CAPITULO 1

INTRODUCCION

A los procesos en los cuales partiendo de las materias primas correspondientes se producen bienes de consumo utilizando organismos vivos se denomina Biotecnología. Gracias a la tecnología del ADN recombinante esta se ha transformado dramáticamente en las últimas dos décadas, frecuentemente refiriendose como la nueva Biotecnología. Esta última emplea microorganismos reprogramados por ingeniería genética para producir proteínas recombinantes de importancia biomédica, pecuaria, industrial, etc. Hoy en día se ofrecen en el mercado internacional toda una variedad de proteínas de orígen recombinante, desde factores de crecimiento hasta anticoagulantes. La lista de estos productos crece día a día, lo que ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado biofarmacéutico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo. Actualmente existe una gran variedad de sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes los cuales emplean una gran variedad de hospederos que van desde bacterias, hasta células en cultivo de mamíferos o de insectos. La bacteria más empleada para estos fines ha sido *E. coli,* aunque también se han utilizado *Bacillus subtilis, Pseudomonas sp,* etc. Mientras que dentro de los hongos, el más empleado ha sido *Saccharomyces cerevisiae,*

recientemente se ha incrementado notablemente el empleo de *Pichia pastoris* gracias a la disponibilidad de un estuche comercial, y a una serie de características favorables que posee dicha levadura. También han sido empleados otros hongos como: *Schizosaccharomyces pombe, Hansenula polymorpha, Trichoderma reesei, Kluyveromyces lactis, Aspergillus nidulans,* etc. Dentro de células en cultivo existe una gran variedad de líneas celulares empleadas para estos fines.

En este trabajo se llevó a cabo la biosíntesis HGHr empleando y comparando dos sistemas de expresión uno de *E. coli* consistente en la fusión a nivel genético de la hormona con la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) y el otro en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris,* donde se produjo la hormona en su forma madura y secretada al medio de cultivo.

1.1 Sistemas de Expresión en *Escherichia coli*

Con *E. coli* se ha acumulado experiencia en la producción de proteínas recombinantes. Se asume que una proteína de tamaño intermedio, hidrofílica y con pocos puentes disulfuro puede ser producida adecuadamente en esta. Sin embargo dado el ambiente reductor del citoplasma de la bacteria que es adverso para la formacion de puentes disulfuro, el plegamiento adecuado de aquellas proteínas con varios puentes disulfuro no se logra, conduciendo generalmente a su precipitación en cuerpos de inclusión y por ende la pérdida de actividad biológica [1]. Para este hospedero se han diseñado sistemas de expresión con los cuales es posible secretar la proteína al espacio periplásmico, donde el ambiente es menos reductor favoreciendo el plegamiento correcto de la proteína. Por otro lado,

el proceso de purificación de una proteína recombinante es más sencillo a partir del espacio periplásmico que del citoplasma, siendo aún más sencillo si se llevase a cabo a partir del medio de cultivo. La secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo se ha logrado en *E. coli* mediante estrategias complicadas [2, 3]. Afortunadamente existen otros microorganismos que secretan fácilmente la proteína recombinante cuando ésta posee una secuencia señal reconocida por el hospedero. Otro inconveniente con los sitemas basados *E. coli* es que ésta no lleva a cabo modificaciones postraduccionales frecuentemente requeridas en proteínas de origen eucariótico. A pesar de todo, existen actualmente una gran variedad de vectores mejorados para su empleo en *E. coli,* por lo que a pesar de las desventajas presentadas, los sistemas que utilizan a *E. coli* como hospedero se siguen empleando ampliamente para la producción de proteínas recombinantes [1].

Los elementos que constituyen un plásmido de expresión en *Escherichia coli* y los cuales son requeridos para alcanzar un buen nivel de producción de la proteína heteróloga son: un origen de replicación para mantener la propagación y replicación del plásmido, un marcador de selección para asegurar su mantenimiento en la bacteria y las regiones reguladoras de la expresión: un potente promotor de la transcripción (como los promotores Tac, Trc o P_L) y un sitio de unión al ribosoma o región Shine-Dalgarno. En ocasiones, algunos plásmidos portan además su propio codón de iniciación e incluso sitios únicos de restricción que facilitan la inserción del ADNc en la fase de lectura apropiada. Otros plásmidos llevan la información que codifica para el extremo amino o carboxilo de un péptido, lo que produciría una proteína híbrida o de fusión, la cual deberá ser liberada de la proteína de interés [4].

1.1.1 Proteínas de Fusión

Las proteínas de fusión fueron los primeros recursos usados para producir proteínas de mamíferos en *E . coli.* Las razones para emplear proteínas de fusión van desde el evitar la degradación proteolítica en la bacteria, hasta facilitar estrategias de purificación sencillas, e incluso dirigir la proteína a diversos compartimentos celulares [5]. Entre estos sistemas se tiene a la proteína de unión a fosfato (PhoS) [6], la glutatión S transferasa [7, 8] y múltiples residuos de cisteína [9]. Estas son algunas de las proteínas de fusión empleadas más frecuentemente; a éstas se añade el uso reciente de la proteína de unión a maltosa.

La proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli* es una proteína periplásmica que facilita la difusión de la maltosa y maltodextrinas a través de la membrana externa. El gen malE es el que codifica para dicha proteína. y se ha aprovechado para construir vectores para sobreprodcir proteínas difíciles de expresar en *E. coli* [10, 11, 12]. A éstos se les conoce como la serie de plásmidos pMal, portan el potente promotor transcripcional Tac [13], las señales de inicio de la traducción del gen malE, y múltiples sitios de clonación donde el gen de interes es integrado al terminar el gen malE. Los vectores portan el gen *lac* Iq que codifica para el represor Lac, el cual mantiene apagado al promotor Tac, a menos que se adicione al medio isopropil-ß-tiogalactósidopiranosa (IPTG, un análogo de la lactosa), para anular la represión e iniciar la expresión. Estos vectores llevan la señal de reconocimiento para la proteasa factor Xa, localizada en la región 5' del sitio de clonación múltiple, lo que permite que MBP sea separada de la proteína de interés [14].

1.2 Sistema de Expresión basados en *P. pastoris*

Las levaduras ofrecen un ambiente apto para el plegamiento de proteínas eucarióticas, llevan a cabo algunas modificaciones postraduccionales y pueden secretar las proteínas recombinantes al medio de cultivo. Las levaduras mantienen las ventajas de los microorganismos al ser unicelulares, de fácil manipulación y rápido crecimiento. Sin embargo su organización celular es eucariótica, permitiendo la realización de procesos de expresión y maduración característicos de células animales y vegetales [15].

Como sistema de producción, el basado en *P. pastoris* es más sencillo barato y rendidor que otros sistemas de eucariotes superiores. Al ser una levadura, *P. pastoris* comparte las ventajas de fácil manipulación genética y bioquímica con *S. cerevisiae* pero supera a ésta en los niveles de producción de proteínas heterólogas (10 a 100 veces mayores) [16].

Pichia pastoris tiene la capacidad de crecer en metanol como única fuente de carbono, por lo que se considera metilotrófica. La habilidad de las levaduras para utilizar metanol como única fuente de carbono para el crecimiento ha sido determinada para géneros tales como *Hansenula, Candida, Torulopsis* y *Pichia* [17]. La ruta metabólica para la conversión del metanol a dióxido de carbono y agua involucra a las enzimas alcohol oxidasa, catalasa, formaldehído deshidrogenasa, S-formil-glutatión hidrolasa y formiato deshidrogenasa [18] (Fig.3). En la primera etapa del metabolismo del metanol, éste se oxida a formaldehído empleando la enzima alcohol oxidasa y oxígeno molecular como donador de electrones, generándose peróxido de hidrogeno. La alcohol oxidasa tiene poca afinidad por el O_2, lo cual es compensado con la síntesis de grandes cantidades de la enzima, llegando a representar el 35% de la proteína total celular [15]. Existen dos genes en

P. pastoris que codifican para la alcohol oxidasa, los genes AOX1 y AOX2. Las proteínas producto de ambos tienen una similitud del 97% y poseen aproximadamente la misma actividad específica. Sin embargo la gran mayoría de los transcritos provienen del gen AOX1; por lo tanto la alcohol oxidasa que es responsable de casi toda la degradación del metanol es la codificada por AOX1 [19].

La expresión del gen que codifica la enzima está regulada de modo que la enzima no es sintetizada en presencia de otra fuente de carbono, sea ésta etanol, glicerol, o glucosa, pero su expresión es estimulada cuando la fuente de carbono es metanol, debido a la activación del promotor de dicho gen por el metanol [18], siendo éste último elemento regulatorio el empleado para dirigir la biosíntesis de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris.*

En base a las características de este proceso metabólico, se ha desarrollado un sistema de producción de proteínas recombinantes en el cual un vector portando el gen heterólogo bajo el control del promotor de la alcohol oxidasa I, se introduce a las células, en donde por recombinación homóloga se integra al genoma de la levadura, siendo posible inducir la expresión del gen heterólogo al añadir el metanol como única fuente de carbono.

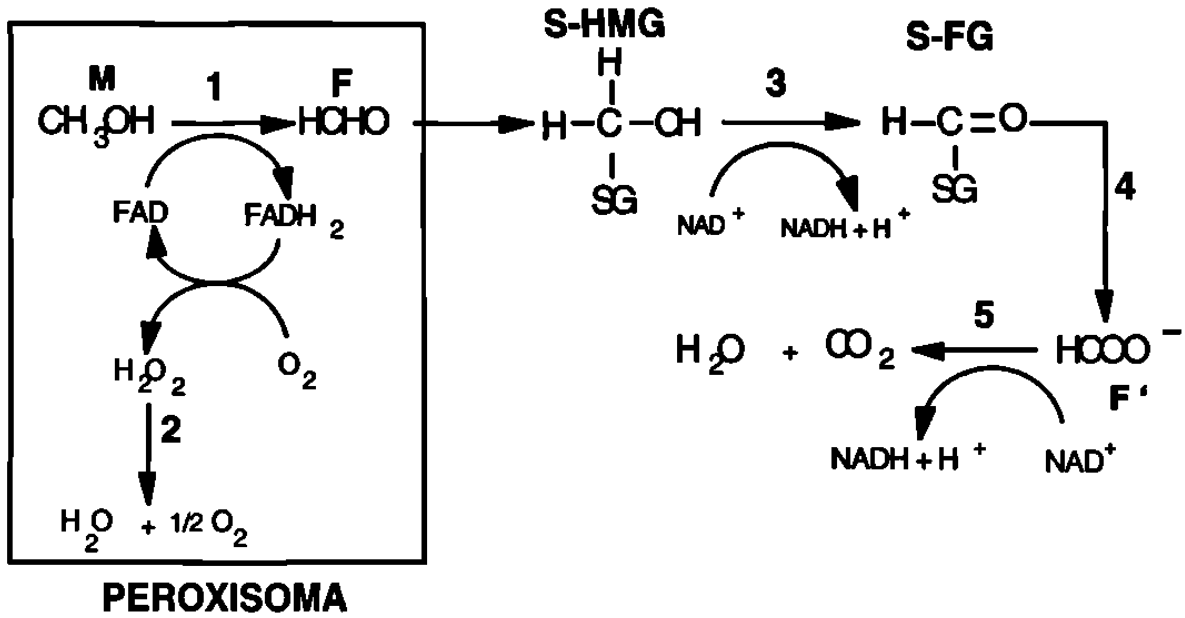


Figura 1.- Vía metabólica para la oxidación del metanol en levaduras metilotróficas. 1: Alcohol oxidasa; 2: Catalasa; 3: Formaldehído deshidrogenasa; 4: S-Formilglutatión hidrolasa; 5: Formiato deshidrogenasa; M: Metanol; F: Formaldehído; S-HMG: S-Hidroximetilglutation; S-FG: S-Formilglutation; SG: Glutatión; F': Formiato [17].

1.2.1 Vectores de Expresión para *Pichia pastoris*

Los vectores emplados para la producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*, son vectores plasmídicos de integración, es decir se integran al genoma de la levadura. Los elementos de un vector característico (Fig.4) son los siguientes: Promotor y terminador de la transcripción del gen AOX1 de *P. pastoris* (regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 TT, respectivamente), región 3' del mismo (3'AOX1), gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4) también de *P. pastoris* el cual sirve como marcador de selección en cepas de *P. pastoris* mutantadas en este gen (his4). Además para la secreción de la proteína al medio de cultivo se utilizan vectores que poseen una secuencia señal tal como la del factor alfa de *S. cerevisiae* o la secuencia señal de la fosfatasa

ácida de *P. pastoris* (PHO1). Finalmente los vectores también contienen secuencias necesarias tanto para su propagación en *Escherichia coli* tales como el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación ColE1, como para la clonación gen de interés (región de múltiples sitios de restricción) [19].

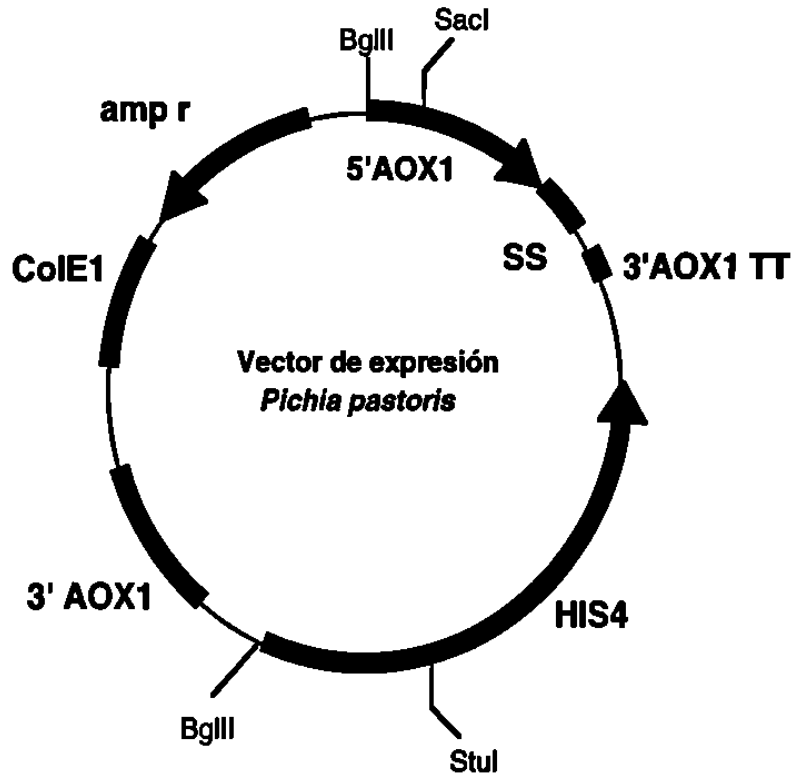


Figura 2.- Vector de expresión típico empleado para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Se representa en forma esquemática las diferentes regiones que componen el plásmido: Promotor y terminador de la transcripción del gen AOX1 de *P. pastoris* (regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 TT respectivamente), región 3' del mismo gen (3'AOX1), gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4) de *P. pastoris*, la secuencia señal (SS), También contiene secuencias necesarias para propagación del plásmido en *Escherichia coli* tales como el gen de resistencia a ampicilina (amp r) y el origen de replicación (ColE1), además de un sitio de policlonación precedido de la secuencia señal.

1.2.2 Integración del Vector al Genoma de *P. pastoris*

El ADN lineal del vector de expresión puede generar clonas estables de *Pichia pastoris* vía recombinación homóloga entre el ADN transformante y las regiones de homología dentro del genoma de la levadura [16]. Tales integrantes muestran alta estabilidad en ausencia de presión selectiva, aún cuando presenten copias múltiples del cassette de expresión. Los tipos de mutantes que se pueden obtener son dos: 1) Aquellos que sufrieron deleción en el gen AOX1, cuyo producto cataliza el primer paso para la degradación del metanol, por lo tanto este tipo de mutantes crecen lentamente en metanol (Mut^s: "Metanol utilization slow") comparado con una cepa nativa. Los mutantes Mut^s aún conservan el gen AOX2 que como ya se dijo codifican para una alcohol oxidasa 97% similar [16] a la alcohol oxidasa codificada por AOX1 y que también cataliza el primer paso para la degradación del metanol con una actividad específica similar, pero que se encuentra en muy bajas cantidades debido a la baja expresión del gen AOX2. 2) El otro tipo de mutante es el que conserva el gen AOX1 y que por lo tanto crece en metanol como única fuente de carbono a una velocidad igual a la de una cepa nativa de*Pichia pastoris* (Mut^+).

La integración de los vectores de expresión en el genoma de *P. pastoris* puede llevarse a cabo de dos formas, dependiendo del sitio de corte del vector antes de llevar a cabo la transformación

1) Inserción génica: Surge de un evento de entrecruzamiento simple entre el locus AOX1 o his4 en el genoma y las regiones 5'AOX1 o HIS4 en el vector (Fig. 3 y 4). Este tipo de integración se favorece al transformar *P. pastoris* con el plásmido linearizado por cortes en las regiones 5'AOX1 o HIS4 respectivamente, aunque también puede ocurrir con plásmidos no

linearizados o religados, y las mutantes obtenidas son Mut+. Casi el 100 % de los clonas producen la proteína heteróloga, la integración de multicopias (Fig. 5) ocurre con muy baja frecuencia.

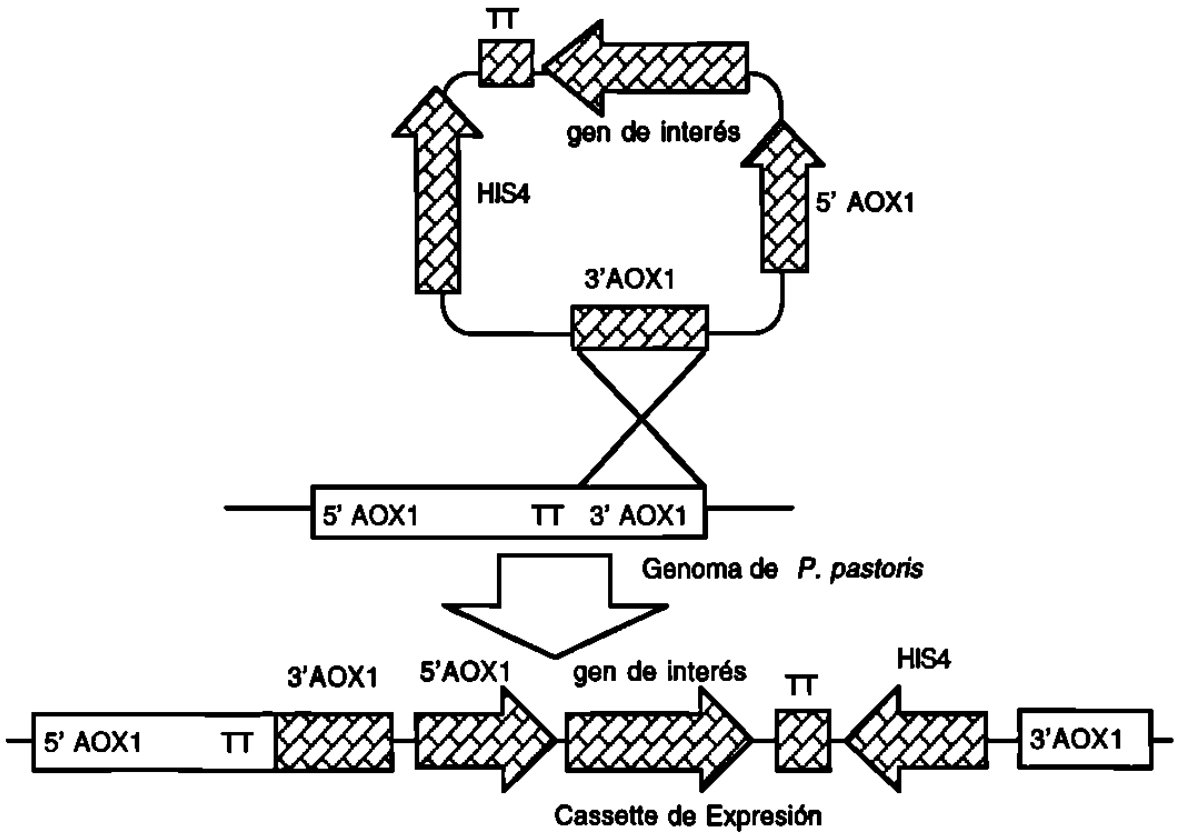


Figura 3.- Inserción génica del cassette de expresión en AOX1. Los eventos de inserción génica en el locus AOX1 surgen de un evento de entrecruzamiento simple entre el locus AOX1 en el cromosoma y alguna de las tres regiones AOX1 en el vector (5', 3' ó TT), el resultado es la inserción de una o más copias del vector, mientras que el gen AOX1 nativo queda intacto (Mut+). Este tipo de eventos también pueden ocurrir con plásmidos no linearizados y religados.

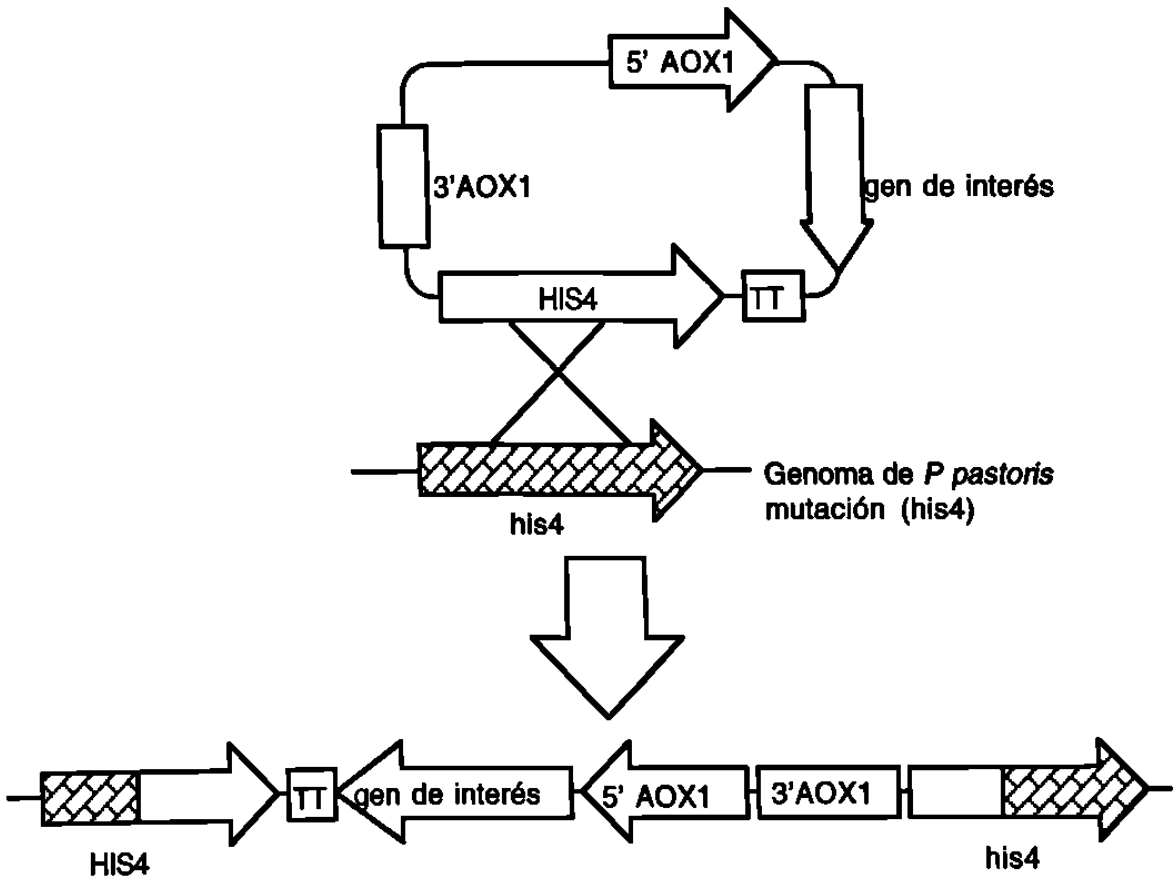


Figura 4.- Inserción génica del cassette de expresión en el locus his4. En cepas de *Pichia pastoris* his4, los eventos de inserción en el locus his4 surgen de un evento de simple entrecruzamiento entre el locus his4 en el cromosoma y el gen HIS4 en el vector, por lo que resulta la inserción de una o más copias del vector. Ya que el locus AOX1 no está involucrado en este evento de recombinación los clonas permanecen con el fenotipo Mut$^+$ tal como se describe.

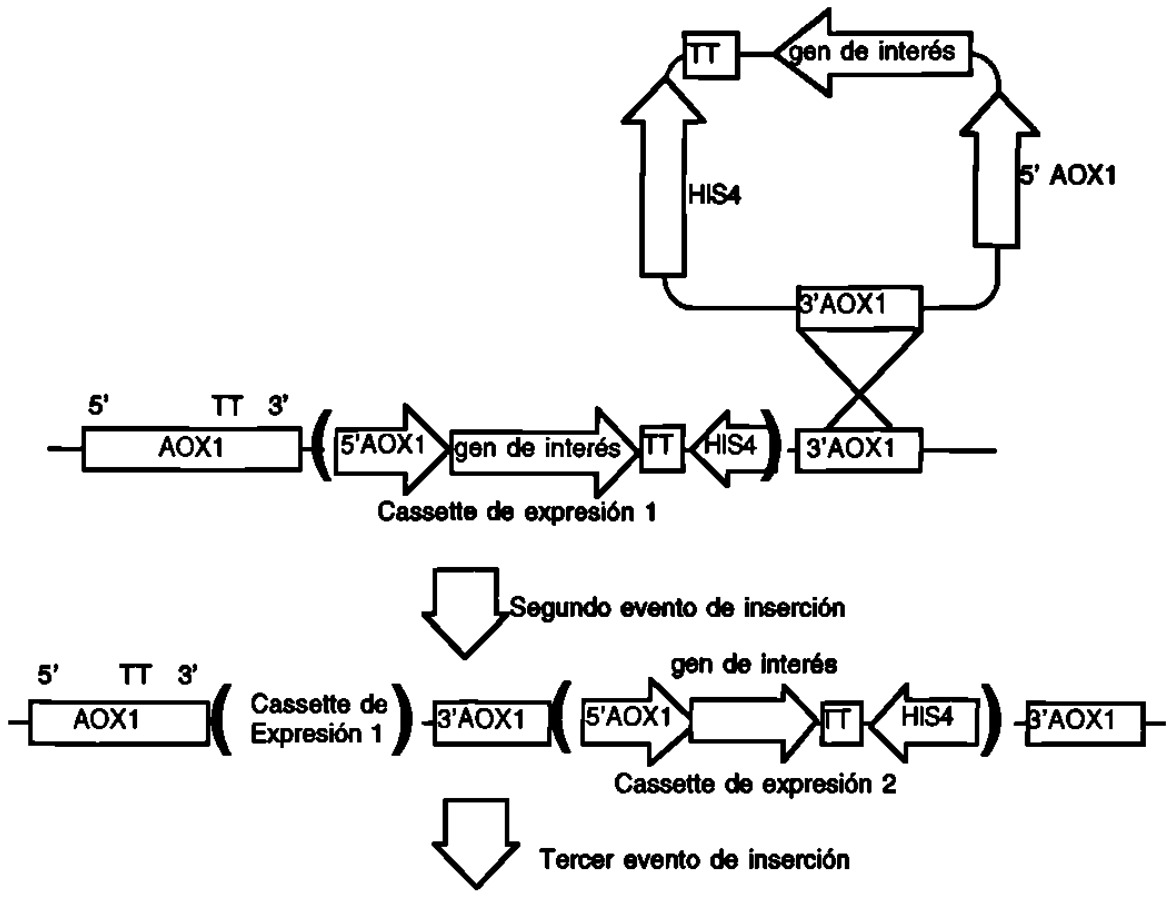


Figura 5.- Múltiples eventos de inserción génica. Estos pueden ocurrir espontáneamente con baja, pero detectable frecuencia, entre 1 a 10% de los tranformantes His$^+$. Los eventos de multi-copia pueden ocurrir como inserciones ya sea en locus AOX1 o his4.

2) Remplazamiento génico: Este se lleva a cabo mediante un doble entrecruzamiento entre las regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 del vector con el genoma (Fig. 6). Este tipo de integración se favorece al transformar células con el plásmido cortado en las regiones 5'AOX1 y 3'AOX1. Aunque se podría esperar solo clonas Mut^s de una sola copia, un detallado análisis revela que la mayoría de los clonas no contienen el vector, por lo que no expresan la proteína y probablemente representen una conversión génica de his4. Aun así del 5 al 30 % de los clonas son verdaderos remplazamientos (Mut^s), mientras que los restantes tienen integraciones en AOX1 o HIS4 y son Mut$^+$.

Finalmente del 1 al 10 % de los clonas Mut^s tienen más de 30 copias integradas (Fig. 5)

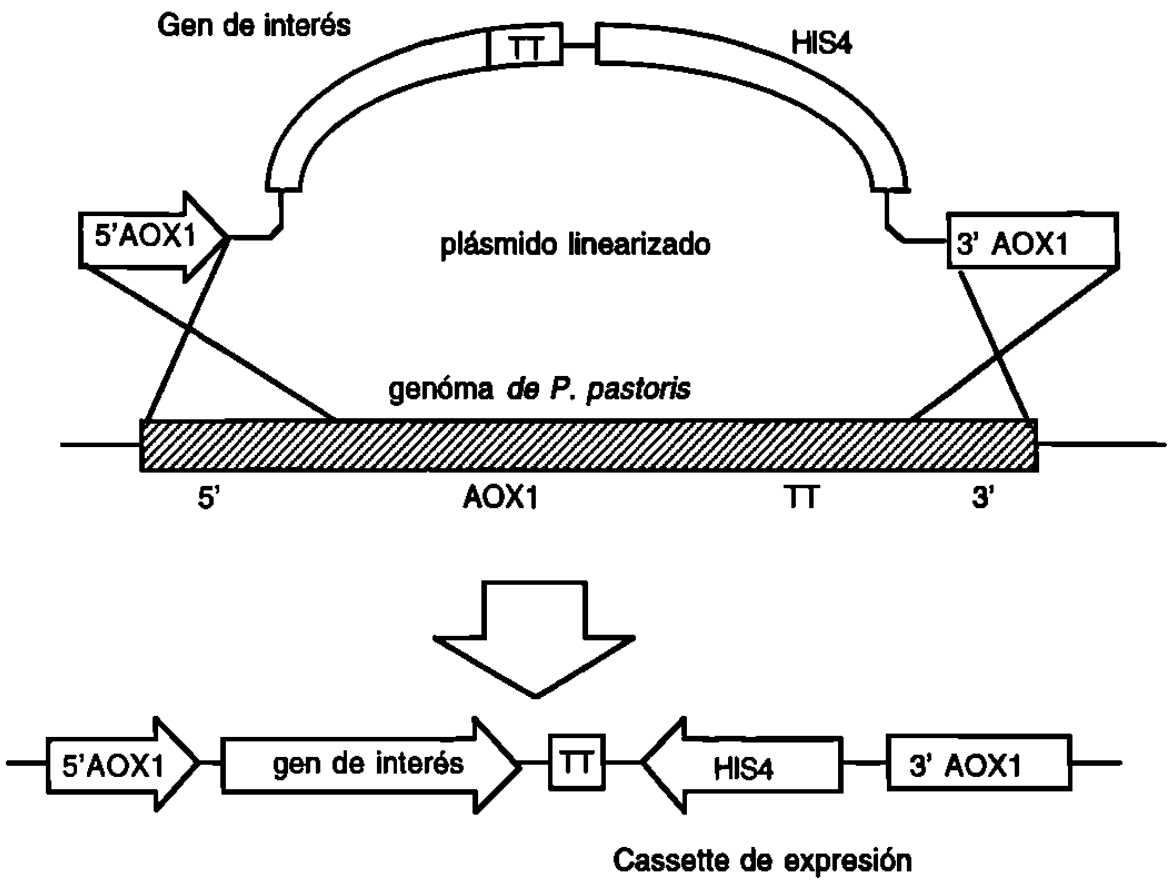


Figura 6.- Integración del cassette de expresión vía remplazamiento génico. En cepas his4 como la GS115, surge un remplazamiento génico de un evento de doble entrecruzamiento entre las regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 del vector con las homólogas del genoma de la levadura. Esto da como resultado la remoción del gen AOX1. El fenotipo resultante es His$^+$ Mut^s. El resultado neto de este tipo de remplazamiento génico es la pérdida del locus AOX1 (Mut^s) y la ganancia del cassette de expresión.

1.2.3. Producción de Proteínas Recombinantes en *P. pastoris*

Las fermentaciones en *P.pastoris* recombinante se llevan a cabo en dos fases. En la primera fase, se busca el aumento de masa celular empleando un

medio de cultivo mínimo, siendo la fuente de carbono glicerol o glucosa. En esta etapa se encuentra reprimida la producción de la proteína recombinante debido a que el promotor del gen AOX1 que dirige la síntesis se encuentra apagado. En la segunda fase, este promotor se activa al agregar metanol al medio y convertirse en la única fuente de carbono disponible, siendo en esta etapa cuando se produce la proteína recombinante.

El sistema de expresión de *P. pastoris* ha sido exitosamente utilizado para producir numerosas proteínas heterólogas (Tab. I). Una variedad de esquemas de lote alimentado y fermentación continua han sido descritos en la literatura [19].

La producción intracelular del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) [20] con una cepa Mut^s de *Pichia pastoris*, a nivel matraz, se obtuvieron concentraciones de 2.3 mg/L. En este sistema se empleó un medio definido con 2% de glicerol hasta que el cultivo alcanzó una densidad de 5×10^7 células/mL, enseguida se cambió el medio por uno similar pero en el que metanol al 0.5% remplazó al glicerol como única fuente de carbono, manteniéndolo durante 200 h a una densidad de 1×10^8 células/mL por dilución periódica con medio fresco. Utilizando un sistema similar pero a altas densidades celulares y en fermentadores, se obtuvieron concentraciones de 0.4 g/L de HBsAg (Tab. I) lo cual representa concentraciones 200 veces más altas que las producidas en matraces [20].

En fermentaciones de lote alimentado, la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) en una mutante Mut^s de *Pichia pastoris* con múltiples copias del cassette de expresión integrado al genoma alcanzó concentraciones finales de 6 a 10 g/L de medio (Tab. I). En cultivos continuos se observó una productividad volumétrica de 0.108 g/L·h [21].

Con mutantes Mut^+ de copia sencilla y llevando a cabo fermentaciones de lote alimentado se llegaron a obtener concentraciones de lisozima c2 de 0.58 g/L. Al cambiar de lote alimentado a una etapa de cultivo continuo durante aproximadamente 1 semana, se obtuvieron concentraciones promedio de 0.35 g/L y productividades volumétricas de 13±2 mg /L·h [22].

Para llevar a cabo la producción del fragmento C de la toxina tetánica se utilizó una mutante Mut^s conteniendo 14 copias del cassette de expresión, y en fermentaciones de lote alimentado se alcanzó una producción de 12 g/L (23).

Tabla I. Niveles de producción de proteínas recombinantes sintetizadas en *Pichia pastoris* [19].

Proteína	Producción (g/L)
Frag. C de toxina tetánica	12.0
Factor de necrosis tumoral	8.0
Interleucina humana 2	4.0
Albúmina sérica humana	4.0
Invertasa	2.5
Inhibidor de proteasas Kunitz	1.0
Análogo de la apoproteína	0.8
Lisozima humana	0.7
Factor de crecimiento epidermico murino	0.45
Ag de superficie de Hepatitis B	0.3

1.3. Hormona del Crecimiento Humano

La hormona del crecimiento humano (HGH) o somatotropina es un polipéptido globular de 191 aminoácidos sin residuos de azúcares, con un peso molecular de 22 kDa. Tomando en cuenta el modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcino (Fig. 7) se considera que la HGH está constituida por 4 hélices alfa antiparalelas. La molécula presenta dos enlaces disulfuro que conectan la hélice 4 con el extremo carboxilo terminal de la proteína, y la hélice 1 con la 4 [24].

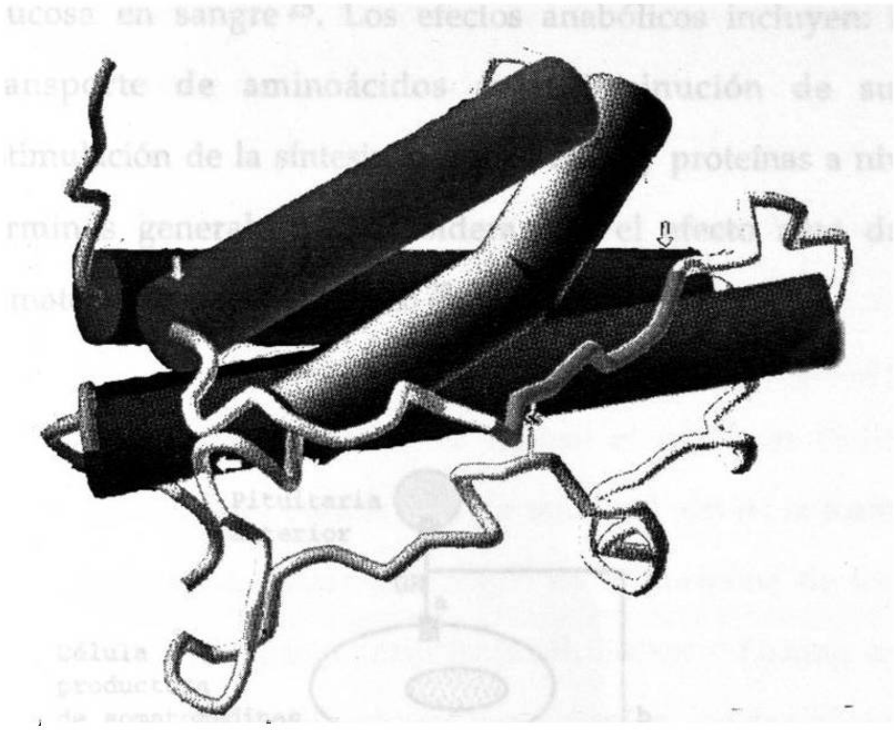


Figura 7.- Modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcino (PGH). Se muestra la representación en cilindros de las cuatro hélices alfa que constituyen la proteína y los lazos que las unen. Se considera que la HGH presenta una estructura tridimensional similar.

Entre las funciones importantes de la HGH se encuentra principalmente su participación en el crecimiento post-natal. La hormona

del crecimiento actúa directamente sobre las células de los tejidos blanco, o por medio de intermediarios de tipo hormonal, llamados somatomedinas (Fig. 8)[25].

La producción de HGH en la hipófisis es episódica y está regida por la acción de dos hormonas hipotalámicas, el factor liberador de la hormona del crecimiento y la somatostatina. Mientras que el primero estimula su síntesis, la segunda inhibe su liberación. Los efectos catabólicos de la HGH incluyen: incremento de la lipólisis, oxidación de los ácidos grasos y transporte disminuido de glucosa, lo cual provoca que se eleve la concentración de glucosa en sangre[25]. Los efectos anabólicos incluyen: incremento en el transporte de aminoácidos con disminución de su catabolismo y estimulación de la síntesis de ADN, ARN y proteínas a nivel hepático[26]. En términos generales, se considera que el efecto neto de HGH y de las somatomedinas es anabólico[27].

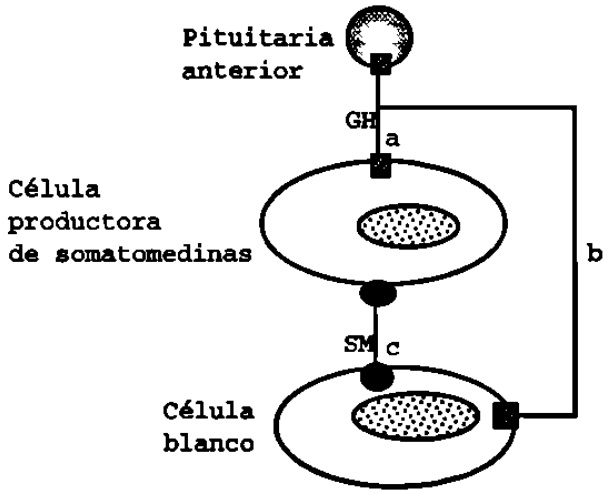


Figura 8.- Mecanismos de acción de HGH. Vía a: La HGH liberada por la hipófisis actúa indirectamente sobre los tejidos, induciendo a otras células para que produzcan intermediarios llamados somatomedinas. Vía b: La HGH actúa directamente sobre las células blanco. Vía c: Las somatomedinas ejercen su efecto sobre las células blanco[28].

La importancia de HGH y su aplicación en el área biofarmacéutica se refleja en los usos que ha tenido dicha hormona: Ha sido utilizada exitosamente en el tratamiento del enanismo hipofisiario; remueve ácidos grasos por lo que es empleada en el tratamiento de obesos, también mejora la vascularización y promueve la ganancia de masa muscular en los ancianos; es usada en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas y acelera la regeneración de tejidos dañados [29].

1.4.1 Síntesis de la Hormona del Crecimiento Humano Recombinante (HGHr) en *Escherichia coli*

La HGHr fue síntetizada por primera vez en *E. coli* (2.4 mg/L de medio de cultivo) por Goodel y colaboradores en 1979 bajo el control del promotor lac [30]. La secreción al periplasma de la bacteria fue lograda por Gray y cols.en 1985 , este sistema consistió en utilizar el ADNc de HGH en fusión con la región que codifica para el péptido señal del gen de la fosfatasa alcalina de *E. coli,* logrando sintetizar 0.28 mg/L de la hormona de los cuales el 82% se dirigió hacia el espacio periplásmico[31]. Becker y Hsiung en 1986 sintetizaron 15 mg/L de HGH al espacio periplásmico gracias al péptido señal de la proteína de membrana externa (OMP) de *E.coli*[2]. Chang y cols., al fusionar el ADNc de HGH a la región que codifica para el péptido señal de la enterotoxina II de *E. coli,* utilizando el promotor de la fosfatasa alcalina de esta misma bacteria sintetizaron 15.4 mg/L de HGH, de los cuales el 90% se exportó al periplasma[3]. Kato y cols. en 1987 reportaron la síntesis de HGH y su secreción al medio de cultivo, esto se realizó mediante el uso de un plásmido híbrido kill-hGH. El gen kill expresa una proteína que

permeabilizaba la membrana externa. La cantidad en que produjeron HGH fue 20.5 mg/L, de los cuales 11.2 se secretaron al medio y 8.6 al periplasma [32]. Hsiung y cols. en 1989 con el uso de la proteína liberadora de bacteriocina permitió que la HGHr, la cual había sido secretada al periplasma gracias a la presencia del péptido señal de OMP, fuera secretada al medio de cultivo con una producción de hasta 69.6 mg/L [33].

Tabla II. Producción de HGHr en *Escherichia coli*

Investigador	Producción (mg/L)	Destino final
Gooddel y cols.(1979)	2.4	Citoplasma
Gray y cols.(1984)	0.28	Periplasma
Becker y cols.(1986)	15.0	Periplasma
Chang y cols.(1987)	15.4	Periplasma
Kato y cols.(1987)	20.5	Medio de cultivo
Hsiung y cols.(1989)	69.0	Medio de cultivo

En la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (U.L.I.E.G.), Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina de la U.A.N.L. se llevó a cabo la producción de la HGHr fusionada a la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) en *Escherichia coli*. Para ello se construyó el plásmido pMalchGH22K (Fig. 9)[14], el cual se introdujo en células de *Escherichia coli* TB1. La biosíntesis fue inducida con IPTG, el cual desreprime al promotor Tac y permite que la transcripción se lleve a cabo libremente. La producción fue citoplasmática debido a que el plásmido carecía de una región codificante para alguna secuencia señal.

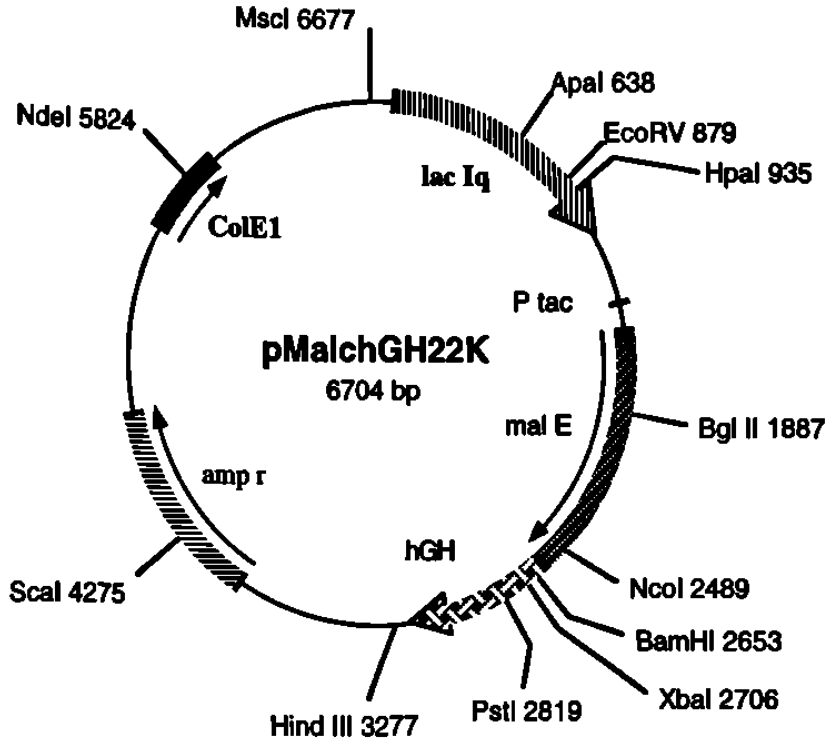


Figura 9.- Mapa gráfico del plásmido pMalchGH22K. El ADNc de HGH se encuentra clonado justo después del gen malE el cual codifica para la proteína MBP, por lo que el resultado es la biosíntesis de HGH-MBPr. También se esquematizan las diferentes regiones del plásmido: el gen que confiere resistencia a ampicilina (amp r), el origen de replicación (ColE1), el gen lac Iq y el promotor Tac (P tac).

1.4.2 Síntesis de HGHr en Otros Hospederos

La HGH también ha sido producida en *S. cerevisiae*; Tokunaga y cols. en 1985 reportaron de 1.4 a 4.7 moléculas por célula (2.5 a 8.5 mg/L)[34]. Franchi y cols. en 1991 reportaron la producción de HGH en *Bacillus subtilis* y su liberación al medio de cultivo con niveles de 35 mg/L[35].

Varios investigadores han reportado la síntesis de HGH en células de mamífero, sin embargo los rendimientos obtenidos son muy bajo, (en el orden de μg/L)[36, 37].

1.5 Optimación empleando el Método Simplex Secuencial

Uno de los aspectos importantes en la producción de proteínas recombinantes, es el encontrar las condiciones de fermentación que permitan una producción óptima de la proteína deseada. El método simplex secuencial es un proceso de optimación empírica que se puede aplicar cuando la respuesta a optimar depende de factores continuos (cuantitativos). La utilidad del método aumenta con el número de factores involucrados y permite alcanzar el objetivo de manera eficiente.

La metodología es sencilla, consiste en diseñar n + 1 ensayos iniciales donde n es el número de factores que influyen en la respuesta a optimar. A los factores seleccionados se les asignan dos niveles de acuerdo a la información obtenida ya sea en ensayos previos o de la literatura. Con estos niveles se diseña el primer grupo de ensayos en forma de un factorial fraccionado y se llevan a cabo los ensayos de acuerdo a la matriz diseñada. Después se identifica y se elimina el ensayo que produjo la peor respuesta, y es diseñado un nuevo ensayo calculando los nuevos niveles para cada factor, se realiza el nuevo ensayo, se identifica la peor respuesta y se continúan diseñando ensayos hasta alcanzar la respuesta óptima [38, 39].

1.6 Objetivos

Tomando en cuenta la importancia que para nuestro país tiene el desarrollo de la nueva Biotecnología prácticamente aun inexistente a nivel industrial, aunado a la importancia biofarmacéutica de HGH, y a la disponibilidad del sistema de expresión de *Pichia pastoris* para producir HGHr se plantearon los siguientes objetivos:

1.6.1 Objetivo General

Desarrollar clonas de *Pichia pastoris* que porten el ADNc de la hormona del crecimiento humano, que sinteticen y secreten esta al medio de cultivo y comparar su productividad con la de clonas de *Escherichia coli*-portadoras del plásmido pMalchGH22K.

1.6.2 Objetivos específicos

1-. Transformar células de *Escherichia coli* con el plásmido pMalchGH22K

2-. Optimar la producción de HGH-MBPr en *E. coli*

3-. Subclonar el ADNc de hGH en el vector de integración pPIC9

4-. Transformar células de *Pichia pastoris* con el vector de integración construido (pPIC9hGH22K)

5-. Seleccionar la clona de *Pichia pastoris* sobreproductoras de HGHr

6-. Optimar la producción de HGHr en *Pichia pastoris*

7-. Comparar la producción de HGHr en ambos sistemas.

CAPITULO 2

MATERIAL Y METODOS

2.1 Area de Trabajo , Reactivos y Material Biológico

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (U.L.I.E.G.), del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.,

Las enzimas de restricción utilizadas fueron adquiridas de New England Biolabs (NEB, Bevrly Ma, EUA) y Bethesda Research Laboratories (BRL, Gaithersburg MD, EUA). Para las digestiones enzimáticas realizadas, se recurrió a los amortiguadores y las recomendaciones señaladas por los proveedores.

Los reactivos para las diferentes soluciones provienen de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo, EUA), Merck de México (Monterrey, N.L.) y Reactivos Monterrey (Monterrey, N.L.). El estuche de "Gene clean" se adquirió de Bio-101 (La Jolla Ca, EUA). El plásmido pMalchGH22K (14) y la cepa TB1 de *E. coli* provienen de la colección de plásmidos y bacterias del laboratorio de Biotecnología de la U.L.I.E.G., Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, de la U.A.N.L. El sistema de expresión de *Pichia pastoris* el cual incluye la cepa GS115, GS115-Albúmina, GS115-ß-Galactosidasa, la cepa de *E. coli* TOP10F', vectores , iniciadores y otros, se adquirieron de Invitrogen Corporation (San Diego Ca, EUA).

· 2.2 Equipo

Se utilizó un horno de microondas GoldStar modelo MA-857M (Seul, Corea), microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, una fuente de poder Biorad 200/2.0 (Nebraska, EUA), un agitador de tubos Barntead/Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, Iowa, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un ultracongelador marca So-Low Enviromental Equipment (Cincinnati, Ohio, EUA) y una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (K. C., Missouri, EUA), una báscula digital marca Sartorios modelo 1206MP (Camibh Göttingen Germany), un evaporador y concentrador marca Labonco Corporation modelo 78100-00 (K. C., Missouri, EUA) .

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo; Power Macintosh 6100/66 (Apple Computer, Inc.; Cupertino California. EUA).

El procesador de texto utilizado fue; *Microsoft Word* versión 5.1a (© 1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsft PowerPoint* Versión 3.0 (© 1987-1992 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition* 2.5.1 (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y *UMAX Scan* (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc.).

Los programas computacionales de Biología Molecular fueron; *Amplify* versión 1.2b (Bill Engels ©1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, Wi. EUA), *DNA Strider* ™ 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Départemet de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *Oligo* versión 4.0 (© 1992, Plymouth, Mn,

EUA), *MacPlasmap* versión 1.82 (© 1988-1990 Jingdong Liu, Biology Department, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112. EUA).

2.3 Métodos

El trabajo experimental se divide en 2 fases:

1) En la primera se llevaron a cabo las etapas experimentales para la producción de HGH-MBPr en *Escherichia coli* (Fig. 9) las cuales son las siguientes:

a) Transformación de *E. coli* TB1 con el plásmido pMalchGH22K

b) Caracterización molecular de la clona obtenida

c) Fermentaciones

d) Análisis de proteínas

e) Optimación de la producción de HGH-MBPr.

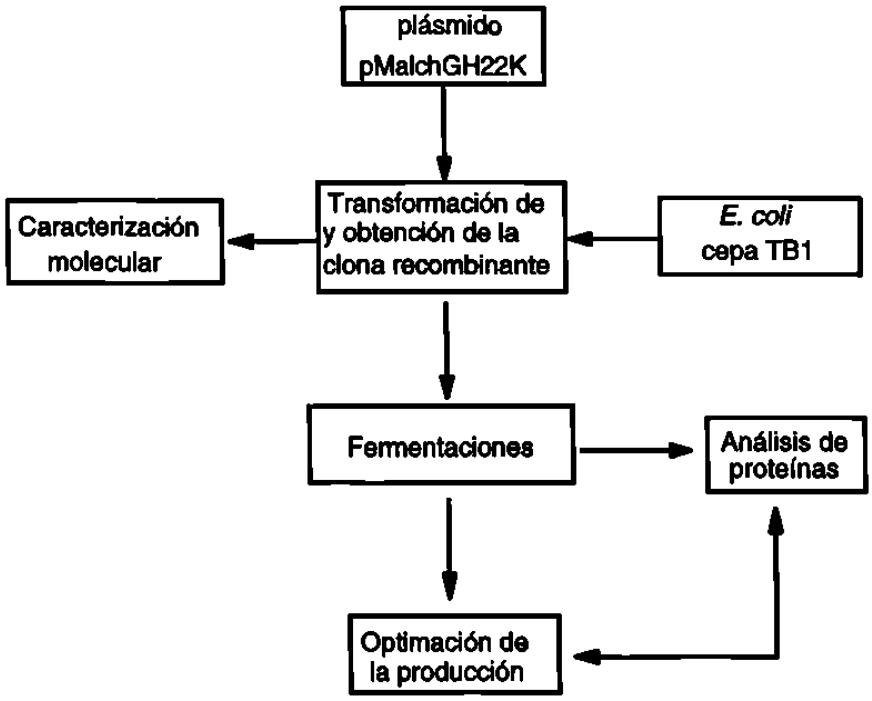


Figura 9.- Representación esquemática de la fase I. Etapa en la cual se llevó a cabo la biosíntesis de HGH-MBPr en *Escherichia coli* .

2) En la segunda fase se llevaron a cabo las etapas experimentales para la producción de HGHr en *Pichia pastoris* (Fig. 10)

a) Construcción del plásmido pPIC9hGH22K

b) Transformeción de *E. coli* TOP10F'

c) Análisis de clonas obtenidas

d) Aislamiento del ADN plasmídico a gran escala de una de las clonas identificadas

e) Transformación de *Pichia pastoris*

f) Selección de la clona productora de HGHr mediante fermentación y análisis de proteínas en el medio de cultivo.

g) Optimación de la producción de HGHr.

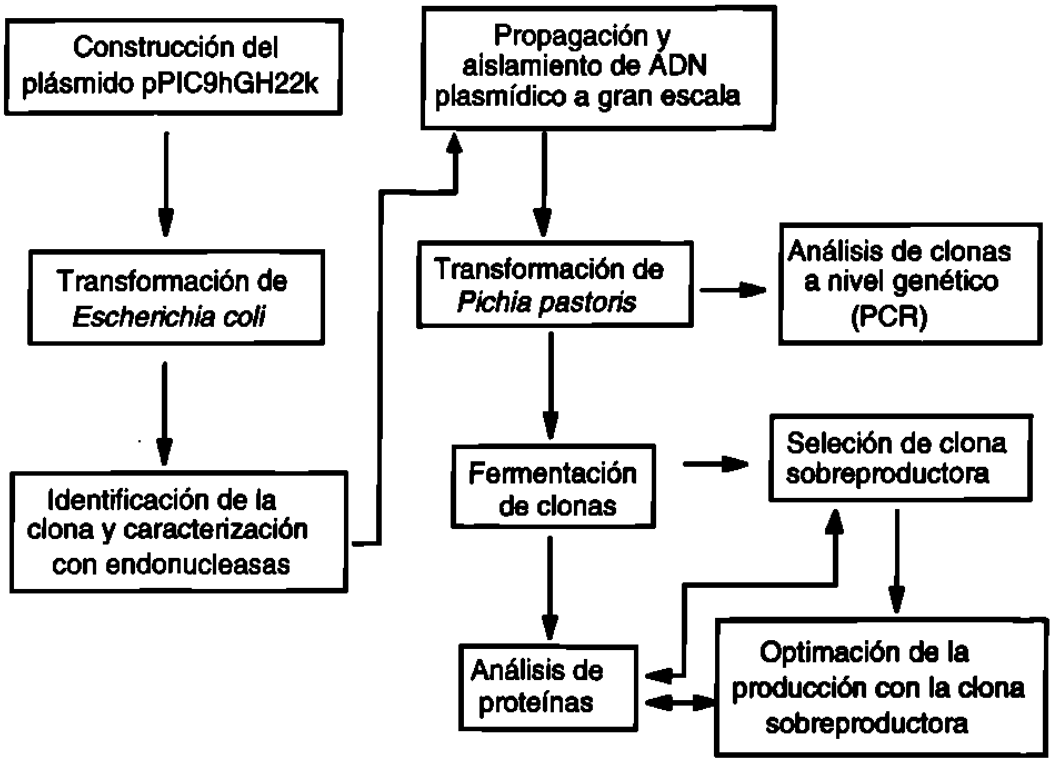


Figura 10.- Representación esquemática de la fase II. Etapas experimentales de la biosíntesis de HGHr en *Pichia pastoris* .

2.3.1 Biosíntesis de HGH-MBPr en *Escherichia coli*

2.3.1.1 Transformación de *Escherichia coli* TB1 con pMalchGH22K

Utilizando bacterias calcio-competentes (*E. coli* TB1), las cuales se prepararon de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook[40], se llevó a cabo la transformación con el plásmido pMalchGH22K[14] según se describe a continuación. En un tubo de microcentrífuga conteniendo 50µL de bacterias *E. coli* TB1 calcio-competentes se añadieron 10 ng del plásmido se colocó en hielo por 30 min con agitación ocasional. Posteriormente se realizó un choque de calor a 37°C por 2 min, se incubó nuevamente en hielo por 10 minutos y se añadieron 300 µL de caldo Luria-Bertani (LB Anexo 1). Se incubó a 37°C por 1 h con agitación suave, para que las bacterias se recuperaran y comenzaran a expresar el gen de resistencia. Luego las bacterias se distribuyeron en una caja de Petri con agar LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C, hasta observar colonias (12-16 h).

La identidad de la clona transformada se aseguró llevando a cabo el siguiente procedimiento: Se tomó una colonia de la placa de transformación, se inoculó en un tubo con caldo LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó durante 18h a 37°C con agitación a 250 rpm. Posteriormente se realizó extracción de ADN plasmídico por minipreparación por lisis alcalina[40]. Empleando 1 µg del ADN plasmídico con calidad de 1.6 (lectura a 260 nm/ lectura a 280 nm), se realizó una digestión doble con las endonucleasas *Xba* I y*Hin* d III para una caracterización parcial. El volumen final de reacción fue de 10 µL, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se tiñó con una solución de bromuro de etidio (2 mg/mL) durante 5 min y se observaron los fragmentos en el transiluminador de luz UV (Foto/Phoresis

I, Fotodyne, EUA). Una vez obtenidos los fragmentos esperados de la digestión anterior se realizó aislamiento de ADN plasmídico a gran escala empleando gradiente de densidad en cloruro de cesio [41] a partir de la colonia previamente analizada. Empleando el ADN plasmídico de gran escala se realizó la caracterización del plásmido pMalchGH22K con endonucleasas diagnósticas; en cada reacción se digirieron 3 µg de ADN plasmídico con una calidad de 1.79 en un volumen final de reacción de 20 µL, de los cuales se emplearon 4 µL para llevar a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, tinción con bromuro de etidio y el empleo de un transiluminador para observar los fragmentos. La cuantificación del ADN así como la obtención del parámetro de calidad del mismo, se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y cols [40].

La caracterización del plásmido pMalchGH22K se basó en el análisis computacional prácticado a su secuencia nucleotídica con el programa *DNA Strider* (Anexo 2). Las enzimas empleadas para la caracterización, así como los fragmentos teóricos obtenidos se muestran en la tabla III.

Tabla III. Enzimas empleadas para la caracterización de pMalchGH22K y fragmentos teóricos obtenidos

Digestión (enzimas)	Fragmentos (pb)
Xba I + *Hin* d III	6113 y 572
Bam HI + *Hin* d III	6077 y 608
Pvu II	2682, 1678, 1612, 497, 123 y 93
Apa LI	2826, 1285, 1246, 830 y 498
Hin d III	6681

2.3.1.2 Fermentación con *Escherichia coli* Recombinante

Una de las colonias de *Escherichia coli* recombinante previamente caracterizada fue propagada en un tubo con 5 mL de caldo LB con ampicilina (100 μg/mL) a 37°C en agitación a 250 rpm durante 18 h. De este cultivo se inocularon 25 mL de medio LB con ampicilina (100 μg/mL) en un matraz de 250 mL para dar una densidad óptica (DO_{600}) inicial de entre 0.02 y 0.03. Se incubó a 37°C en agitación a 250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5, y enseguida se añadió el inductor (IPTG) a una concentración final de 0.3 mM. Posteriormente se siguió incubando a las mismas condiciones y se tomaron dos alicuotas de 1 mL a las 2 h de inducción, para llevar a cabo el análisis de proteínas.

2.3.1.3. Análisis de Proteínas del Paquete Celular

El análisis de proteínas se realizó del paquete celular debido a que en este sistema de expresión, la proteína recombinante (HGH-MBPr) no es secretada, sino que permanece en el citoplasma de la bacteria. El paquete celular se obtuvo por centrifugación a 16000 *g* (14000 rpm centrífuga Eppendorf 5402) por 3 min, de las alícuotas tomadas en el paso anterior. Posteriormente se evaluaron la concentración de proteínas utilizando el método de Bradford [42] y el porcentaje de HGH-MBPr, el cual se determinó por densitometría de geles de poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Coomassie.

2.3.1.3.1 Determinación de Proteínas Totales

Para la determinación de proteínas las bacterias fueron sometidas a lisis de la siguiente manera: Los paquetes celulares de alicuotas de 1 mL de medio de cultivo se resuspendieron en 50 µL de amortiguador de lisis (Na_2HPO_4 10 mM, NaCl 30mM, Tween 20 0.25 %v/v, ß-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10 mM, pH=7), para muestras de células no inducidas y en 200 µL para células inducidas. Posteriormente fueron congeladas en nitrógeno líquido y descongeladas en un baño de agua a 37°C por 2 min Este proceso de congelación-descongelación se repitió 4 veces para asegurar una lisis completa. Empleando alícuotas de 5 a 10 µL de la suspensión del lisado se determinaron proteínas por el método de Bradford [42], empleando un espectrofotómetro (*Beckman DU-70)* para determinar la absorbancia a 595 nm que se presenta por la unión del azul brillante de Coomassie a las proteínas. Se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino (ASB, *Sigma)* en un intervalo de concentración de 1 a 17 µg/mL. Tanto las muestras como los estándares fueron preparados por duplicado. La concentración de las muestras se estimaron interpolando los valores de absorbancia en la curva de calibración con apoyo del programa computacional *Microsoft Excel.*

2.3.1.3.2 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE) y Densitometría

Los paquetes celulares de alícuotas de 1 mL de medio de cultivo se resuspendieron en 200 µL de solución amortiguadora de SDS-PAGE.

Posteriormente se calentaron a 100°C durante 10 minutos. La separación de proteínas se realizó por electroforesis en gel discontinuo de poliacrilamida (gel separador al 12 % y un gel concentrador de acrilamida al 4%) en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se aplicó un voltaje inicial de 80 V hasta que el colorante penetró en el gel concentrador aproximadamente 1 cm, y luego se incrementó este a 140 V, se mantuvo la electroforesis hasta que el colorante llegó al gel separador y finalmente se incrementó a 180 V salió del gel (14 cm x 17 cm x 0.1 cm). Se desensamblaron los vidrios que contenían el gel y éste se colocó en un contenedor de vidrio con solución fijadora (metanol 50%v/v, ácido acético 10%v/v en agua desionizada) para luego someterlo a agitación a 40 rpm durante 1 hora. Después se retiró la solución fijadora y se añadió la solución colorante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie 0.5%p/v, metanol 50%v/v, ácido acético 10%v/v, en agua desionizada) y se agitó a 40 rpm durante 25 minutos, se retiró la solución colorante y se añadió solución decolorante (metanol 5%v/v, ácido acético 7%v/v, en agua desionizada) agitando a 40 rpm durante 1 hora. El gel se continuó decolorando con cambios periódicos de la solución decolorante, hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel [43].

El porcentaje relativo de HGH-MBPr en los extractos celulares se determinó por densitometría en gel, basándose en la medición de la intensidad del color de las bandas obtenidas. El equipo empleado fue un densitómetro Zeineh Soft Laser (Scanning Densitometer, Model SLR-2D/ID, *Biomed Instruments, Inc.)* con Zeineh programs Universal Software *(Advanced American Biotechnology Biomed VGA Programs).* El programa empleado para inicio de la sesión fue el *"Laser 1D Scanning Main Program"*. Se determinó la longitud de los carriles del gel para indicar la distancia a

registrar. El equipo se calibró ajustando la densidad óptica a 0 de absorbancia acomodando el laser en medio de dos carriles (blanco), donde no había proteínas (para ello se emplea el botón "ZERO" en el equipo "Zeineh Soft Laser Densitometer"). Posteriormente se ajustó el 100 de absorbancia con el botón "GAIN", colocando el haz de luz sobre la banda más intensa del carril, (se recomienda que en lugar de 100 se ajuste de 80 a 90 para evitar problemas en caso de que exista una banda más intensa de la que se ha considerado). Para realizar las lecturas se ubica el laser al inicio del carril y se escoge la opción "Scan and Save Report" en el menú. Al realizar esta operación el laser automáticamente pasa a lo largo del carril donde se acomodó, registra la inensidades de las bandas y despliega un reporte (densitograma, con los valores de áreas y porcentajes relativos de cada uno de los picos), los datos se graban en el programa *"Expanded and View Process 1 Data", en* el cual se pueden procesar los datos e imprimir los resultados y densitogramas.

2.3.1.3.3 Inmunodetección de la HGH-MBPr por "Western blot"

Se realizó un análisis por SDS-PAGE bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Posteriormente se llevó a cabo la electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa (0.45 micrones Bio-rad) por 3 h a 100 V, ésta se incubó 1 h con agitación a 40 rpm en solución de bloqueo (Tween 20 al 0.3 % v/v, albúmina de suero bovino al 0.3 % p/v en PBS) para bloquear las áreas libres de proteína en la membrana.

Como primer anticuerpo se empleó un antisuero anti-HGH desarrollado en conejo (Sigma) en una dilución 1:1000 en 1 % de solución de bloqueo en PBS. Este se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente se

hicieron 3 lavados de 15 min con agitación moderada con Tween 20 al 0.3 % en PBS. Como segundo anticuerpo se empleó un anti-IgG de conejo desarrollado en cabra (Sigma) en una dilución 1:1000 en 1 % de solución de bloqueo en PBS. Se incubó 1 h a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de 15 min con agitación moderada con tween 20 al 0.3 % en PBS. Para el revelado se emplearon 10 mL de la mezcla de sustratos cromogénicos que contenía 66 µL de nitroazul de tetrazolio (NBT) al 5 % p/v y 33 µL de fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indol (BCIP) al 5 % p/v en amortiguador fosfato-alcalino (NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 5 mM, Tris-HCl 100 mM pH=9.5). Se añadió a la membrana y se agitó moderadamente hasta la aparición de las bandas de interés (10 min aproximadamente).

2.3.1.4 Optimación de la Producción de HGH-MBPr en *E. coli*

Esta etapa experimental consistió en optimar las condiciones de fermentación para mejorar la producción de HGH-MBPr sintetizada por *Escherichia coli*. Para ello se empleó el método simplex secuencial básico[38, 39] el cual es un método matemático para dirigirse rápidamente al punto óptimo determinado por la combinación de los valores de los factores considerados para la optimación.

Las factores empleadas para la optimición fueron:

a) Densidad óptica al inicio de la inducción (D.O.)

b) Concentración de Inductor (IPTG)

c) Concentración de glucosa en el medio de cultivo (% Glc)

d) Tiempo de inducción (T.I.)

El indicador para la optimación fue la producción de HGH-MBPr, la cual se obtuvo a partir del porcentaje de HGH-MBPr, determinada por densitometría de geles y la concentración de proteínas (mg/L) determinada por el método de Bradford [42]. De esta manera el resultado obtenido se expresó en mg de HGH-MBPr/L de medio de cultivo.

De acuerdo al método simplex, el número de ensayos iniciales debe ser de n+1, siendo n el número de factores empleados. Debido a que durante esta optimación se emplearon 4 factores, el número de ensayos iniciales fueron 5. La combinación de los valores de los factores para cada uno de los cinco ensayos iniciales se decidió según un diseño matricial propuesto por el método simplex tal y como se indica en la tabla IV

Tabla IV. Diseño matricial para cuatro factores propuesto por el método simplex secuencial

Ensayo	X1	X2	X3	X4
1	bajo	bajo	bajo	bajo
2	alto	bajo	bajo	alto
3	bajo	alto	bajo	alto
4	alto	alto	bajo	bajo
5	bajo	bajo	alto	alto

Posteriormente se fijaron valores altos y bajos para cada una de los factores de acuerdo a la informsción obtenida de la literatura y estudios de influencia de factores que afectan las fermentaciones [44], tomando en cuenta también ensayos preliminares realizados , por lo tanto los cinco ensayos iniciales fueron los siguientes:

Tabla V. Valores de factores de los 5 ensayos iniciales

Ensayo	D.O.	[IPTG]	%Glc	T.I. (h)	Resultado
1	0.4	0.3	0	2	R1
2	0.8	0.3	0	5	R2
3	0.4	1	0	5	R3
4	0.8	1	0	2	R4
5	0.4	0.3	0.2	5	R5

De acuerdo a los resultados obtenidos para cada uno de los cinco ensayos realizados, se descartó el número adecuado de ensayos de acuerdo al siguiente procedimiento: En una lista se ordena de menor a mayor el valor del parámetro a optimar, obtenido de los ensayos iniciales, en este caso la producción de HGH-MBPr (por ejemplo: R3<R5<R2<R1<R4). Al primer valor de la lista (R3) se le considera como el peor resultado, enseguida se obtiene el promedio de los valores restantes (R1+R2+R4+R5/4=RX). Posteriormente se calcula la diferencia entre el resultado más bajo y el promedio de los restantes (RX-R3=A). Esta misma metodología se continúa aplicando solo que en el siguiente paso se considera como peores ensayos los primeros dos de la lista (R3 y R5), se obtiene el promedio de sus respuestas (R3+R5/2=RY) y se resta al promedio de los demás experimentos ([R1+R2+R4/3]-RY=B). En el siguiente paso se agrupan los primeros tres resultados como los peores (R3, R5 y R2) y los demás como los mejores (R1 y R4), se obtienen los promedios y la diferencia entre éstos (C) y así sucesivamente. Finalmente, aquella combinación que produzca la máxima diferencia entre el promedio de cada uno de los dos grupos, peores y mejores, identifica al ensayo (s) que debe (n) descartarse (ejemplo: si A>B y C, se elimina R3, y si B>A y C, se elimina R3 y R5). Posteriormente se calculan los valores de las variables para el nuevo o los nuevos ensayos.

Realizando el proceso anterior se llevaron a cabo un total de 14 ensayos (tabla XIII, Capítulo 3) distribuidos en 5 etapas. En cada etapa se realizó un ensayo control (un ensayo de una etapa anterior) para descartar el efecto de variables no contempladas. Las condiciones empleadas para cada ensayo, así como los parámetros evaluados y el resultado o indicador para la optimación se observan en la tabla XIII en la sección de resultados.

2.3.2 Biosíntesis de HGHr en *Pichia pastoris*

2.3.2.1. Construcción del Vector pPIC9hGH22K

Para llevar a cabo la construción del vector pPIC9hGH22K se llevaron a cabo una serie de pasos los cuales se esquematizan en la figura 12

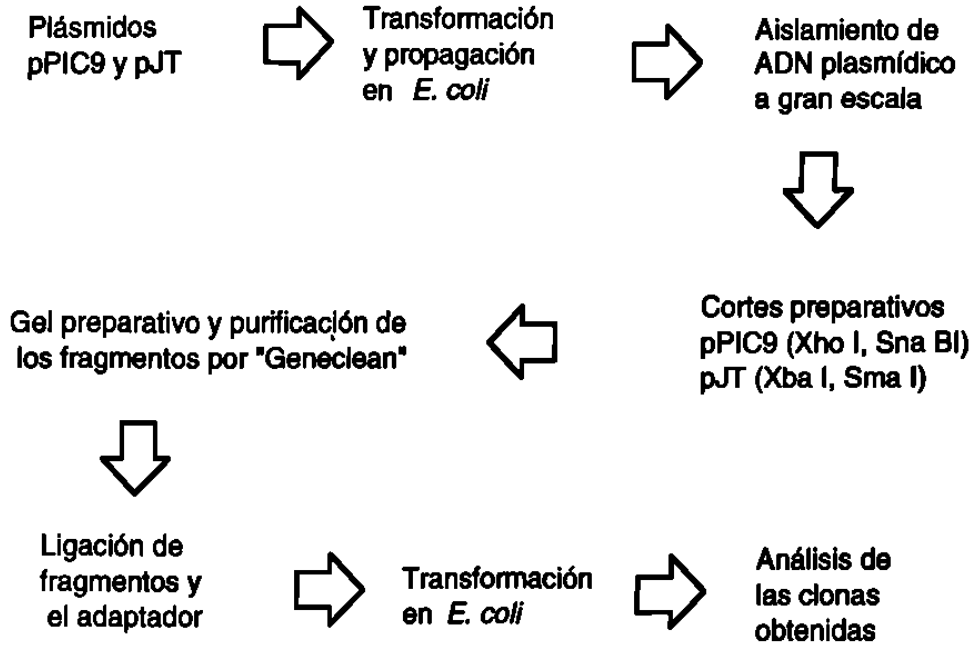


Figura 12.- Estrategia experimental para llevar a cabo la construcción del vector pPIC9hGH22K.

El ADNc de hGH se obtuvo del corte *Xba* I-*Sma* I del plásmido pJT, en un fragmento de 563 pb (Anexo 3) portador de los codones 8 al 191 de la hormona madura (Fig. 13). Por otra parte el plásmido pPIC9, el cual contiene las secuencias necesarias para la integración, expresión y secreción del producto recombinante en *P. pastoris* , fue hidrolizado por las enzimas *Xho* I-*Sna* BI, eliminando 11 nucleótidos del extremo 3' de la secuencia señal (factor alfa de *S. cerevisiae)* (Fig. 14). Para restaurar ambas secuencias eliminadas (11 nucleótidos de la secuencia señal de pPIC9 y 19 nucleótidos de la secuencia codificante para HGH madura), se empleó un adaptador sintético (Fig. 15). El fragmento de 563 pb obtenido de pJT, el plásmido pPIC9 digerido con *Xho* I y *Sna* BI y el adaptador sintético se pusieron en una misma reacción de ligación (Fig. 16), con una alícuota de la cual se transformaron células de *E. coli.* Posteriormente se realizó un análisis de las clonas para detectar las portadoras del plásmido pPIC9hGH22K.

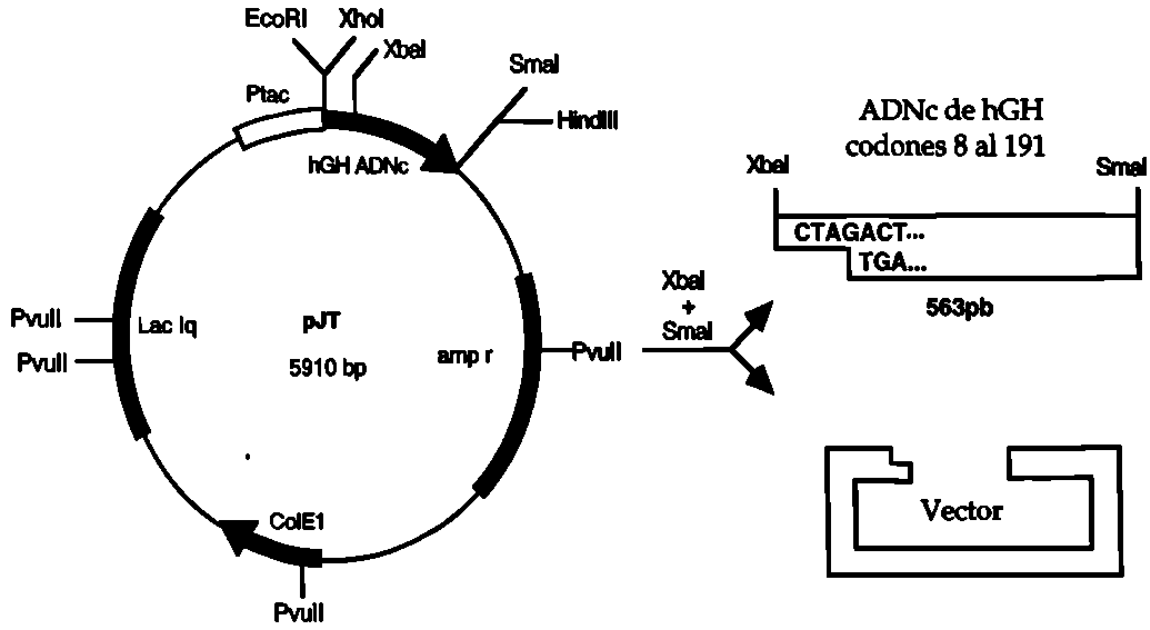


Figura 13.- Representación esquemática del corte preparativo de pJT. Se presenta la estructura de pJT con sus elementos más importantes y los productos obtenidos después de la digestión con las enzimas *Xba* I-*Sma* I.

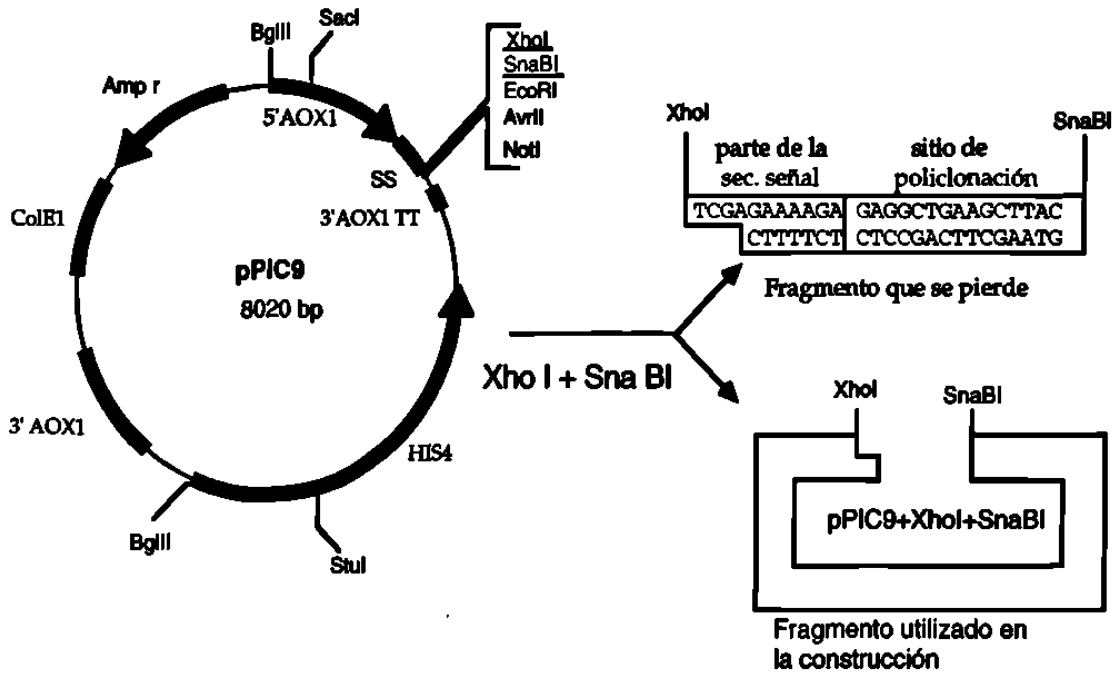


Figura 14.- Representación esquemática del corte preparativo de pPIC9. Se presenta la estructura de pPIC9 con sus elementos más importantes y los productos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas *Xho* I y *Sna* BI

TCGAGAAAAGATTCCCAACCATTCCCTTAT
Oligonucleótido 1

CTTTTCTAAGGGTTGGTAAGGGAATAGTTC
Oligonucleótido 2

↓ alineamiento

Adaptador sintético

TCGAGAAAAGA	TTCCCAACCATTCCCTTAT
CTTTTCT	AAGGGTTGGTAAGGGAATAGTTC
A)	**B)**

A) Porción eliminada con el corte de pPIC9 con Xho I y Sna BI

B) Porción eliminada con el corte de pJT con Xba I y Sma I

Figura 15.- Secuencia nucleotídica del adaptador sintético empleado para la construcción de pPIC9hGH22K. Se indican las secuencias recuperadas al realizarse la ligación de éste con los fragmentos procedentes de pPIC9 y pJT.

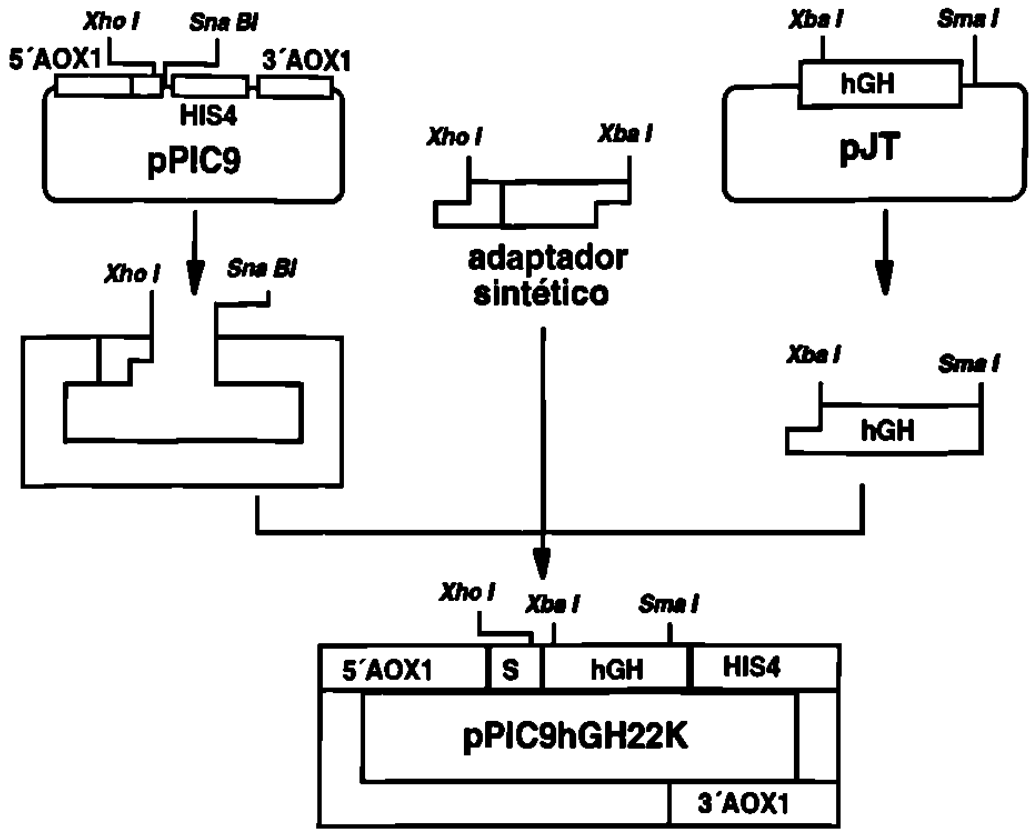


Figura 16.- Estrategia de construcción del vector pPIC9hGH22K para síntesis de HGHr en *P. pastoris*. El ADNc de HGH se obtuvo del plásmido pJT realizando cortes con las endonucleasas *Xba* I y *Sma* I. Con este corte se pierde una pequeña región del ADNc de HGH. El vector pPIC9 portando los elementos para la expresión en *P. pastoris* fue cortado con las endonucleasas *Xho* I y *Sna* BI, perdiendo de esta manera una pequeña porción correspondiente a la secuencia señal del plásmido (factor alfa de *S. cerevisiae).* Las porciones eliminadas del ADNc de hGH y la secuencia señal se recuperaron con la ligación de estos dos fragmentos con un adaptador sintético que es compatible con *Xho* I en uno de sus extremos y con *Xba* I en el otro.

2.3.2.1.1 Preparación de los Plásmidos pPIC9 y pJT

Células calcio-competentes de *E. coli* TOP 10F' (Invitrogen, Co. San Diego Ca, EUA) fueron transformadas con los plásmidos pPIC9 y pJT. La preparación de bacterias calcio-competentes así como la transformación se

realizaron de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook y cols [40]. Posteriormente se levantaron colonias de bacterias portando el plásmido pPIC9 o pJT y se cultivaron en 1L de caldo LB para después realizar aislamiento de ADN plasmídico a gran escala utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio [41]. De esta manera se obtuvo una fuente de plásmido de buena calidad para llevar a cabo la construcción del plásmido pPIC9hGH22K.

2.3.2.1.2 Preparación de Fragmentos para Ligación

La digestión de pJT con la enzima *Xba* I se llevó a cabo tal como indica la tabla VI.

Tabla VI. Mezcla de reacción de la digestión preparativa de pJT con la endonucleasa *Xba* I.

Reactivo	Volumen (µL)
Xba I (10 U/µL)	2
Buffer 10 X	5
ASB 10 X	5
ADN (pJT 600 ng/µL)	13
Agua Milli-Q	25
Volumen total	50

La reacción se efectuó a 37°C durante 5 h y después se agregaron 2 µL de la endonucleasa *Sma* I (10 U/µL) y se incubó durante toda la noche a 25°C.

La digestión pPIC9 con las endonucleasas *Xho* I y *Sna* BI se realizó de la siguiente manera: primero se llevó a cabo el corte con la enzima *Sna* BI

incubando a 37°C por 5 h la mezcla de reacción descrita en la tabla VII. Posteriormente se agregaron 2 µL de la endonucleasa *Xho* I (10 U/µL) y se incubó durante toda la noche a 37°C.

Tabla VII. Mezcla de reacción de la digestión preparativa de pPIC9.

Reactivo	Volumen (µL)
Sna BI (4 U/µL)	5
Buffer 10 X	5
ASB 10 X	5
ADN (pPIC9 800 ng/µL)	15
Agua Milli-Q	20
Volumen total	50

El éxito de las digestiones se verificó por análisis de alícuotas de 1 µL mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez concluidas las digestiones preparativas antes mencionadas, se llevó a cabo la electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1% con 25 µL de cada reacción de digestión y se realizó una tinción con bromuro de etidio (2 µg/mL en TBE). Los fragmentos de 563 pb de la digestión de pJT con *Xba* I y *Sma* I y de 7996 pb de la digestión de pPIC9 con *Xho* I y *Sna* BI , fueron recuperados del gel cortando las bandas correspondientes con ayuda de un bisturí. Estos se extrajeron de la matriz de agarosa utilizando la técnica de "Geneclean" (The Geneclean II Kit Bio 101, Inc. Ca, EUA) y se almacenaron en amortiguador TE a -20°C hasta su empleo. El adaptador sintético empleado se construyó a partir de oligonucleótidos sintéticos complementarios que fueron proporcionados en cadena sencilla por el Laboratorio de Química Biomolecular de la U.L.I.E.G., Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina de la U.A.N.L. donde se empleó un síntetizador Oligo-1000 (Beckman) para su síntesis. Previo a la reacción de

ligación éstos fueron apareados por complementariedad de bases de la siguiente manera: Se llevó a cabo la mezcla conteniendo: 5 µL de amortiguador TE 10X, 3.3 µL de NaCl 150 mM, 21 µL del oligonucleótido 1 (0.74 µM) y 21 µL del oligonucleótido 2 (0.70 µM), dando lugar una solución de NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, y EDTA 1 mM, se calentó la mezcla a 80°C por 5 minutos, se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente y se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.3.2.1.3 Reacción de Ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo en una proporción molar 1 : 8 : 40 (fragmento de 7996 pb : fragmento de 563 pb : Adaptador 30 pb), realizando una mezcla como se indica en la tabla VIII.

Tabla VIII. Mezcla de reacción de ligación.

Reactivo	Volumen (µL)
Fragmento de 7996 pb (100 ng/µL)	2
Fragmento de 563 pb (60 ng/µL)	2
Adaptador sintético 30 pb (5 ng/µL)	6
Buffer de ligasa 5 X	4
Ligasa 40 U/µL	3
H_2O Milli-Q	3
Volumen total	20

Después de realizar esta mezcla se incubó durante toda la noche a 16°C y se corroboró la ligación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, para visualizar la ausencia de los fragmentos de ligación (7996 y 563 pb) y la

presencia de bandas de mayor peso molecular. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* TOP 10F' con una alícuota de 5 µL de producto de ligación usando bacterias calcio-competentes.

2.3.2.1.4. Análisis y Selección de Clonas Portadoras de pPIC9hGH22K

De las colonias obtenidas de la transformación (resistentes a ampicilina) se levantaron 20 para su inoculación individual en tubos con 4 mL de caldo LB con ampicilina (100 µg/mL). Se incubaron a 37°C y a 250 rpm durante 18 h. Posteriormente se tomaron 2 mL de cada cultivo y se realizó aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (minipreparación) de acuerdo al método descrito por Sambrook y cols [40]. El ADN plasmídico aislado de cada una de las clonas fue tratado con la endonucleasa *Xba* I, para detectar el plásmido pPIC9hGH22K, el cual debería presentar fragmentos específicos de 7210 y 1377 pb, debido a que dicha enzima corta en los posiciones 1222 y 2599 (Anexo 4). Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para analizar las digestiones. Las clonas que mostraron el patrón esperado fueron caracterizadas más exhaustivamente, realizando digestiones con cada una de las siguientes endonucleasas: *Xho* I, *Xho* I+*Eco* RI, *Xba* I, *Pvu* II y *Bgl* II. Los fragmentos teóricos según el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider*, alimentado con la secuencia del plásmido pPIC9hGH22K, se muestran en la tabla IX.

Tabla IX. Endonucleasas empleadas para llevar a cabo la caracterización de pPIC9hGH22K.

Enzima (s)	Fragmento
Xho I	8587 pb
Xho I+*Eco* RI	7990 y 597 pb
Xba I	7210 y 1377 pb
Pvu II	4875, 2948, 497y 267 pb
Bgl II	4574, 2403 y 1610 pb

Se seleccionó una de las clonas que presentó el patrón de restricción esperado y se realizó preparación ADN plasmídico a gran escala utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio[41]. De esta manera se obtuvo una fuente de plásmido de buena calidad para llevar acabo la transformación de *Pichia pastoris.*

2.3.2.2 Transformación de *Pichia pastoris*

Una vez asegurada la identidad del vector pPIC9hGH22K, se realizaron digestiones para linearizar el plásmido con las endonucleasas *Sac* I y *Stu* I y de esta manera llevar a cabo la transformación. El plásmido linearizado con *Sac* I favorece la inserción génica en el locus AOX1 y el plásmido linearizado con *Stu* I favorece la inserción génica en el locus his4 [17]. Las células de *Pichia pastoris* GS115 fueron transformadas por electroporación[45] con los plásmidos linearizados como se describe a continuación: las células de *Pichia pastoris* se cultivaron en 50 mL de caldo YPD (Anexo 1) a 30°C y 250 rpm hasta llegar a la fase logarítmica tardía

(DO_{600}≈2.0). Luego se centrifugó a 5000 rpm por 5 min (Centrífuga IEC Centra MP4R Rotor 854) para obtener el paquete celular, el cual se lavó 2 veces, primero con 25 mL de Agua Milli-Q estéril y después con 2 mL de sorbitol 1 M estéril y se resuspendió en 0.5 mL del mismo (DO_{600}≈200). Se mezclaron 20 µL de esta suspensión celular con 5 µL del ADN lineal (50 ng/µL), se transfirió a las microcámaras de electroporación de 0.15 cm y se llevó a cabo la electroporación con un pulso de 400 V, 10 µF y un campo de fuerza de 2666.6 V/cm. Se tomaron 10 µL de la mezcla de electroporación y se le añadiron 0.5 µL de sorbitol 1M estéril. Posteriormente se distribuyó el contenido del tubo Eppendorf en placas con medio MD (medio mínimo con dextrosa, Anexo 1) y se incubó a 30°C hasta la aparición de las colonias (3-6 días). Ya que el medio MD carece de histidina, solamente crecen las levaduras que hayan integrado el plásmido en su genoma y que por lo tanto son capaces de sintetizar histidina (His^+). Posteriormente se levantaron colonias de ambas preparaciones y se llevaron a conservación para su posterior análisis.

Las clonas resultantes de la transformación con ambas preparaciones (digestiones con *Sac* I y *Stu* I) se cultivaron en tubos con 4 mL de caldo YPD (Anexo 1) durante 48 h a 30°C y agitación a 250 rpm. Posteriormente se obtuvo la pastilla celular por centifugación a 16000 *g* (14000 rpm centrífuga Eppendorf 5402) durante 5 minutos, se resuspendió en YPD con 15% de glicerol en un volumen tal que tuviera una DO_{600} de entre 50 y 100, se llevaron a congelación rápida en N_2 líquido y se almacenaron a -70°C[16].

2.3.2.3 Caracterización de Clonas Recombinantes de *P. pastoris*

Se seleccionaron cuatro clonas al azar, dos por cada una de las transformaciones (ADNs digeridos con *Sac* I y *Stu* I). Cada una de las clonas fueron inoculadas del medio de conservación (viales con 15 % de glicerol a -70°C) a placas con agar YPD (Anexo 1), llevando a cabo una estría en tres campos con el fin de obtener colonias aisladas. Como ya se mencionó las fermentaciones con *P. pastoris* recombinante se dividen en dos fases, la fase de crecimiento celular y la fase de inducción o producción de la proteína recombinante. A partir de colonias aisladas se inocularon 4 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio BMG (Anexo 1) y se incubaron a 30°C en agitación (250 rpm) hasta alcanzar una DO_{600} de 4.0. Con 3.125 mL de este cultivo propagado se inocularon 22 mL de medio BMG contenidos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL para alcanzar una DO_{600} inicial de 0.5, se incubó a las mismas condiciones hasta alcanzar una DO_{600} de 1.0. Posteriormente se eliminó el medio BMG por centrifugación (5000 rpm 5 min, centrífuga IEC Centra MP4R Rotor 854) y se resuspendió en 25 mL de medio BMM (Anexo 1). Se continuó la incubación a 30°C y 250 rpm durante 150 h y de esta manera se inició la etapa de inducción o producción de la proteína recombinante. Se añadió 125 µL de metanol cada 24 h para compensar la pérdida por evaporación. Posteriormente se relizó SDS-PAGE e inmunodetección por la técnica de "Western blot" de HGHr del medio de cultivo libre de células, para determinar la identidad de la misma.

2.3.2.3.1 SDS-PAGE e Inmunodetección de HGHr

Debido a que en este sistema el producto es secretado al medio de cultivo, se realizó análisis de proteínas del medio de cultivo, el cual fue dializado contra agua Milli-Q antes del análisis. Las bolsas de diálisis con 25 mL de medio permanecieron en un vaso de precipitados con 4 L de agua fría durante 1.5 h, con agitación moderada y se realizaron dos cambios más del agua Milli-Q. El medio dializado se concentró de la siguiente manera: Se agregaron cuatro volumenes de una solución metanol:acetona (1:1), se dejó a -20°C toda la noche, se centrifugó 10 min a 10000 rpm (8400 *g* , centrífuga IEC Centra MP4R, rotor 854), se eliminó el sobrenadante y se secó al vacío el paquete de proteínas. El paquete se resuspendió en 1/20 de su volumen original de buffer SDS-PAGE, se calentó durante 10 min a 100°C, se centrifugó por 5 segundos para bajar el líquido evaporado y condensado en las paredes del tubo y se aplicaron de 10 a 20 µL para la electroforesis en gel de poliacrilamida. Las condiciones de separación de proteínas, así como el proceso de tinción y decoloración del gel y el análisis densitométrico se detallan en la sección 2.3.1.3.2 (pag 30). También se realizó inmunodetección de la HGHr mediante la técnica de "Western blot" empleando anticuerpos anti-HGH. El procedimiento del "Western blot" se describe detalladamente en la sección 2.3.1.3.3 (pag. 32).

2.3.2.4 Selección de la Clona de *P. pastoris* Sobreproductora de HGHr

Se analizaron 24 clonas (18 cortes *Sac* I y 6 cortes *Stu* I) para seleccionar aquella con más altos niveles de producción de HGHr. Una colonia de cada

clona seleccionada fue inoculada en 3 mL de medio BMG en tubos de 25 mL. Las células se crecieron a 30°C en agitación a 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600} de entre 2 y 6. Posteriormente se obtuvo el paquete celular por centrtifugación a 10000 rpm (centrífuga IEC Centra MP4R, rotor 854) por 5 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en medio BMM (medio iductor) en un volumen tal que resultara una DO_{600} de 1.0. Se transfirieron 3 mL del medio ajustado a tubos estériles y se incubó a 30°C por 150 h para inducir la expresión del gen heterólogo (hGH). Para mantener la inducción se agregó metanol al 100% cada 24 h a una concentración final de 0.5%. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10000 rpm (centrífuga IEC Centra MP4R, rotor 854), para separar el paquete celular del medio de cultivo y realizar en este último análisis de proteínas. A las 24 clonas se les determinaron proteínas totales, pero solo a 7 con los niveles más altos de proteínas se les valoró porcentaje de HGHr por densitometría de geles. El procedimiento del análisis densitométrico se describe en la sección 2.3.1.3.2 (pag 31). Con los valores obtenidos de estos parámetros se calculó la producción expresada en mg de HGHr/L de medio de cultivo.

2.3.2.4.1 Determinación de Proteínas

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford [42] (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce EUA), se empleó un espectrofotómetro (*Beckman DU-70)* para determinar la absorbancia a 595 nm que se presenta por la unión del azul brillante de Coomassie a las proteínas evaluadas. Se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino (ASB, *Sigma)* en un intervalo de concentración

de 1 a 6 μg/mL. Tanto las muestras como los estándares fueron preparadaos por duplicado, la preparación de estándares se muestra en la tabla X. Los cálculos se realizaron utilizando una recta de calibración determinada por el método de mínimos cuadrados con el apoyo del programa computacional *Microsoft Excel.*

Tabla X.- Curva de calibración para la determinación de proteínas en el medio de cultivo por el método de Bradford

Estándar	ABS (0.49 mg/mL) Vol. (μL)	Medio dializado (μL)	Solución de azul brillante de Coomassie (μL)	Conc. final de ABS (μg/mL)
1	3	197	800	1.47
2	6	194	800	2.94
3	9	191	800	4.41
4	12	188	800	5.88
blanco	0	200	800	0

Las muestras se prepararon agregando 200 μL de medio dializado de fermentación y 800 μL de solución de azul brillante de Coomassie.

2.3.2.5 Análisis de ADN Genómico de las Clonas

2.3.2.5.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico de *P. pastoris,* se empleó una modificación a la técnica de TSNT [46]: Las levaduras se crecieron en 4 mL de caldo YPD durante 24-48 h, se cosechó el paquete celular por centrifugación

por 5 min a 16000 *g* (14000 rpm, centrífuga Eppendorf 5402) y se lavó con 500 µL de agua Milli-Q. Al paquete celular se le agregaron 300 µL de solución TSNT (Tritón X-100 al 2 %, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1mM, pH=8) y 650 µL de fenol saturado y se mezcló en vortex durante 10 s. Posteriormente se agregaron 150 µL de Sevag (cloroformo: alcohol isoamílico 1:1) y se agitó en vortex durante 5 min Una vez concluida la agitación, se añadieron a la mezcla 300 µL de TE pH=8 y se procedió a centrifugar por 10 min a 16000 *g* (14000 rpm, centrífuga Eppendorf 5402). Se transfirió la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se precipitó el ADN agregando 1.3 mL de etanol al 100 %. Se centrifugó por 10 min a 16000 *g* (14000 rpm, centrífuga Eppendorf 5402) y se decantó el sobrenadante. La pastilla de ADN se resuspendió en 500 µL de TE, se le agregaron 3 µL de una solución de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó 15 min a 37°C. Se realizaron dos extracciones con 500 µL de fenol-sevag, se separó la fase acuosa por centrifugación durante 5 min y 16000 *g* (centrífuga Eppendorf 5402). Se añadieron 10 µL de acetato de amonio 7.5 M y 1.3 mL de etanol al 100% para precipitación del ADN, se mezcló por inversión y se centrifugó por 10 min a 16000 *g* (centrífuga Eppendorf 5402) para decantar el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con etanol al 70 % y se resuspendió en 50 µL de TE, solución a la cual se le realizó medición espectrofotométrica para cuantificación de ADN y determinación del parámetro de calidad (A_{260}/A_{280}) (43). También se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en TBE y tinción con bromuro de etidio para verificar si los ADN's genómicos no se encontraban degradados.

2.3.2.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN genómico de seis clonas fue analizado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para corroborar la integración del plásmido pPIC9hGH22K en el genoma de *P. pastoris*. El iniciador del extremo 5' (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') se aparea en la región 5′ AOX1 (nucleótido 855-875) del plásmido pPIC9, el iniciador del extremo 3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') se aparea en la región 3′ AOX1 TT (nucleótido 1327-1347) del mismo. Ya que la PCR del plásmido pPIC9 resulta en un producto amplificado de 449 pb y el sitio de multiclonación (MCS) de pPIC9 se encuentra entre las dos regiones de apareamiento de los iniciadores, el fragmento clonado causa un aumento del tamaño del producto amplificado en 567 pb generando un fragmento de 1016 pb para pPIC9hGH. La PCR del ADN genómico de *P. pastoris* no recombinante da por resultado un producto de 2200 pb proveniente de la amplificación del gen AOX1. La PCR de ADN genómico de clonas (*P. pastoris* recombinante) que conservan el gen AOX1 (Mut^+), da por resultado productos de 2200 y 1016 pb correspondientes al gen AOX1 y al cassette de integración respectivamente.

Se llevó a cabo la estandarización de la PCR con el objetivo de obtener bandas nítidas y lo más lejano posible a la saturación para detectar multicopias del cassette de expresión en caso de haberlas. Para la estandarización se emplearon diferentes concentraciones de ADN molde e iniciadores, también se varió el número de ciclos. La PCR estandarizada tuvo las siguientes condiciones: Buffer de PCR (Promega) 1 X, ADN genómico 2 ng/µL, dNTP's 200 µM, iniciador 5′AOX1 0.5 µM, iniciador 3′AOX1 0.5 µM, agua estéril y 2.5 unidades de Taq polimerasa en 25 µL de reacción. Se empleó un termociclador PTC-150 (MJ Research), el programa llevado a cabo fue el

siguiente: 1 ciclo 94°C (2 min), 18 ciclos 94°C (1 min) 60°C (1 min) 72°C (1 min), 1 ciclo 72°C (7 min). Se realizó el análisis de 5 µL del producto de la PCR por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE.

Debido a que las clonas Mut+ siempre cuentan con una sola copia del gen AOX1, la relación de la intensidad entre las bandas amplificadas (2200 pb y 1016 pb) resulta igual en diferentes clonas que contienen una sola copia del plásmido integrado. Considerando que la mayoría (99% aproximadamente) de los clonas de *P. pastoris* tendrían una copia del plásmido integrado, estas presentarían la misma relación de la intensidad de las bandas amplificadas. Por lo tanto las clonas con multicopias del plásmido integrado serían facilmente detectables debido a que se distinguirían de entre la mayoría de clonas de una sola copia al cambiar la relación de intensidad entre ambas bandas (2200 pb/1016 pb), debido al aumento de la intensidad de la banda de 1016 o banda recombinante. Por lo tanto se realizó un análisis densitométrico de las bandas de PCR teñidas con bromuro de etidio para determinar la existencia de clonas con multicopias del plásmido integrado o si solo se contaba con clonas con una sola copia.

2.3.2.6 Optimación de la producción de HGHr en *Pichia pastoris*

Esta etapa experimental consistió en optimar la producción de HGHr con la clona seleccionada de *P. pastoris* recombinante, empleando el Método Simplex Secuencial Modificado, el cual es un método matemático para dirigirse rápidamente al punto donde la combinación de valores de factores empleados son los óptimos [38, 39]. El Método Simplex Secuencial Modificado (MSSM) se diferencia del Método Simplex Secuencial Básico (MSSB), en que

en el MSSM puede haber distintas operaciones matemáticas (expansión, contracción y reflexión) para determinar las condiciones del(los) siguiente(s) ensayo(s) según las respuestas obtenidas, mientras que el MSSB solamente se realiza reflexión.

Las factores empleadas para la optimación fueron:

- Conc. de metanol (inductor) en medio de cultivo (% M)
- Densidad óptica al inicio de la inducción (DO_{600})
- Tiempo de inducción (T.I.)

El indicador para la optimación fue la concentración de HGHr en el medio de cultivo, la cual se obtuvo a partir de los parámetros evaluados (% de HGHr y la concentración de proteínas totales mg/L). De esta manera el resultado obtenido se expresó en mg de HGHr/L de medio de cultivo.

De acuerdo al método simplex el número de ensayos iniciales debe ser de n+1, siendo n el número de factores empleados. Debido a que durante esta optimación se emplearon 3 variables, el número de ensayos iniciales fueron 4. La combinación de los valores de los factores para cada uno de los cinco ensayos iniciales se decidió según un diseño matricial propuesto por el método simplex (Tabla XI).

Tabla XI. Diseño matricial para tres variables propuesto por el método simplex secuencial

Ensayo	X1	X2	X3
1	bajo	bajo	alto
2	alto	bajo	bajo
3	bajo	alto	bajo
4	alto	alto	alto

Posteriormente se fijaron valores altos y bajos para cada una de las variables de acuerdo a la información obtenida de la literatura, tomando en cuenta también ensayos preeliminares realizados; por lo tanto, los cuatro ensayos iniciales fueron los siguientes los descritos en la tabla XII.

Tabla XII. Valores de los factores de los 4 ensayos iniciales

Ensayo	% M	DO_{600}	TI (h)
1	0.25	1.0	175
2	0.75	1.0	140
3	0.25	1.4	140
4	0.75	1.4	175

Después de realizar los cuatro ensayos iniciales, se llevó a cabo el procedimiento de eliminación de un ensayo anterior y se calcularon los factores para el nuevo ensayo mediante operaciones ya sea de reflexión, expansión o contracción, según la respuesta obtenida [38, 39].

Se realizaron un total de 10 ensayos divididos en 4 etapas. Las condiciones empleadas para cada ensayo, así como los parámetros evaluados y el resultado o indicador para la optimización se observan en la tabla XIV en la sección de resultados.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Biosíntesis de HGH-MBPr en *Escherichia coli*

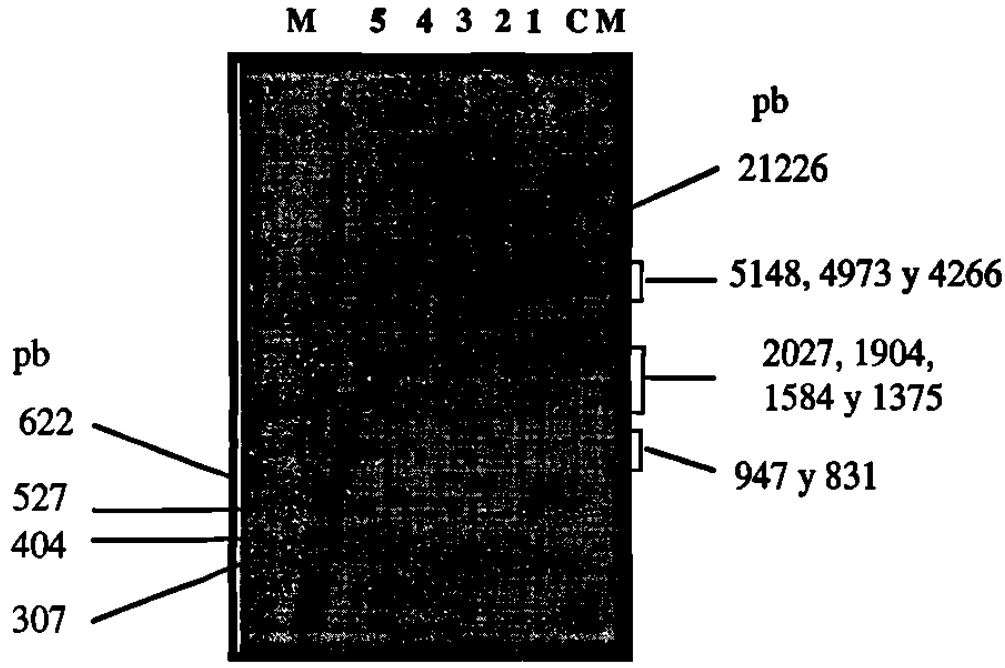
3.1.1 Transformación de *E. coli* con pMalchGH22K

Al tarnsformar células de *E. coli* TB1 calcio-competentes con 10 ng del plásmido pMalchGH22K se obtuvieron 62 colonias. El tamaño de los fragmentos de pMalchGH22K obtenidos en la caracterización, visualizado después de realizar una electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio correspondieron a los tamaños esperados (fig. 17), según el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* (alimentado con la secuencia del plásmido pMalchGH22K). De esta manera se aseguró la identidad del plásmido

3.1.2 Análisis de Proteínas y Caracterización de HGH-MBPr

La determinación de proteínas del paquete celular de la fermentación con *E. coli* arrojó un valor de 115.14 mg/L. En la figura 18 se muestra un análisis electroforético en gel de poliacrilamida-SDS de extractos de *E. coli* teñidos con azul de Coomassie. Se muestra el marcador de peso molecular (M), extracto de células no inducidas (NI) y extracto de células inducidas (I).

En el carril (I) la banda predominante que está ausente en el carril (NI) y que muestra un tamaño aproximado de 64 kDa corresponde a HGH-MBPr. También se muestra la inmunodetección de HGH-MBPr mediante la técnica de "Western blot", empleando anticuerpos anti-HGH. La banda de 64 kDa (HGH-MBPr) representa un 27.3 % del total de proteínas según análisis densitométricos (fig. 19). Por lo tanto la producción de HGH-MBPr en este ensayo fue de 31.4 mg/L.



Carril	Digestión	Fragmentos (pb)
1	*Hind* III	6681
2	*Xba* I+*Hind* III	6113 y 572
3	*Bam* HI+*Hind* III	6077 y 608
4	*Pvu* II	2682, 1678, 1612, 497, 122 y 93
5	*Apa* LI	2826, 1285, 1246, 830 y 498

Figura 17.- Caracterización enzimática del plásmido pMalchGH22K. Análisis electroforético en gel de agarosa al 0.8% de digestiones de pMalchGH22K con diferentes enzimas de restricción. M, Marcadores de peso molecular (lambda-*Eco* RI-*Hind* III y pBR322-*Msp* I respectivamente); (C), pMalchGH22K circular; carril (1) al (5), Diferentes digestiones de pMalchGH22K las cuales se indican en la tabla de la figura. El tamaño de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

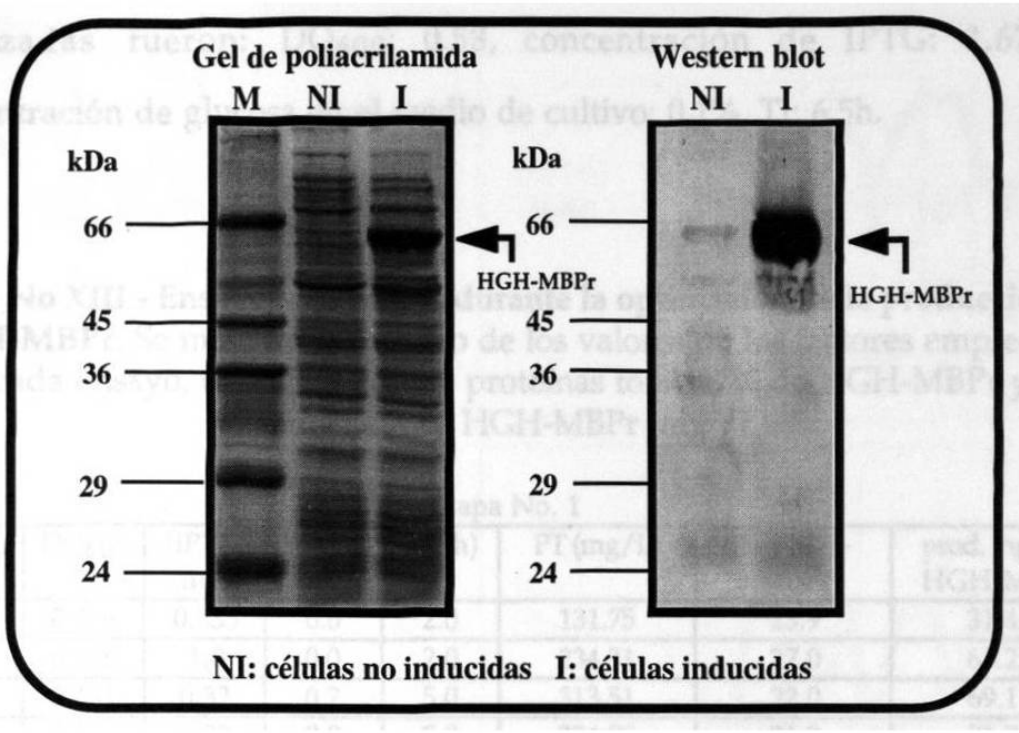


Figura 18.- Análisis de proteínas de extractos celulares de *E. coli*. A la izquierda se muestra un análisis electroforético en gel de poliacrilamida-SDS, teñido con azul de Coomassie. M, marcador de peso molecular; NI, extractos de células no inducidas; I, extracto de células inducidas. A la derecha se observa la inmunodetección de HGH-MBPr mediante la técnica de "Western blot" empleando anticuerpos anti-HGH; NI, extracto de células no inducidas; (I), Extracto de células inducidas.

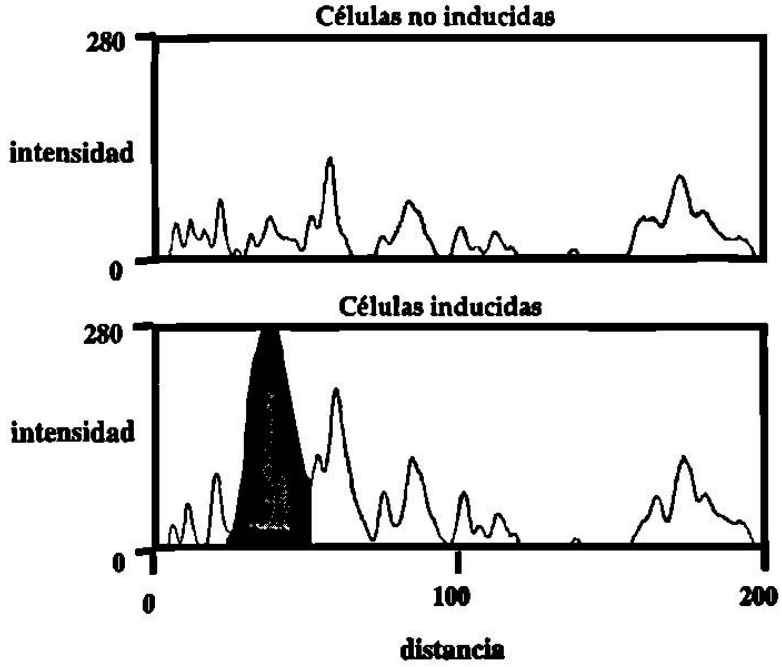


Figura 19.- Análisis densitométricos de geles de poliacrilamida-SDS de extractos de células inducidas y sin inducir. Se muestra que el patrón de picos es similar en ambos densitogramas, a excepción del pico sombreado que corresponde a HGH-MBPr.

alcanzadas fueron: DO_{600}: 0.58, concentración de IPTG: 1.67mM, concentración de glucosa en el medio de cultivo: 0.1%, TI: 6.5h.

Tabla No XIII.- Ensayos realizados durante la optimación de la producción de HGH-MBPr. Se muestran cada uno de los valores de los factores empleados en cada ensayo, concentración de proteínas totales, % de HGH-MBPr y la producción de HGH-MBPr (mg /L).

Ensayo	DO_{600}	[IPTG] (mM)	% Glc.	TI (h)	PT (mg/L)	% HGH-MBPr	prod. mg/L HGH-MBP
Etapa No. 1							
A	0.396	0.333	0.0	2.0	131.75	23.9	31.4
B	0.905	1.0	0.0	2.0	234.31	27.0	63.2
C	0.431	0.32	0.2	5.0	313.51	22.0	69.1
D	0.914	0.33	0.0	5.0	224.00	31.8	71.2
E	0.434	1.00	0.0	5.0	283.40	28.9	81.8
Etapa No.2							
E1	0.443	1.00	0.0	5.0	260.00	34.8	90.0
F	0.967	1.00	0.1	6.5	380.86	22.9	87.2
Etapa No.3							
E2	0.405	1.00	0.0	5.0	311.89	30.6	95.5
G	0.988	1.67	0.0	6.5	358.56	33.6	121.8
H	0.659	1.00	0.1	9.5	444.85	29.1	129.6
I	0.58	1.67	0.1	6.5	448.05	31.7	142.2
Etapa No.4							
G1	0.975	1.67	0.0	6.5	349.94	32.3	112.9
J	0.580	1.89	0.033	8.5	424.82	20.1	85.53
K	1.175	1.89	0.133	10.0	490.09	20.0	97.77
Etapa No.5							
I1	0.595	1.67	0.1	6.5	543.52	26.0	141.20
L	0.613	1.00	0.1	9.5	588.02	14.8	87.26
M	0.95	1.00	0.0	9.5	394.50	23.3	91.95
N	0.579	1.00	0.0	6.5	384.06	28.7	110.07

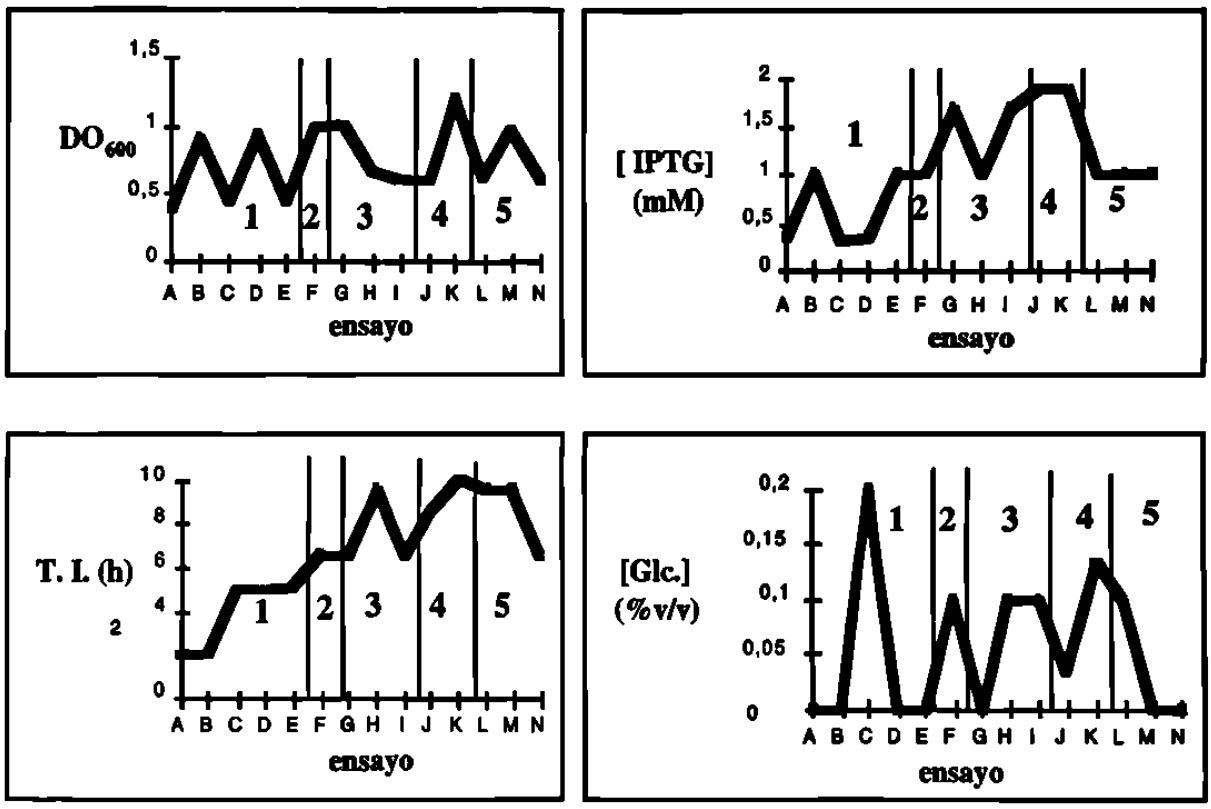


Figura 20.- Variación de los factores empleados durante la optimación. En cada uno de los gráficos los factores se representan en el eje de las ordenadas y los ensayos acomodados en orden cronológico en el eje de las abcisas. Se muestra que [IPTG] y el T.I. se incrementó durante la optimación, mientras la DO_{600} y [Glc.] muestran valores oscilantes. Las líneas verticales y los números dentro del gráfico representan las etapas de la optimación.

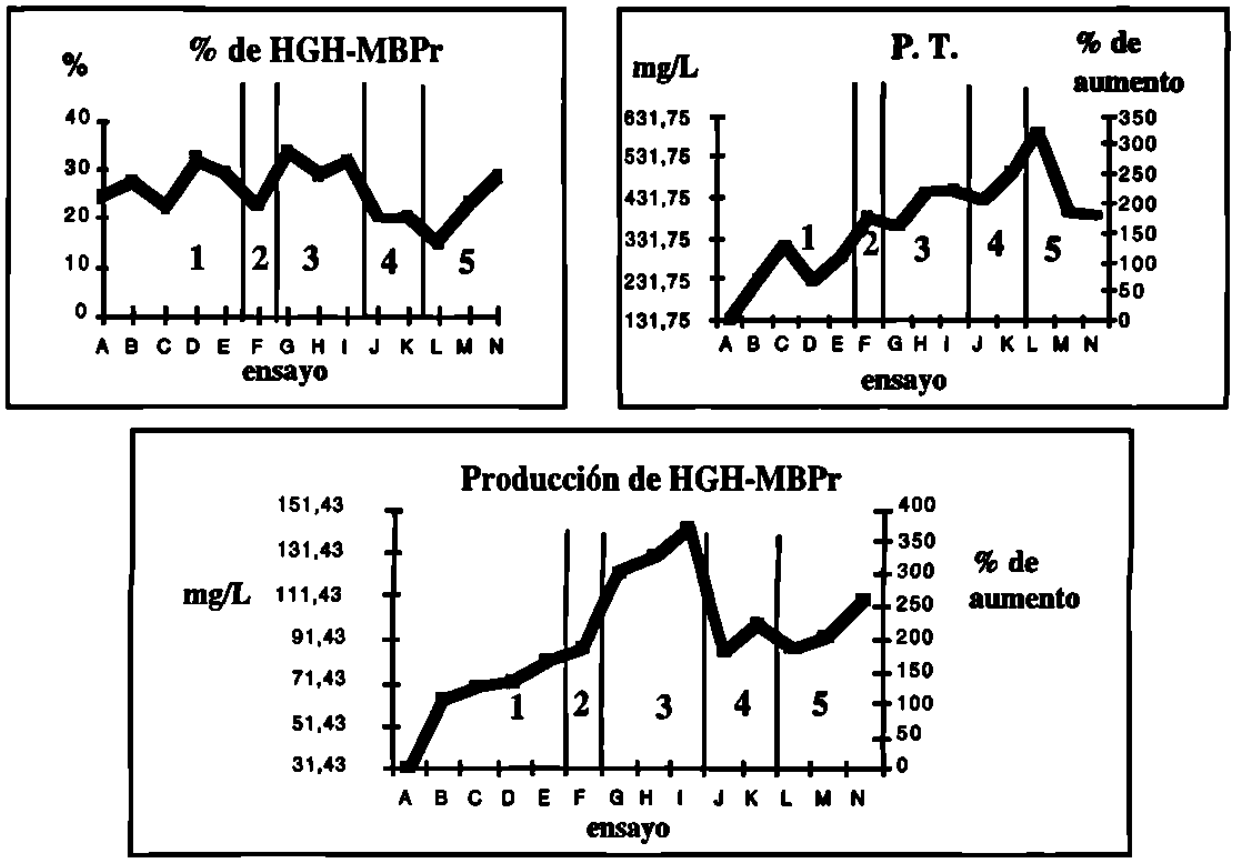


Figura 21.- Variación del porcentaje de HGH-MBPr, concentración de proteínas totales y niveles de producción de HGH-MBPr durante la optimación. El ensayo óptimo resultó ser el "I" tal como se muestra en la gráfica inferior. Este tuvo una producción de 144 ± 2.6 mg/L (X±E.S., n=3) y fue 300% más productivo que el ensayo inicial. Las líneas verticales y los números dentro del gráfico representan las etapas de la optimación.

3.2 Biosíntesis de HGHr en *Pichia pastoris*

3.2.1 Construcción del Vector pPIC9hGH22K

3.2.1.1 Preparación de los Plásmidos pJT y pPIC9

Se logró la transformación de bacterias calcio-competentes con los vectores plasmídicos pJT y pPIC9. Las preparaciones de ADN plasmídico a gran escala resulatron de buena calidad con valores A_{260}/A_{280} aceptables, como se muestra en la tabla XIV. Aunque el rendimiento obtenido de los plásmidos aislados mostró ser comparable con los límites inferiores reportados en la biblografía (500 a 2000 μg por litro de medio de cultivo), la cantidad de ADN obtenida fue suficiente para realizar la construcción del plásmido pPIC9hGH22K.

Tabla XIV. Rendimiento y calidad de las preparaciones a gran escala de los plásmidos pJT y pPIC9.

Plásmido	A_{260}/A_{280}	Rendimiento
pJT	1.79	462 μg/L
pPIC9	1.74	522 μg/L

3.2.1.2 Preparación de Fragmentos de Ligación

La digestion preparativa de pJT con las endonucleasas *Xba* I y *Sma* I liberó dos fragmentos de 563 pb y 5427 pb, mientras que la digestión pPIC9 con *Xho* I y *Sna* BI liberó dos fragmentos, de 7998 pb y otro de 26 pb (para comprobar la liberación del fragmento de 26 pb se realizó la estrategia descrita

en el Anexo 5); ambas digestiones fueron completas. Los fragmentos empleados en la construcción fueron el de 563 pb de pJT y el de 7998 pb de pPIC9.

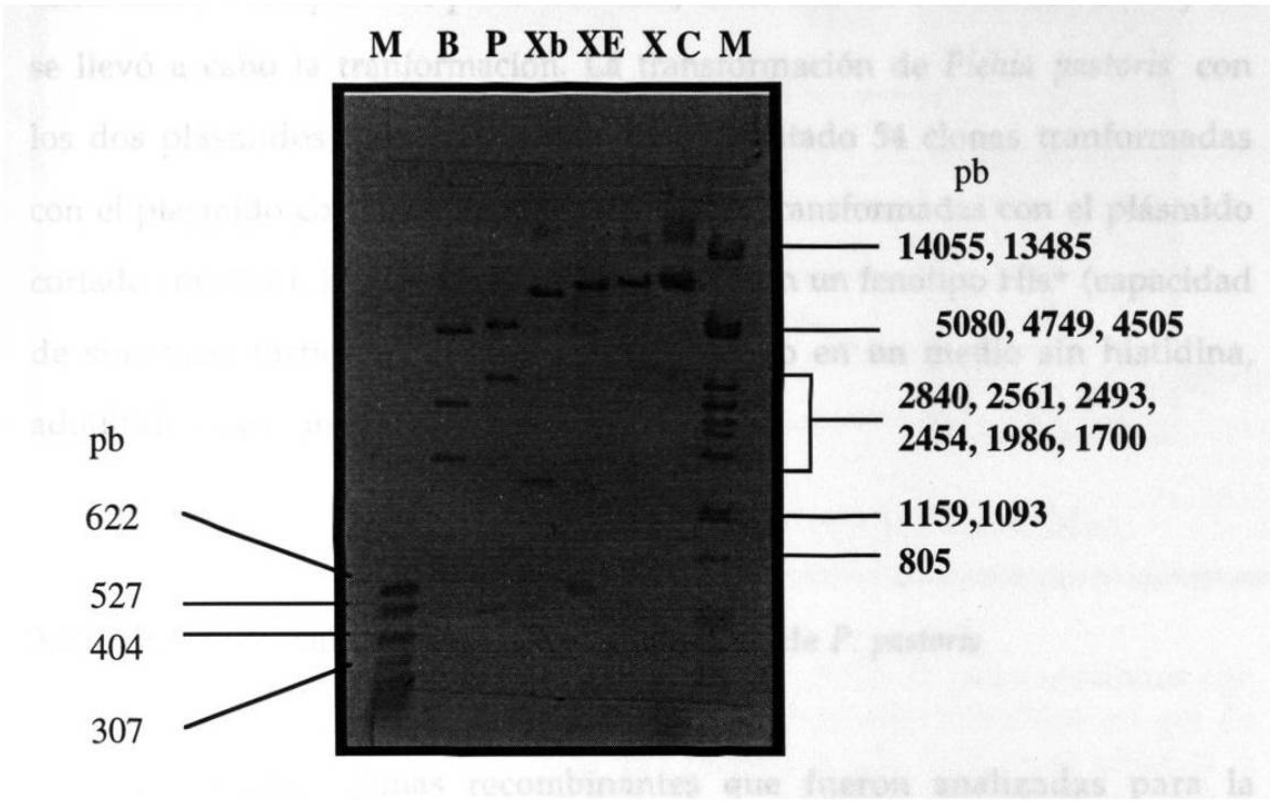
3.2.1.3 Reacción de Ligación

El análisis electroforético de la reacción de ligación mostró la presencia de las bandas correspondientes a los fragmentos de 7798 y 563 pb con una intensidad mucho menor que las correspondientes al control negativo (no ligación). Además se observó la presencia de al menos una banda de mayor peso molecular e intensidad mayor que las antes mencionadas. Esto fue indicativo de una reacción de ligación parcial, que sin embargo fue aceptable y suficiente para llevar a cabo las siguientes etapas.

3.2.1.4. Análisis y Selección de Clonas

De la transformación de *E.coli* con 5 µL del producto de ligación se obtuvieron 300 colonias de las cuales fueron tomadas 20 para determinar las portadoras del plásmido recombinante (pPIC9hGH22K). Tres de ellas resultaron poseer el plásmido que generaba los fragmentos específicos esperados al ser digerido con la endonucleasa *Xba* I (7212 y 1377pb). La caracterización exhaustiva del ADN plasmídico de una de las clonas seleccionadas, con las endonucleasas *Xho* I, *Xho* I+*Eco* RI, *Xba* I, *Pvu* II y *Bgl* II, mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron

a los tamaños esperados (Fig. 22) según el mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido.



Enzima (s)	Fragmento
Xho I	8587 pb
Xho I-*Eco* RI	7990 y 597 pb
Xba I	7210 y 1377 pb
Pvu II	4875, 2948, 497y 267 pb
Bgl II	4574, 2403 y 1610 pb

Figura 22.- Caracterización enzimática del plásmido pPIC9GH22K. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de digestiones de pPIC9hGH22K con diferentes enzimas de restricción. M, marcadores de peso molecular (pBR322-*Msp* I y lambda-*Pst* I respectivamente); C, pPIChGH22K circular. Los demás carriles son cortes de pPIC9 con diferentes enzimas: *Xho* I (X), *Xho* I+*Eco* RI (XE), *Xba* I (Xb), *Pvu* II (P) y *Bgl* II (B). El patrón de fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

3.2.2 Transformación de *Pichia pastoris*

El análisis electroforético en un gel de agarosa confirmó una linearización completa de pPIC9hGH22K, tanto con *Sac* I como con *Stu* I y así se llevó a cabo la tranformación. La transformación de *Pichia pastoris* con los dos plásmidos linearizados dio como resultado 54 clonas tranformadas con el plásmido cortado con *Sac* I y 33 clonas transformadas con el plásmido cortado con *Stu* I. Las clonas obtenidas presentan un fenotipo His^+ (capacidad de sintetizar histidina) debido a haber crecido en un medio sin histidina, adquirido por la integración del plásmido.

3.2.3 Caracterización de Clonas Recombinantes de *P. pastoris*

Las cuatro clonas recombinantes que fueron analizadas para la caracterización del producto de la expresión del gen heterólogo integrado, produjeron y secretaron HGHr. En la figura 23 se muestra un análisis electroforético en gel de poliacrilamida del medio de cultivo de una fermentación con una de las clonas de *P. pastoris*. Se muestra el marcador de peso molecular (M), medio de cultivo de células no inducidas (NI) y medio de cultivo de células inducidas (I). En el carril (I) la banda predominante y que está ausente en el carril (NI) de aproximadamente 22 kDa corresponde a la HGHr. También se muestra la inmunodetección de HGHr mediante la técnica de "Western blot", empleando anticuerpos anti-HGH.

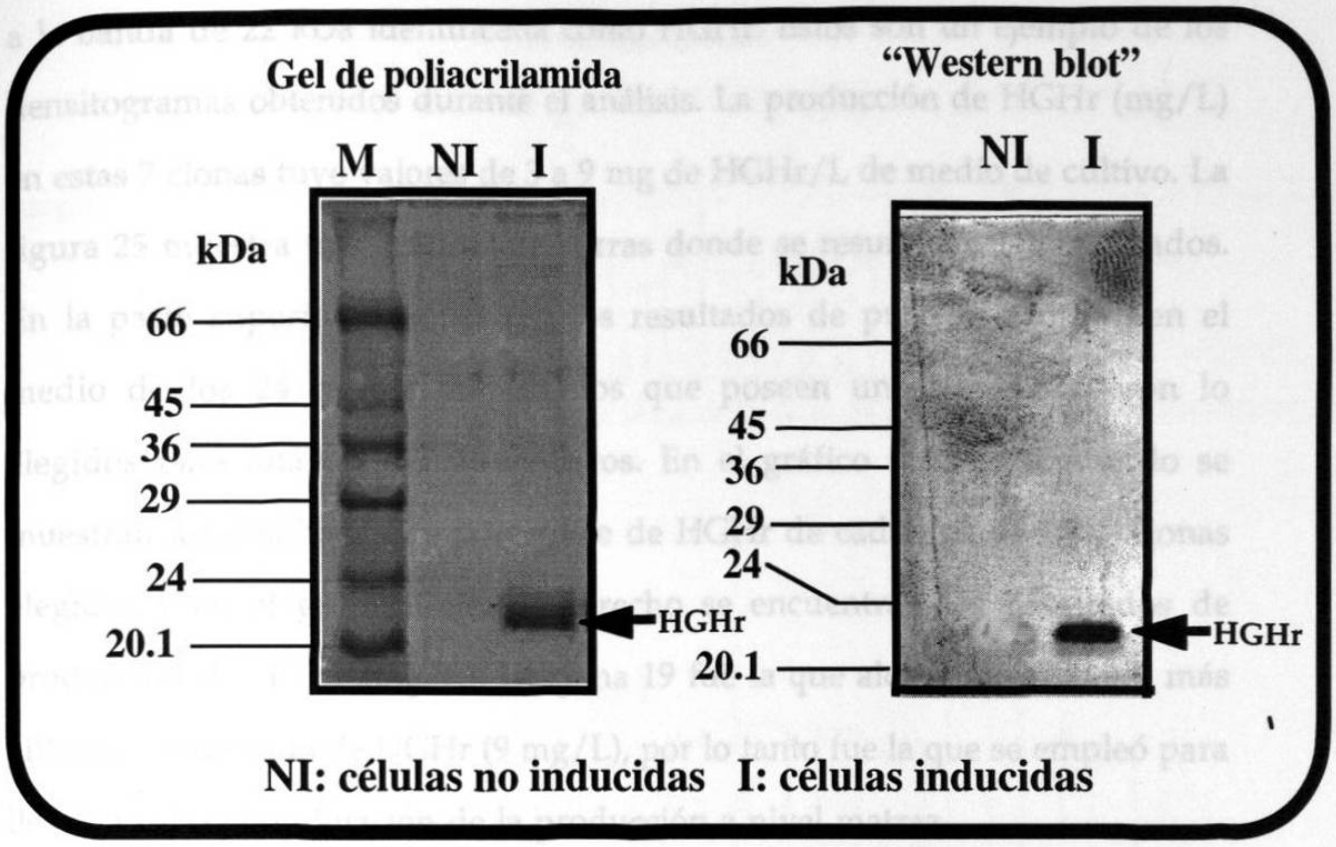


Figura 23.- Análisis de proteínas de medios de cultivo de fermentaciones con *P. pastoris*. A la izquierda se muestra un análisis electroforético en gel de poliacrilamida-SDS, teñido con azul de Coomassie, a la derecha se observa la inmunodetección de HGHr mediante la técnica de "Western blot" empleando anticuerpos anti-HGH. M, marcador de peso molécular; NI, medio de células no inducidas; I, medio de células inducidas.

3.2.4 Selección de la Clona Sobreproductora de HGHr

La concentración de proteínas totales del medio de cultivo de las 24 clonas analizadas presentan una variación de entre 3 a 11 mg/L (Fig. 25). Los porcentajes de HGHr obtenidos por densitometría de geles de poliacrilamida de las 7 clonas con mayores niveles de proteínas varían del 35 al 80 % (Fig 25), En la figura 24 se muestra dos densitogramas; el superior representa las proteínas del medio de cultivo de células no inducidas, mientran el inferior representa las proteínas del medio de cultivo de células inducidas, el pico sombreado ausente en el densitograma de células no inducidas corresponde

a la banda de 22 kDa identificada como HGHr. Estos son un ejemplo de los densitogramas obtenidos durante el análisis. La producción de HGHr (mg/L) en estas 7 clonas tuvo valores de 3 a 9 mg de HGHr/L de medio de cultivo. La figura 25 muestra tres gráficos de barras donde se resumen estos resultados. En la parte superior se muestran los resultados de proteínas totales en el medio de los 24 transformantes, los que poseen un asterisco fueron lo elegidos para análisis densitométricos. En el gráfico inferior izquierdo se muestran los resultados de porcentaje de HGHr de cada una de las 7 clonas elegidas y en el gráfico inferior derecho se encuentran los resultados de producción de HGHr (mg/L). La clona 19 fue la que alcanzó los niveles más altos de producción de HGHr (9 mg/L), por lo tanto fue la que se empleó para llevar a cabo la optimación de la producción a nivel matraz.

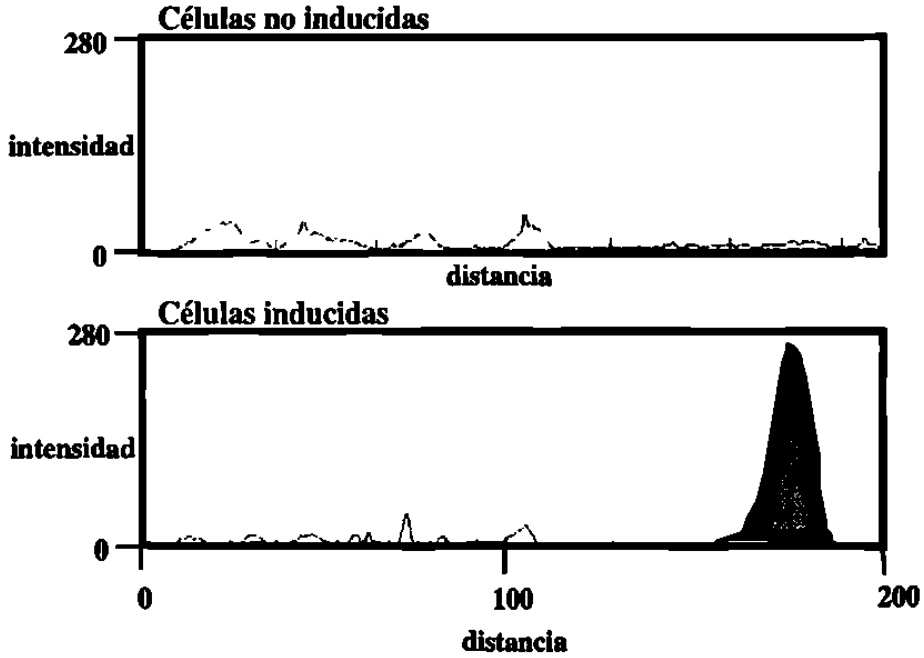


Figura 24.- Análisis densitométricos de medio de cultivo concentrado de células inducidas y sin inducir. Se muestra que el patrón de picos es similar en ambos densitogramas a excepción del pico sombreado el cual corresponde a HGHr y en este caso representa el 80 % de las proteínas en el medio de cultivo.

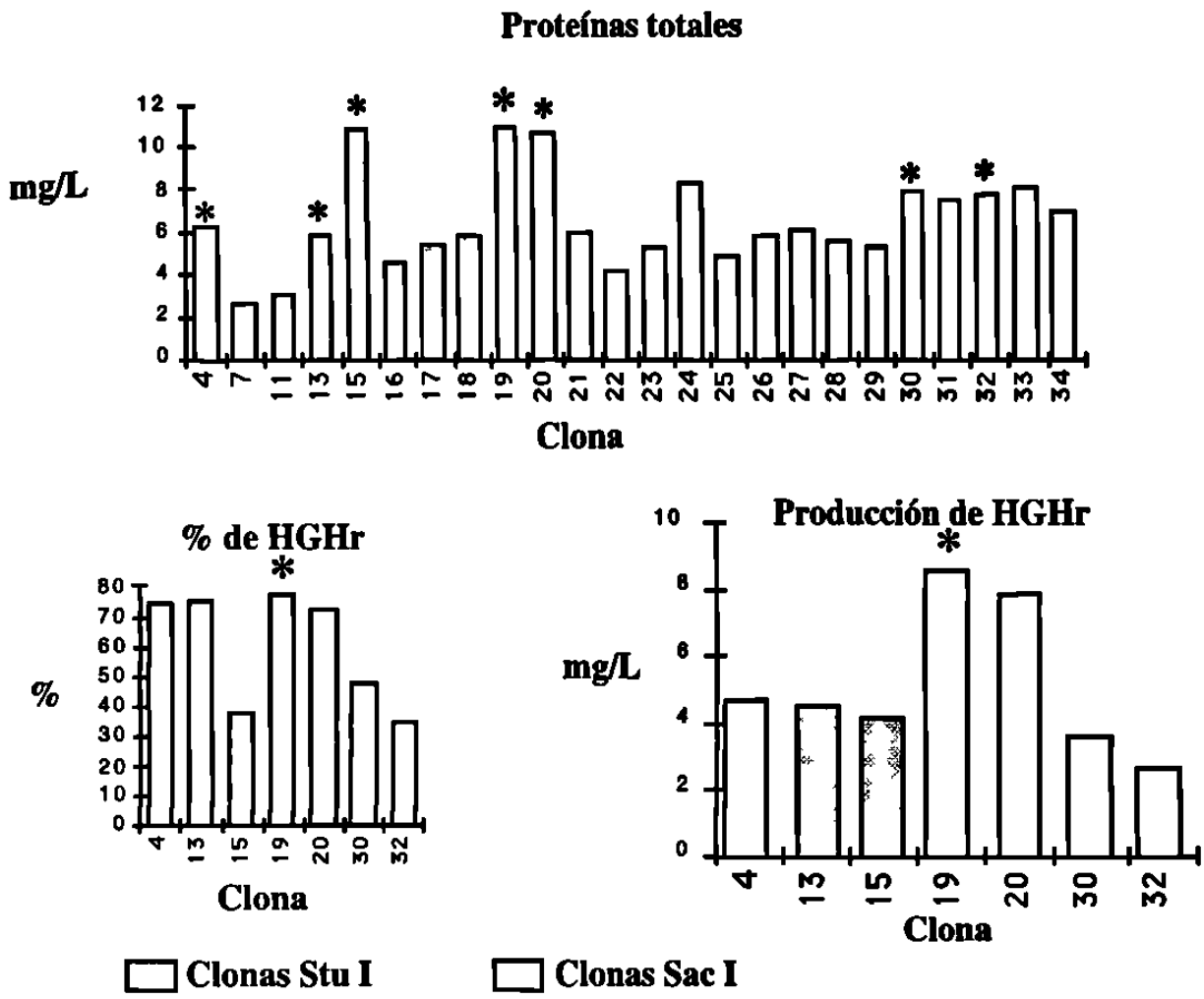


Figura 25.- Resultados de la selección de la clona sobreproductora. En el gráfico superior se muestran los resultados de proteínas totales de 24 clonas analizadas, las que tienen un asterisco en la parte superior fueron elegidas para la determinación del porcentaje de HGHr, resultados que se muestran en el gráfico inferior izquierdo. Los resultados de producción de HGHr de estas 7 clonas se muestran en el gráfico inferior derecho. La clona 19 cuenta con los niveles más altos de HGHr.

3.2.5 Análisis del ADN Genómico de Transformantes

Los ADN's genómicos extraidos de seis clonas sobreproductoras, separados por electroforesis en gel de agarosa no mostraron degradación aparente. Los

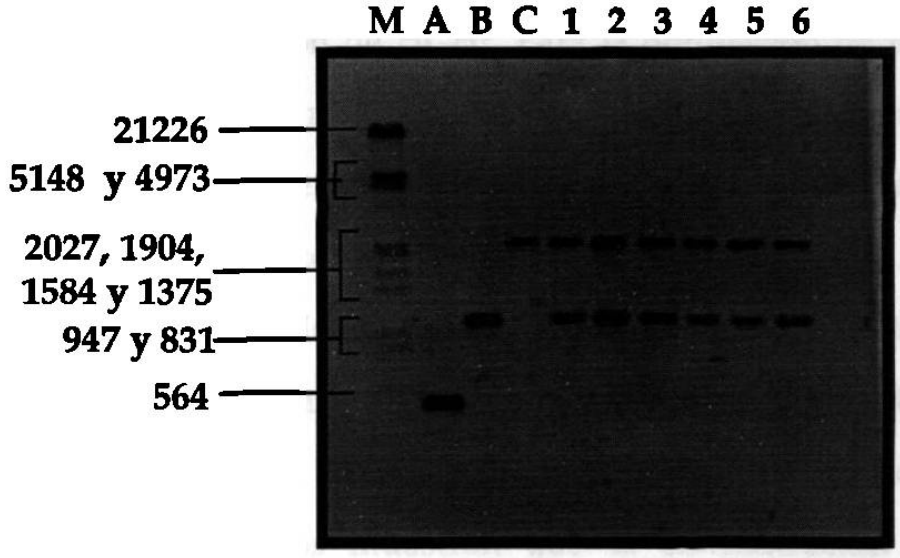
rendimientos obtenidos en la extracción de ADN genómico de cada una de las 6, clonas así como la calidad del mismo se muestran en la tabla XV.

Tabla XV.- Calidad y rendimiento de ADN genómico extraido de *P. pastoris*.

Clona	Calidad (A_{280}/A_{260})	Rendimiento (mg/L)
7	2.2	4.13
11	2.1	2.1
13	2.0	1.5
15	1.9	2.4
17	2.4	1.5
19	2.0	0.8

El tamaño de cada uno de los productos amplificados obtenidos por la PCR, correspondieron a los tamaños esperados para cada uno de los ADN's moldes empleados: pPIC9 (449 pb), pPIC9hGH22K (1016 pb), ADN genómico de *P. pastoris* no recombinante (2200 pb), clonas recombinantes Mut^+ de *P. pastoris* (1016 y 2200 pb). En la figura 26 se muestran cada uno de los productos amplificados, separados por electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. En el carril M se muestra el marcador de peso molecular (lambda, *Eco* RI-*Hind* III), en el carril A se muestra el producto amplificado de pPIC9, en el carril B se encuntra el producto amplificado de pPIC9hGH22K, en el C se muestra el producto amplificado de ADN genómico de *P. pastoris* no recombinante, los carriles 1 al 6 representan productos amplificados de diferentes clonas recombinantes Mut^+ de *P.pastoris.* También se muestra la relación de intensidad entre la banda de 2200 pb y 1016 pb para cada clona recombinante y tiene una media de

0.996±0.041 (X±E.S., n=6), lo que demuestra que cada una de estas clonas tiene solo una copia del cassette de expresión integrado.



Clona Stu I

Clona Sac I

Relación banda 2200/banda1062	
clona	valor
1	0.95
2	0.96
3	0.93
4	0.98
5	1.20
6	0.96

Figura 26.- Análisis de integración del plásmido pPIC9hGH22K al genoma de *P. pastoris* usando la PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular (lambda, *EcoR I-Hind III)*. Carril 2: Amplificación de pPIC9 (449 pb). Carril 3: Amplificación de pPIC9hGH22K (1060 pb). Carril 4: Amplificación de ADN genómico de *P. pastoris* no recombinante (2200 pb). Carriles del 5 al 10: Amplificación de diferentes transformantes (1016 y 2200 pb) lo que indica un fenotipo Mut$^+$. Carril 11: Control negativo para la PCR.

3.2.6 Optimación de la producción de HGHr en *Pichia pastoris*

La cepa de *P. pastoris* (clona 19) que produjo más altos niveles de HGHr durante la selección (80% y 9 mg/L) en tubos de ensayo, fue empleada para optimar la producción de HGHr. Para la optimación de la producción extracelular de HGHr se realizaron un total de 7 ensayos distribuidos en 4 etapas, además de repetir en cada etapa un ensayo empleado como control de etapas anteriores. Los factores empleados para la optimación, así como los valores de porcentaje de HGHr, proteínas totales y los niveles de producción de HGHr (indicador de la optimación) se muestran en la tabla XVI. En la figura 27 se representa la variación de los factores respecto a los ensayos realizados. Estos gráficos muestran que la concentración de metanol incrementó durante la optimación, mientras la DO_{600} y el T.I. mostraron valores oscilantes. La DO_{600} fluctuó entre 0.91 y 1.43, la concentración de metanol entre 0.25 y 1.36 %v/v, el T.I. entre 140 y 186 h. En los gráficos de la figura 28 se muestra la variación del porcentaje de HGHr, proteínas totales y la producción de HGHr durante la optimación. El porcentaje relativo de HGHr fluctuó entre 31 y 82 % mostrando valores oscilantes, mientras que la concentración de proteínas totales que fluctuó entre 4.9 y 18.6 mg/L y mostró un incrementó durante la optimación, aunque en el último ensayo se observa una disminución. La producción de HGHr que fluctuó entre 1.3 y 13 mg/L, mostrando un incremento y luego disminución. El ensayo (D) resultó ser el óptimo tal como se muestra en la gráfica inferior de la figura 28. Este tuvo una concentración de proteínas de 15±0.6 mg/L (X±E.S., n=3) y un porcentaje de HGHr de 80.7 % , lo que se traduce en una producción de HGHr de 12.3±0.7 mg/L es decir 900 % más productivo que el ensayo inicial (A). Por lo tanto las condiciones determinadas para alcanzar niveles óptimos de

producción de HGHr fueron: DO_{600}: 1.38, concentración de metanol: 0.75 % y TI: 175 h

Tabla XVI.- Ensayos llevados a cabo durante la optimación empleando el método simplex. Se muestran los valores de cada una de las variables empleadas en cada ensayo, la producción de HGHr (mg /L), y se muestran cada una de las etapas relizadas durante la optimación.

Ensayo	% M	DO_{600}	TI (h)	PT (mg/L)	% de HGHr	HGH (mg/L)
				Etapa I		
A	0.25	1.43	140	4.9	27.3	1.3
B	0.25	1.10	175	10.8	64.1	6.9
C	0.75	1.08	140	16.5	76.2	12.6
D	0.75	1.38	175	15.9	82.2	13.1
				Etapa II		
C1	0.75	0.94	140	16.2	78.9	12.8
E	0.92	0.91	186	14.0	76.6	10.8
				Etapa III		
E1	0.92	0.97	186	12.1	68.9	8.4
F	1.36	1.07	160	18.6	48.6	9.1
				Etapa IV		
C2	0.75	1.26	140	13.8	55.7	7.7
G	1.06	1.37	166	7.7	31.1	2.4

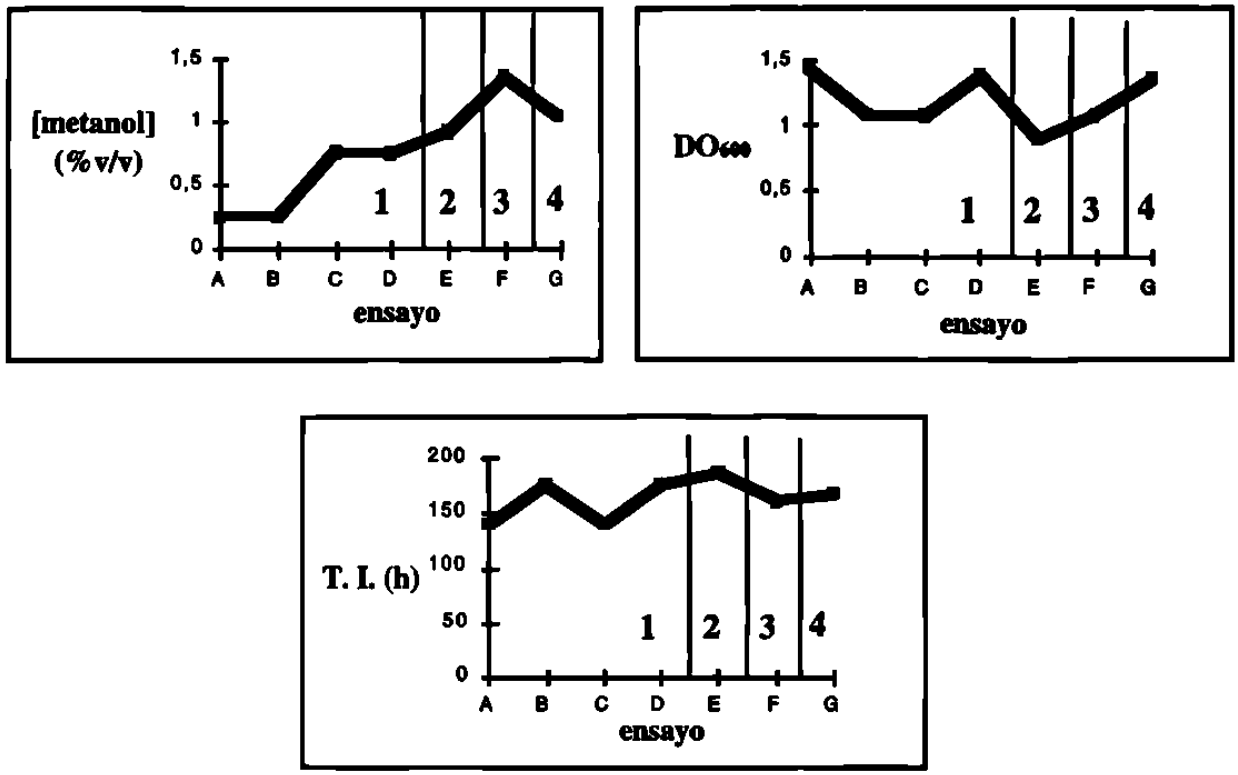


Figura 27.-Variación de los factores empleados durante la optimación. En cada uno de los gráficos los factores se representan el eje de las ordenadas y los ensayos acomodados en orden cronológico en el eje de las abscisas. Se muestra que concentración de metanol incrementó durante la optimación, mientras la DO_{600} y el T.I. mostraron valores oscilantes. Las líneas verticales y los números dentro del gráfico representan las etapas de la optimación.

CAPITULO 4

DISCUSION

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis de la HGH-MBPr en *E. coli* por el sistema anteriormente desarrollado en la U.L.I.E.G.[14], se realizó la biosíntesis de HGHr en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* y se compararon ambos sistemas.

4.1 Biosíntesis de HGH-MBPr en *E. coli*

Las digestiones del plásmido pMalchGH22K para su caracterización resultaron dar los patrones esperados con lo que su identidad quedó asegurada. La banda de aproximadamente 64 kDa obtenida al realizar SDS-PAGE de extractos de células inducidas de *E. coli* y la inmunodetección con anticuerpos anti-HGH mostraron la identidad de HGH-MBPr producida. La optimación condujo a niveles de producción de HGH-MBPr 300% mayores que el ensayo de menor producción, lo que indica la efectividad del método simplex secuencial básico.

4.2 Biosíntesis de HGHr en *Pichia pastoris*

Se realizó con éxito la construcción del plásmido pPIC9hGH22K debido a que las digestiones de éste con un grupo de enzimas de restricción resultó dar cada uno de los fragmentos esperados. La transformación de *Pichia pastoris* fue efectiva pues todos las clonas transformadas analizadas[24] sintetizaron la HGHr, lo que indica la integración del vector de expresión. Esta integración fue corroborada al llevar a cabo la PCR y obtener dos productos amplificados de 1016 y 2200 pb. La relación de la intensidad entre las dos bandas (productos amplificados), es prácticamente la misma en 6 de los transformantes más productores de HGHr, indicando que cuentan con una sola copia del vector de expresión. La banda de aproximadamente 22 kDa obtenida al realizar SDS-PAGE del medio de cultivo concentrado y la inmunodetección con anticuerpos anti-HGH muestran la identidad de la HGHr producida. La optimación condujo a niveles de producción de HGHr 900% mayores que el ensayo de menor producción, lo que indica la efectividad del método simplex secuencial modificado.

4.3 Comparación entre ambos sistemas

En ambos sistemas se llevó a cabo la optimación de la producción de HGH-MBPr en el caso de *E. coli* y HGHr en el caso de *P. pastoris*. El ensayo óptimo en *E. coli* produjo 144±2.6 mg/L (X±E.S., n=3) de HGH-MBPr, lo que estequiométricamente corresponde a 50 mg/L de HGHr, la producción fue citoplasmática y la HGH-MBPr se encontraba con un porcentaje de 31 % con respecto al total de proteínas celulares en un tiempo de inducción de 6.5 h.

En el sistema en el cual se empleó *Pichia pastoris*, el ensayo óptimo produjo 12.3±0.7 mg/L (X±E.S., n=3) de HGHr en el medio de cultivo, en donde se encontró con una pureza de un 81 % respecto al total de proteínas en un tiempo de inducción de 175 h.

Aparentemente el sistema en el cual se empleó *E. coli* es mejor por tener más altos niveles de producción y un tiempo de inducción más corto. Sin embargo el hecho de que la hormona se encuentre no solo fusionada a MBP, sino también con menor pureza (31 %) comparado con el sistema que emplea *P. pastoris* (81 %), implica mayores pasos de purificación y costos mayores, así como bajos rendimientos[11], Todavía más al ser la proteína producida en el citoplasma de*E. coli,* es altamente probable encontrar la proteína sin actividad biológica requiriéndose de procesos adicionales de plegamiento. El sistema que emplea *P. pastoris* produce HGHr madura con un alto grado de pureza en el medio de cultivo (81 %), permitiendo procesos de purificación sencillos, menos costosos y la probabilidad de que la HGHr se encuentre activa es mayor debido a que el microorganismo hospedero es un eucariote y la proteína se encuentra en forma soluble en el medio de cultivo.

Se ha descrito[20, 48, 49] que la producción de proteínas recombinantes a nivel fermentador en *P. pastoris* es de 10 a 200 veces más alta que a nivel matraz (Tabla XII). Ya que este estudio se realizó a nivel matraz, es posible predecir que los niveles de HGHr secretada de *P.pastoris* en un fermentador serían mucho mayores que los alcanzados bajo las condiciones experimentales aquí estudiadas.

Tabla XVII.- Comparación de la producción de diversas proteínas heterólogas a nivel matraz *vs* nivel fermentador en *Pichia pastoris*.

Proteína	No. de copias	Intracelular o secretado	Producción nivel matraz (mg/L)	Producción nivel fermentador (mg/L)
MEGFr	1	Secretado	1.5	33.6
	9		23.2	355
	13		35.6	402
	19		48.7	447
TAPr	1	Secretada	72	1700
HBsAg	1	Intracelular	2.3	380
HGHr	1	Secretada	12.3	?

A pesar de que la producción de HGHr ha sido alcanzada por varios grupos de investigación principalmente empleando *E. coli* como hospedero [2, 3, 14, 30, 31, 32, 33], también habiéndose recurrido a *S. cerevisiae* [34], *Bacillus subtilis* [35] e incluso a células en cultivo de mamífero [36, 37], el sistema de producción de HGHr en *P. pastoris* desarrollado en este trabajo tiene claras ventajas (principalmente la secreción al medio de cultivo y su abundancia en éste) sobre los sistemas antes mencionados. Sin embargo aun son necesarios estudios de actividad biológica y ensayos a nivel fermentador para documentar mejor dicha ventaja del sistema y perfeccionarlo.

CAPITULO 5

6. CONCLUSIONES

1.- La proteína HGH-MBPr sintetizada por *E. coli* fue identificada por su peso molecular (≈64 kDa) y su inmunoreactividad con anticuerpos específicos anti-HGH.

2.- La optimación de la producción de HGH-MBPr en *E. coli* condujo a niveles por encima del 300 % que el ensayo de menor producción.

3.- Se logró la construcción del vector pPIC9hGH22K, portador del ADNc de HGH madura y de los elementos requeridos para su integración en el genoma de *Pichia pastoris* y la sobreexpresión del gen clonado.

4.- La integración del cassette de expresión en el genoma de *P. pastoris* fue confirmado por la síntesis de HGHr y corroborado por la PCR.

5.- Se seleccionó una clona sobreproductora la cual resultó contener una sola copia del cassette de expresión de acuerdo a la PCR.

6.- La HGHr sintetizada por *P. pastoris* resultó tener un peso molecular aproximado de 22 kDa, además de reaccionar con anticuerpos específicos anti-HGH, lo que confirmó la identidad de la misma.

7.- La optimación de la producción de HGHr en *P. pastoris* condujo a niveles por encima del 900 % que el ensayo de menor producción.

8.- La aplicación del método simplex permitió combinar el efecto de las condiciones de fermentación y optimar en corto tiempo la producción de HGHr en los sistemas empleados.

9.- A pesar de que los niveles de biosíntesis de HGHr en el sistema que emplea *E. coli* fueron mayores a los presentados con *P. pastoris,* este último sistema ofrece ventajas sobre el de *E. coli* para la posterior obtención de HGHr pura y biológicamente activa.

10.- El sistema de expresión que emplea *P. pastoris* ofrece una buena alternativa para la producción de HGHr.

BIBLIOGRAFIA

1. Goeddel D.V. (1991) Gene Expression Technology. Methods in Enzymology Academic Press Inc.

2. Kato, C., Kobayashi, T., Kudo, T., Furusato, T., Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Ohtssukaa, E., Ikeharaa, M., Yanagida, T., Kato, H., Moriyama, S. y Horikoshi, K. (1987). Construction of an exretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. 54, 197-202.

3. Hsiung, H.M., Cantarell, A., Luirink, J., Oudega, B., Veros, A. J., y Becker., G. W. (1989). Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human grrowth hormone into the culture medium., *Biotechnology* 7, 267-271.

4. Balbas, P. y Bolívar, F. (1990). Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli*. .Methods in Enzymology. 185, 14-37.

5. Uhlén, M. y Moks, T. (1990). Gene fusions for purpose of expression: an introduction. Methods in Enzymology. 185, 129-143.

6. Anaba, J.,Baty, D.,Lloubes, R.,Pages, J.-M.,Joseph-Liauzun, E.,Shire, D.,Roskaman, W., y Lazdusnsi, C. (1987). Expression vector promoting the synthesis and export of the human growth-hormone-releasing factor in *Escherichia coli*. . 4. 219-226.

7. Guan, K. L., y Dixon., J. E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with Glutathione S-Tranferase. Annal. Biochem., 192, 262-267.

8. Smith, D. B., y Johnson., K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene, 67, 31-40.

9. Carter, P. y Wells, A.J. (1987). Engineering enzyme specificity by "substrate-assisted catalysis". Science. 237, 394-399.

10. Guan, C.,Li, P.,Riggs, P. D., y Inouye., H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of forign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. Gene 67, 21-30.

11. Maina, C. V.,Riggs, P. D.,Grandea, A. G.,Slatko, B. E.,Maoran, L. S.,Tagliamonte, J. A.,McReynolds, L. A., y Guan., C. d. (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. Gene 67, 366-373.

12. Nagai, K., y Thorgensen, C. (1984). Generation of *ß*- globin by sequence specific proteolysis of a hybrid protein in *Escherichia coli.* . Nature 309, 810-812.

13. Brosius, J., y Holy., A. (1984). Regulation of ribosomal RNA promoters with synthetic lac operator. Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 6929-6933.

14. Martínez-Torres, A. (1994). Expresión en *Escherichia coli* de las hormonas del crecimiento humano y bovino en fusión con la proteína de unión a la maltosa. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UANL.

15 Marta Izquierdo Rojo (1993). Ingeniería Genética. Ediciones Pirámide S. A. Madrid España

16. Invitrogen, (1994). Pichia Expression Kit: Istruction Manual.

17. Ellis, S.B., Brust, P.F.,Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. y Gingeras, T.R. (1985). Isolation of Alcohol Oxidasa and two other methanol regulatable genes from the yeast, *Pichia pastoris. Mol. Cell. Biol.* 5 (5):1111-1121.

18. Buckholz, R.G., Gleeson, M.A. (1991): Yeast system for the comercial production of heterologus protein. *Biotechnology* 9: 1067-1072.

19. Cregg J.M., Vedvick T.S. y Rascke W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris. Biotechnology* 11, 905-910.

20. Creeg J.M., Tschopp J.F., Stillman C., Siegel R., Akong M., Craig W.S., Buckholz R.G., Madden K.R., kellaris P.A., Davis G.R., Smily B.L., Cruze J., Torregrosa R., Velicelebi G y Thill G.P. (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris. Biotechnology* 5, 479-485.

21. Sreekrishna, K., Nelles L., Potenz R., Cruze J., Mazzaferro P., Fish W., Fuke M., Holden K., Phelps D., Wood P. y Parker K. (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the thylotropphic yeast *Pichia pastoris. Biochemestry* 28, 4117-4125.

22. Digan M.E., Laair S.V., Brierly R.A., Siegel R.S., Williams M.E., Ellis S.B., Kellaris P.A., Prorow S.A., Craig W.S., Velicelebi G., Harpold M.M. y Thill G.P. (1989). Continuos Production of a novel lisozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris. Biotechnology* 7, 160-164.

23. Clare, J.J., Rayment, F.B., Bollantine, S.P., Sreekrishna, K. y Romanos, M. A. (1991). High-level expression of tetanus toxin fragment "C" in *Pichia pastoris* strains containing múltiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology* 9, 455-460.

24. Devos, M.A.; Ultsch, M.; Kossiakoff, A.A.: Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of complex. *Science* 255: 306-312, (1992).

25. Daughaday, W.H.: The anterior pituitary. Willams textbook of endocrinology. Ed 7. Philadelphia, W.B Saunders, pp 568-613, (1985).

26. Campbell, K.L.: Growth hormone-related disorders in dogs. *Compend cont. Educ. Pract, Vet.* 10: 477-482, (1988).

27. Welsh, T.H.: Endocrine control of growth: Current and emerging concepts. Anim. Natur, health. June-July: 14-19, (1985).

28. Castro-Peralta, F. (1995). Clonación molecular, caracterización y expresión del DNAc de la hormona del crecimiento del gato (FCGH). Tesis de Maestría. Facultad de medicina, U.A.N.L.

29. Watson, A.R. (1991). Safety of growth hormone. *Science*, 337-108.

30. Goeddel, D.V., H.L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itajura, D.G. Yansura, M.J. Rosss, G. Miozzarri, R. Crea and P. Seeburg (1979). Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone., 281, 544-548.

31. Gray, G.L. Baldridge, J.S., Mckeown, K.S., Heyneker, H.L., y Chang, C. N. (1985). Periplasmic production oof correcty processed human growth hormone in Escherichia coli: natural and bacterial signal sequences are interchangable., 39, 247-254.

32. Becker, G.W., y Hsiung, H.M. (1986). Expression, secretion adn folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. FEBS Letters, 204, 145 y 150.

33. Chang, C.N., M. Rey, B. Bochner, and, H.H., y Gray, G. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli.*, 55, 189-196.

34. Tokunaga, T., Iwai, S., Gomi, H., Kodama, K., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Chisaka, O., y Matsubara, K. (1985). Expression of synthetic human growth hormone gene in yeast. *Yeast.*, 39, 117-120.

35. Franchi, E., Maisano, F., Testori, S.A., Galli, G., Toma, S., Parente, L., Ferra, F. d., y Grandi, G. (1991). A new human growth hormone production process using a recombinant Bacillus subtilis strain. *J. Biotechnology*, 18, 41-54.

36. Ortíz-López, R. (1992). Obtención de líneas celulares productoras de las isoformas de 20 y 22 kDa de la hormona del crecimiento humano. Tesis. Facultad de Medicina, U.A.N.L.

37. Pavlakis, G.N., Hizuka, N., Gorden, P., Seburg, P.H., y Hamer, D.H. (1981) Expresson of two human growth hormone genes in mokey cel infected by simian virus 40 recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7398-7402.

38 Hendrix, C. D. (1980). Empirical optimization in research and development. Union Carbide Corporation South Charlestone, West Virginia.

39 Shavers, C. L., Parsons, M. L., y Deming, S. N. Simplex Optimization of Chemicals Systems. *J. Chem. Educ.* 1979, 56: 397-399.

40. Sambrook, J., Fristsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloninig: A Laboratory Manual. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.

41. Cab-Barrera, E. L., and Barrera-Saldaña (1988). Versatile plasmid vector for use in studies of eukariotic gene expression. *Gene,* 70 411-413.

42. Bradford, M.A. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72.

43. Ausbel, M.F., Brent, R., Kingstone, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, A.J., Struhl, K.(1992): Short Protocols in Molecular Biology (Second Edition). Harvard Medical School.

44. Mendoza-Maldonado R (1996). Hormona del crecimiento humano recombinante (HGHr): biosíntesis, purificación y producción de anticuerpos monoclonales. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

45. Simon, J.R., McEntee, K.(1990): Electroporation of intact Saccharomyces cerevisiae. *Focus* 12 : 82-83.

46. Martínez Soriano, J. P., Cab Barrera, E. L., Tamez Gonzales, R., Leal Klevezas, D. S. (1993). Detección de Brucella abortus por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Bioquimia XVIII (72): 10-16.

47. Jaramillo-Rangel, G. (1996). Alelos del gen del receptor de la vitamina D y su relación con la densidad mineral ósea. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L.

48 Clare, J. J., Romanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith M. A., Payne M. M., Sreekrishna, K. y Henwood, C. A. (1991). Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strain containing multiple genes copies. *Gene*, 105: 205-212.

49. Laroche Y., Storme V., Meutler J., Messens J., Lauwereys M. (1994). High-level serection and very efficient isotopic labeling of tichk anticoagulant peptide (TAP) expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 12, 1119-1124.

50. Gallardo-Blanco, H.L. (1995). Mutagenesis sitio-dirigida en la secuencia señal de la proteína de unión a maltosa. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. U.A.N.L.

51. Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y. y Madden K.R. Pichia pastoris as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology* 5, 3376-3385.

52. Scorer C.A., Clare J.J., Macombie R., Romanos M.A. y Sreekrishna K. Rapia selection using G418 of high copy number tranformats of *Pichia pastoris* for High-level foreign gene expression. *Biotechnology* 12, 181-184.

53. Ramírez-Angulo, V. (1991). Expresión en *Escherichia coli* del DNAc de la hormona del crecimiento bovino. Tesis. Facultad de Medicina, U.A.N.L.

ANEXO 1

Composición de Medios de Cultivo Empleados

YPD:
Extracto de levadura 1 %
Peptona 2 %
Dextrosa 2 %

YPD agar:
Extracto de levadura 1 %
Peptona 2 %
Dextrosa 2 %
Agar 1.5 %

MD agar:
Base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34 %
Biotina 4 X 10^{-5} %
Dextrosa 1 %
Agar 1.5 %

BMG:
Fosfato de potasio 100 mM pH=6
Base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34 %
Biotina 4 X 10^{-5} %
Glicerol 1%

BMM:
Fosfato de potasio 100 mM pH=6
Base nitrogenada para levadura (YNB) 1.34 %
Biotina 4 X 10^{-5} %
Metanol 0.5 %

LB:
Triptona 1 %
Cloruro de Sodio 0.5 %
Dextrosa 1 %

LB agar:
Triptona 1 %
Cloruro de Sodio 0.5 %
Dextrosa 1 %
Agar 1.5 %

ANEXO 2

Análisis teórico de restricción de pMalchGH22K empleando el programa computacional *DNA Strider*

```
 Digestion with :
*HinD III a/agctt
     1 fragment
 Order    Length            From                    To
    1       6685       3261 *HinD III   ->    3261 *HinD III


 Digestion with :
*HinD III a/agctt
*Xba I    t/ctaga
     2 fragments
 Order    Length            From                    To
    2       6113       3261 *HinD III   ->    2689 *Xba I
    1        572       2689 *Xba I      ->    3261 *HinD III


 Digestion with :
*BamH I   g/gatcc
*HinD III a/agctt
     2 fragments
 Order    Length            From                    To
    2       6077       3261 *HinD III   ->    2653 *BamH I
    1        608       2653 *BamH I     ->    3261 *HinD III


 Digestion with :
*Pvu II   cag/ctg
     6 fragments
 Order    Length            From                    To
    5       2682       3354 *Pvu II     ->    6036 *Pvu II
    6       1678       6036 *Pvu II     ->    1029 *Pvu II
    2       1612       1122 *Pvu II     ->    2734 *Pvu II
    3        497       2734 *Pvu II     ->    3231 *Pvu II
    4        123       3231 *Pvu II     ->    3354 *Pvu II
    1         93       1029 *Pvu II     ->    1122 *Pvu II


 Digestion with :
ApaL I    g/tgcac
     5 fragments
 Order    Length            From                    To
    2       2826       1241 ApaL I      ->    4067 ApaL I
    5       1285       5811 ApaL I      ->     411 ApaL I
    3       1246       4067 ApaL I      ->    5313 ApaL I
    1        830        411 ApaL I      ->    1241 ApaL I
    4        498       5313 ApaL I      ->    5811 ApaL I
```

ANEXO 3

Secuencias de Importancia

ADNc de hGH natural

tcagggtcctgtggacagctcacctagcggca**ATGGCTACAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTG**
GCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTA
TCCAGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGA
GTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTT
TCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGC
ATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGCGCTGGAGCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCT
GGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGA
TGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACA
AACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAA
GGTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGctgcccgggt
ggcatccctgtgacccctccccagtgcctctcctggccctggaagttgccactccagtgcccaccagcctt
gtcctaataaaattaag

Minúsculas normales: Secuencias 3' y5' no traducibles
Mayúsculas negritas: Secuencia señal nativa de hGH
Mayúsculas normales: Secuencia que codifica para la hormona madura

ADNc de hGH extraido de pJT incluye sitios *Xho* I y *Xba* I creados por mutagénesis

CTCGAGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGC
AGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTATCTAGACTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACC
AGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTG
CAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACA
GAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGCGCTGGAGCCGTGCAGTTCC
TCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGAC
CTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAA
GCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCT
ACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGC
AGCTGTGGCTTCTAGctgcccggg

Mayúsculas negritas: Mayor parte de la secuencia señal
Mayúsculas normales: Secuencia que codifica para HGH madura
Minúsculas normales: Parte de la secuencia 3' no traducible

pPIC9hGH22K: Secuencia señal (factor alfa) y ADNc de hGH madura

ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTC
CAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTA
CTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAAC
GGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTC
TCGAGAAAAGATTCCCAACCATTCCCTTATCTAGACTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTC
TGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCA
TTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAAC
ACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGCGCTGGAGCCGTGC
AGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTA
AAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGAT
CTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGC
TGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTG
GAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGctgccc

Mayúsculas negritas: Secuencia señal del factor alfa
Mayúsculas normales: Secuencia que codifica para la HGH madura
Minúsculas normales: codones no traducibles provenientes de pJT

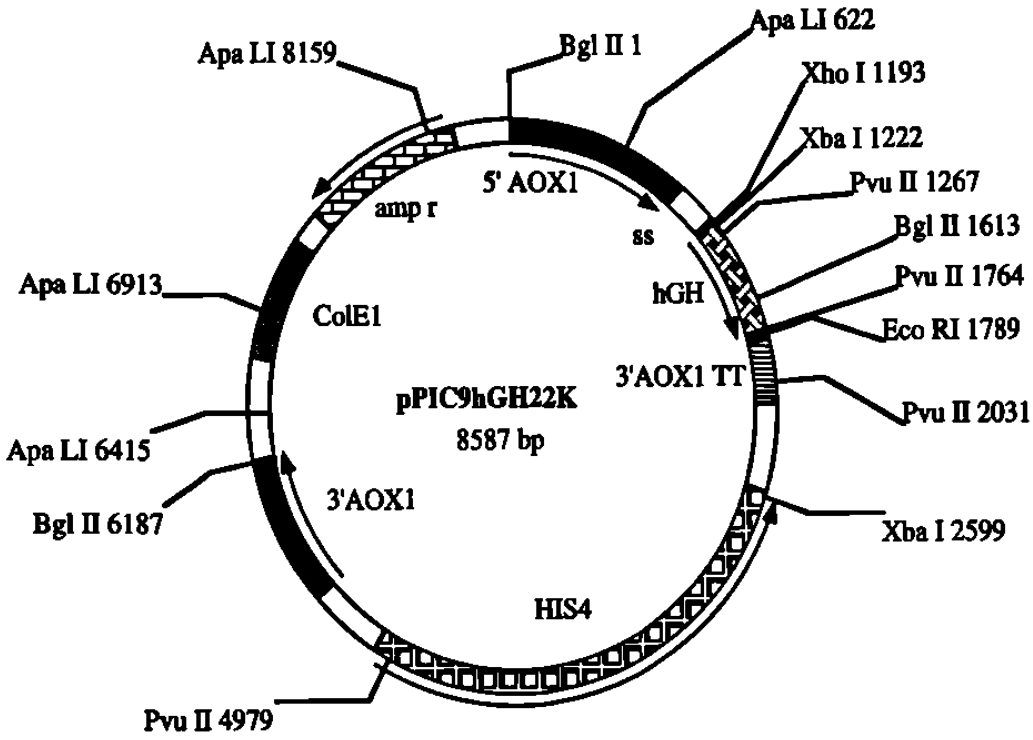
Fragmento de 563 pb extraido de pJT empleado en la construccion de pPIC9hGH22K

CTAGACTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTTGACACCTACCAGGAG
TTTGAAGAAGCCTATATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTT
CTCAGAGTCTATTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCA
TCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGCGCTGGAGCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTG
GTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCTATGACCTCCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGAT
GGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAA
ACTCACACAACGATGACGCACTACTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAG
GTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGctgccc

Mayúsculas: Secuencia que codifica para parte de la HGH madura
Minúsculas: codones no traducibles

ANEXO 4

Mapa y análisis de restricción del plásmido pPIC9hGH22K empleando el programa computacional *DNA Strider*




```
 Digestion with :
*Xho I    c/tcgag
     1 fragment
 Order    Length            From                    To
    1       8589       1192 *Xho I      ->    1192 *Xho I


 Digestion with :
*EcoR I   g/aattc
*Xho I    c/tcgag
     2 fragments
 Order    Length            From                    To
    2       7992       1789 *EcoR I     ->    1192 *Xho I
    1        597       1192 *Xho I      ->    1789 *EcoR I


 Digestion with :
*Xba I    t/ctaga
     2 fragments
 Order    Length            From                    To
    2       7212       2599 *Xba I      ->    1222 *Xba I
    1       1377       1222 *Xba I      ->    2599 *Xba I
```

Digestion with :
*Pvu II cag/ctg
4 fragments

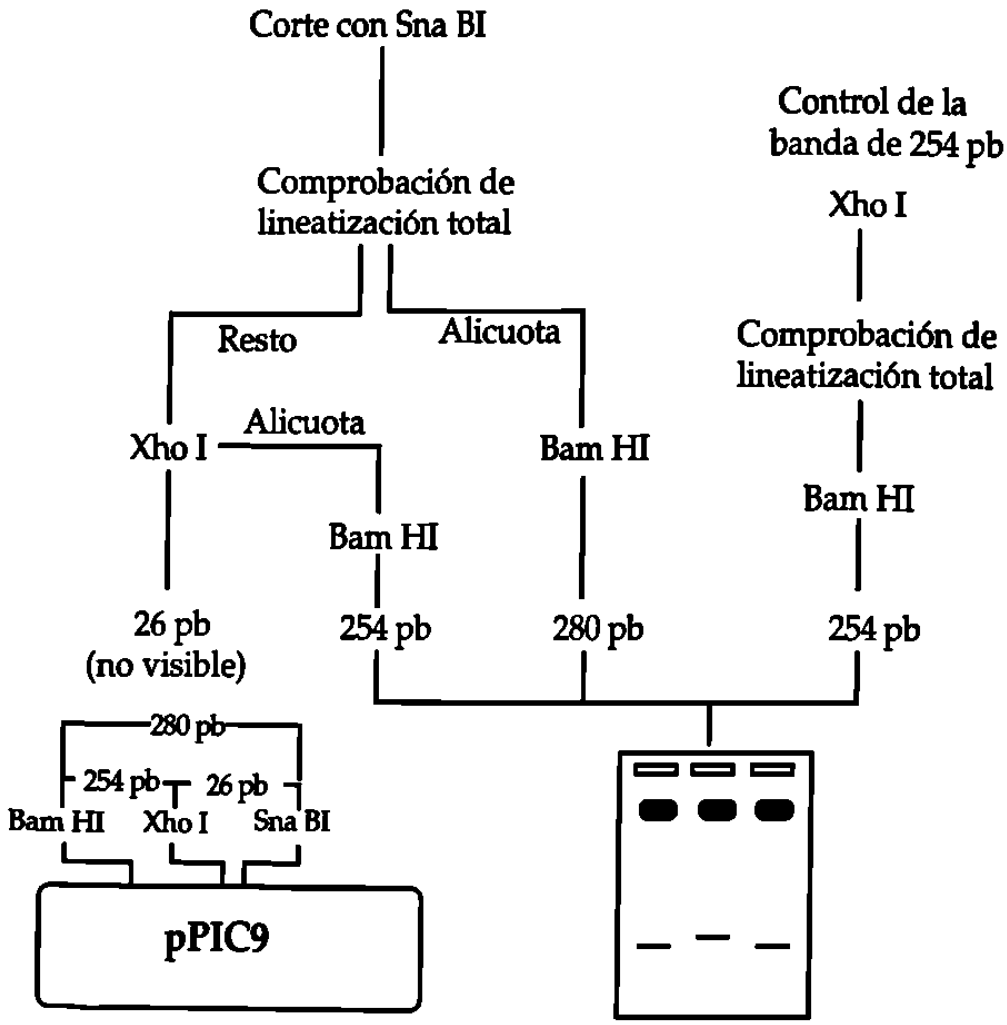
Order	Length	From		To
4	4877	4979 *Pvu II	->	1267 *Pvu II
3	2948	2031 *Pvu II	->	4979 *Pvu II
1	497	1267 *Pvu II	->	1764 *Pvu II
2	267	1764 *Pvu II	->	2031 *Pvu II

Digestion with :
*Bgl II a/gatct
3 fragments

Order	Length	From		To
2	4574	1613 *Bgl II	->	6187 *Bgl II
3	2403	6187 *Bgl II	->	1 *Bgl II
1	1612	1 *Bgl II	->	1613 *Bgl II

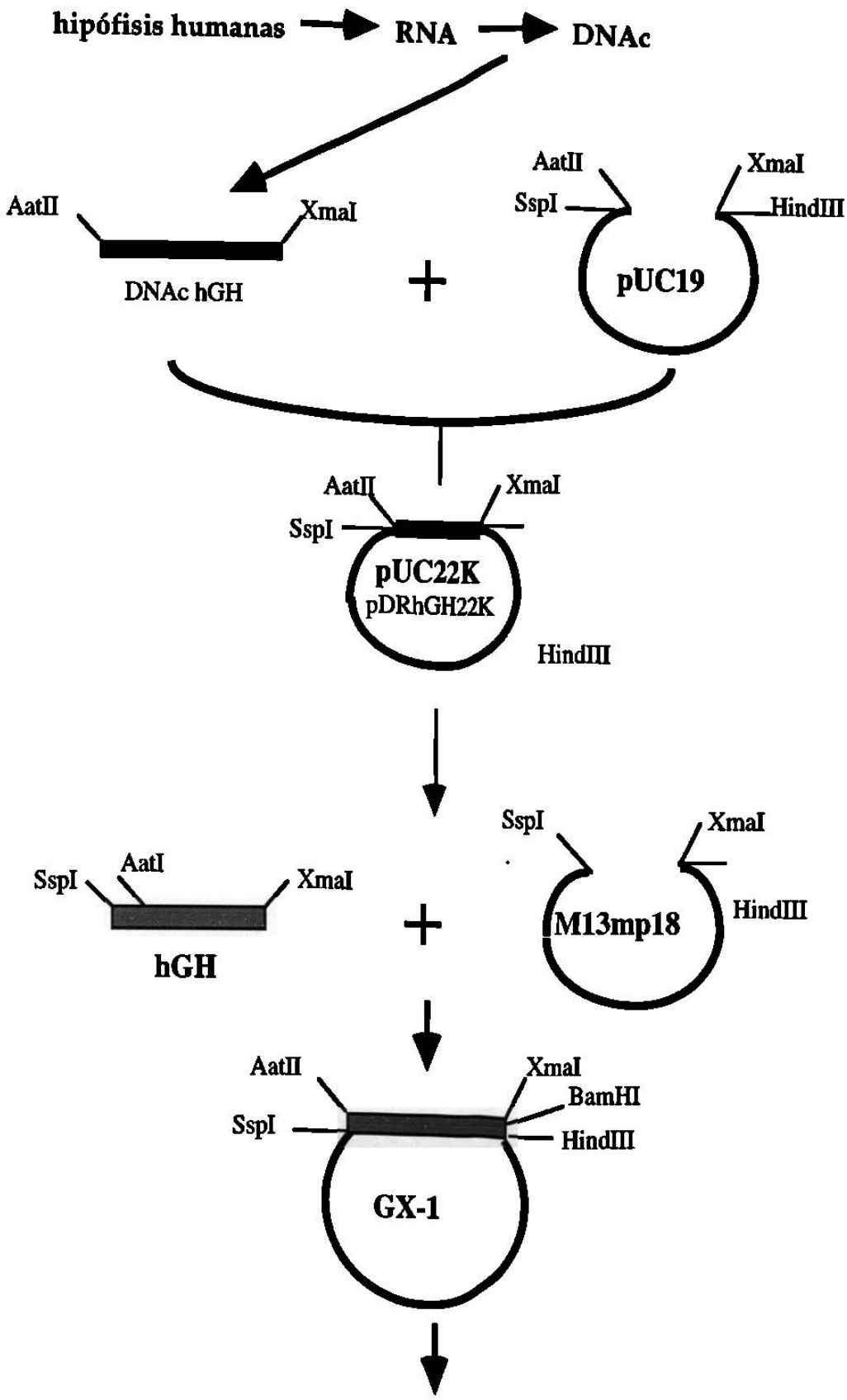
ANEXO 5

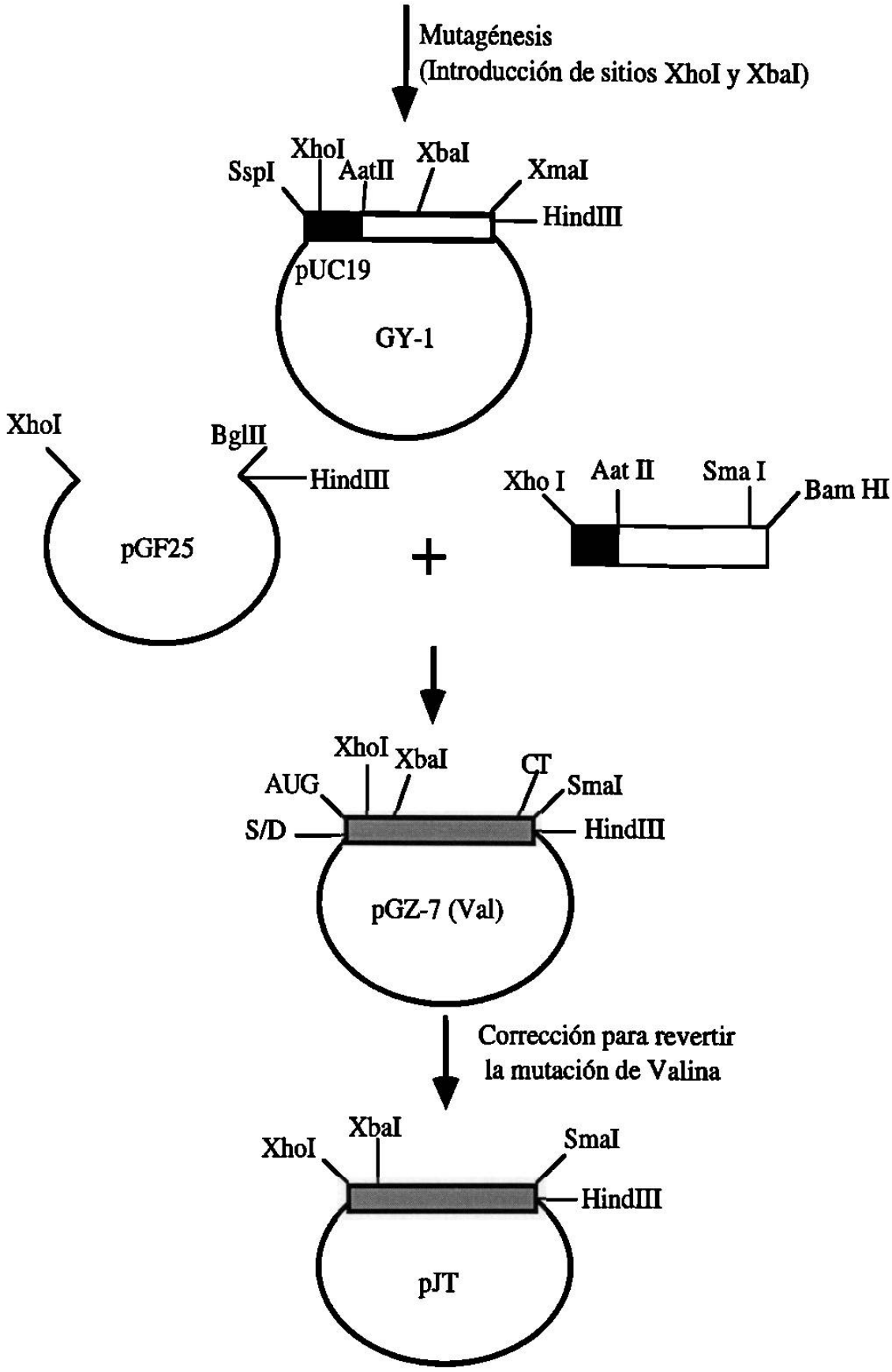
Comprobación de la liberación del fragmento de 26 pb al digerir pPIC9hGH22K con *Xho* I y *Sna* BI



ANEXO 6

Ontogenia de pJT.




Mutagénesis
(Introducción de sitios XhoI y XbaI)
SspI
XhoI
AatII
XbaI
XmaI
HindIII
pUC19
GY-1
XhoI
BglII
HindIII
pGF25
+
Xho I
Aat II
Sma I
Bam HI
XhoI
XbaI
AUG
CT
SmaI
S/D
HindIII
pGZ-7 (Val)
Corrección para revertir
la mutación de Valina
XhoI
XbaI
SmaI
HindIII
pJT