponiendo que el balance de carbono es igual a la unidad, debido a la formación de productos, se calcularon sus concentraciones mediante HPLC, luego su velocidad de consumo específica y se consideró que su rendimiento máximo era la única incógnita por parte de los productos formados.

Cultivo y Condición	$Y^{máx}_{X/S}$ (C-mol/C-mol)	$Y^{máx}_{P/S}$ (C-mol/C-mol)	m_s (C-mol/C-mol)
BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) limitado en fosfato inorgánico	0.54	0.75	0.02

Tabla. 29 Resultados finales obtenidos.

Capítulo 5

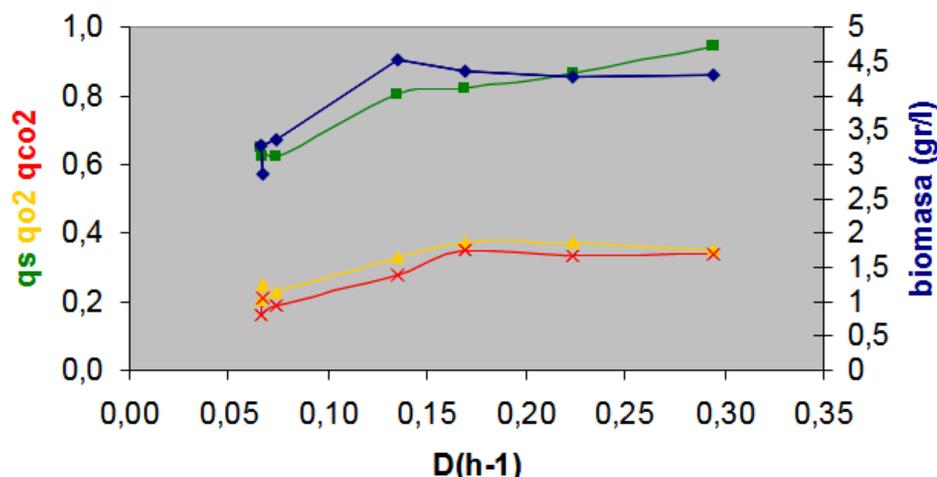


Figura 64 Parámetros cinéticos de los cultivos continuos de BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) limitado en fosfato inorgánico.

Los primeros tres puntos de la (Fig.64) corresponden a un cultivo inicial donde se tuvo que adicionar glucosa en repetidas oportunidades para alcanzar un exceso de ésta, razón por la cual la concentración de fosfato quedó reducida a aproximadamente 3 mM en el reservorio. Esto explicaría que la biomasa dé menores valores. Los cultivos siguientes se hicieron con una concentración de 4 mM.

Nuevamente los valores para la cepa recombinante, tanto bajo limitación de FCE como en fosfato, dieron resultados semejantes en rendimiento máximo y mantenimiento.

La similitud hallada en las cepas recombinantes en distintas condiciones, sería consistente con el hecho de que, como se mencionó para el caso de limitación en FCE, hubo una muy baja expresión de angiostatina, mientras que en el cultivo continuo limitado en fosfato, hubo nula expresión pero también una alta segregación del vector de expresión con lo cual la carga metabólica debida a la expresión de angiostatina sería despreciable.

5.3.3.4 Cultivo Continuo de BL21 (DE3) limitado en FCE

Finalmente como para completar la serie de experimentos se evaluó el comportamiento de la cepa BL21 (DE3) si bien existen muchas evidencias bibliográficas es un control importante para la serie de experimentos en función de los parámetros que se estuvieron estudiando. Análogamente a lo evaluado en las secciones anteriores, se trabajó en CC con

Capítulo 5

la cepa BL21 (DE3)_{WT} (sin plásmido) en iguales condiciones de temperatura y agitación (pero sin el agregado de ampicilina) que para su posterior uso como control negativo fundamentalmente de la expresión.

Las siguientes condiciones de fermentación fueron aplicadas a todos los CC realizados, exceptuando aquellas maniobras propias del cultivo de cada condición en particular (ej. agregado de antibióticos, nutrientes, etc.) Se utilizó un biorreactor LH de 1.5 L de capacidad máxima, con un volumen de medio de cultivo de 1 L aproximadamente (Sección. 3.2.2.2). La agitación tal que no se limite en O₂ se mantuvo entre 550 y 800 r.p.m con una aireación de 25 L.h⁻¹. El pH fue controlado automáticamente en 7.0 ± 0.2 mediante la adición de NaOH 0.5 N.

Se utilizó el mismo medio mineral MR (Glucosa: 12 gr.L⁻¹) tanto en etapa batch como en el reservorio y solución madre de vitaminas que para el cultivo batch, excepto que se añadió el fosfato incorporando de 95 µl (1.6 mmoles) de H₃PO₄ (85%) por litro. El medio mineral completo con todos los componentes minerales combinados después de esterilizar y enfriar a temperatura ambiente, se suplementó con glucosa utilizando filtros estériles desechables de 0.22 µm (Millipore) junto con 0.25 ml de solución madre de vitaminas por litro.

Las condiciones de EE se alcanzaron típicamente después de 5 t_R y se confirmaron mediante la concentración constante de biomasa (ya sea a través de la densidad óptica o el peso seco).

En experiencias previas de ajuste al comienzo la concentración de fosfato en el reservorio fue de 6.0 mM PO₄⁻³, luego dado a que en EE quedaba cerca de 3.0 mM se disminuyó el reservorio a 4.5 mM PO₄⁻³ pero comenzaron a evidenciarse fenómenos de lisis celular, por este motivo nuevamente se incrementó a 6.0 mM PO₄⁻³.

5.2.3.1.2 Resultados

En la (Tabla. 31) se muestran los resultados obtenidos en estado estacionario para seis valores de velocidad de dilución, junto con los balances correspondientes para la cepa WT BL21 (DE3) limitado en FCE glucosa. Se muestran en la tabla los datos obtenidos, incluyendo los valores medidos de láctico y acético y el BC corregido con estos valores.

Capítulo 5

D (h ⁻¹)	Concentración (gr.L ⁻¹)				r _{CO₂} (mmol/lh)	r _{O₂} (mmol/lh)	RC	y _{x/s} (c-molx/c-mols)
	PS	Glucosa	Acetato	Amonio				
0.116	3.935 ± 0.106	0.000	0.000	0.201 ± 0.01	0.0201 ± 0.001	0.0240 ± 0.003	0.810 ± 0.04	0.410 ± 0.03
0.153	3.685	0.000	0.000	ND	0.0273	0.0251	1.090	0.357
0.180	3.975	0.000	0.000	ND	0.0281	0.0316	0.890	0.385
0.218	4.440	0.000	0.000	0.443	0.0287	0.0349	0.820	0.430
0.232	4.910	0.000	0.000	0.468	0.0374	0.0405	0.920	0.476
0.296	4.940	0.000	0.000	0.583	0.0417	0.0440	0.950	0.479

Tabla. 30 Resultados finales en EE.

D F/V (H ⁻¹)	0.116	0.153	0.180	0.218	0.232	0.296
S _p (mM)	3.5	3.3	3.2	3.3	2.9	2.4
Biomasa (gr/L)	3.94	3.69	3.98	4.44	4.91	4.94
Biomasa c-mol/L	0.153	0.143	0.154	0.172	0.190	0.191
r _{O₂} (mmol/Lh)	0.0243	0.0251	0.0316	0.0350	0.0405	0.0440
r _{CO₂} (mmol/Lh)	0.0198	0.0273	0.0281	0.0287	0.0374	0.0417
CR	0.81	1.09	0.89	0.82	0.92	0.95
BC (sin producto)	0.807	0.802	0.780	0.760	0.880	0.830
B _γ (sin producto)	0.925	0.784	0.843	0.852	0.936	0.874
r _s (c-mol/Lh)	0.046	0.061	0.072	0.087	0.093	0.119
q _s	0.302	0.427	0.467	0.506	0.490	0.621
q _{O₂} (mol/Lh c-molx)	0.160	0.176	0.205	0.203	0.213	0.230
q _{CO₂} (mol/Lhc-molx)	0.130	0.191	0.182	0.167	0.197	0.218

Tabla. 31 Totalidad de los resultados obtenidos de los respectivos EE.

Se grafican a su vez la concentración de biomasa, y velocidades específicas de consumo de glucosa, O₂ y producción de CO₂.

Capítulo 5

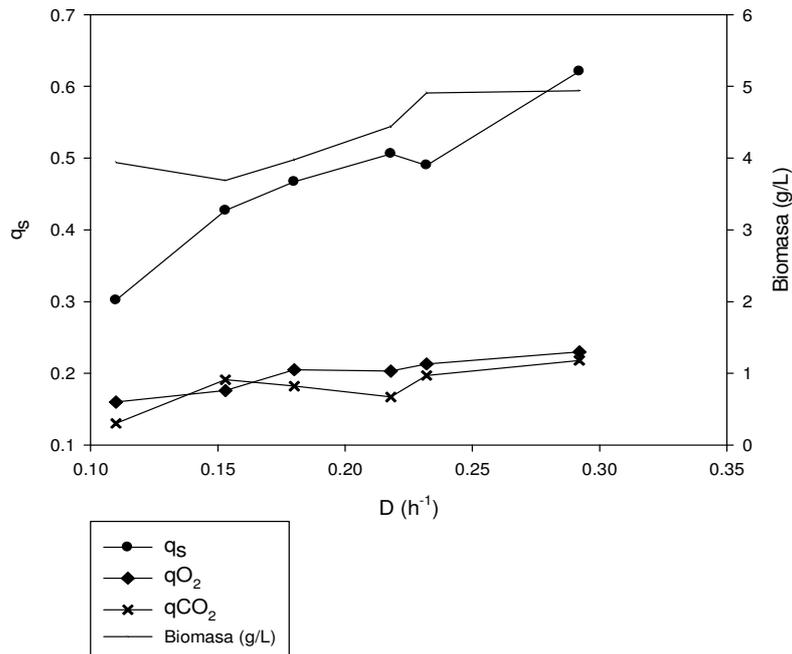


Figura 65 Parámetros cinéticos de los cultivos continuos de BL21 (DE3) limitado en FCE.

En la figura 65 se ve que el comportamiento de q_s no es exactamente una recta en el plano. Esto es debido a la formación de productos, que daría una extrapolación lineal en el espacio, en caso de formación de sólo un producto, o una extrapolación lineal en más dimensiones, si hay más de un producto. Tal cual se explicó anteriormente, se simuló teniendo en cuenta los parámetros cinéticos (Tabla. 31) determinados para *E. coli* utilizando el modelo de Pirt extendido. Nuevamente no fue posible determinar cuantitativamente ningún otro componente que no sea acetato o láctico.

Como se mencionó generalmente los valores estimados del grado de reducción de los productos más habituales derivados de las rutas centrales del metabolismo de la glucosa en *E. coli*, son similares a los de ácidos orgánicos acético, láctico, fórmico, succínico, todos posibles metabolitos de la cepa huésped.

Cultivo y Condición	$Y^{MAX}_{X/S}$ (C-mol/C-mol)	$Y^{MAX}_{P/S}$ (C-mol/C-mol)	m_s (C-mol/C-mol)
BL21 (DE3) limitado en FCE	0.72	0.90	0.09

Tabla. 32 Resultados finales obtenidos.

Capítulo 5

Nosotros hemos intentado explicar la carga metabólica (Sección. 1.5.3) impuesta sobre las cepas recombinantes debido a la expresión de la angiostatina en términos del coeficiente de mantenimiento. Este parámetro junto con la determinación de ácidos orgánicos nos permite tener una medida de la carga metabólica. Otros autores, en vez de determinar el coeficiente de mantenimiento, han desarrollado metodologías que permiten la detección de ppGpp mediante HPLC correlacionándola con la producción de ácidos orgánicos. Cuando los nutrientes se vuelven limitantes para el crecimiento, *E. coli* ajusta su perfil de expresión génica a uno que permite una supervivencia prolongada en la fase estacionaria. Un potenciador clave de este cambio fisiológico es la acumulación de las alarmonas guanosina 5',3' bispirfosfato y guanosina pentafosfato (ppGpp y pppGpp: colectivamente referidas aquí como ppGpp). Estas moléculas efectoras también se manifiestan bajo la expresión de proteínas recombinantes [50]. Basado en nuestro conocimiento adquirido, para cualquier sistema recombinante en este último trabajo con la cepa WT, el valor m_s es mayor y el comportamiento no es el esperado, ya que se supone que la cepa recombinante presente un valor mayor de coeficiente de mantenimiento con respecto a la salvaje.

Se observan diferencias en el rendimiento máximo en biomasa entre la cepa salvaje y la recombinante. Lamentablemente, al no haber podido cuantificar todos los productos, tampoco se pudieron realizar una reconciliación de los datos y una estimación los errores en estos parámetros, pero es posible que existan errores en la cepa salvaje, ya que los valores de mantenimiento y de rendimiento verdadero son mayores que los hallados en bibliografía.

5.2.4 Reevaluación de los ensayos de expresión de angiostatina

En esta instancia de la tesis nos encontramos con una cuestión clave a evaluar con el fin de poder determinar si los objetivos planteados podrían ser sostenidos. Sin adentrarnos demasiado en la discusión global del trabajo (Capítulo. 7) hablando de la construcción de interés pBKI-IV(1) hasta aquí hemos realizado pruebas en un único medio RM con una única cepa donde hemos evaluado una concentración o umbral de expresión referido como $[PO_4]^{-3}$ donde se detectó angiostatina (Fig.41) en modo batch en erlenmeyers agitados y en biorreactores, se ha evaluado CC limitado en FCE, verificando la presencia del vector en etapa batch y en diferentes EE, con posterior incubación en modo batch en erlenmeyers

Capítulo 5

para evaluar el impacto de al crecer a una D determinada podría imponer una re adaptación metabólica durante la limitación por fosfato, y por tanto surgió plantear si solo la μ previa a la limitación es la responsable excluyente de la re adaptación en el momento de la inducción de la expresión de angiostatina. Por otro lado permitiría evaluar el costo energético de mantenerse a una determinada μ . En este punto nos encontramos que la expresión fue muy baja para todas la D evaluadas, pero así los niveles de vector para todas la D se mantuvieron constantes (Fig.62) sin embargo, observamos una fuerte dependencia del número de copias del plásmido con respecto al método elegido para el aislamiento del ADN plasmídico. Como se mencionó (Sección. 1.5.3) el número de copias de plásmido está íntimamente relacionado con la expresión de proteínas recombinantes y con el estrés producido debido al proceso y por tanto a la carga metabólica.

Por otra parte, dentro de los objetivos parciales (Sección. 2.2.2) en los estudios de CC limitados en fosfato no se pudo evidenciar la expresión de angiostatina debido a un drástico incremento en la concentración de ácidos orgánicos entre 5 gr.L^{-1} de acetato y 2 gr.L^{-1} de lactato que como se discutirá más adelante tiene sus consecuencias a $D < 0.1 \text{ h}^{-1}$ y por otro lado debido a que $D > 0.1 \text{ h}^{-1}$ la población del cultivo conteniendo plásmido era cercana al 20%. Por último queda mencionar que es posible que el acetato y otros productos obtenidos sean productos propios de la cepa BL21 (DE3), aunque sin poder cuantificar (Tabla.31) podrían ser perjudiciales para la expresión de angiostatina utilizando el promotor de la fosfatasa alcalina.

Como ensayos complementarios para chequear la integridad de la cepa recombinante utilizada durante los CC limitados en fosfato inorgánico y evaluar su expresión, se realizaron los ensayos siguientes para evaluar las posibles cuestiones impuestas por el huésped.

Para comenzar se procedió a caracterizar el plásmido obtenido de un CC limitado en fosfato a una $D = 0.15 \text{ h}^{-1}$, debido a que era la situación intermedia donde provenía la mayor proporción de células libres de plásmido (Fig. 63) y donde probablemente exista la posibilidad de algún desajuste génico. Se extrajo el DNA plasmídico y se transformaron dos tipos diferentes de cepas BL21 (DE3) nuevamente y DH5 α . Las cepas BL21 (DE3) y DH5 α obtenidas de las transformaciones se caracterizaron mediante mini-prep, restricción y corrida en gel de agarosa para ver si sus plásmidos poseían los tamaños correctos.

Capítulo 5

También se utilizó una cepa control la BL21 (DE3)/pBAce (que posee el vector sin el inserto). Los productos de mini prep se digirieron con las enzimas *SalI* y *NdeI* que debían rendir un fragmento de 3.3 Kbp (el vector) y un fragmento de 1.1 Kpb (inserto).

Las bandas obtenidas fueron las siguientes:

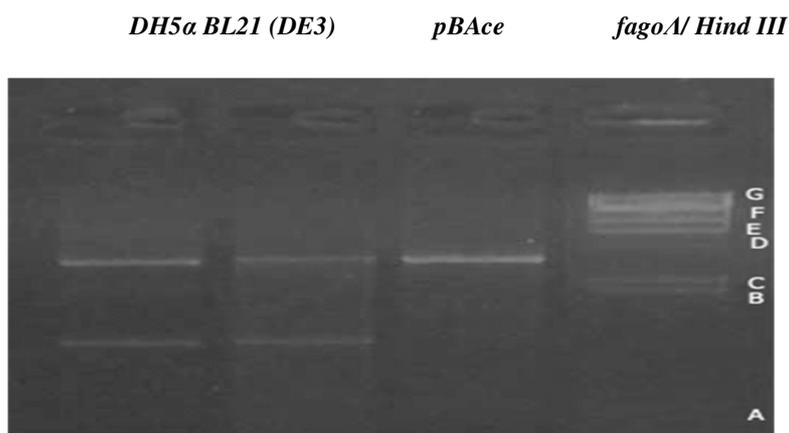


Figura 66 Tamaños de los fragmentos obtenidos.

Se muestran los tamaños de las bandas del patrón lambda. A: 564 pb, B: 2027 pb, C: 2322 pb, D: 4361 pb, E: 6557 pb, F: 9416 pb, G: 23130 pb. Se indican las calles con el nombre de la cepa portadora. El fago lambda digerido con *Hind III* es el marcador de PM utilizado.

La banda de la cepa con el plásmido control pBAce mostró un tamaño esperado de 3.3 kpb (entre los fragmentos de 2322 pb y de 4361 pb, del fago lambda.) ubicado como era de esperarse, a la misma altura que el fragmento más grande de la mini-prep.

Las bandas mostraron los tamaños esperados para las cepas transformadas con los productos de la mini prep. El fragmento más pequeño (inserto) corrió a una altura intermedia, entre los fragmentos de 2027 pb y 564 pb del fago lambda.

Los ensayos de expresión con las cepas transformadas se realizaron en erlenmeyer según se detalló en (Sección 5.2.1.3). Se partió de una DO_{600} aproximada de 0.11- 0.13 y los resultados fueron los siguientes.

Ensayo	Cepa y conc.	DO_{600} medio	pH final	DO_{600} final
1	DH5α	0.694	6.05	1.06

Capítulo 5

	0.2 mM			
2	WT 0.2 mM	0.705	4.8	0.826
3	BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) 0.2 mM	0.752	5.7	0.879
4	BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) 0.01 mM	0.243	6.4	0.306
5	BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) 0.2 mM (*)	ND	6.2	1.0

Tabla. 33 Reevaluación de la expresión en forma comparativa con diferentes cepas de trabajo. (*) Cepa utilizada en esta tesis.

Se guardaron pellet a las 9:30 horas (proveniente de 4 mL) y a las 22:30 horas (proveniente de 10 mL).

Para los ensayos de DB se seleccionaron los siguientes pellets:

A	Ensayo 1 DO ₆₀₀ medio
B	Ensayo 3 DO ₆₀₀ medio
C	Ensayo 4 DO ₆₀₀ medio
D	Ensayo 5 DO ₆₀₀ medio
E	Ensayo 2 DO ₆₀₀ final
F	Ensayo 1 DO ₆₀₀ final
G	Ensayo 3 DO ₆₀₀ final
H	Ensayo 4 DO ₆₀₀ final
I	Ensayo 5 DO ₆₀₀ final
J	Ensayo 2 DO ₆₀₀ medio

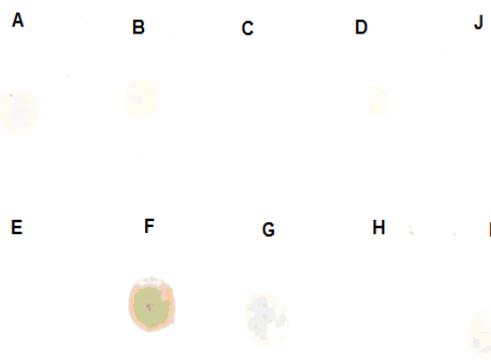


Figura 67 Membrana de nitrocelulosa revelada mediante DB

(Tabla. 34) Referencias de cada uno de los ensayos.

De la figura 67 se pone de manera evidente que la cepa DH5 α dio una mejor expresión (A y F). La BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) con 0.2 mM de fosfato inorgánico, también dio cierta expresión (B y G), aunque no se vio de una manera tan intensa como la DH5 α . La BL21 (DE3) / pBKI-IV (1), (C y H) incubada con 0.01 mM de fosfato pareció no dar una señal apreciable, posiblemente debido a su pobre crecimiento, y por lo tanto menor cantidad sembrada de proteína total. La cepa recombinante, que fue utilizada en los ensayos a lo largo de la tesis (teóricamente igual a la BL21 (DE3) / pBKI-IV (1)), (D e I), dio una expresión similar a la BL21 (DE3) / pBKI-IV (1) nuevamente transformada, con lo cual se obtuvieron los resultados esperados, mostrando que el plásmido de la miniprep (que se obtuvieron de una cepa cultivada en medio sólido proveniente de la cepa utilizada en el CC

Capítulo 5

en fosfato), no sufrió ningún tipo de re arreglo en el CC limitado en fosfato, que haya podido afectar la expresión. La cepa salvaje no dio expresión como era de esperar (E y J).

Los resultados de los ensayos de expresión obtenidos al momento de realizar cada CC y obtenidos en cada ensayo de expresión en batch, hacen suponer que hubo pérdida de plásmidos en el CC, la cual haría que el número promedio de plásmidos por célula caiga hasta un nivel tal que sea suficiente para inactivar la ampicilina agregada al medio de cultivo y que sea lo suficientemente baja como para que la señal obtenida en los ensayos preliminares de DB no sea visible o sea muy débil como se mencionó anteriormente.

Los resultados mostrados hasta aquí evidencian que se cuenta con una cepa la *E. coli* DH5 α , de uso habitual para el clonado y el mantenimiento de plásmidos, que podría ser una nueva fuente de evaluación promisorio para la obtención de angiostatina mediante el uso del promotor de la fosfatasa alcalina. Shiloach y col [46], reportan diferencias entre la cepa BL21 y la cepa DH5 α , esta última posee la capacidad de estabilizar los plásmidos debido a sus deleciones en *endA* y *recA*, diciendo además que ambas poseen diferencias que las diferencias en cuanto al consumo de glucosa, *E. coli* BL21 es menos sensible a las condiciones de crecimiento que las cepas *E. coli* JM109 o DH5 α , si bien la cepa BL21 puede crecer a altas densidades debido a que posee activo el ciclo del glioxilato y a rutas anapleoróticas que le permiten no ser sensibles a la alta concentración de glucosa, hemos evidenciado que la misma muestra una cierta tendencia a la pérdida del plásmido, por este motivo en la próxima sección se mostraran nuevas evaluaciones para la cepa recombinante DH5 α .

5.2.5 Estudios de expresión de angiostatina en *E. coli* DH5 α

Como se mencionó anteriormente, el ingreso de *E. coli* en una situación de limitación (FCE/fosfato) o ambas (recordar que al limitarse en fosfato la relación entre la glucosa y el fosfato se incrementa notablemente a medida que transcurre el tiempo, y cada vez “cuesta” más llegar al umbral de expresión) está asociada además con la inducción de la respuesta de estrés general. Estos resultados motivaron la búsqueda de una nueva línea de trabajo para la cepa DH5 α . Esta cepa ha sido utilizada para expresar el factor de crecimiento epidérmico humano utilizando el promotor de la fosfatasa alcalina [47].

Capítulo 5

Inicialmente hubo que construir nuevamente un clon. Se transformaron bacterias competentes de DH5 α con 4 μ l de vector original pBKI-IV con 120 μ l de bacterias competentes. La transformación se realizó de manera habitual. Luego al plaquear crecieron solo 20 colonias. Sé picaron 10 en medio líquido con ampicilina. De las 10 solo crecieron 2 colonias, las denominadas 2 y 4. Se realizaron miniprep de ambos clones arrojando resultados positivos. El resto de cultivo se utilizó para realizar glicerol stock de ambos clones.

λ E/H pBKI-IV(1) pBKI-IV(1)
 [2] [4]

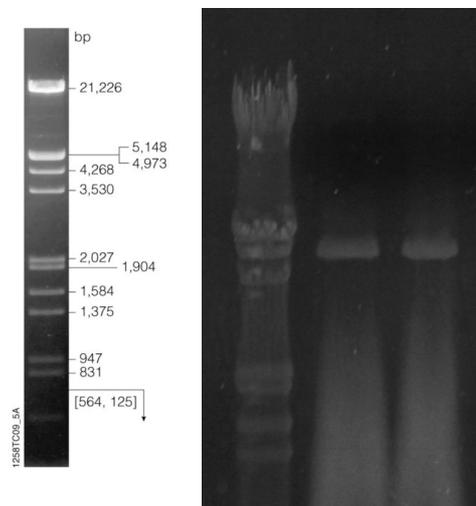


Figura 68 Vector pBKI-IV (1) obtenido de los clones generados.

5.2.5.1 Sistema Batch - Erlenmeyer Agitado

5.2.5.1.1 Evaluación de cinética de crecimiento en diferentes medios de cultivo.

El objetivo de aquí en más fue evaluar la expresión de angiostatina en dos cepas de *E.coli* inicialmente en un sistema de cultivo batch en erlenmeyers agitados. Se tomaron muestras en intervalos regulares de tiempos y estudiar la analítica del proceso.

Se cuenta con un antecedente en el cual la cepa DH5 α evidencio mayor señal de expresión mediante DB que la cepa de uso habitual BL21 (DE3). Por otro lado, se observaron diferencias en cuanto al crecimiento y al pH final del proceso que podrían explicar la

Capítulo 5

aparición diferencial de productos como ser ácidos orgánicos. Cabe mencionar que la cepa BL21 (DE3) tanto la WT como la recombinante al ser evaluada en cultivo continuo incluso a baja D no cerraron sus BC y mostraron mediante HPLC la aparición de productos como láctico y acético. Los indicios de que la cepa DH5 α muestre una mayor señal de expresión y un 18.7% más de crecimiento nos indicaría que no estaría produciendo los compuestos que produce la cepa BL21 (DE3) y es la que deberíamos evaluar al utilizar para futuros ensayos.

Debido a los resultados obtenidos con 0.2 mM de fosfato, se repitió el ensayo con ambas cepas, de manera de tener una mayor cantidad de muestras para realizar cinética de crecimiento, obtener datos analíticos de crecimiento como ser consumo de glucosa, consumo de fosfato y producción de ácidos orgánicos.

Por este motivo, inicialmente se reprodujeron las condiciones evaluadas anteriormente con la finalidad de obtener una cinética de crecimiento. Se repitieron las siguientes condiciones de cultivo: Glucosa 5.0 gr.L⁻¹; 9.0 gr.L⁻¹ de MOPS a pH 7.0; 6.0 gr.L⁻¹ de amonio. Metales traza, tiamina y ampicilina de manera habitual para el medio MR. Como control se utilizaron las respectivas cepas WT.

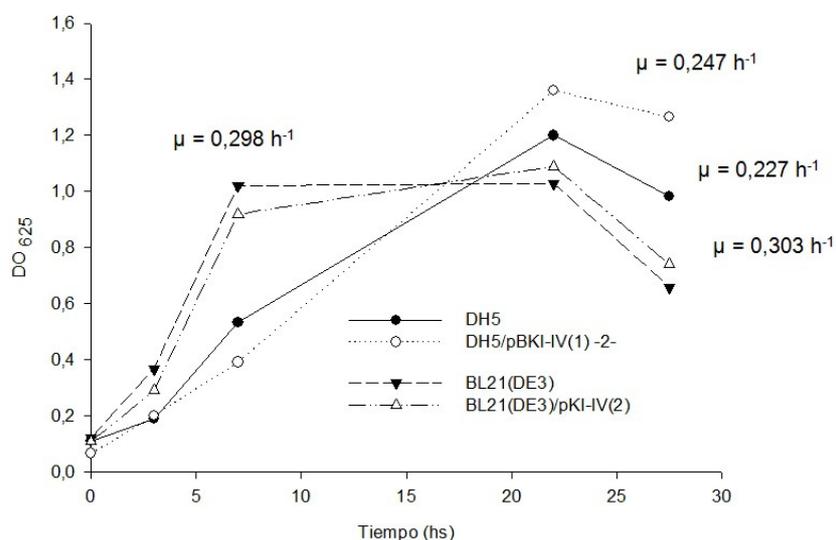


Figura 69 Cinética de crecimiento de las cepas estudiadas.

Las determinaciones se realizaron entre el tiempo inicial y las siete horas de cultivo.

Capítulo 5

A continuación se muestran las figuras de cada cultivo realizado detallando los consumos de fosfato inorgánico y la cantidad de ácido acético producido.

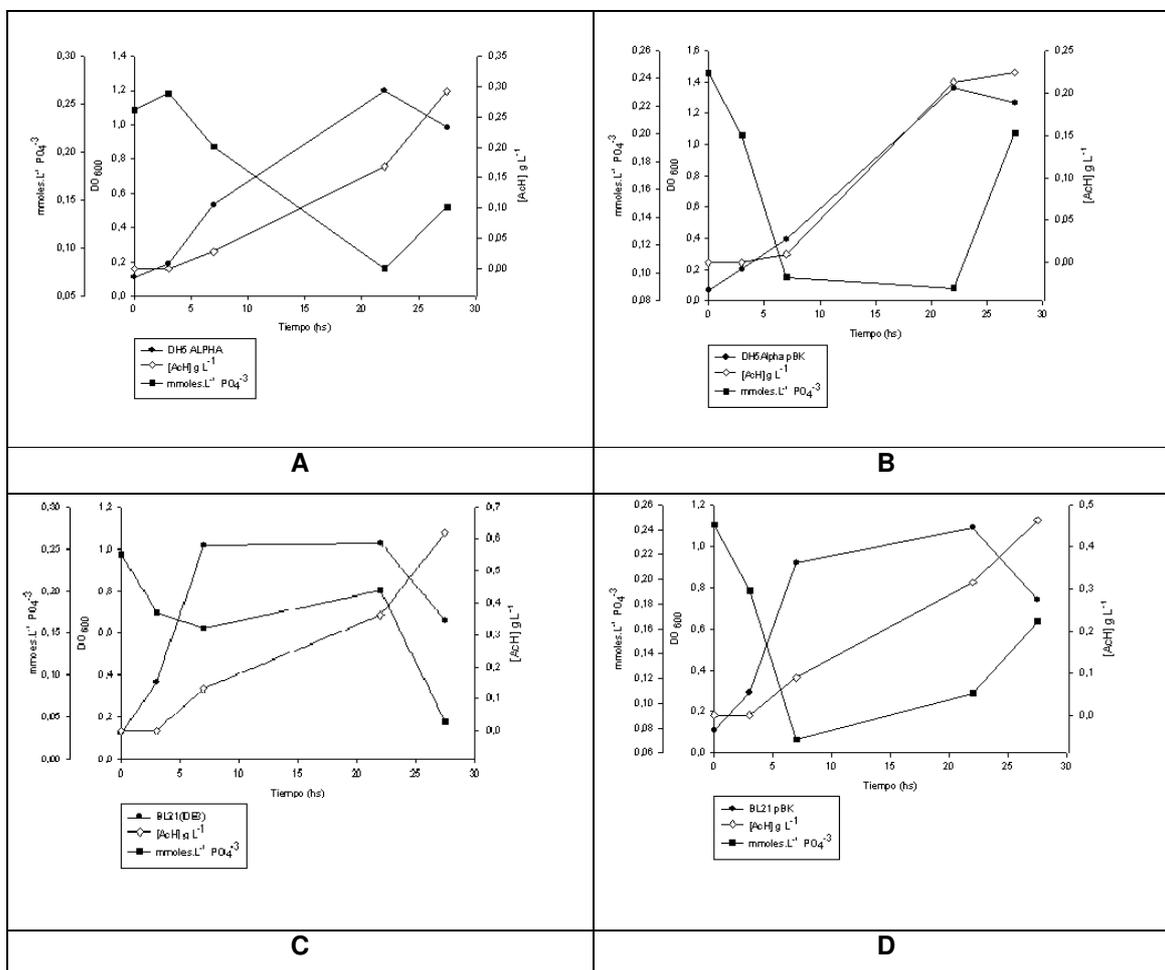


Figura 70 Referencias: A. Cultivo DH5 α WT. B. Cultivo DH5 α pBK-IV-1[2]. C. Cultivo BL21 (DE3)WT. D. Cultivo BL21 (DE3) pBK-IV (2).

Se observa una alta proporción de ácido acético para la cepa WT y la cepa recombinante BL21 (DE3) que podría estar vinculado a la manifestación de baja o nula señal de expresión de angiostatina (Fig. 71).

La cepa DH5 α muestra en proporción una baja producción de acetato evidenciando una vez más un aspecto importante a considerar.

Un parámetro determinante fue la presencia del plásmido. Por este motivo, se tomaron muestras a las 7 horas y al finalizar el cultivo, se extrajo el DNA y posteriormente se realizó una corrida electroforética. Como control se sembró las muestras de los cultivos de siembra ON.

Capítulo 5

Se realizaron diluciones de la biomasa ajustando la DO₆₀₀ de manera de tener 1 ml de una DO₆₀₀ de 1. Sé re suspendió en un volumen de 15 µl con agua purificada. Se efectuó una corrida electroforética en gel de agarosa 1% en buffer TAE con la totalidad del producto. El fenómeno de pérdida de plásmido también puede estar vinculado a la expresión.

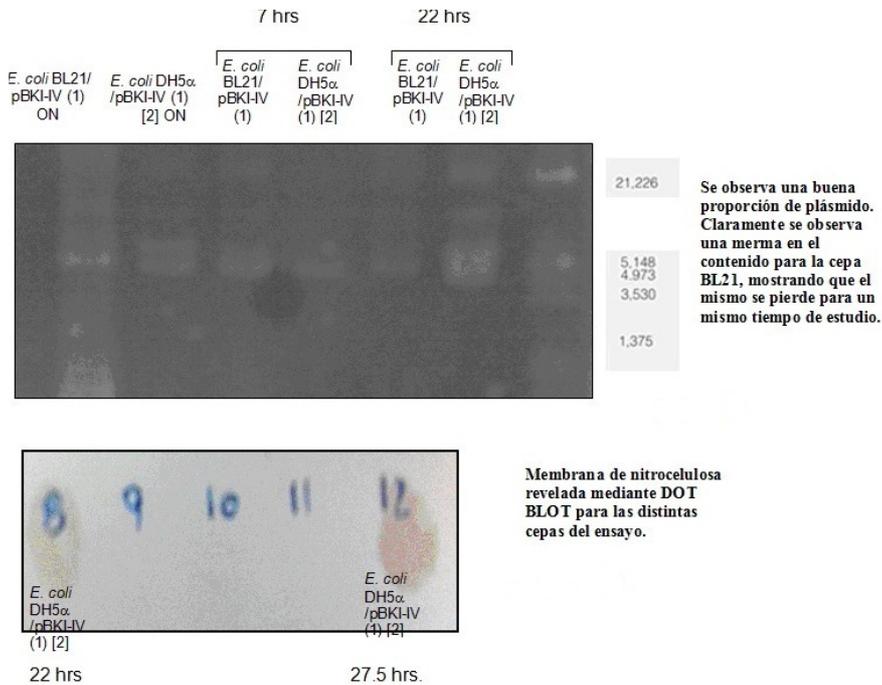


Figura 71. Perfil plásmidico de los clones evaluados al finalizar los cultivos a los tiempos indicados. Se observa en la misma los DB de las muestras reveladas.

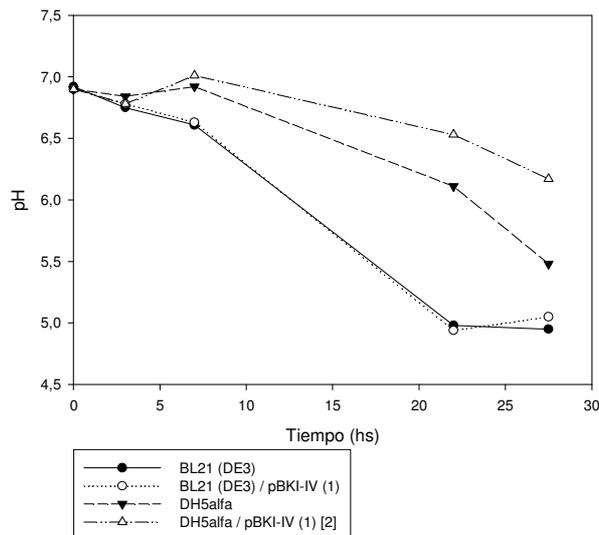


Figura 72 pH a lo largo de la cinética de cultivo.

Capítulo 5

De la figura 72 puede observarse que son notables las diferencias de pH entre las diferentes cepas de estudio. La cepa DH5 α recombinante muestra el perfil más diferencial probablemente debido a la baja producción de ácido acético.

Los resultados confirman los estudios preliminares. De aquí a futuros ensayos se considerara la cepa DH5 α como la cepa de referencia en estudios de expresión de angiostatina utilizando el promotor de la fosfatasa alcalina.

Con estos resultados se rediseñaron experimentos con el fin de ajustar la relación de glucosa y fosfato y evaluar el empleo de fuentes complejas de nutrientes (libres de fosfatos) con el fin de mejorar el rendimiento. Preliminarmente se evaluara un experimento ídem (Sección 5.3.1.1) con la cepa *E. coli* DH5/ pBKI-IV (1) -2- evaluando la presencia de ácido acético en condiciones de limitación y no limitación de fosfatos. Con la información allí obtenida se previó armar un plan de estrategias que serán empleadas en los sistemas de batch alimentado según lo planteado en (Sección. 2.2).

Se realizó una serie de experimentos en modo batch en erlenmeyers agitados empleando el MR y el M-LP ambos proporcionales a la misma cantidad de FCE (glucosa) 0.168 C-moles/L. La cantidad de fosfato inorgánico inicial se varió en la misma cantidad para ambos medios. Como control se evaluaron ambas cepas WT. El tiempo de cultivo fue monitoreado a las 16 y 24 h.

Los resultados mostrados en la tabla 35 corresponden a cultivos para los cuales sobre el final de los mismos no dejaron un remanente significativo de glucosa y fosfato, respecto de sus valores iniciales.

El objetivo es optimizar los nutrientes teniendo en cuenta el efecto de la concentración inicial de fosfato sobre el metabolismo en las nuevas cepas obtenidas en términos de los productos de fermentación para los cultivos aeróbicos.

Capítulo 5

MEDIO DE CULTIVO LP				
mM PO ₄ ³⁻	BL21 pBK		DH5 pBK	
	[g/L]			
	LÁCTICO	ACÉTICO	LÁCTICO	ACÉTICO
0.5	2.11	0.35	1.62	0.76
1	2.51	0.60	0.60	0.10
2	1.85	0.34	2.83	1.49
4	3.78	1.01	1.55	0.62

Medio de cultivo MR				
mM PO ₄ ³⁻	BL21 pBK		DH5 pBK	
	[g/L]			
	LACTICO	ACETICO	LACTICO	ACETICO
0.5	1.34	0	5.03	0
1	7.69	0	2.23	0
2	4.05	0	3.55	0
4	2.95	0	4.40	0

Medio de cultivo LP				
mM PO ₄ ³⁻	BL21		DH5	
	[g/L]			
	LACTICO	ACETICO	LACTICO	ACETICO
2	1.49	0.72	3.01	1.73

Medio de cultivo MR				
mM PO ₄ ³⁻	BL21		DH5	
	[g/L]			
	LACTICO	ACETICO	LACTICO	ACETICO
0.2	0	0.36	0.09	0.17
2	2.90	0	3.62	0

mM PO ₄ ³⁻	BL21 pBK		DH5 pBK	
	Biomasa [g/L]			
	MR	LP	MR	LP
0.5	0.91	0.92	0.81	0.49
1	0.95	0.91	0.73	0.61
2	1.17	0.95	0.71	0.48
4	1.15	0.89	0.80	0.56

mM PO ₄ ³⁻	BL21		DH5	
	[g/L]			
	LACTICO	ACETICO	LACTICO	ACETICO
2	0.88	0.93	0.63	0.98
0.2	0.60	NA	0.68	NA

Tabla 35 Comparación de los valores de concentración de ácido acético y ácido láctico y rendimiento de biomasa celular después de 24 h de crecimiento en medio LP y MR.

Para hallar los parámetros cinéticos debió utilizarse un método numérico para su ajuste dado a que no pueden resolverse analíticamente o de manera exacta, de forma que su solución debe ser abordada con ayuda de algún procedimiento numérico. En este caso se utilizó un ajuste de *Runge – Kutta* sobre una función polinómica de grado dos. Se observan valores prácticamente constantes para la biomasa.

Capítulo 5

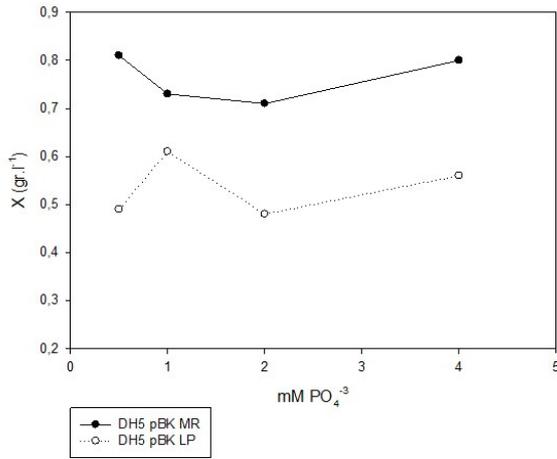


Figura 73 Biomasa final cepa DH5α en MR/LP.

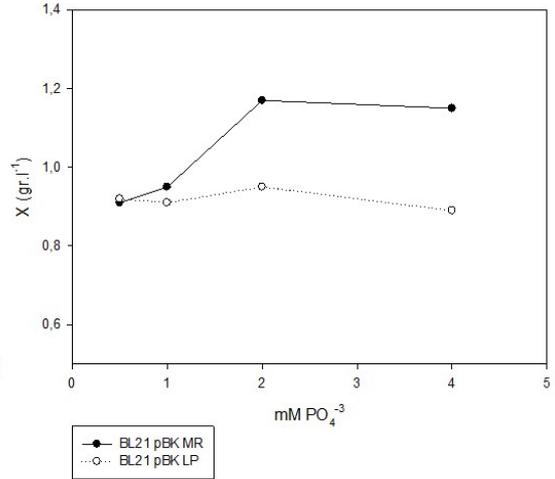
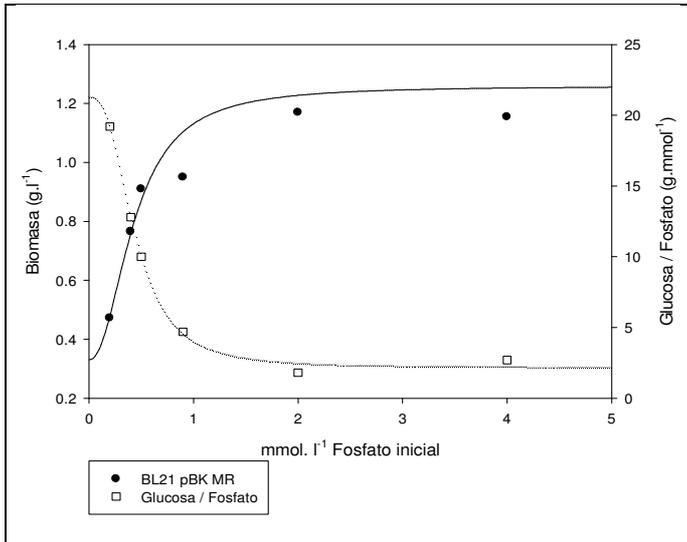
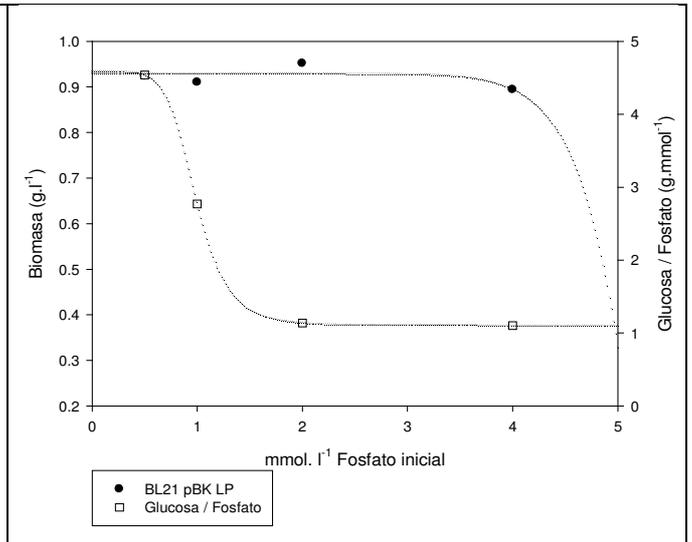


Figura 74 Biomasa final cepa BL21 en MR/LP.



**Figura 75 BL21 pBK MR
Relación glucosa/ PO₄³⁻
respecto de la biomasa
final.**



**Figura 76 BL21 pBK LP
Relación glucosa/ PO₄³⁻
respecto de la biomasa
final.**

Capítulo 5

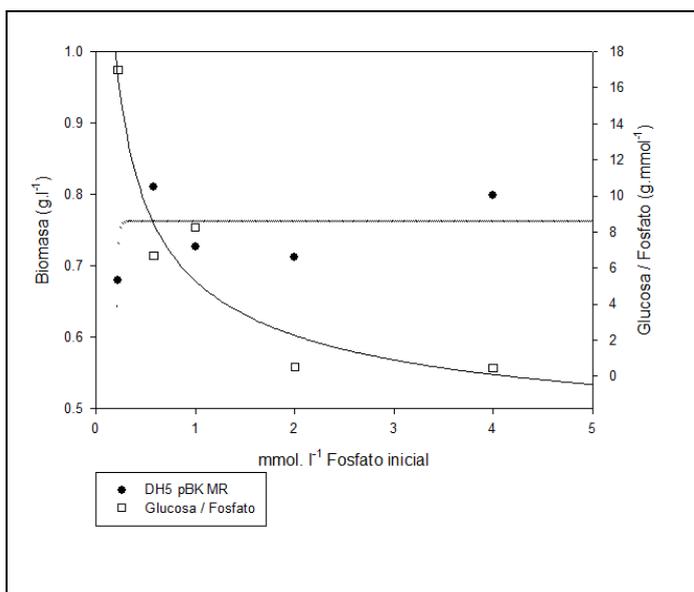


Figura 77 DH5α pBK MR
Relación glucosa/ PO₄³⁻
respecto de la biomasa
final.

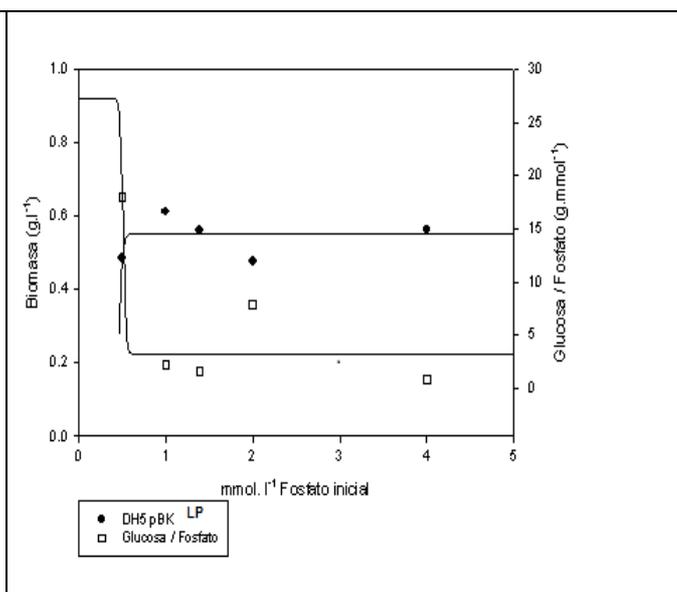


Figura 78 DH5α pBK LP
Relación glucosa/ PO₄³⁻
respecto de la biomasa
final.

X (g.l ⁻¹) - PO ₄ ³⁻ (mmoles.l ⁻¹) inicial			
R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0.9064	0.8215	0.6430	0.1931
Min	Max	EC50	Hill slope
0.3303	1.2596	0.4296	-2.1672
Gluc (g) / PO ₄ ³⁻ (mmol) - PO ₄ ³⁻ (mmoles.l ⁻¹) inicial			
R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0.9984	0.9969	0.9921	0.5989
Min	Max	EC50	Hill slope
2.1368	21.2597	0.4375	2.6919

(Tabla. 36)

X (g.l ⁻¹) - PO ₄ ³⁻ (mmoles.l ⁻¹) inicial (*)			
R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0.6846	NA	NA	NA
Min	Max	EC50	Hill slope
4.031	2.0406	NA	NA
Gluc (g) / PO ₄ ³⁻ (mmol) - PO ₄ ³⁻ (mmoles.l ⁻¹) inicial			
R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
1.0000	1.0000	1.0000	NA
Min	Max	EC50	Hill slope
1.1015	4.5814	0.9879	6.4909

(Tabla. 37)

DH5α/pBKl-IV(1) MR			
X (g.l ⁻¹) - PO ₄ ³⁻ (mmoles.l ⁻¹) inicial (**)			
R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
1.0000	NA	NA	NA
Min	Max	EC50	Hill slope
0.2231	0.5735	NA	NA
Gluc (g) / PO ₄ ³⁻ (mmol) - PO ₄ ³⁻ (mmoles.l ⁻¹) inicial			
R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
1.0000	1.0000	1.0000	NA
Min	Max	EC50	Hill slope
3.4558	0.2000	NA	NA

(Tabla. 38)

DH5α/pBKl-IV(1) LP			
X (g.l ⁻¹) - PO ₄ ³⁻ (mmoles.l ⁻¹) inicial			
R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
NA	NA	NA	NA
Min	Max	EC50	Hill slope
2.0000	1.0000	NA	NA
Gluc (g) / PO ₄ ³⁻ (mmol) - PO ₄ ³⁻ (mmoles.l ⁻¹) inicial			
R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate
0.9231	0.8520	0.4082	5.5411
Min	Max	EC50	Hill slope
3.1402	27.5552	0.5073	32.5580

(Tabla. 39)

Tabla 36-39 Valores de ajuste por iteración mediante RK. Los valores de EC50 muestran los puntos de quiebre de las curvas para las diferentes cepas en medio LP y MR.

Capítulo 5

En este caso es esperable que sea el fosfato por ende estos resultados preliminares arrojaron que la cantidad de glucosa remanente es muy importante para lograr disminuir la concentración de fosfato para que comience a ser limitante. Los gráficos de ajuste de las tablas 36-39, muestran que para el caso de la cepa DH5 α comienza a ser crítico el consumo de glucosa al comenzar con 0.5 mM de fosfato inorgánico en M-LP, pero en MR lo es a la mitad es decir por debajo de 1 mM, mientras que respecto a los ácidos producidos, hay muy baja producción de acetato y relativamente poco lactato (ver Fig.72), sin embargo al cambiar a MR no se produce acetato pero sí láctico. Respecto a la cepa BL21 (DE3) los umbrales de fosfato parecieran invertirse 0.988 en M-LP y 0.438 en MR. Pero respecto a los ácidos produce mucho más en medio M-LP que en MR (ver Fig.72). Es de destacar que en un amplio rango de concentraciones ambas cepas no producen acetato y si láctico en MR, con lo cual sería más apropiado para el crecimiento tal como muestra la (Fig. 77-78). Nuevamente estamos frente a una decisión tal como en (Sección. 5.2.4) donde los hallazgos a escala de erlenmeyers agitados no mostraron resultados escalables y reproducibles en todas las condiciones evaluadas. Probablemente lo más notable de esta última evaluación es la disparidad de producción de ácidos orgánicos.

Se observa una buena proporción de plásmido hacia el final del cultivo poniendo en evidencia que los resultados obtenidos muestran la misma tendencia de estabilidad del vector en la cepa DH5 α (Sección. 5.2.5.1.1).

Los resultados mostraron notorias diferencias entre ambas cepas de estudio. Para la BL21 (DE3), en cuanto a consumo de fosfato se encuentran similares resultados a los reportados por R.Y. Stainer [48], puede verse que el mismo es independiente para ambas concentraciones de glucosa y fosfato inicial, y es aquí donde se centrara parte de la discusión pensando en optimizar el momento de inducción de la expresión. Puede verse que la DH5 α sería más “eficiente” en términos de síntesis de biomasa asociada al fosfato, pero a expensas de un mayor consumo de glucosa, y un menor rendimiento celular (Fig.72).

Hemos visto una muestra de la complicada naturaleza de la regulación metabólica para realizar procesos de fermentación con limitación de fosfato. Se sabe que las reacciones bioquímicas en el metabolismo central del carbono están reguladas por la fosforilación y desfosforilación de enzimas. De las experiencias previas, cuando se disminuye el umbral de

Capítulo 5

0.5 mM, existe una etapa de adaptación donde los niveles de transcripción implicadas en la regulación bajo limitación de fosfato implica una activación de la glucólisis debido a una mayor tasa de consumo de glucosa por mmol de fosfato situación que puede deberse a una mayor demanda de ATP debido a la disminución de ATP para obtener fosfato disponible generando un desbalance de la relación $[ATP] / [ADP]$ en el flujo glucolítico. La obligación de obtener más ATP obliga a desviar el metabolismo a rutas menos desfavorables obteniendo como hemos vistos productos como acetato y lactato, entre otros.

Resumiendo, el aumento en el consumo de glucosa puede deberse a la demanda de ATP causada por la producción limitada de ATP bajo la limitación de fosfato.

Claramente en esta situación debemos pensar que en el diseño de un BA a medida que nos vayamos limitando en fosfato el consumo de glucosa en la alimentación será más exhaustivo con el correr del cultivo [49].

Sera necesario de alguna manera ir evaluando la relación de fosfato consumido respecto a la glucosa de manera que el producto pueda limitarse en fosfato y no en glucosa a modo de poder alimentar el cultivo con una cantidad de fosfato mínima basal y obviamente glucosa con fuentes de minerales para favorecer la expresión de angiostatina. Mientras no haya limitación tal (por encima de 1 mM de fosfato) la relación de glucosa y fosfato será cercana a 6 ± 0.5 . Según los resultados obtenidos en (Tabla. 37) en erlemneyer arrojó un valor cercano a 4 pero por debajo de 2 mM de fosfato, la relación se duplicó. Eso nos hace suponer que en el momento de llegar al fin de la etapa batch el consumo de glucosa se incrementará y deberíamos alimentar el cultivo con cada vez más glucosa para disminuir el fosfato e inducir el promotor.

Parecería ser que el principal problema para obtener una determinada cantidad de biomasa llegando a limitar en fosfato el sistema para luego inducir la expresión, es la tarea de compensar con glucosa los cambios metabólicos. Por ello hemos pensado en desarrollar un diseño de control no lineal debido a que es un proceso inestable, respecto a la demanda de glucosa. Para intentar clarificar dicha conjetura se propuso una experiencia de cultivo en batch alimentado a los fines de determinar qué cantidad de glucosa sería necesaria para poder consumir el fosfato y lograr la activación del promotor.

Capítulo 5

5.2.6 Evaluación complementaria de cultivo de batch alimentado

Históricamente a lo largo de muchos años fue motivo y lo sigue siendo el desarrollo de determinaciones on-line mediante el uso de sensores reproducibles para tomar decisiones rápidamente sobre el curso de un proceso [50]. Muchos de ellos se han sugerido como herramientas potentes para estimaciones en línea de variables para poder controlar el proceso biológico en la mayor medida posible, de manera de evitar la formación de subproductos inhibitorios en forma de ácidos orgánicos, causado por sobre flujo (Sección. 1.5.3) o simplemente determinar cuándo se agotó algún nutriente [51]. En nuestro caso para obtener una alimentación controlada deberíamos poder controlar un μ . Para ello, deberíamos poder determinar online variables directas como la concentración de fosfato inorgánico, glucosa, etc. Claramente este aspecto no pudo ser abordado por las situaciones antes mencionadas, pero no queríamos dejar de presentar la situación de factibilidad a futuro de este aspecto con la nueva cepa encontrada más estable a nivel interacción hospedador – vector.

Se deseó evaluar una prueba de cultivo en batch alimentado basado en ensayos previos, donde se ponderaron varios factores, por un lado la estabilidad del plásmido que fue mayor en la cepa DH5 α , y por otro lado el medio de cultivo para la cepa DH5 α , en esta oportunidad LP (Sección. 5.2.5.1.1). Si bien anteriormente no se había evidenciado expresión, se asume que esto fue debido a que el cultivo no llegó a limitarse en fosfato el tiempo suficiente debido a la carencia de glucosa suficiente para agotar el fosfato remanente. Aquí la estrategia a seguir es en base a la idea que las bacterias consumen oxígeno cuando consumen glucosa, si hay fosfato próximo a agotarse, asumimos que las bacterias consumirán más rápidamente la glucosa, por lo tanto, la alimentación de glucosa solo aumenta si hay una respuesta en el oxígeno disuelto. La desventaja de esta alimentación indirecta implica que podemos estar alimentando sin que se haya agotado la glucosa. La demanda de ser tal, tal vez llegaría a requerir en una alimentación exponencial como se mencionó en (Sección 2.2). La alimentación se inicia una vez que la glucosa inicialmente añadida al medio se agotó (como un pico incremental de %DO). En este punto,

Capítulo 5

la μ en respuesta a un aumento manual en la alimentación, podría determinarse mediante DO_{stat} .

El diseño se desea realizar de modo tal que, teóricamente, se alcance una $X_i = 10 \text{ gr.L}^{-1}$ (final de la etapa Batch), en un volumen inicial de $V_i = 3.0 \text{ L}$. Basándose en esto y considerando de experiencias previas (Sección 5.2.5.1) que $\mu_{m\acute{a}x} = 0.36 \text{ h}^{-1}$ y que $Y_{x/s} = 0.42 \text{ g cel/g sustrato}$ para obtener 10 gr de biomasa se requerirían en el reservorio 59.2 gr.L^{-1} de glucosa en el reservorio. Se utilizarán 25 gr.L^{-1} de glucosa y una concentración de fosfato de 3 mM , para esta cantidad teórica de glucosa se debería incorporar 15 mM de fosfato, con cinco veces menos de fosfato, aseguraremos sobre el final de la etapa batch que se comience a limitar en fosfato y se incremente de esta manera el consumo de glucosa casi abruptamente, con lo cual se espera que el sistema al final del batch este limitado en ambos recursos. Llegado el final de la etapa batch el medio de alimentación será básicamente un medio de mantenimiento conteniendo por litro del mismo: 60 gr de glucosa; 1.6 mmoles de fosfato; 7 gr de MgCl_2 y la correspondiente cantidad de metales traza (500X) y ampicilina de manera habitual. El caudal de la bomba se regula a 300 ml/h de manera de *estimar* un consumo, estimado de $0.106 \text{ mmoles de fosfato/g glucosa h}^{-1}$.

5.2.6.1 Resultados

El objetivo aquí fue censar el momento de agotamiento de glucosa y determinar el fosfato remanente. Naturalmente, estas determinaciones se realizaron offline y lógicamente tienen una demora que conlleve en tomar la medida correctiva. El %DO luego cuando se ha añadido una cierta cantidad de sustrato en el cultivo. Para poder trabajar de manera efectiva, la transferencia de oxígeno debe mantenerse lo suficientemente alta durante el tiempo de estudio aumentando la velocidad de agitación y el flujo de aireación [52].

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos en dos estadios de alimentación, dado a que impensadamente, el primer estadio solo logra producir un incremento de biomasa cercano al 3%. Se comenzó a alimentar debido al brusco salto de oxígeno disuelto producido (Fig. 79).

Capítulo 5

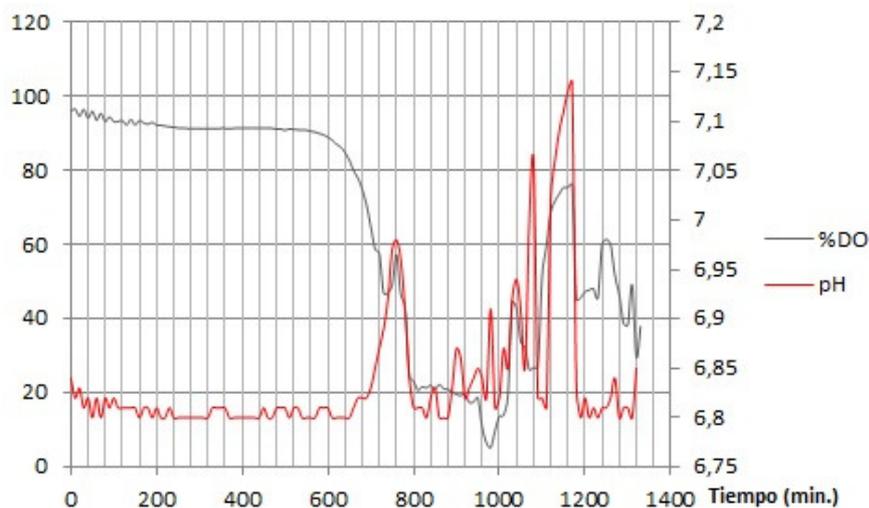


Figura 79. Evolución del %DO y el pH del cultivo a lo largo del tiempo de proceso.

μ (h^{-1})	Concentración ($gr.L^{-1}$)					Vel. Agitación (r.p.m)	%DO	yx/s (c-molx/c-mols)	Tiempo (hs)	Volumen (ml)
Etapa Batch										
	PS	Glucosa	Acetato	PO_4^{-3}	Lactato					
0.224	6.92	2.200	1.750	0.580	0.000	350	22.2	0.420	13.5	2995
Etapa Batch Alimentado 1 ($300 ml.h^{-1}$)										
0.100	7.10	0.000	ND	ND	ND	550	26.3	0.015	3.3	3895
Etapa Batch Alimentado 2 ($50 ml.h^{-1}$)										
0.290	7.07	0.200	0.200	0.360	2.270	550	38	0.173	2.0	3995

Tabla 40 Comparación de los valores de concentración de ácido acético y ácido láctico y rendimiento de biomasa celular después de operar en diferentes modos.

Los cálculos fueron realizados sobre el final de la etapa batch donde se comienza a limitar en fosfato y en glucosa arrojaron un valor de $\mu_{m\acute{a}x} = 0.224 h^{-1}$.

Contenido de plásmido a diferentes tiempos de cultivo

Las determinaciones cualitativas en el contenido de plásmidos se hicieron a partir del análisis electroforético. El patrón del gel de agarosa al 1% después de la tinción demuestra que todas las muestras aisladas tienen el mismo tamaño.

Capítulo 5

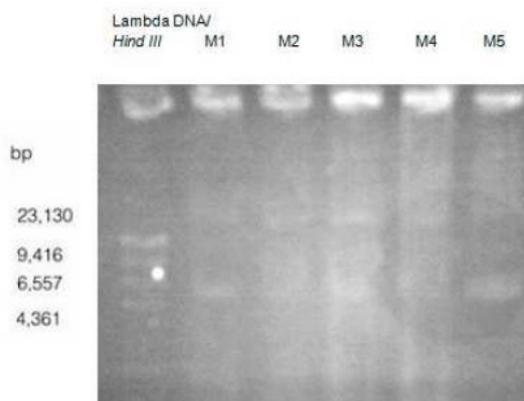


Figura 80. Comparación del contenido de plásmido. M1 (fin etapa batch); M2 (800-1000 min); M3 (1000-1100 min); M4 (1100-1200 min) y M5 fin del cultivo.

Si bien no es del todo comprable sobre todo debido a las diferencias encontradas en la sección anterior, se quiere mostrar que el “mantenimiento” de la cepa DH5 α es de varios ordenes de magnitud que el real obtenido con la cepa BL21 (DE3), la evidencia, es sobre todo en la fase 2 de alimentación donde incluso con una S_r de 20% de glucosa, si bien fue muy estrecho el lapso, no se logró reducir el fosfato en un orden capaz de inducir la expresión. Al finalizar la alimentación solo se detectó en el medio 0.2 gr.L⁻¹ de glucosa y 0.36 mM de fosfato. La determinación de angiostatina arrojó resultados negativos tanto para WB como para DB.

El mayor mantenimiento del plásmido, pero sin evidenciar amplificación, respecto de la cepa BL21 (DE3) probablemente afecte negativamente al metabolismo. Una de las señales de estrés debido a la inducción, es la amplificación en el número de copias del plásmido (Sección. 1.5.3) [53]. Este fenómeno lo hemos evidenciado y es bien conocido bajo la inducción mediante IPTG pero no hay evidencia del fenómeno debido a la inducción mediante el promotor de la fosfatasa alcalina. Podemos decir únicamente que el plásmido estuvo en todo el periodo del cultivo.

Para la alimentación de glucosa, la estrategia elegida fue una mezcla de DO_{stat} y pH-stat, simplemente por ser simple y confiable, sobre el final de la etapa batch, el pH comenzó a aumentar a medida que se agotaba la glucosa inicial. Esto era probablemente a la desaminación de aminoácidos en el medio cuando se los utiliza como FCE. Este aumento en el pH se usó como una señal para alimentar con glucosa, cuando el valor de pH se elevó por encima de 7.0, mientras que la bomba peristáltica para la alimentación de un 20% de

Capítulo 5

solución de glucosa. Como se ve en la tabla, la concentración de glucosa se mantuvo a un nivel muy bajo y la concentración de fosfato estuvo por debajo de 0.50 mM durante el período de alimentación. La acumulación de ácido acético ocurrió en la fase final de la etapa batch, y la concentración máxima estuvo por debajo de 2.0 gr.L⁻¹, y luego disminuyó rápidamente a medida que la glucosa ingresaba. Durante la fase estacionaria, la concentración de ácido acético concentración fue menor pero se incrementó la de ácido láctico, no obstante el cultivo podría estar limitado en algún otro nutriente o bien consumiendo fosfato de alguna otra reserva dado a que no hay forma de saber porque tanta glucosa no pudo disminuir los niveles de fosfato inorgánico para poder inducir el promotor.

5.3 Bibliografía

- [1] Malgorzata Kesik-Brodacka. Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnol Appl Biochem.* 2018; 65(3): 306–322.
- [2] Sezonov G., Joseleau-Petit D., D'Ari R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol.* 2007; 189 (23): 8746-8749.
- [3] Manual del pET 11ed.
- [4] Calam, C.T. Shake-Flasks Fermentations. *Manual of Industrial Microbiology.* A. S. Microbiol.1986; 59-63.
- [5] S Bhaduri, P H Demchick. Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies. *Appl Environ Microbiol.* 1983 Oct;46 (4):941-3.
- [6] Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(5):a000414.
- [7] Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol.* 2004 Nov;22(11):1399-408.

Capítulo 5

- [8] Lee, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. 1996; Tibtech. Elsevier Science Ltd. 14: 431 – 438.
- [9] M J Park. cDNA cloning and expression of angiostatin, an angiogenesis inhibitor, from human liver tissue mRNA. 1999, J. Korean Cancer Assoc.; 31(6): 1236-1245.
- [10] Lucas R, Holmgren L, Garcia I, Jimenez B, Mandriota SJ, Borlat F, Sim BK, Wu Z, Grau GE, Shing Y, Soff GA, Bouck N, Pepper MS. Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells. Blood. 1998 Dec 15;92(12):4730-41.
- [11] Xu ZN, Shen WH, Chen H, Cen PL. Effects of medium composition on the production of plasmid DNA vector potentially for human gene therapy. 2005. Journal of Zhejiang University. Science. 6(5): 396-400.
- [12] Wang A, Clapper J, Guderian JA, Foy TM, Fanger GR, Retter MW, Skeiky YA. A novel method for increasing the expression level of recombinant proteins. 2003. Protein Expr Purif. Jul; 30(1): 124-33.
- [13] Li-Chun Cheng, Lien-I Hor, Jau-Yann Wu, Teh-Liang Chen. Effect of specific growth rate on the production of a recombinant nuclease by *Escherichia coli*. 2003. Biochemical Engineering Journal 14; 101–107.
- [14] Wang, L., Schumann, U., Liu, Y., Prokopchuk, O. & Steinacker, J. M. Heat shock protein 70 (Hsp70) inhibits oxidative phosphorylation and compensates ATP balance through enhanced glycolytic activity. 2012. J. Appl. Physiol. 113, 1669–1676.
- [15] Thiry M, Cingolani D. Optimizing scale-up fermentation processes. 2002. Trends Biotechnol. Mar;20(3):103-5.
- [16] Neubauer P, Lin HY, Mathiszik B. Metabolic load of recombinant protein production: inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*. 2003. Biotechnol Bioeng. Jul 5; 83(1): 53-64.
- [17] Jürgen, B., Lin, H.Y., Riemschneider, S., Scharf, C., Neubauer, P., Hecker, M., Schweder T. Monitoring of genes that respond to overexpression of recombinant protein in *Escherichia coli* fed-batch process. 2001. Biotechnol Bioeng 73: 349-357.

Capítulo 5

- [18] V. Babaeipour, S.A. Shojaosadati, S.M. Robotjazi, R. Khalilzadeh, N. Maghsoudi. Over-production of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. 2007. *Process Biochemistry*. 42 (1): 112-117.
- [19] Rowe D. C, Summers D. K. The quiescent-cell expression system for protein synthesis in *Escherichia coli*. 1999. *Appl Environ Microbiol*. 65 (6): 2710-2715.
- [20] Mukherjee K. J, Rowe D. C, Watkins N. A, Summers D. K. Studies of single-chain antibody expression in quiescent *Escherichia coli*. 2004. *Appl Environ Microbiol.*, 70 (5): 3005-3012.
- [21] Summers D. K, Chant E. Chemical induction in quiescence in bacteria. Patent US2009/0004700A1. 2009.
- [22] Johansson L, Lindskog A, Silfversparre G, Cimander C, Nielsen KF, Liden G: Shikimic acid production by a modified strain of *E. coli* (W3110. shik1) under phosphatelimited and carbon-limited conditions. 2005. *Biotechnol Bioeng.*, 92 (5): 541-552.
- [23] Wolfe AJ. The acetate switch. 2005. *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar; 69(1):12-50.
- [24] Neidhardt FC, Bloch PL, Smith DF. Culture medium for enterobacteria. 1974. *J Bacteriol*. 119(3): 736-47.
- [25] B L Wanner and M R Wilmes-Riesenberg. Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. 1992. *J Bacteriol*. 174(7): 2124–2130.
- [26] Damoglou AP, Dawes EA. Studies on the lipid content and phosphate requirement of glucose-and acetate-grown *Escherichia coli*. 1968. *Biochem J*. 110 (4): 775-81.
- [27] Bauer S, Ziv E Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. 1976. *Biotechnol. Bioeng*. 18(1): 81-94.
- [28] Roels JA. Application of macroscopic principles to microbial metabolism. 2009. *Biotechnol Bioeng*. 103 (1): 2-59; discussion 1.
- [29] D. Weuster-Botz, J. Altenbach-Rehm, M. Arnold Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks *Biochem. Eng. J.*, 7 (2001), pp. 163-170.

Capítulo 5

- [30] Glick BR. Metabolic load and heterologous gene expression. 1995. *Biotechnol Adv.* 13(2): 247-61.
- [31] Cooney, Charles L., Henry Y. Wang, and Daniel I. C. Wang. Computer-Aided Material Balancing for Prediction of Fermentation Parameters. 1977. *Biotechnol Bioeng.* 19 (1): 55–67.
- [32] Sanjoy K Bhattacharya, Ashok K. Dubey. Metabolic burden as reflected by maintenance coefficient of recombinant *Escherichia coli* overexpressing target gene. 1995. *Biotechnol Lett.* 17 (11): 1155–1160.
- [33] Marzan L.W, Shimizu K. Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its phoB and phoR genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. 2011. *Microb Cell Fact.* 10-39.
- [34] Riesenber D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. 1999. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 51:422-430.
- [35] Andersson L, Shaojun Yang, Peter Neubauer, Sven-olof Enfors. Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*. 1996. *Journal of Biotechnology.* 46(3):255-263.
- [36] Xu B, Jahic M, Blomsten G, Enfors SO. Glucose overflow metabolism and mixed acid fermentation in aerobic large scale fed batch processes with *Escherichia coli*. 1999. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:564–571.
- [37] Riesenber D, Menzel K, Schulz V, Schumann K, Veith G, Zuber G, Knorre WA. High cell-density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon. 1990. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:77–82.
- [38] P.K.R. Kumar, H-E. Maschke, K. Friehs, K. Schügerl. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. 1991. *Trends in Biotechnology.* 9(1): 279-284.
- [39] Monod, J. The growth of bacterial cultures. 1949. *Annual Review of Microbiology.* 3: 371–394.
- [40] S. J. Pirt. Principles of microbe and cell cultivation. 1975. Halsted Press book.

Capítulo 5

- [41] Kovárová-Kovar K, Egli T. Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. 1998. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(3):646-66.
- [42] Urs Lendenmann, T. Egli. Kinetic models for the growth of *Escherichia coli* with mixtures of sugars under carbon-limited conditions. 1998. *Biotechnol Bioeng.* 59 (1): 99–107.
- [43] Jeong-Yoon Kim, Dewey D. Y. Ryu. Physiological and Environmental Effects on Metabolic Flux Change Caused by Heterologous Gene Expression in *Escherichia coli*. 1999. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4 (3): 170-175.
- [44] Jin-Ho Seo, James E. Bailey. Continuous cultivation of recombinant *Escherichia coli*: Existence of an optimum dilution rate for maximum plasmid and gene product concentration. 1986. *Biotechnol. Bioeng.* ; 28 (10) 1590-1594.
- [45] Imanaka, I. T. and Aiba, S. A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmid. 1981. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 369: 1-14.
- [46] Phue JN, Lee SJ, Trinh L, Shiloach J. Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5alpha). 2008. *Biotechnol. Bioeng.* 101(4): 831-6
- [47] Han Y, Li ZM, Du P, Gan RB, Ye Q. Production of human epidermal growth factor in fed-batch culture of acetate-tolerant *Escherichia coli*. 2007. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15(5): 760-764.
- [48] Schwartz, W., R. Y. Stanier, E. A. Adelberg and J. L. Ingraham, *The Microbial World* (4th Edition). XV, 871 S., 614 Abb., 165 Tab. Englewood Cliffs 1976. *Z Allg Mikrobiol*, 19: 151-151.
- [49] Lee, S.S. Mohler. R.D. Contolled growth rate fermentation. 1988. EP 0 315 944 A2.
- [50] Cleland, N., Enfors, SO. Control of glucose-fed batch cultivations of *E. coli* by means of an oxygen stabilized enzyme electrode. 1983. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 141–147.

Capítulo 5

- [51] Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 1995 Feb 21;39(1):59-65.
- [52] Cutayar, J.M., Poillon, D. High cell density culture of *E. coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. 1989. *Biotechnol Lett* 11, 155–160.
- [53] Teich, A., Meyer, S., Lin, H.Y., Andersson, L., Enfors, S.-O. and Neubauer, P. Growth rate related concentration changes of the starvation response regulators σ^S and ppGpp in glucose limited fed-batch and continuous cultures of *Escherichia coli*. 1999. *Biotechnol. Prog.* 15, 123-129.

CAPITULO 6:

IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN

DE ANGIOSTATINA.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD

BIOLÓGICA.

6.1 Introducción

Tal cual se muestra en el capítulo anterior, la angiostatina ha sido clonada y expresada en *E. coli* utilizando el promotor de T₇ y el *phoA* que fue adoptado como modelo para investigar la expresión en *E. coli* por limitación de fosfato inorgánico. En la (Fig. 41) se pone en evidencia que la angiostatina se obtiene con el peso y el tamaño correcto. En el presente capítulo, se presentarán los resultados de la purificación y del estudio de la actividad biológica de la angiostatina mediante el ensayo de formación de tubos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) mediante el uso de una matriz artificial que favorece el crecimiento de los vasos sanguíneos (Matrigel®) (Sección. 3.3.1).

Durante la angiogénesis, las células endoteliales se activan mediante la unión de factores angiogénicos a sus receptores, liberando proteasas para disolver la membrana basal, migrando hacia señales angiogénicas, proliferando y aumentando en número de células para la formación de nuevos vasos sanguíneos.

El ensayo de formación de tubos HUVEC es uno de los ensayos de angiogénesis in vitro simples pero bien establecidos basados en la capacidad de las células endoteliales para formar una estructura tubular tridimensional similar a un capilar, que representa la etapa

Capítulo 6

posterior del proceso angiogénico. Durante el ensayo, las células HUVEC se diferencian, migran direccionalmente para alinearse, ramificarse y formar las redes poligonales de los vasos sanguíneos [1-2].

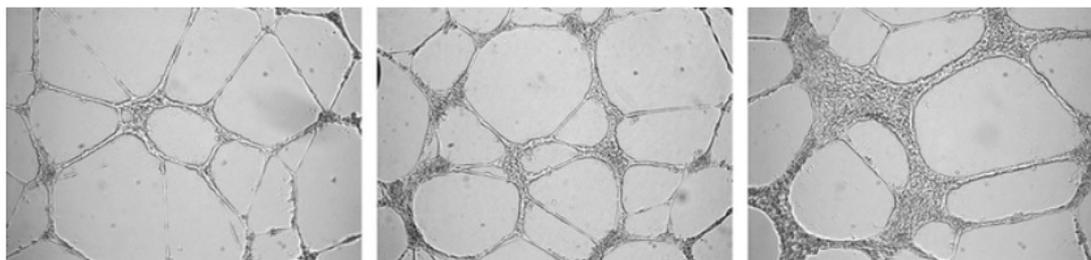


Figura 81 Efecto del número de células en la formación de tubos HUVEC.

Se utilizó el modelo de angiogénesis in vivo en Matrigel[®]. Básicamente se añadió la muestra conteniendo la angiostatina recombinante, directamente al Matrigel[®] en las concentraciones indicadas. Los controles negativos fueron suspensiones provenientes de extractos proteicos de *E.coli* de cepas WT o en estado sin inducción según fuera el caso. El próximo paso fue evaluar la actividad biológica de la angiostatina producida posterior al proceso de solubilizar y purificar los IB.

6.2 Metodología

6.2.1 Cultivo y expresión

Se trabajó nuevamente con la cepa BL21 (DE3)/pBKI-IV(1) con el medio MR con una concentración inicial de 0.9 mM de fosfato inorgánico dado que no ha manifestado la producción de metabolitos secundarios y posee un $y^{x/s}$ 0.37 (Tabla.17).

Como se mencionó, en base a los resultados anteriores, se utilizó MR, en una fermentación a escala de laboratorio. Durante la fermentación a 37 ° C, 800 ml de cultivo en 8 erlenmeyers por separado y se procesó según el protocolo indicado en la (Sección 3.4.3.4). La producción de biomasa fue monitoreada durante el cultivo mediante OD₆₀₀. Después de

Capítulo 6

22 h de cultivo, se determinó el fosfato remanente arrojando un valor prácticamente nulo. El pH, el amonio y la glucosa se monitorearon al final del cultivo.

6.2.2 Purificación de angiotatina

Se tomaron muestras de cada erlenmeyer y se centrifugaron a 5.000 g durante 10 min.

Se resuspendió el pellet en 25 ml de 50 mM Buffer fosfato pH 7.5. Se le adicionó al buffer 30 μ l de PMSF. Inicialmente la concentración promedio del cultivo fue de $1.21 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomasa. Por tanto en 800 ml de cultivo, $0.972 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Al re suspender en 25 ml se obtuvo una concentración celular de 38.9 g de biomasa en los 25 ml de suspensión.

Para la purificación de la angiotatina, el pellet bacteriano se lisó mediante prensa francesa (Sección. 3.4.3.4) [3] realizando tres pasajes obteniendo una resistencia máxima de 100 KN. Entre pasaje y pasaje se congelo la muestra por un lapso de 20 minutos a $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ en alcohol absoluto. Los cuerpos de inclusión se recogieron mediante centrifugación. El buffer de solubilización (Tris-HCl 584 mM, pH 8.6, Urea 8.125 M y 5.37 mM EDTA se añadió al sedimento. Posteriormente, la mezcla se trató con 5 μ l de 2-mercaptoetanol, y la solución se incubó a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h en atmósfera de nitrógeno (ambiente reductor). Posteriormente, a la solución reducida, se le añadió 1 ml de solución de urea 8 M (0.1 M Tris-HCl pH 8.0 conteniendo EDTA 1 mM) y se incubó a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación durante toda la noche. Luego se clarificó por centrifugación y se recogió el sobrenadante.

El paso final de la purificación se realizó utilizando una columna de Lys-Sepharose CL-4B Fast Flow (Pharmacia) la misma posee como ligando el aminoácido Lisina, que posee la afinidad suficiente para unirse específicamente a los dominios kringles de la angiotatina, pero para ello se realizaron tres procesos previos para facilitar la unión al ligando de la columna, de manera de eliminar ácidos nucleicos y restos proteicos, los mismos fueron: precipitación mediante sulfato de amonio, tratamiento con MgCl_2 y diálisis exhaustiva.

Precipitación de ácidos nucleicos: Se partió de a 1 ml de muestra proveniente de lisado, inicialmente se clarifico mediante centrifugación en tubo eppendorf por 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a 15000 r.p.m. Se tomó con cuidado el sobrenadante y el pellet conservándolo como control del experimento de extracción. El sobrenadante se colocó en un nuevo tubo

Capítulo 6

ependorf y se adicionaron 20 μ l de solución 1 M de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ se aplicó vortéx e inversión por 2 minutos y se centrifugo por 20 minutos a 15000 r.p.m a 4° C.

Fraccionamiento de angiostatina mediante sulfato de amonio: se investigaron los efectos de la saturación de sal (40-80%) del homogeneizado. Se fraccionaron alícuotas del sobrenadante y se adiciono $SO_4 (NH_4)_2$ saturado (aproximadamente 77%). Se agito suavemente hasta homogeneización total de la solución. Se incubo durante 16 hs a 4° C en cámara fría. Se centrifugaron las muestras mediante centrifugación por 20 minutos a 4° C a 15000 r.p.m. Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante mediante la técnica de Bradford (Sección 3.4.3.1) las muestras se diluyeron 1:4. Se realiza ensayo de DB para evaluar en qué fracción precipitó la angiostatina.

Diálisis exhaustiva: antes de sembrar la columna, se realizó diálisis mediante una membrana con un rango de corte de 12000 KDa de MWCO (SIGMA) D- 0530 DIALYSIS TUBING contra buffer fosfato pH 7.4 durante 16 horas se realizaron tres cambios de buffer. La cantidad de angiostatina purificada se determinó mediante el ensayo de Bradford. El volumen dializado obtenido fue de 1.5 ml, se tomaron 0.25 ml como contra muestra sin sembrar en la columna.

Se regenero la columna de afinidad según las indicaciones del fabricante (Sección. 3.4.3.5).

Purificación mediante Lys-Sepharose CL-4B: El procedimiento se basa en el trabajo de Deutsch y Mertz [4] quienes trabajaron en el purificación del plasminógeno a partir de plasma humano en la década del setenta. Con el aminoácido lisina inmovilizado se puede principalmente aislar el plasminógeno y el activador del plasminógeno. Los grupos ϵ -amino y α -carboxilo en la lisina están libres después de la inmovilización e interactúan con una gama de biomoléculas.

La muestra consistió de 1.5 ml utilizando además 3 ml de buffer fosfato 50 mM (pH 7.4) para su siembra. Esta solución se cargó a una velocidad de flujo de 30 $ml \cdot h^{-1}$ en una columna (2.6 x 8.7 cm) conteniendo la resina de lisina Sepharose 4B previamente equilibrada con buffer fosfato 50 mM (pH 7.4) para eliminar cualquier restos de proteínas unidas inespecíficamente. Posteriormente la matriz se lavó con el mismo buffer fosfato 50 mM (pH 7.4) hasta que el A_{280} regresó a la línea base y posteriormente se lavó buffer

Capítulo 6

fosfato 50 mM / NaCl 0.5 M (pH 7.5) para eliminar proteínas unidas inespecíficamente. La angiostatina se eluyó con aproximadamente 50 ml de ácido ϵ - amino caproico 200 mM.

Se tomaron lecturas de las muestras de manera diluida 1:10 se leyeron las muestras mediante DO_{280} . Se midió inicialmente DO_{280} 1:10 como control de proceso; por otra parte se registró la DO_{310} para realizar una corrección por turbidez. La $DO_{280-310}$ nm igual a 1 corresponde a una concentración de proteínas de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [5]. Las fracciones fueron conservadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Medida de actividad antiangiogénica de la angiostatina recombinante purificada:

Los cultivos primarios de HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Lonza) se cultivaron en placas tratadas con gelatina bovina con medio EBM2 (Endothelial Basic Medium 2, Lonza) suplementado con EGM2 (Endotelial Growth Medium, Lonza). Todos los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 2mM de L-Glutamina y 100 u/ml de Penicilina/streptomycin (Gibco). Para hacer pases de las células, éstas se levantaron usando una solución de Tripsina-EDTA (0.05% y 0.02%, respectivamente).

Para el ensayo de formación de tubos, se sembraron 100.000 células HUVECs por pocillo, y se cultivaron a 37°C en medio EGM-2/EBM-2 sobre placas de 24 pocillos recubiertas de matrigel (Becton Dickinson) a una dilución $\frac{1}{2}$ en medio DMEM sin SFB ni antibióticos. Se comenzaron a tomar fotografías de los pocillos a partir de 3 horas hasta las 12 horas después de haberlas sembrado. Las células endoteliales HUVEC son capaces de formar estructuras tubulares in vitro cuando son incubadas sobre una matriz artificial denominada Matrigel[®] (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA). Placas de 24 pocillos se recubrieron con Matrigel[®] (150 μl por pocillo) y se dejó gelificar a 37°C durante 30 minutos. Luego, se sembraron 3×10^4 células en cada pocillo y se incubaron en presencia o ausencia de los extractos (5 o 10 μg) durante 20 horas en la estufa de cultivo. La formación de cordones endoteliales fue fotografiada a una magnificación de 40X y 100X en un microscopio invertido de campo claro y se procedió a la cuantificación de las estructuras tubulares por campo.

6.3 Resultados

Capítulo 6

La (Tabla.41) muestra los resultados finales de los cultivos en batch realizados. A las 24 h de cultivo, se centrifugaron las muestras y se recogió el sobrenadante para realizar las determinaciones analíticas.

Erlenmeyer	pH 24h	DO ₆₀₀ 24 h	PO ₄ 24 h mmoles.l ⁻¹	Peso seco 24 h g·L ⁻¹	NH ₄ ppm 24 h g·L ⁻¹	Glucosa 24 h g·L ⁻¹
2	6.85 ± 0.02	2.08 ± 0.10	0.02 ± ND	1.22 ± 0.10	19.6 ± ND	0.111 ± ND
4	6.84 ± 0.02	2.22 ± 0.06	0.01 ± ND	1.37 ± 0.12	19.6 ± ND	0.108 ± ND
6	6.86 ± 0.01	2.12 ± 0.10	0.01 ± ND	1.17 ± 0.10	19.6 ± ND	0.106 ± ND
8	6.84 ± 0.03	2.03 ± 0.08	0.00 ± ND	1.16 ± 0.05	19.8 ± ND	0.110 ± ND

(Tabla. 41) Parámetros finales de los cultivos realizados. La primera columna muestra que solo se testaron los cultivos pares.

El pellet de cada cultivo se resuspendió en 25 ml de 50 mM de Buffer fosfato pH 7.5. Se le adiciono al buffer 30 µl de PMSF. Posteriormente, se procedió según (Sección. 3.4.3.4) realizando tres pasajes mediante prensa. La angiostatina obtenida en forma de IB del lisado bacteriano, se trató mediante un proceso de solubilización con urea 8 M según Park y col. [6] la muestra fue incubada con solución de urea 8 M (Buffer Tris-HCl 0.584 M a pH 8.6 que contiene 8.125 M urea y 5.37 mM EDTA) para la reducción. Posteriormente, la mezcla se trató con 5 µl de 2-mercaptoetanol, y la solución se incubó a 40 ° C durante 1 h en atmósfera de nitrógeno (solución reducida). Posteriormente, a la solución reducida, se le añadieron 1 ml de solución de urea 8 M (0.1 M Tris-HCl pH 8.0 que contenía EDTA 1 mM) se preincubó a 4 ° C agitación durante toda la noche.

La fracción solubilizada se sometió a un proceso de purificación de manera de no introducir proteínas contaminantes. Antes de sembrar la muestra en la columna de purificación (Sección. 3.4.3.5) la fracción soluble previamente clarificada se sometió a un proceso de purificación parcial que involucro una precipitación de los posibles restos de ácidos nucleicos de la muestra y un posterior paso de concentración mediante sulfato de amonio y su posterior diálisis exhaustiva. De cada fracción preliminarmente se realizó DB (Sección 3.3.9) y una vez que se escogió el rango de fraccionamiento se trató el resto de la muestra. En esta etapa preliminar se trabajó con 1 ml de muestra.

Capítulo 6

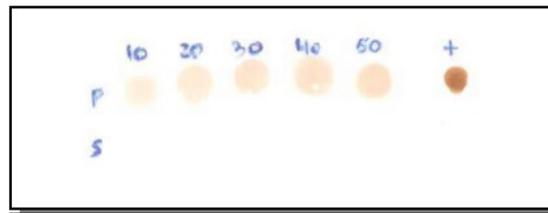


Figura 82 DB de pruebas de precipitación con sulfato de amonio.

Las referencias son las siguientes P: Corresponde a las muestras del Pellet (10) equivale a un % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 69.6; (20) equivale a un % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 61.9; (30) equivale a un % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 54.1; (40) equivale a un % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 46.4; (50) equivale a un % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 38.7; (+) Control Positivo; S: Corresponde a las muestras del sobrenadante retratado de la prensa.

A medida que aumentaba la concentración de sulfato de amonio, se observa que la angiostatina se precipitaba en mayor proporción. Preferentemente con una saturación de sal del 30%, casi todo se había recuperado en el precipitado. La precipitación se asoció con la naturaleza hidrófoba de la angiostatina (Capítulo. 4). La precipitación completa de la proteína total requirió concentraciones de sal superiores al 20% de la saturación. En definitiva, se observa que se obtiene señal correspondiente a angiostatina solamente en el pellet, con lo cual para todo el rango evaluado % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ la angiostatina precipito.

Luego se purifico el resto de la muestra (aproximadamente 2.5 ml) precipitando previamente los ácidos nucleicos, y tratando con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en un rango de 45% a 55% concentrando las proteínas del pellet mediante diálisis y re suspendiendo con 50 mM de buffer fosfato pH 7.4 en un volumen de 0.2 ml de manera de concentrar. De esta manera se sembrara en la columna una muestra de mayor grado de pureza en menor volumen. Se realizó diálisis mediante una membrana con un rango de corte de 12000 KDa de MWCO (SIGMA) D- 0530 DIALYSIS TUBING contra buffer fosfato pH 7.4 durante 16 horas se realizaron tres cambios de buffer. (Sección. 3.4).

Se regenero la columna de afinidad según las indicaciones del fabricante (Sección. 3.4.3.5). La angiostatina eluyó como muestra la figura 99 con aproximadamente 50 ml de ácido ϵ -aminocaproico 200 mM.

Capítulo 6



Figura 83 Esquema del sistema de purificación.

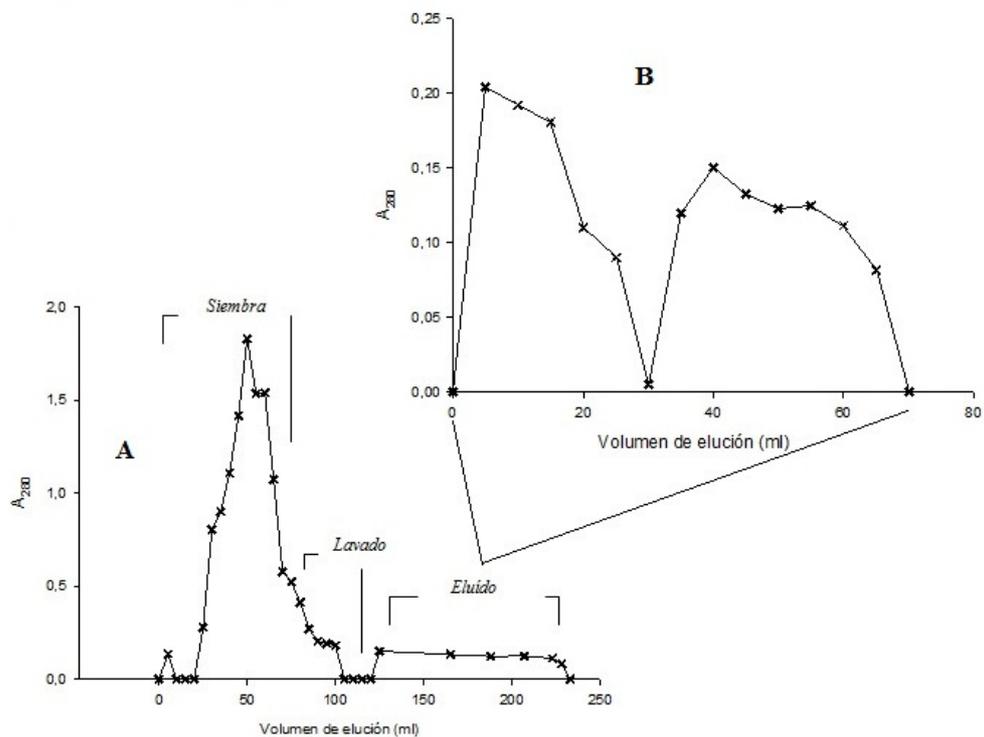


Figura 84 Perfil de elución de la angiostatina recombinante. A. gráfica del proceso. B. gráfica en escala de la región de elución.

La posterior medición de la actividad de la angiostatina y la cuantificación cantidad de proteínas totales de cada una de las muestras, es una forma confiable para seguir los

Capítulo 6

distintos pasos de un proceso de purificación, también sirve para determinar cuáles fueron los pasos más importantes del proceso y permite discriminar que pasos pueden ser eliminados por tener un bajo factor de purificación o bajo rendimiento, lo cual es importante para abaratar los costos de purificación.

Las muestras fueron cuantificadas mediante la técnica de Bradford. La siguiente (Tabla.42) muestra el esquema de purificación general.

Operación	Prot. Tot. (mg)	Vol. (ml)	Y (%)
Sobrenadante inicial Ruptura prensa	6.18	1.0	100
Urea 8 M (0.1 M Tris- HCl pH 8.0 EDTA 1 mM)/β- mercaptoetanol	ND	1.0	ND
Tratamiento con MgCl ₂ 1M	5.15	1.5	83.3
Tratamiento con 40 % (NH ₄) ₂ SO ₄ (pellet)	2.94	1.5	57.1
Diálisis exhaustiva	2.20	1.5	42.8
Lys-Sepharose CL-4B columna (B) †	0.47	2.7	9.14

(Tabla. 42) Esquema de purificación de la angiotatina recombinante.

† Corresponde al pool de elusión B (Fig.84).

Capítulo 6

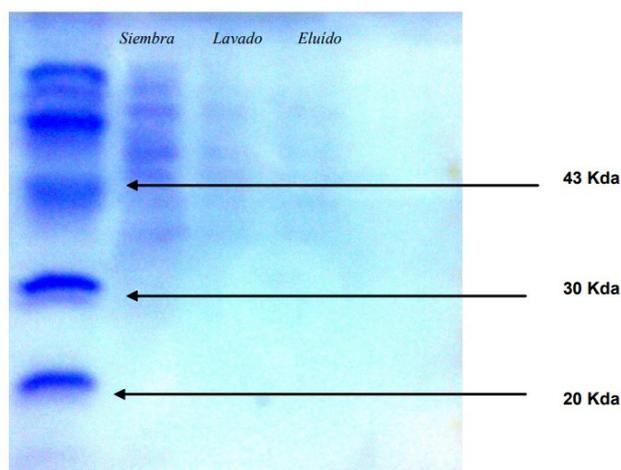


Figura 85 SDS-PAGE 12.5% del proceso de purificación de la angiostatina extraída de las fracciones de la cromatografía (Fig. 84). El gel se tiñó con azul brillante de Coomassie.

En la figura 85, se identifican las fracciones de siembra y lavado, observamos el perfil característico para la movilidad de restos de angiostatina con pesos moleculares que varían entre 30 y 50 kDa en condiciones reductoras. Los restos entre 36 y 48 kDa podrían representar las formas de los kringle 3 y 4, respectivamente. Una banda de 38 kDa es visible, aunque no abundante en ambas fracciones. No se observa prácticamente nada en la calle de elusión. Paralelamente se realizó un DB para visualizar la fracción de angiostatina, pero no se observa ninguna señal para la fracción de la elusión. Tal vez los niveles de angiostatina en la fracción eluída fueron tan bajos que serían indetectables, por ello de todas maneras se procede a realizar el ensayo de actividad de angiogénesis in vitro con dicha fracción.

Se procesaron cuatro extractos correspondientes a la fracción soluble eluída (S) o (B) (Tabla. 42) y al pellet (P) del cultivo que expresa angiostatina (A₄) y su correspondiente control (Control)¹¹ [7]. En estos extractos se cuantificó la cantidad de proteína total por la técnica de Bradford.

La cantidad de proteínas totales en el eluído arrojó un valor promedio de 400 µg / ml. Se procedió como se describió en (Sección 3.3.1). Se evaluaron dos concentraciones de proteína de manera de determinar el efecto a 5 y 10 µg / ml.

¹¹ Extracto de *E. coli* BL21 (DE3) que expresa la proteína P₂₄ del virus de Inmunodeficiencia Felina.

Capítulo 6

La figura 86 muestra los resultados de la angiogénesis in vitro de extractos con una concentración 5 µg / ml proteína total.

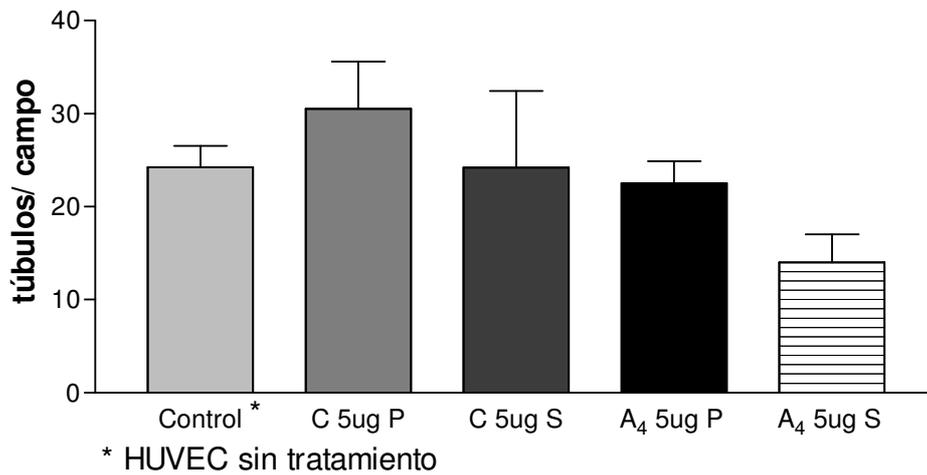


Figura 86 Angiogénesis in vitro de células HUVEC sobre matrigel 5 µg / ml proteína total.

De igual manera, la figura 87 muestra los resultados de la angiogénesis in vitro de extractos con una concentración 10 µg / ml proteína total.

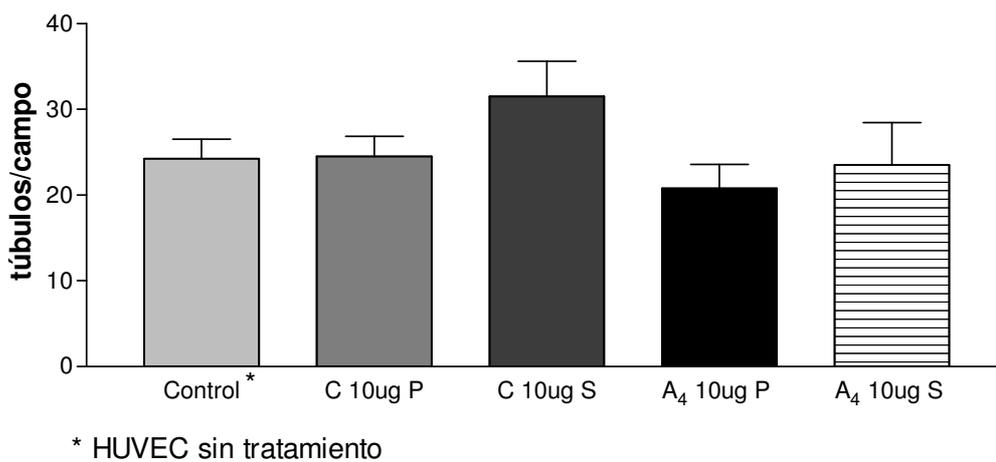


Figura 87 Angiogénesis in vitro de células HUVEC sobre matrigel 10 µg / ml proteína total.

Capítulo 6

Los resultados muestran que en la fracción eluída se disminuyó, aunque no de forma significativa, la formación de túbulos cuando fue incubado en una concentración de 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ($p > 0.05$; ANOVA contrastado con test de Dunnet). Por otra parte, la concentración de 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ no parece modificar sustancialmente la angiogénesis in vitro, y por otro lado, la cuantificación de la muestra de la fracción del pellet no tuvo efecto sobre la formación de estructuras vasculares.

En la figura 88 pueden verse las imágenes registradas mediante una magnificación de 40 X. Las muestras corresponden todas a la fracción soluble o eluída.

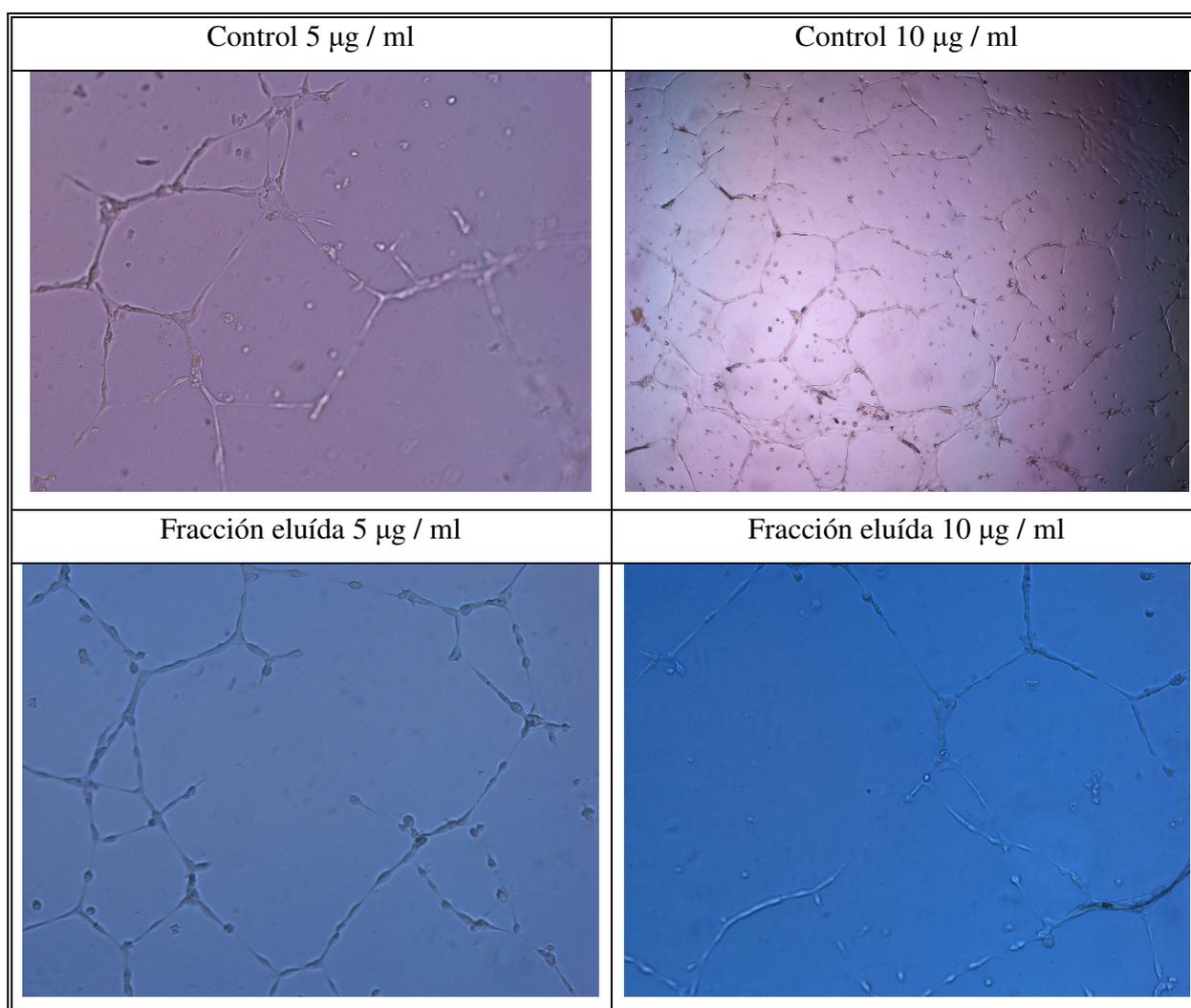


Figura 88 Microfotografías representativas del ensayo de angiogénesis in vitro de Células HUVEC sobre Matrigel®

Los canales vasculares formados por las células HUVEC fueron cuantificados obteniéndose los resultados volcados en la siguiente tabla.

Capítulo 6

Grupo	Túbulos vasculares por campo (media SD)
Control (5- 10 µg / ml)	23-32 ± 7.2- 4.4
Fracción eluída (5- 10 µg / ml)	14-24 ± 2.5- 2.9

Test estadístico utilizado: ANOVA contrastado con el test de Dunnet.

Tabla. 43 Número de túbulos formados por campo de células HUVEC en respuesta al tratamiento con angiostatina recombinante.

Una de las pruebas más específicas para la angiogénesis es la medición de la capacidad de las células endoteliales para formar estructuras tridimensionales (formación de tubos). Como conclusión de este primer ensayo de angiogénesis in vitro puede decirse, que si bien en términos de estrictez estadística no se hallaron diferencias significativas cuando se comparó con el control, puede verse que a una concentración de 5 µg / ml se mostró una mayor tendencia a inducir la reducción de túbulos por campo.

De todas maneras, intentamos establecer si aún en estas condiciones las preparaciones mostraban efectos de forma similar a lo reportado previamente por otros autores para lo que sería un ensayo in vivo. Con este fin evaluamos aquellas preparaciones que obtuvimos en cada purificación con excepción de las correspondientes que mostró solo una tendencia a una mayor capacidad de inducir per se la reducción de túbulos por campo.

Varios ensayos in vivo se utilizan para el estudio de la angiogénesis y actualmente se reconoce la necesidad de acceder a ellos para confirmar los ensayos obtenidos in vitro por tanto podría concluirse que en el futuro se puede afirmar que el estudio in vivo es imprescindible para una mejor interpretación de los resultados obtenidos, aunque siempre, las pruebas in vitro proporcionan la primera aproximación de la información y son las utilizadas en los primeros pasos.

Los resultados de los ensayos mostrados hasta el momento, se han realizado en células HUVECs sanas, se puede observar que si comparamos las células control con las HUVECs, tras el tratamiento con diferentes cantidades de angiostatina, migran más lento y forman menos tubos.

Nuestros datos sugieren que las células endoteliales tratadas mostraron *menor* tendencia de completar la formación de estructuras vasculares.

En una próxima experiencia se evaluara un ensayo in vivo CAM para medir la actividad antiangiogénica [8].

Capítulo 6

6.4 Bibliografía

- [1] Tahergorabi, Z. A review on angiogenesis and its assays. 2012. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 15(6): 1110-1126.
- [2] Donovan, D. Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. 2001. Angiogenesis, 4(2): 113-121.
- [3] Singh RS. A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from E. coli K-12. Indian J Exp Biol. 2013 Nov; 51(11):997-1003. PMID: 24416937.
- [4] Deutsch DG, Mertz ET. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography. 1970. Science. Dec 4;170(3962):1095-6
- [5] Stoscheck CM. Quantitation of protein. 1990. Methods Enzymol. 182:50-69.
- [6] J Park. cDNA cloning and expression of angiostatin, an angiogenesis inhibitor, from human liver tissue mRNA. 1999, J. Korean Cancer Assoc.; 31(6): 1236-1245.
- [7] Tizzano MA, Sguazza GH, Fuentealba NA, Galosi CM, Pecoraro MR. Diagnóstico de Inmunodeficiencia Felina mediante la Técnica de Western-Blot utilizando la Proteína P24 Recombinante. Cátedra Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Bs. As., Argentina. Revista Veterinaria Argentina.
- [8] Akanchha Shukla, Jyotika Rajawat, Sameer Dixit, Swapnil Mishra. Chapter 4 - Assays to evaluate tumor angiogenesis. Editor(s): Gauri Misra, Jyotika Rajawat. Protocol Handbook for Cancer Biology. Academic Press.2021 Pages 43-67. ISBN 9780323900065.

CAPITULO 7:

Discusión y Conclusiones

7.1 Discusiones

Así como se sabe que el plasminógeno humano es producido principalmente en el hígado y que se lo encuentra de dos maneras en diferentes sitios de glicosilación (Sección. 1.4.1), la angiostatina también existe de dos maneras, una glicosilada en Asn₂₈₉ y Thr₃₄₆ y otra glicosilada en Thr₃₄₆ y Ser₂₄₉, pero está demostrado por varios autores que ninguna de las formas están involucradas en el mecanismo de inhibición del crecimiento tumoral [1-2-3].

Por lo tanto la actividad demostrada de las formas de angiostatina expresadas en *Escherichia coli* (Tabla. 1 - Sección. 1.4.2), no depende de sus glicosilaciones (Sección 1.4.1) y por este motivo no es necesario una plataforma de expresión eucariótica para producir al menos una fracción de kringles que posea actividad de regresión vascular natural o tumoral [3].

Los clones positivos obtenidos para ambos vectores de expresión fueron secuenciados y comparados con la secuencia correspondiente en GenBank EMBL Data Bank: J05286 / AH002941.2 (Sección 4.4) [4]. Este resultado confirmó que se clono el cDNA de la angiostatina humana con un alto grado de similitud. Los dos sistemas de expresión mostraron expresión de angiostatina con algunas diferencias en el patrón de peso molecular, aunque dentro del rango esperado. Una vez que se verifico la integridad de la angiostatina mediante el sistema control (Sección. 5.1.2.2) el objetivo de este estudio fue evaluar las concentraciones de fosfato para lograr la expresión para luego observar el impacto de los parámetros del proceso en el crecimiento celular en función del estado metabólico, donde para ello se emplearon CC a diferentes velocidades de dilución (D^{h-1}).

El sistema de expresión mediante el promotor de la fosfatasa alcalina ha sido utilizado para expresar varias proteínas heterólogas (Tabla. 5 - Sección. 1.5.2), pero los estudios llevados a cabo sobre procesos de fermentación a la fecha son escasos. Desde aquellos primeros

Capítulo 7

trabajos de Lubke quien describió experimentos en erlenmeyers en un medio bajo en fosfato para la expresión del activador tisular del plasminógeno humano (tPA) bajo el control del promotor *phoA* [5]. El tPA es una serin proteasa de 68 kDa compuesta entre 527 a 530 aminoácidos y que contiene entre siete y un 13% de carbohidratos. La molécula, similar en complejidad de estructura a la angiostatina, está formada por cinco estructuras de dominio, entre ellas dos dominios kringle que están involucrados en la unión del tPA a la fibrina y quince puentes disulfuro. Posteriormente, Dien y colaboradores, representaron un modelo matemático que intentaba explicar el funcionamiento de la regulación del promotor y así poder ser utilizado más ajustadamente [6], hasta que finalmente, basados en los estudios de Kikuchi y colaboradores [7] Qin Ye y colaboradores lograron expresar el factor epidérmico de crecimiento humano (hEGF) en *Escherichia coli* YK537 (pAET-8) utilizando compuestos organofosforados debido al uso de medios complejos. La práctica del mismo fue un cultivo en batch en medio complejo y un trasvaso de la biomasa inoculando un reactor con medio mínimo libre de fosfatos y alimentado con FCE [8].

En la mayor parte de las bacterias, la fosforilación de la glucosa para formar glucosa 6-fosfato la hace el sistema de transporte de azúcar fosfoenolpiruvato. La fosforilación se acopla al consumo de azúcar y el grupo fosforilo es donado por el fosfoenolpiruvato. Pero en la inducción mediante la limitación por fosfato, vimos que el fosfato promueve directamente la asimilación de la glucosa estimulando su mayor consumo, es decir a menor fosfato inicial mayor consumo de glucosa y por ende mayor mantenimiento, como mencionamos la hipótesis más probable es que el aumento en el consumo de glucosa puede deberse a la demanda de ATP causada por la producción limitada de ATP bajo limitación de fosfato (Sección. 5.2.3.1.2). Por ello la relación gluc. / fosf fue el primer parámetro de diseño para cualquiera de los medios de cultivo utilizado. Nosotros encontramos en general que una acumulación de fosfato inorgánico en el medio de cultivo implicó un agotamiento de la FCE, en los casos más habituales la glucosa, y un suministro de glucosa promueve la absorción de fosfato reduciendo su concentración generando la inducción. Sin embargo, un exceso de glucosa estacional vimos que promovió el metabolismo de sobre flujo generando ácidos incentivando la pérdida de plásmidos principalmente en la cepa BL21 (DE3), no así en la cepa DH5 α . Esto fue interpretado como un fenómeno consecuente de la carga metabólica impuesta (Sección. 1.5.3).

Capítulo 7

Para la cepa BL21 (DE3), en los cultivos en MR con concentraciones iniciales de fosfato de 0.9 y 4.0 mM, no se produjo agotamiento de fosfato inorgánico ni expresión significativa de angiostatina. Sin embargo, las DO_{600} de los cultivos con 0.4; 0.2 mM, donde se produjo un agotamiento de fosfato, incluso aumentaron levemente después de que el fosfato se agotó. Esto es sorprendente, porque esperábamos que la falta de fosfato restringiera el crecimiento celular. En general para todos los experimentos en erlenmeyer agitados, para alcanzar una DO_{600} de siembra de 0.14 se requirió un inóculo de 2% (V/V) probablemente esta concentración de siembra permitió continuar creciendo sin evidenciar una fase de retardo agotando rápidamente el fosfato mostrando una DO_{600} más sostenida. Esto indicaría que a esta concentración de inóculo para una misma concentración de fosfato, las células agotaron el fosfato disponible casi de inmediato, entre dos y tres horas e inmediatamente ingreso en la fase de producción durante la cual se sintetizó la angiostatina.

Con las herramientas que dispusimos en su momento, el poder explicar porque la cepa DH5 α fue superior a la BL21 (DE3) sería ingresar en un campo desconocido o al menos poco claro en cuanto a hipótesis, pero no así de especulaciones. Lo documentado por Wang y colaboradores [8] nos aclara un poco el impacto de las células que han perdido su plásmido. La transformación con un plásmido siempre trae consigo una serie de cargas fisiológicas que afectan su estabilidad [9]. La inestabilidad del plásmido generalmente se origina a partir de una inestabilidad estructural causada por cambios en el propio plásmido (mutación puntual, delección, inserción o reordenamiento en el ADN del plásmido) o inestabilidad segregacional causada por partición defectuosa de plásmidos entre las células hijas durante la división celular [10]. Esta última sumada a la limitación nutricional debido al fosfato sería la hipótesis para este caso. Como se mencionó, en los procesos de fermentación, la inestabilidad segregacional del plásmido está relacionada con la carga metabólica de la cepa fundamentalmente. En primer lugar, la transcripción y la replicación son procesos competitivos en células procariotas, lo que significa que un aumento de la transcripción bloquearía la segregación de moléculas plasmídicas y, además, sobrecarga la capacidad bacteriana para reparar el ADN plasmídico [11]. En segundo lugar, la segregación de plásmidos es también consecuencia del resultado de crecer a una μ más lenta propio de células portadoras de plásmidos en comparación con células libres de plásmidos, ya que experimentan una carga adicional causada por el mantenimiento del

Capítulo 7

plásmido y replicación [11]. En fin, debemos recordar que la cepa DH5 α recombinante, proviene de un plásmido funcional extraído de un CC con baja D de una cepa BL21 (DE3) donde el porcentaje de células libres de plásmido era muy alto, sin embargo aquellas pocas que lo contenían lo mantenían funcional, porque eran capaces de crecer nuevamente en un medio con ampicilina, pero incapaces de producir angiostatina en una etapa batch (Sección. 5.2.3.3 y Sección. 5.2.4).

Relacionando directamente el efecto de la concentración de fosfato inorgánico del medio con respecto a la estabilidad de plásmido debemos mencionar que no hay antecedentes para ninguno de los hospedadores (BL21 / DH5 α) con el origen de replicación del cual deriva el vector pBAce. Este vector, deriva de pBlueScript KS⁺ [12]. El origen de replicación de pBlueScrip es de la familia pUC (pBluescript® II KS⁺), que generan un alto número de copias de plásmido por célula (aproximadamente 300 a 500 copias/célula) [13-14]; (Tabla. 11 - Sección. 4.3). El fosfato inorgánico juega un papel vital como efector de un gran número de reacciones enzimáticas del metabolismo primario (Sección. 1.5.3) [15]. Hemos visto, que el exceso de fosfato inorgánico, a niveles superiores al umbral de inducción empleados aquí, ha estimulado el consumo de glucosa, crecimiento celular y la producción de ácidos orgánicos tanto en microorganismos de tipo salvaje y recombinantes (Tabla. 17). Como no se obtuvo expresión de angiostatina en los CC, al menos en niveles detectables, a partir de las transformaciones con las cepas BL21 (DE3) y DH5 α (Sección. 5.2.4), se realizaron ensayos de caracterización de los plásmidos y ensayos de expresión en erlenmeyers en condiciones previamente evaluadas para descartar modificaciones en el plásmido o en la cepa que pueden alterar la expresión. Esta hipótesis fue descartada dado a que los perfiles de digestión de los vectores fueron los esperados. Descartadas estas razones, es factible que la pérdida de expresión se deba a una pérdida del plásmido en el CC aunque sus causas no tengan una única explicación.

Respecto a la interacción vector / hospedador (Sección. 1.5.3), observamos que no existen correlaciones simples entre el tiempo después de la transición de la etapa batch a la etapa CC en el que las células libres de plásmidos comienzan a aparecer en números significativos. Hemos visto que la inestabilidad se incrementa con la D, aunque el m_s muestra valores bajos, probablemente debida a casi una reversión de células libres de plásmidos. Esto es presumiblemente el resultado de dos tendencias contrapuestas: (1) para

Capítulo 7

células portadoras de plásmidos, de un alto número de copias, y (2) para las células portadoras de plásmidos compiten peor con las células libres de plásmidos, donde hay mayores necesidades energéticas que las células portadoras de plásmidos y menor rendimiento de ATP tal cual se ve reflejado en el global del experimento en esa condición (Sección. 2.2.2). Cabe mencionar que cuando el CC fue limitado en FCE los valores de fosfato en EE rondaron entre 1.5 – 2 mM, mientras que cuando el CC estuvo limitado en fosfato los valores rondaron entre 0.2 – 0.4 mM (Sección. 5.2.3.3.1). Schendel, demostró que manteniendo el nivel de fosfato inorgánico a 1 mM o menos, permite una determinación cuantitativa de la actividad de la fosfatasa alcalina y además se demostró que ese nivel de fosfato inorgánico es suficiente para sostener el crecimiento celular [16].

Por otra parte, el alto número de copias generalmente disminuiría per se la velocidad de crecimiento celular, posibilitando a las células con menor cantidad de plásmidos dominar un CC ya que crecen con una velocidad específica mayor, llegándose a un EE compuesto de células libres de plásmido [17].

Lamentablemente no pudimos debido a la falta de recursos realizar un estudio de esta naturaleza con la cepa DH5 u otra como la XL1 Blue que son utilizadas para la producción de plásmidos, y por ello su uso principal es como cepa de clonado [18].

En resumen respecto a los parámetros fisiológicos evaluados (mantenimiento y rendimientos máximos) en los CC, los valores obtenidos no representarían la fisiología de la cepa recombinante sino de una población mixta ya que los CC probablemente estuvieran compuestos por una población de bacterias con plásmido y sin plásmido, posiblemente siendo esta última preponderante a juzgar por la expresión observada. Hubo expresión de angiostatina destacable solo en los cultivos en batch con cepas recientemente transformadas con el plásmido del cual deriva el vector pBAce (alto número de copias), y no hubo expresión considerable en los CC inducidos durante y luego del cultivo, ya sea limitado en fosfato o en carbono. Se concluye que la pérdida de plásmido durante los CC es significativa y por esta razón no se observa expresión.

Al no poder hacer una evaluación de los errores acarreados en los parámetros obtenidos, no podemos decir que haya diferencias en el coeficiente de mantenimiento entre las cepas salvajes y recombinante, aunque sí parece existir una diferencia significativa en el Rendimiento verdadero en biomasa. (≈ 0.54 c-mol/c-mol en la cepa recombinante y ≈ 0.72

Capítulo 7

c-mol/ c-mol en la cepa salvaje. Se esperaba que estos valores, al depender de la estequiometría de la célula variaran muy poco, con lo cual es posible que existan errores en los valores obtenidos con la cepa salvaje. No pareciera haber diferencias significativas entre la cepa recombinante en limitación en fosfato (inducción) y limitación en carbono en ninguno de los parámetros evaluados, resultado coherente con la ausencia de expresión de angioestatina.

Respecto de lo evaluado mediante BA, la muy poca evidencia experimental empleando el promotor *phoA*, nos hizo reevaluar este aspecto. Respecto a que la variable de control de la inducción (fosfato) estaba íntimamente ligada a la variable operacional de control (glucosa) nos hizo repensar la posibilidad de que debería realizarse un cultivo en un medio más apto para el crecimiento para posteriormente alimentar con glucosa y minerales, para disminuir el fosfato remanente y permitir la expresión, pero los bajos rendimientos celulares con la cepa DH5 α nos hizo desestimar esta búsqueda debido a que se debería proponer un nuevo hospedador. Aunque los resultados obtenidos en este aspecto podrían mejorarse evaluando un nuevo medio de cultivo.

En este trabajo se presentó un sistema de control con buenas señales de expresión de angioestatina, y con mucho mejor rendimiento en cuanto a la biomasa (≈ 0.43 c-mol/c-mol), utilizando IPTG como inductor en medio complejo, y la respuesta podría ser debido a que el medio LB ha sido un estándar para el cultivo de *Escherichia coli* desde la década de 1950 [19-20-21] y ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones de microbiología molecular para la preparación de ADN plásmidico y proteínas recombinantes, dado a su aporte en nutrientes que proporcionan péptidos y peptonas, vitaminas y oligoelementos aunque no así en muchos carbohidratos [22 – 23], aunque su falla más evidente siempre ha sido su baja reproducibilidad debido a la variabilidad dentro de su composición. Sin embargo, para el caso de una proteína con alta composición de aminoácidos donde *Escherichia coli* comúnmente posee una baja productividad puede haber sido la clave de este resultado.

Capítulo 7

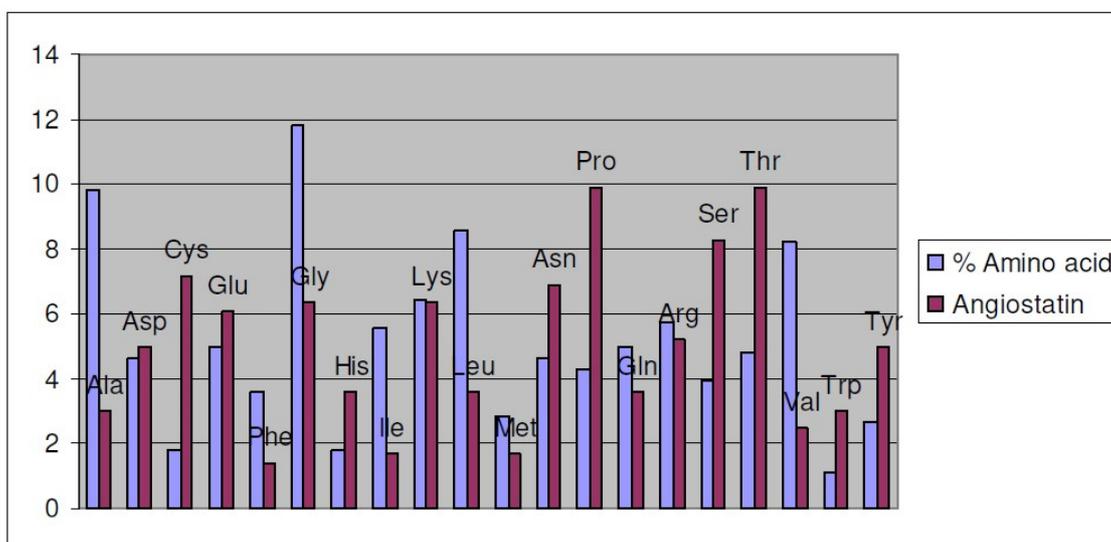


Figura 89. Composición comparativa en porcentajes de los aminoácidos en mayor abundancia de *E. coli* respecto de la composición en la angiostatina. Tomado de Hiroshi y col. [24].

Los perfiles metabólicos intracelulares de *Escherichia coli* fueron estudiados por Jungyeon y col. [25] donde determinó que los niveles de aminoácidos, esenciales para la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, fueron significativamente mayores en medio LB que en medio mínimo (M9). Estos resultados sugieren que las células preparan su metabolismo para su supervivencia en los medios mínimos, mientras que participan activamente en un rápido crecimiento en los medios complejos. La figura 90 muestra las reacciones y las rutas biosintéticas de producción de aminoácidos de *E. coli*. Las reacciones de alimentación y las rutas biosintéticas de los aminoácidos se muestran como flechas negras y azules, respectivamente. El número de flechas no refleja el número de pasos en las vías biosintéticas. La vía anaplerótica principal, que rellena oxaloacetato (oaa) en el ciclo de ácido tricarboxílico (TCA), se muestra en amarillo. Los aminoácidos marcados corresponden a los de mayor proporción en la angiostatina.

Capítulo 7

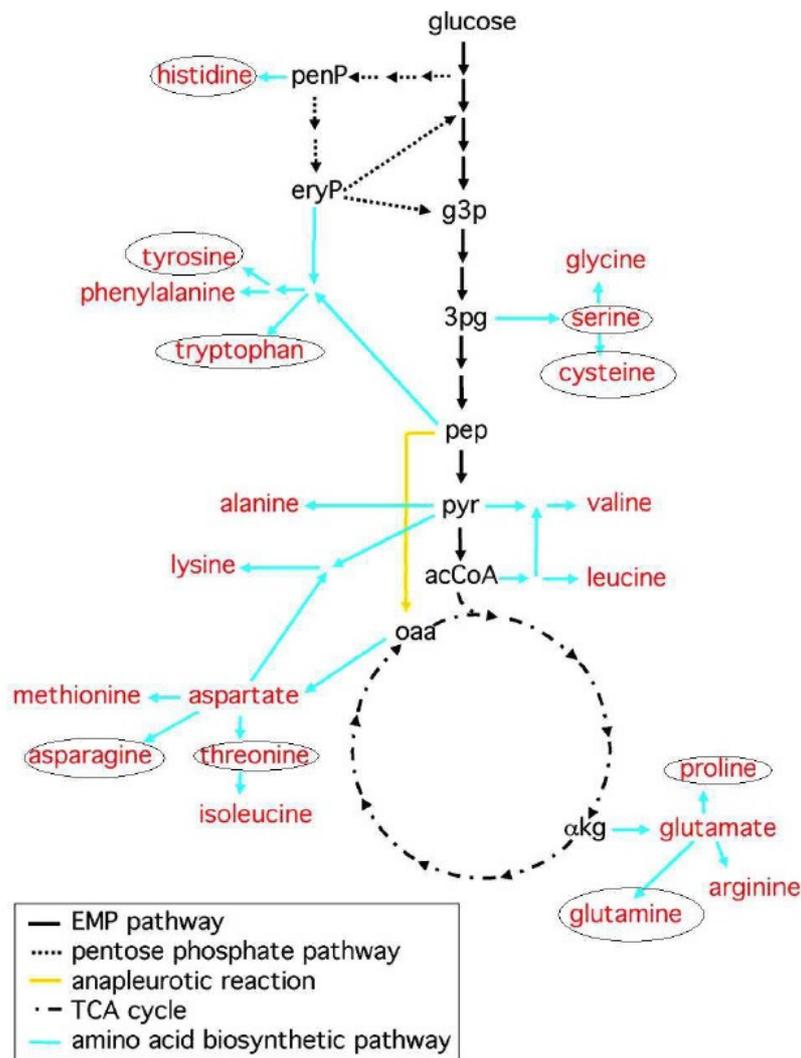


Figura 90. Rutas biosintéticas de producción de aminoácidos de *E. coli*
Tomado de Hiroshi y col. [24].

La dependencia del medio LB en los perfiles de expresión de angiostatina mostrados en este estudio puede ser atribuido a la absorción y el metabolismo de diferentes nutrientes. En algunos casos al comienzo (Sección. 5.1.3.1) el medio complejo se suplemento con la misma fuente principal de carbono, la glucosa. Sin embargo, como fuente de nitrógeno, los medios complejos contenían abundantes aminoácidos, mientras que el amoníaco era básicamente la fuente de nitrógeno en el MR – MLP, por tanto se suministraron pequeñas cantidades para poder sintetizar aminoácidos suficientes para la síntesis de proteínas y el crecimiento celular [26 - 27].

Capítulo 7

Probablemente ante semejante demanda de recursos para poder obtener los bloques funcionales en cuanto a aminoácidos pocos habituales para *E. coli*, en el momento de inducirse el promotor *phoA* sea el responsable de disparar una gran carga metabólica que explique la poca o nula expresión y esto explicaría los resultados obtenidos en medio LB, y la mejoría en la señal de expresión empleando la cepa BL21 (DE3).

7.2 Conclusión

Lo que podemos establecer acerca del sistema elegido para la producción de angiostatina, es que al ser un promotor nutricional está en contacto permanente con rutas muy importante del metabolismo y que su inducción probablemente tiene un impacto que genera un desbalance en las rutas de obtención de energía. El principal problema que nos encontramos fue establecer las condiciones de crecimiento para alcanzar el “umbral de inducción”. Si bien, hemos visto que el promotor se induce por debajo de 0.5 mM reproducir la cantidad de FCE necesaria para llegar a esa concentración de fosfato fue lo poco reproducible. En la mayoría de los casos se evidencio carencia de FCE para continuar bajando la concentración de fosfato, hemos visto que en muchos casos antes de llegar al límite de 0.5 mM, los microorganismos comenzaban a crecer menos y a consumir más glucosa. . Por otro lado la producción de ácidos fue una variable que pudo afectar la expresión de angiostatina. El metabolismo del fosfato está muy relacionado a diversos mecanismos incluyendo las rutas centrales del metabolismo de FCE, por tanto podemos decir que los resultados indicarían que las velocidades específicas de consumo de glucosa y las velocidades de producción de ácidos orgánicos, acético, láctico se incrementan a medida que disminuye la concentración de fosfato debido probablemente a la gran demanda de ATP, y a la limitación de la producción del mismo, como consecuencia de la limitación en fosfato. Si consideramos que de por si la expresión de una proteína es el proceso biosintetico que más gasto energético tiene una célula podemos establecer que se coincide con los resultados obtenidos.

Respecto a los valores hallados de actividad, no se demostró efecto antiangiogenico directo de la muestra evaluada sobre las células endoteliales in vitro de manera estadísticamente significativa. Esto podría ser resultado de un proceso de replegado incorrecto. Está demostrado que si el plegado no es correcto la angiostatina es incapaz de inhibir el

Capítulo 7

crecimiento en el modelo de carcinoma pulmonar (Lewis Lung carcinoma LLC-LM) [28], con lo cual probablemente los resultados podrían mejorarse, evaluando una técnica de replegamiento y purificación mejor, si bien no era un objetivo primordial de esta tesis, no se llegó a evaluar debido que se priorizó la búsqueda de mejores condiciones, y dicha técnica posee un alto costo que no estuvimos a la altura de poder concretarlo. Se agradece profundamente al grupo de Daniel F. Alonso y Daniel Gomez del Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes por su apoyo y la colaboración de sus asistentes en esta etapa de la tesis.

7.3 Apéndice I

Dedicado a la memoria de Carlos F. Mignone.

..... *“lo voy a escribir, así les queda claro de una buena vez a todos...”* dixit 23/09/08

**Transferencia de materia gas – líquido
en Bioprocesos
C. F. Mignone. Area de Biotecnología, Facultad de Ciencias
Exactas – UNLP.**

C. F. Mignone. Area de Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas – UNLP

Son muchos los productos de origen biotecnológico cuyo rendimiento está ligado a un buen suministro de O₂, por ejemplo: biomasa, antibióticos, aminoácidos, etc. La solubilidad del O₂ en agua es muy baja y debe reponerse constantemente a medida que es consumido por el cultivo. Por tal motivo es de suma importancia contar con un criterio para evaluar la capacidad de suministrar O₂ del biorreactor donde se realizará el bioproceso. La forma más económica de suministrarle O₂ a un cultivo es por burbujeo de aire.

Cuando un compuesto tiene diferente potencial químico entre dos puntos de una misma fase, se produce un flujo de materia en la dirección que tiende a anular esa diferencia de potencial. El en caso específico del O₂ la diferencia de potencial puede ser evaluado como diferencia de presiones parciales, en fase gaseosa, o de concentraciones, en fase líquida. Se define al coeficiente de transferencia de materia (en nuestro caso de O₂) como:

Capítulo 7

$$k = \frac{N_{O_2}(1)}{\Delta C}$$

Donde N_{O_2} es el flujo de O_2 , mol / (área. tiempo), y ΔC representa la diferencia de concentración entre dos puntos de la misma fase. En los biorreactores aireados se tienen dos fases, la gaseosa que corresponde al volumen de gas de todas las burbujas dispersas y la líquida, el medio de cultivo donde están creciendo las células (bacterianas, fúngicas, Animales o vegetales) en suspensión. El O_2 deberá migrar desde el seno de las burbujas hasta el líquido, donde es consumido. Este proceso generará naturalmente gradientes de concentración dentro de cada fase, así es dable pensar que la PO_2 en las cercanías de la interfase será menor que en el centro de las burbujas y que al concentración de O_2 disuelto será mayor en las cercanías de la interfase que en el seno del líquido. Puede representarse esta situación mediante el siguiente esquema.

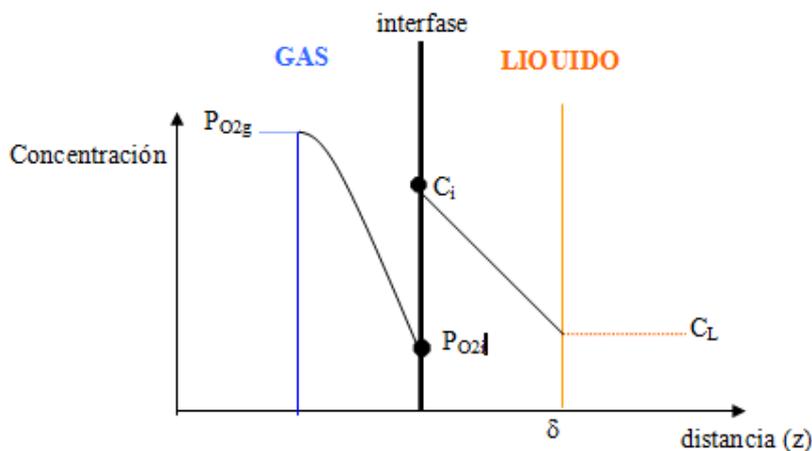


Figura 106. El modelo de la doble película de Whitman [29].

El modelo de la doble película se debe a Whitman y data de 1923. El mismo supone que adyacente a la interfase existen dos películas, una del lado del gas y otra del líquido que están estancas y el O_2 debe difundir a través de ellas desde el seno del gas hasta alcanzar el seno del líquido. Tanto en el seno del gas como del líquido la concentración es uniforme pues se hallan bien mezclados. Cuanto más intensa sea el estado de agitación (flujo turbulento) menor será el espesor de las películas y mayor la transferencia de O_2 .

Capítulo 7

En la figura, P_{O_2i} es la presión parcial de O_2 en la interfase y C_i la concentración en la interfase, para gases de baja solubilidad ambos valores están en equilibrio y relacionados por la ley de Henry. Se puede suponer que están en equilibrio debido a que a 1 atm de presión de aire y a $25^\circ C$ o colisionan contra la interfase 1024 moléculas de O_2 por cm^2 y por segundo, lo que es muy superior a los flujos netos de transferencia de O_2 que se observan en los bioprocesos.

$$P_{O_2i} = H \cdot C_i \quad (2)$$

Independientemente de cual sea la forma del gradiente de concentración es posible definir un coeficiente de transferencia para la fase gaseosa, k_g , y otro para la líquida, k_l

$$k_g = \frac{N_{O_2}}{P_{O_2} - P_{O_2i}} \quad (3) \quad k_l = \frac{N_{O_2}}{C_i - C_L} \quad (4)$$

En estado estacionario los moles de O_2 por unidad de tiempo y área que atraviesan la interfase serán los mismos que ingresan a la fase líquida (e iguales a los que consumen las células), por tanto podemos poner:

$$N_{O_2} = k_g \cdot (P_{O_2} - P_{O_2i}) = k_l \cdot (C_i - C_L) \quad (5)$$

Aún suponiendo que conozcamos k_g o k_l la Ec. (5) es de escaso valor ya que es difícil conocer el valor de P_{O_2i} o de C_i , por tal motivo es conveniente definir un nuevo coeficiente, K_L , como:

$$K_L = \frac{N_{O_2}}{C - C_L} \quad (6)$$

Donde C^* corresponde a la concentración de O_2 disuelto que *estaría* en equilibrio con la presión parcial de O_2 que hay en el seno de la fase gaseosa, es decir:

$$P_{O_2} = H \cdot C \quad (7)$$

Reordenando la Ec. (4):
$$\frac{1}{K_L} = \frac{C}{N_{O_2}} - \frac{C_L}{N_{O_2}} = \frac{C - C_i}{N_{O_2}} + \frac{C_i - C_L}{N_{O_2}} \quad (8)$$

Reemplazando C^* y C_i por Ecs. (7) y (2) y teniendo en cuenta las ecs. (3) y (4) resulta:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{H \cdot k_g} + \frac{1}{k_l} \quad (8)$$

Capítulo 7

La inversa de un coeficiente de transferencia puede ser vista como una resistencia, así en la Ec. (8) la resistencia global a la transferencia de O₂ se compone de dos resistencias en serie, una en la fase gaseosa y otra en la fase líquida. Cabría preguntarse cuál de ellas es más importante. En la tabla 37 se muestra el valor de H para distintos gases en agua a 25 °C.

Compuesto	H (atm.L/mol)
NH ₃	17.1 10 ⁻³
CH ₄	745.5
C ₂ H ₃	545.1
CO ₂	29.7
O ₂	790.6
H ₂	1270.0

Tabla 37 Comparación de los

valores de H para una gran variedad de gases conocidos.

valores de H para una gran

Para compuestos de baja solubilidad en agua como el O₂ el valor de H es grande, por otra parte y como se verá, el coeficiente de transferencia es proporcional al coeficiente de difusión del O₂ (D_{O₂}), el cual es mucho mayor en aire que en agua, por todo esto se puede afirmar que la principal resistencia a la transferencia se encuentra del lado del líquido o, lo que es lo mismo:

$$K_L \approx k_l$$

(9)

Este resultado tiene *profundas implicancias* en los bioprocesos, ya que si queremos asegurarnos una buena transferencia de O₂ de nada valdrá agitar la fase gaseosa ya que la resistencia se encuentra en la fase líquida.

Ahora podemos escribir la ecuación de transferencia como:

$$N_{O_2} = k_l \cdot (C - C_L) \quad (10)$$

En bioprocesos más que el flujo de O₂ interesa conocer la velocidad de transferencia de O₂, a la que denotaremos como R_{O_2} y corresponde a los moles de O₂ transferidos de la fase gaseosa a la líquida por unidad de volumen y de tiempo. Si A_T es el área total interfacial (área de transferencia) y V_L el volumen de la fase líquida, resulta:

$$R_{O_2} = N_{O_2} \frac{A_T}{V_L} \quad (11)$$

Si $a = \frac{A_T}{V_L}$ es el área de transferencia por unidad de volumen se obtiene:

Capítulo 7

$$R_{O_2} = k_L a (C - C_L) \quad (12)$$

El valor de a es muy difícil de evaluar experimentalmente y lo que se evalúa en los biorreactores es directamente el producto, como si fuese un único coeficiente, y se lo conoce como **coeficiente volumétrico de transferencia de O₂**. Es conveniente rescribir la Ec. (12) como:

$$R_{O_2} = k_L a (C - C_L) \quad (13)$$

El valor de $k_L a$ da una idea de la capacidad que tiene un equipo para suministrar O₂, depende de la geometría (erlenmeyer, tanque agitado, columna de burbujeo, air lift, etc.) y de las condiciones de operación (velocidad de agitación, caudal de aireación).

La diferencia $(C - C_L)$ se conoce como *fuerza impulsora* de la transferencia y es generada por el consumo de O₂. De acuerdo a la ec.(7) C^* se calcula a partir de la P_{O₂} que hay en el seno de la fase gaseosa y esta, en biorreactores pequeños donde el mezclado en ambas fases es perfecto, se corresponde con la P_{O₂} existente en los gases de salida. Si durante el proceso aumenta la velocidad de consumo de O₂ la P_{O₂} disminuirá, por tanto C^* no será constante. El valor de C_L se mide con un electrodo de O₂.

En biorreactores mas grandes puede ocurrir que la fase líquida esté bien mezclada pero no así la gaseosa, en tal caso se calcula la fuerza impulsora mediante:

$$(C - C_L) = \frac{(c_1 - c_L) - (c_2 - c_L)}{\ln(c_1 - c_L) - \ln(c_2 - c_L)} \quad (14)$$

Donde c_1 y c_2

Los subíndices 1 y 2 representan entrada y salida del biorreactor respectivamente.

Un modelo para k_L

Continuando con el modelo de Whitman y teniendo en cuenta que la fase gaseosa no ofrece mayor resistencia a la transferencia, podemos hacer un nuevo esquema y centrar nuestra atención en lo que ocurre en la fase líquida.

Capítulo 7

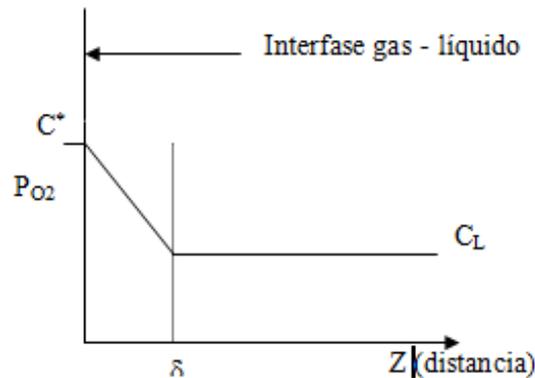


Figura 107. El modelo de la doble película de Whitman para la interfase gas – líquido.

Las células se encuentran en el seno del líquido y el O₂ debe atravesar la película líquida estanca de espesor δ para llegar a ellas. Dado que dentro de la película no hay movimiento del fluido, el O₂ debe *difundir a través de ella* para llegar al seno de líquido. En estado estacionario C* y C_L no varían con el tiempo, esto equivale a decir que los moles por unidad de tiempo y de área interfacial (N_{O_2}) que atraviesan la película son constantes y se demuestra que el perfil de concentración de O₂ dentro de la película es el mostrado en la figura. Según la ley de Fick:

$$N_{O_2} = -D_{O_2} \cdot \frac{dc}{dz} \quad (15)$$

D_{O_2} Es el coeficiente de difusión del O₂ (área transversal / tiempo)

De la figura:
$$\frac{dc}{dz} = \frac{(c_L - c^*)}{\delta} \quad (16)$$

Por tanto:
$$N_{O_2} = -D_{O_2} \cdot \frac{(c_L - c^*)}{\delta} \quad (17)$$

Comparando las Ecs. (17) y (10) resulta claro que:

$$k_l = \frac{D_{O_2}}{\delta} \quad (18)$$

Si bien coeficiente de difusión del O₂ en agua o soluciones acuosas es conocido, la ec. (18) no permite calcular k_l debido a que no es posible medir el espesor de la película y estrictamente hablando se sabe que la velocidad del fluido es menor en las cercanías de la interfase, pero no existe realmente una película estanca que la bordee. También puede no

Capítulo 7

ser cierta la suposición de un gradiente de concentración lineal dentro de la película cuando la velocidad de reacción del O₂ en la fase líquida es tan grande que la reacción ocurre dentro de la película. Afortunadamente las velocidades de consumo de O₂ que son usuales en los Bioprocesos no entran en esa categoría. De todos modos y a pesar de estos inconvenientes el modelo de la película es el más difundido para un primer abordaje al estudio de la transferencia de materia gas – líquido.

7.4 Bibliografía

- [1] O' Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. 1994. Cell. 79: 315-328.
- [2] M J Park. cDNA cloning and expression of angiostatin, an angiogenesis inhibitor, from human liver tissue mRNA. 1999. J. Korean Cancer Assoc.; 31(6): 1236- 1245.
- [3] Zhang X, Wu J, Gao D, Chai Y, Fei Z, Yi L, Liu X, Liang J. Cloning and sequencing of the fragment of angiostatin K (1-3) gene. 1999. Chin Med J (Engl). Nov; 112 (11):1013-5. PMID: 11721462.
- [4] T E Petersen, M R Martzen, A Ichinose, E W Davie. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. 1990. Journal of Biological Chemistry; 265, (11): 6104-6111. ISSN 0021-9258.
- [5] Lubke C, Biodol W, Petri T. Analysis and optimization of recombinant protein production in Escherichia coli using the inducible phoA promoter of the E. coli alkaline phosphatase. Enzyme Microb Technol 1995; 17:923-8.
- [6] Stephen J, Dien V, Keasling JD. A dynamic model of the Escherichia coli phosphate-starvation response. J Theor Boil 1998. (190):37-49.
- [7] Kikuchi Y, Yoda K, Yamasaki M, Tamura G. The nucleotide sequence of the promoter and the amino-terminal region of alkaline phosphatase structural gene (phoA) of Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 1981; 9 (21):5671-5678.
- [8] Wang Z, Xiang L, Shao J, Wegrzyn A, Wegrzyn G. Effects of the presence of ColE1 plasmid DNA in Escherichia coli on the host cell metabolism. Microb Cell Fact 2006; 5: 34-51.
- [9] Yu H, Shi Y, Sun X, Luo H, Shen Z. Effect of poly(beta-hydroxybutyrate) accumulation on the stability of a recombinant plasmid in Escherichia coli. J Biosci Bioeng 2003; 96:179-83.
- [10] Kumar PKR, Maschke HE, Friehs K, Schugerl K. Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. Trends Biotechnol 1991;9: 279-84.

Capítulo 7

- [11] Xu J, Li W, Wu J, Zhang Y, Zhu Z, Liu J, et al. Stability of plasmid and expression of a recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) vaccine in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;73:780–8.
- [12] Craig, Sydney P., Ling Yuan, Douglas A. Kuntz, James H. McKerrow, and Ching C. Wang. High Level Expression in *Escherichia coli* of Soluble, Enzymatically Active Schistosomal Hypoxanthine/Guanine Phosphoribosyltransferase and Trypanosomal Ornithine Decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, no. 6 (1991): 2500–2504.
- [13] Twigg AJ, Sherratt D. Trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColE1. *Nature*. 1980 Jan 10;283(5743):216-8.
- [14] Atlung T, Christensen BB, Hansen FG. Role of the rom protein in copy number control of plasmid pBR322 at different growth rates in *Escherichia coli* K-12. *Plasmid*. 1999 Mar; 41(2):110-9.
- [15] Martin, J. F. 1977. *Adv. Biochem. Eng.* 6 105-127.
- [16] Schendel, F.J., Baude, E.J. and Flickinger, M.C. Determination of protein expression and plasmid copy number from cloned genes in *Escherichia coli* by flow injection analysis using an enzyme indicator vector. 1989. *Biotechnol. Bioeng.*, 34: 1023-1036.
- [17] Ryan, W. y S. J. Parulekar (1990). Effects of culture conditions on plasmid stability and production of a plasmid-encoded protein in batch and continuous cultures of *Escherichia coli* JM103[pUC8]." *Ann N Y Acad Sci* 589: 91-110.
- [18] Carnes AE. Fermentation design for the manufacture of therapeutic plasmid DNA. *BioProcess Int* 2005; 3:36–44.
- [19] Luria, S.E., Burrous, J.W.: Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 74: 461-476 (1955).
- [20] Lennox, E.S.: Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*.1955. 1: 190-206.
- [21] Luria, S.E., Adams, J.N., Ting, R.C. Transduction of lactose-utilizing ability among strain of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology*.1960. 12: 348-390.
- [22] Miller, J.H.: *Experiments in molecular genetics*. 1972. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [23] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [24] Hiroshi Akashi and Takashi Gojobori. Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. 2002, *PNAS* vol. 99; 2002; no. 6; 3695–3700.

Capítulo 7

- [25] Jungyeon Kim, Kyoung Heon Kim, Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochemistry*. Volume 57, 2017, Pages 64-71, ISSN 1359-5113
- [26]. M.A. Cotta, J.B. Russell, Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture, *J. Dairy Sci.* 65 (1982) 226-234.
- [27]. W.J. Maeng, C.J. Van Nevel, R.L. Baldwin, J.G. Morris, Rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acids and protein, *J. Dairy Sci.* 1976. 59; 68-79.
- [28] B. Kim Lee Sim, Michael S. O'Reilly, Hong Liang, Anne H. Fortier, Weixuan He, John W. Madsen, Randall Lapceovich, Carol A. Nacy; A Recombinant Human Angiostatin Protein Inhibits Experimental Primary and Metastatic Cancer. 1997. *Cancer Res* 1 April; 57 (7): 1329–1334.
- [29] Whitman, W.G. A preliminary experimental confirmation of the two-film theory of gas absorption. 1923. *Chem. Metal. Eng.* 29:146-148.