

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Características de la Hormona del Crecimiento Humana (HGH)

1.1.1 Generalidades de la HGH

La hormona del crecimiento humana se sintetiza en los somatotropos, subclase de células acidófilas de la hipófisis que son las más abundantes en esa glándula. Es un péptido globular de cadena única de 191 aminoácidos unidos por dos puentes disulfuro. Su masa molecular aproximada es de 22 kDa y no posee residuos de azúcares (Figura 1) (1).

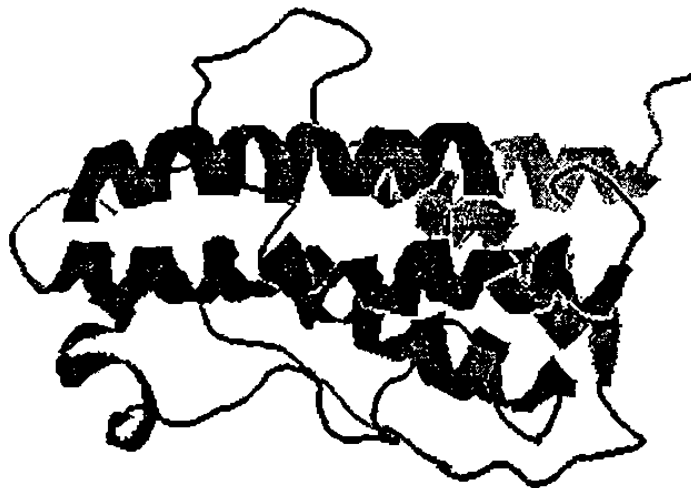


Figura 1. Modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcino. Se muestran las cuatro hélices alfa que constituyen la proteína y los enlaces que las unen.

La HGH es necesaria para el crecimiento postnatal y para el metabolismo normal de carbohidratos, lípidos, nitrógeno y minerales. Se dice que sus efectos son anabólicos, diabetogénicos y lipolíticos, actuando a través de mecanismos directos e indirectos, e influye en el metabolismo de:

- Proteínas, incrementando su síntesis y disminuyendo los valores plasmáticos y urinarios de aminoácidos y urea (1).

- Lípidos, favoreciendo la liberación de ácidos grasos libres y glicerol del tejido adiposo, así como la oxidación de los ácidos grasos en el hepatocito (1).
- Nitrógeno, incrementando su retención (2).
- Minerales, promoviendo un equilibrio positivo de calcio, magnesio y fosfato y causando retención de Na^+ , K^+ y Cl^- (1).

Los efectos en el metabolismo de carbohidratos y grasas están mediados directamente a través de receptores específicos, mientras que los efectos en las proteínas y en el crecimiento son mediados a través del IGF-1 (factor de crecimiento semejante a insulina-1) (1, 3).

Al unirse a los receptores de lactógeno estimula las glándulas mamarias y la lactogénesis (1). Además, provoca niveles elevados de insulina y cambios en el empleo de sustrato. Actualmente se estudian sus efectos en la producción de IGF-1 y la inducción de proteínas de unión a IGF, en un esfuerzo por entender mejor el mecanismo de las acciones de las HGH durante el estrés (3).

1.1.2 Usos de la HGH

La HGH ha sido utilizada exitosamente en el tratamiento del enanismo hipofisiario, para la remoción de ácidos grasos en obesos, para mejorar la vascularización y promover la ganancia de masa muscular en los ancianos, en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas y para acelerar la regeneración de tejidos (4). En los últimos años se ha investigado su efecto en un gran número de padecimientos, como en niños con insuficiencia renal crónica, retardo en el crecimiento intrauterino, artritis reumatoide, hipocondroplasia y osteogénesis imperfecta, entre muchos otros (5, 6, 7, 8, 9).

Crecimiento, densidad ósea y metabolismo del hueso.

Un estudio en el que se empleó la HGH recombinante (HGHR) en niños con raquitismo familiar hipofosfatémico mostró un efecto positivo en el crecimiento, sin embargo se puede agravar la tendencia ya existente al crecimiento desproporcionado (6). Uno de los efectos en falla renal crónica es el síndrome de insensibilidad secundaria a HGH, provocando que los niños

posean corta estatura. Su administración en prepúberes aumenta la velocidad del crecimiento (7). El tratamiento con HGHR en niños con artritis reumatoide juvenil activa puede rectificar la deficiencia de IGF-1, pero su efecto está adversamente influenciado por la respuesta de fase aguda, lo que se refleja en un nivel elevado de proteína C reactiva (8). El tratamiento con HGH en osteogénesis imperfecta moderada incrementa significativamente la velocidad de crecimiento lineal así como el contenido mineral en hueso trabecular de la espina lumbar, y no incrementa el riesgo de fractura en pacientes en el corto plazo (9). Se sabe que los niños de corta estatura con talasemia tienen niveles reducidos de HGH e IGF-1 circulante, y se ha observado que las células eritroides en cultivo responden de modo normal al estímulo con HGH e IGF-1 (10).

La respuesta inmune

Aunque existe un reporte de que la HGH no ejerce influencia en las subpoblaciones de las células encargadas de la respuesta inmune, en la respuesta proliferativa, así como en la producción de interleucinas, TNF e interferón gamma (11), existe un estudio más reciente que sugiere interacciones entre los sistemas inmune y endócrino a diferentes niveles, pues muestra que la HGH puede influenciar al sistema inmune mediante la estimulación en la proliferación de células secretoras de interferón gamma así como la estimulación de su producción (12).

Trauma severo

Una terapia prometedora en trauma severo, donde se necesita un estímulo anabólico además del soporte nutricional en la fase de flujo catabólico, parece ser la infusión con HGHR (13). Un estudio muestra que la administración de HGHR atenúa la oxidación de ^{13}C -Leucina (que es administrada para estudiar la degradación de proteínas) que se observa en pacientes quirúrgicos (14,15). En otros estudios, se ha observado un balance de nitrógeno menos negativo y un aumento de los siguientes parámetros: la eficiencia de la síntesis proteica, la velocidad de lipólisis, la reesterificación de ácidos grasos libres, los niveles plasmáticos de GH anabólica, de IGF-1, de IGFBP-3 y de insulina. La glucosa plasmática es significativamente mayor sin

afectar la salida de glucosa hepática, ni la oxidación de la glucosa ni las velocidades de reciclaje. No altera el nivel de hormonas inducidas por trauma (cortisol, glucagon, catecolaminas); se normaliza la hipoaminoacidemia inducida por trauma y la excreción de 3-metilhistidina es significativamente baja. La mejoría en los niveles de IGF-1 observada explica los efectos anabólicos sobre proteínas que ayudan a la reparación del tejido y la recuperación temprana (13, 16).

Sistema reproductivo

La HGH tiene efectos importantes en el sistema reproductivo. Numerosos experimentos proporcionan evidencia de acción local de la HGH en los ovarios. Se ha demostrado la presencia de receptores para HGH en las células de la granulosa humana, así como la habilidad de la HGH para aumentar la producción de estradiol (E2) en estas células en la fase folicular tardía. La HGH también provoca un incremento en la biosíntesis de la progesterona por las células lúteas humanas. Siendo la HGH el principal regulador de los niveles plasmáticos de IGF-1, es posible su efecto indirecto por medio de la producción de IGF-1 hepática u ovárica (17).

Un estudio en que se administró HGH a mujeres con ciclos ovulatorios normales y un factor de infertilidad tubal, mostró que la HGH es un sinérgico en la esteroidogénesis folicular inducida por FSH (18). Otro estudio muestra que la HGH incrementa la secreción de oestradiol y promueve el desarrollo del oocito en mujeres con el síndrome de ovario poliquístico (19).

La administración de HGH a madres de infantes prematuros con lactación inadecuada, puede mejorar el volumen de leche materna sin presentar efectos adversos (20).

Cardiomiopatía

La HGH se ha empleado en el tratamiento de la cardiomiopatía dilatada. Su administración por tres meses en pacientes incrementa la masa miocárdica y reduce el tamaño de la cámara ventricular izquierda, dando como resultado una mejora en la hemodinamia, en el metabolismo energético del miocardio y en el estatus clínico (21).

1.1.3 Producción de HGH

La HGH fue sintetizada en *Escherichia coli* por primera vez por Goodel y cols. en 1979 bajo el control del operón Lac, recuperándola del citoplasma (22). Investigaciones posteriores permitieron obtenerla a partir del periplasma y medio de cultivo, pero para este último, se requiere de estrategias complicadas (23-28). La HGH se ha sintetizado en otros hospederos: *Bacillus subtilis* (29) y *Saccharomyces cerevisiae* (30) a nivel de mg/mL, y células de mamífero (31, 32) a nivel de µg/mL.

Escamilla en 1996 (33) logró producir HGHr empleando a *Pichia pastoris* como hospedero. Realizó la construcción de un vector portador del ADNc de HGH con el que obtuvo cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras y secretoras de HGHr madura alcanzando alrededor de un 82 % de las proteínas totales secretadas al medio de cultivo (equivalente a 12 mg/L).

1.2 Características de *Pichia pastoris*

1.2.1 Generalidades

Las levaduras combinan la facilidad, simplicidad y economía de los sistemas de expresión bacteriana con la autenticidad de los sistemas de cultivo de tejido animal, los cuales son más costosos y menos convenientes. Al igual que las bacterias, las levaduras son fáciles de crecer en medios de cultivo económicos, y existen muchas herramientas para la manipulación e introducción de genes externos de interés. Las levaduras, como organismos eucariotes, proveen un medio ambiente apto para el procesamiento postraduccional y posterior secreción de proteínas, resultando en un producto biológicamente activo que es idéntico o muy similar a la proteína nativa.

Saccharomyces cerevisiae tiene una larga historia de uso en la producción de pan y bebidas alcohólicas. Como resultado, hay confianza en que el organismo es seguro, y la experiencia en fermentaciones industriales facilita el escalamiento de la producción. La primera levadura empleada para

la producción de proteínas recombinantes fue precisamente *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo tiene algunas desventajas. Durante la secreción proteica, tiene lugar el plegamiento, formación de enlaces disulfuro y glicosilación. La N-glicosilación ocurre en los sitios correctos pero frecuentemente difiere del patrón nativo en que las cadenas de carbohidratos son frecuentemente de longitud excesiva y del tipo ricos en manosa. La proteína resultante puede ser inmunogénica limitando el uso de proteínas glicosiladas como agentes terapéuticos humanos. Además, *Saccharomyces cerevisiae* está limitada como sistema de expresión debido a su baja producción (34).

El interés en el estudio de levaduras no convencionales, distintas a *Saccharomyces cerevisiae* se ha incrementado considerablemente en los últimos años. En esta categoría se encuentran las levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* y otras, las cuales poseen las ventajas de *Saccharomyces cerevisiae* pero son confiables para alcanzar producciones elevadas (35, 36).

Pichia pastoris fue inicialmente desarrollada por la compañía Phillips Petroleum para la producción de proteína unicelular para alimento de ganado. Se desarrollaron procesos fermentativos con alta productividad de biomasa (mayor a 10 g/L-hora) (37). Sin embargo, no resultó económicamente rentable. Esta compañía invirtió sus esfuerzos en desarrollar con ésta levadura un sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes, al igual que muchos otros investigadores (38) (TABLA 1).

TABLA 1
ALGUNAS PROTEÍNAS PRODUCIDAS EN *Pichia pastoris*
(Sreekrishna y Kropp 1996).

Proteína	Autor
Antígeno de superficie VHB	Cregg y cols. 1987 (39)
Invertasa	Tschopp y cols. 1987 (40)
Factor de necrosis tumoral	Shreekrishna y cols. 1988 (41)
Lisozima	Digan y cols. 1989 (42)
Fragmento C de la toxina tetánica	Clare y cols. 1991 (43)
Proteína de envoltura del HIV-1	Scorer y cols. 1993 (44)
D-alanina carboxipeptidasa	Despereaux y cols. 1993 (45)
Péptido anticoagulante de garrapata	Laroche y cols. 1994 (46)
CD-38 humana	Fryxell y cols. 1995 (47)
α -Galactosidasa del grano de café	Zhu y cols. 1995 (48)
Anticuerpos monoclonales de conejo	Ridder y cols. 1995 (49)
Pectato liasa	Guo y cols. 1995 (50)
Factor de crecimiento endotelial vascular humano	Mohanraj y cols. 1995 (51)
Proteína anticoagulante antimetastásica	Brankamp y cols. 1995 (52)
Transferrina	Steinlein y cols. 1995 (53)
Fosfatasa ácida	Payne y cols. 1995 (54)
Enterocinasa bovina	Vozza y cols. 1996 (55)
Glicolato oxidasa y catalasa	Payne y cols. 1997 (56)
c-Kit receptor cinasa	Lam y cols. 1997 (57)
Proteína ORF3 del VHE	Lai y cols. 1997 (58)
Inhibidor de la anhidrasa carbónica porcina	Wuebbens y cols. 1997 (59)
Ligando trimérico CD40	McGrew y cols. 1997 (60)
Hexosa oxidasa del alga <i>Chondrus crispus</i>	Hansen y cols. 1997 (61)
Proteína HMG1	Mistry y cols. 1997 (62)

1.2.2 El metabolismo del metanol

Las levaduras metilotróficas como *Pichia pastoris*, utilizan el metanol como única fuente de carbono y energía. La primera enzima para la vía de utilización del metanol es la alcohol oxidasa, conocida como AOX, que cataliza la oxidación del metanol a formaldehído (Figura 2).

Existen dos genes que codifican para la AOX, que son AOX 1 y AOX 2. El primero es el responsable de la mayor parte de la actividad en la célula. La producción de AOX está altamente regulada, ya que la enzima es reprimida en presencia de otra fuente de carbono como glucosa o etanol. El poderoso

promotor regulable que programa la expresión de AOX ha sido aislado y empleado dentro de un plásmido para dirigir la producción de proteínas recombinantes (63, 64).

Durante el crecimiento en metanol, la AOX constituye aproximadamente el 30 % de la proteína celular total, secuestrada en los peroxisomas que pueden ocupar el 80 % del volumen celular (64).

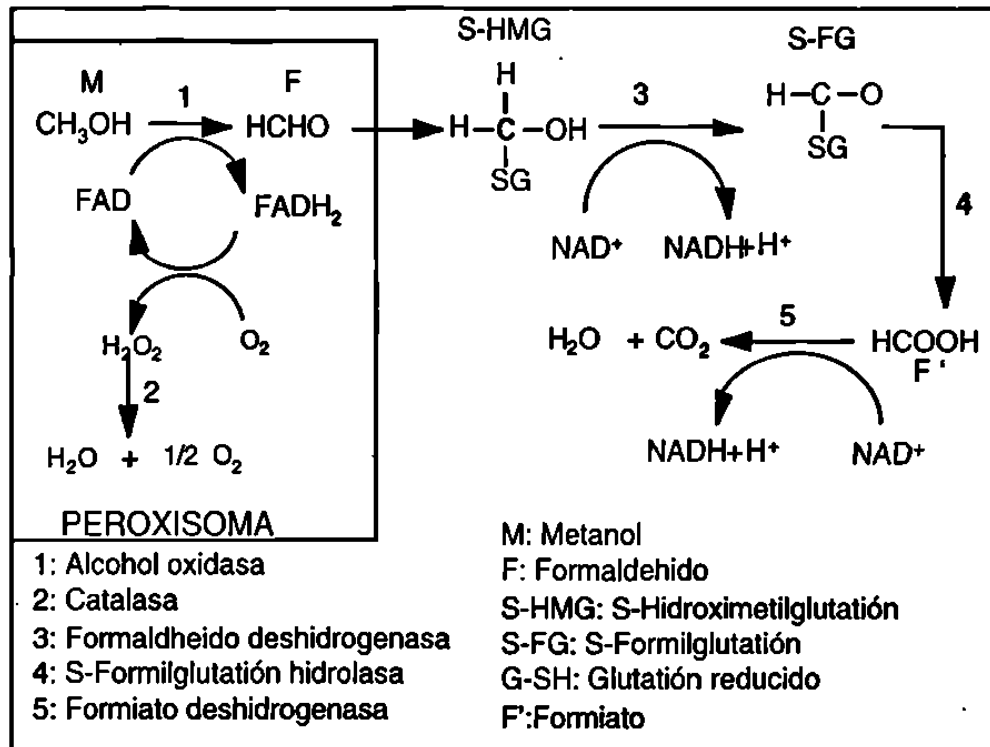


Figura 2. Esquema del metabolismo del metanol (21). Dentro del peroxisoma, el primer paso de oxidación a formaldehído es catalizado por la enzima alcohol oxidasa, empleando oxígeno como aceptor de electrones. El catabolismo posterior a bióxido de carbono y agua se lleva a cabo en el citoplasma.

1.2.3 Ventajas de *Pichia pastoris*

la mayor ventaja de producir proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* es la secreción de niveles muy bajos de proteínas nativas. La mayor parte del medio de cultivo comprenderá a la proteína de interés y esto facilita su purificación (65).

Como ya se ha mencionado, a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* tiene la ventaja de que sus proteínas no sufren hiperglicosilación. Ambas levaduras producen una N-glicosilación del tipo rico en manosa, pero la longitud de las cadenas del oligosacárido añadidas a las proteínas postraduccionalmente es más corta en *Pichia pastoris* (8-14 residuos de manosa por cadena) que en *Saccharomyces cerevisiae* (50-150 residuos de manosa) (40). El oligosacárido de *Saccharomyces cerevisiae* tiene enlaces glicosos α -1,3 terminales, mientras que *Pichia pastoris* no. Se cree que estos enlaces son los responsables de la naturaleza hiperantigénica de estas proteínas dificultando su uso terapéutico.

1.2.4 Vectores de expresión

Los vectores de expresión de *Pichia pastoris* poseen los siguientes elementos genéticos.

1. Las secuencias regulatorias 5'AOX1 (940 pb) y un segmento 3'AOX1 (256 pb), derivadas del gen altamente expresable AOX1 para la expresión regulada de los genes de interés (63).
2. *P. pastoris* HIS4 (gen de la histidinol deshidrogenasa) contenido en un fragmento de 2.8 kb puede servir como un marcador de selección en la transformación de huéspedes de *P. pastoris* His⁻ como GS115 (66).
3. La región 3'AOX1 es de 650 pb. Junto con la región 5'AOX1 es necesaria para la inserción sitio-dirigida al gen estructural cuando se emplea un plásmido digerido con la enzima apropiada para la transformación (64).
4. El gen de la beta-lactamasa y el origen de replicación proporciona a los vectores la característica de ser utilizables tanto por *Escherichia coli* como por *Pichia pastoris*.
5. Una secuencia señal que codifica para una señal n-terminal de secreción de la proteína.
6. Sitio de clonación múltiple que permite la inserción del gen de interés dentro del vector de expresión.

7. Señal de terminación de la transcripción y poliadenilación nativa para el gen *AOX1* (~260 pb).
8. Un origen de replicación f1 de bacteriófago (~458 pb) que permite la generación de ADN de cadena sencilla para mutagénesis.
9. Sitios de restricción únicos que permiten la linearización del vector para la integración eficiente dentro del genoma de *Pichia pastoris* (64).

1.2.5 La cepa GS115 de *Pichia pastoris*

La cepa GS115 de *Pichia pastoris* tiene un defecto en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*His4*) lo cual le impide sintetizar histidina. Los plásmidos de expresión que contienen el gen *HIS4* complementan el *His4* del huésped, de modo que las transformantes se seleccionan por su habilidad de crecer en un medio deficiente de histidina. La reversión espontánea de GS115 al prototipo His⁺ ocurre con una frecuencia de 10⁻⁸ (64).

1.2.6 Dosis génica

Se ha demostrado que es posible obtener una mayor producción de la proteína recombinante si se integra más de una copia del gen que codifica para ésta en el genoma de *Pichia pastoris*, y algunos estudios muestran que existe una correlación entre el número de copias y la producción de la proteína recombinante (TABLA 2). Clare y cols. (43) encontraron que el factor más importante para obtener altos niveles del fragmento C de la toxina tetánica es la integración de múltiples copias del cassette de expresión del fragmento C. En otro estudio (67), con la finalidad de incrementar los niveles de Factor de Crecimiento Epidérmico de ratón (mEGF) se desarrolló un método para efectuar un tamizaje rápido de un gran número de transformantes de *Pichia pastoris* con la presencia de muchas copias del gen foráneo. Scorer y cols. (68) observaron una alta correlación entre el número de copias con la resistencia a drogas, así como un incremento progresivo en el RNA mensajero de HIV-1 ENV.

TABLA 2

REFERENCIAS SOBRE LA PRODUCCIÓN CON MULTICOPIAS EN *Pichia pastoris*.

Proteína	Nivel de expresión	Referencia
TNF humano	10 g/L (> 20 copias)	41
Proteína de 51.4 KD de <i>B. sphaericus</i>	Rango de < 1 a > 20 de la proteína soluble (multicopia, número no determinado)	69
Fragmento C de la toxina tetánica	12 g/L (14 copias)	43
Hormona de crecimiento de salmón	0.3 g/L (18 copias)	70
Pertactina P69 de <i>Bordetella pertussis</i>	> 3 g/L (>10 copias)	71
Aprotinina	0.9 g/L (5 copias)	72
mEGF	0.45 g/L (19 copias)	67

Sin embargo, se ha encontrado que para ciertas proteínas como LacZ (73) y el Antígeno de Superficie del Virus de la Hepatitis B (39) sólo fue necesaria una copia para la producción de la proteína a altos niveles, ya que a mayor dosis génica no hubo aumento en el nivel de producción. Esto implica que es necesario evaluar para cada proteína el nivel de producción respecto a la presencia de múltiples copias, si se desea aumentar por esta vía la producción de la proteína recombinante.

Gracias al empleo del vector pPIC9K (figura 3), el cual posee el gen que provee de resistencia a Geneticina en levaduras, es posible tamizar la integración de más de una copia del cassette de expresión al genoma de la levadura, al conferirle la capacidad de crecer en concentraciones progresivamente mayores de Geneticina (64, 68).

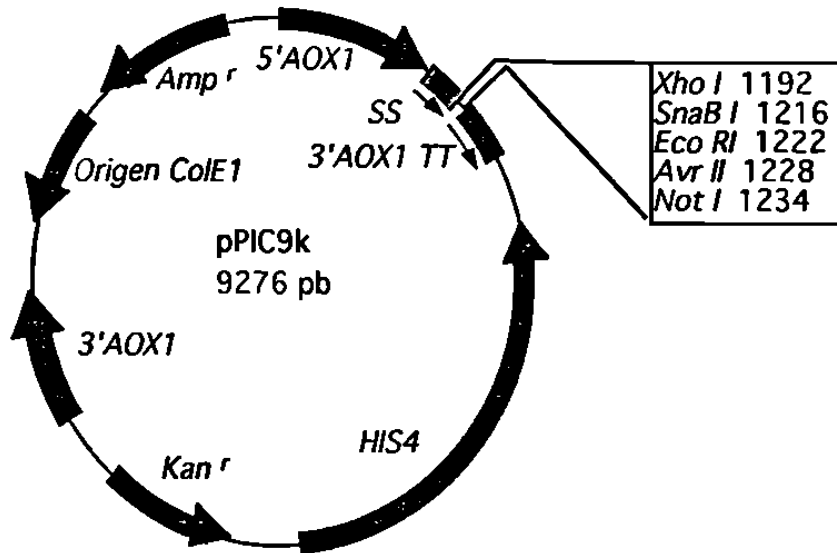


Figura 3. Plásmido pPIC9K. Posee los siguientes genes: región 5' de la alcohol oxidasa (5' AOX1), secuencia señal de *Saccharomyces cerevisiae* (SS), señal de terminación de la transcripción (3'AOX1 TT), gen de la histidinol deshidrogenasa (HIS4), gen de resistencia a kanamicina o Geneticina (*Kan^r*), región 3' de la alcohol oxidasa (3' AOX1), origen de replicación de *Escherichia coli* (*ColE1*) y el gen de resistencia a ampicilina (*Amp^r*).

1.3 Justificación del trabajo

Se ha logrado la expresión de hGH en diversos sistemas procarióticos y eucarióticos, siendo el antecedente más reciente y novedoso la producción de HGHr en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Debido a que se desea construir una cepa con características mejores que la cepa de *Pichia pastoris* previamente construida, y la posibilidad de seleccionar cepas que han integrado más de una copia del ADNc de HGH y sobreproductoras, a través del tamizaje con el antibiótico Geneticina, se planteó el presente trabajo.

1.4 Objetivos del trabajo

Objetivo general:

Construir cepas de *Pichia pastoris* productoras de Hormona del Crecimiento Humano recombinante y evaluar esquemas de purificación.

Objetivos específicos:

1. Producir HGHR.
 - a) Construir el vector de integración pPIC9KhGH22K.
 - b) Obtener cepas recombinantes de *Pichia pastoris* mediante su transformación con el vector pPIC9KhGH22K y caracterizar sus genotipos y fenotipos.
 - c) Seleccionar cepas multicopias del cassette de expresión productoras de HGHR.
2. Evaluar esquemas de purificación de HGHR.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Area de trabajo, reactivos y equipo

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

Las enzimas de restricción, así como las enzimas ADN Ligasa de T4 fueron obtenidas de New England Biolabs (NEB, Beverly Ma, EUA) y Bethesda Research Laboratories (BRL, Gaithersburg MD, EUA), la enzima liticosa fue adquirida de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo, EUA). Para las reacciones enzimáticas se siguieron las recomendaciones dadas por los proveedores.

Los reactivos para las diferentes soluciones proceden de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo, EUA), Merck de México (Monterrey, N.L.) y Reactivos Monterrey (Monterrey, N.L.). Los oligonucleótidos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa se sintetizaron y cuantificaron en el Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.

La cepa de *E. coli* XL1-Blue y los marcadores de peso molecular provienen de la bacterioteca y genoteca de la U.L.I.E.G. El sistema de expresión de *Pichia pastoris*, el cual incluye la cepa GS115, el vector pPIC9, el vector pPIC9K, catálogos y otros, así como el Estuche de expresión de *Pichia pastoris* (cat. No. K1710-01), se adquirieron de Invitrogen Corporation (San Diego Ca, EUA).

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 Orbit Lab line modelo 0993-33061, una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un ultracongelador marca So-Low Environmental Equipment (Cincinnati, Ohio, EUA), una campana Clase II

marca Labconco Corporation (K. C., Missouri, EUA), una báscula digital marca Sartorius modelo 1206MP (Camibh Göttingen Germany), una balanza analítica Mettler modelo AE 163, un evaporador y concentrador marca Labonco Corporation modelo 78100-00 (K. C., Missouri, EUA), un bloque de calentamiento Thermoline Tipo 16600 Modelo OB17615, una cámara de electroforesis horizontal Fotodyne, centrifugas Beckman Mod.TJ-6 y J2-MI, una plataforma agitadora Shaker Orbit Mod Lab Line mod 3520, una plataforma orbital Labline Modelo 3520, una cámara de electroforesis vertical Miniprotean II de Bio Rad, una incubadora con agitación Orbit Lab line Catálogo No. 3526 y un espectrofotómetro UV/Vis DU50 Beckman. Además, un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución System Gold de Beckman y una columna de intercambio aniónico Protein Pak DEAE 8HR, cat. no. PN35650, AP-1, de dimensiones 10 X 100 mm, 8 μ m, 1000 °A (Waters, Chromatography Division Millipore).

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo Power Macintosh 5260/100 (Apple Computer, Inc.; Cupertino California. EUA) y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO-RAD). Los periféricos compatibles para Macintosh utilizados fueron: Modem Global Village Communication Inc. modelo Teleport/Silver A801 (East Middlefield Road Mountain View Ca. EUA); digitalizador de imágenes de cama plana UMAX data System Inc. modelo UC630 MaxColor (Industrial Park Hsinchu Taiwan, R.O.I.) .

El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word* versión 5.1a (1987-1992 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft Power Point* 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.). El programa utilizado para comunicación en la red fue el Netscape 2.0.

Los programas computacionales de Biología Molecular empleados fueron: *Amplify* versión 1.2b (Bill Engels 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, Wi. EUA), *ADN Strider*™ 1.1 (Ch. Marck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *Oligo* versión 4.0 (1992, Plymouth, Mn, EUA), *Molecular Analyst* 1997 (BIO-RAD). *RASMac* v2.5, Molecular Graphics Program (1994, Roger Sayle, Biomolecular Structure, Glaxo Research and

Development, Greenford, Middlesex, UK., EUA). *Graphic Converter V2.7* (US) (1997, Shareware, Thorsten Lemke, E-Mail: 100102.1304@compuserve.com, lemkesoft@aol.com). *CLUSTAL W* Multiple Sequence Alignment Program version 1.6, Marzo 1996 (Des Higgins; E-mail: Higgins@EBI.ac.uk. Toby Gibson; E-mail: Gibson@EMBL-Heidelberg.DE).

Los programas utilizados por vía Internet en un servidor remoto fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); *BLAST Network Service* (Blaster) y *Retrieve* [National Center for Biotechnology Information (NCBI)], *GENEBANK* (ICEGEB, Trieste, Italia).

2.2 Estrategia general experimental

El trabajo experimental consistió de las siguientes etapas:

- a) Construcción del vector pPIC9KhGH22K. Se partió de la construcción pPIC9hGH22K y mediante el corte con las enzimas de restricción *Sac I* y *Not I* se recuperó el fragmento que contiene el ADNc de HGH, el cual posteriormente se transfirió al vector pPIC9K digerido con las mismas enzimas, y se verificó su identidad mediante patrones de restricción.
- b) Transformación de la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. Se empleó el vector construido pPIC9KhGH22K linearizado con la enzima *Sac I* para permitir la recombinación homóloga con la región 5'AOX 1 del genoma de la levadura.
- c) Selección de cepas multicopias. Se seleccionaron las transformantes His⁺ y después de verificar la integración del cassette de expresión mediante PCR, se efectuó el tamizaje con el antibiótico Geneticina o G418 para la selección de posibles multicopias. Se analizaron por PCR semicuantitativo las intensidades de las bandas de 2200 y 1060 pb en las cepas que crecieron a concentraciones mayores de G418.
- d) Fermentación. Se seleccionaron tres cepas para efectuar los ensayos de fermentación y el análisis de proteínas por Bradford y SDS-PAGE, para seleccionar la cepa sobreproductora.
- e) Purificación. Se evaluaron estrategias de purificación de la HGHr mediante precipitación con sulfato de amonio y Cromatografía de Intercambio Aniónico.

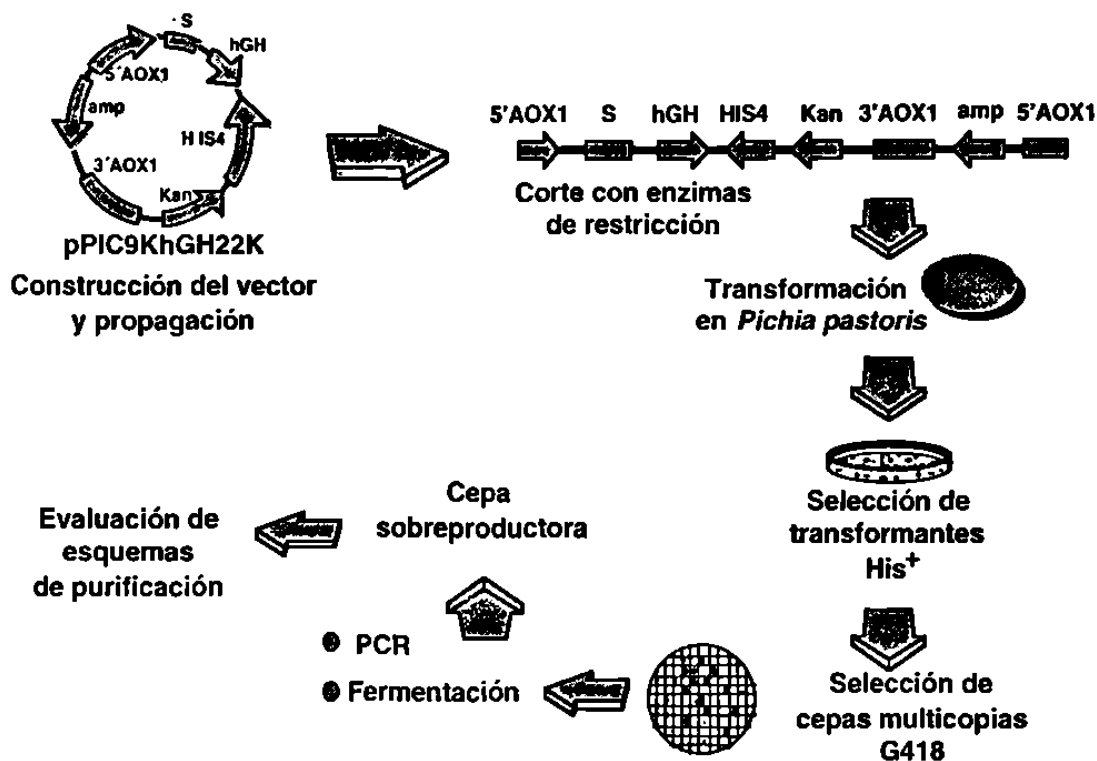


Figura 4. Representación de la estrategia general planteada para cumplir con los objetivos del presente trabajo. Incluye construcción del vector pPIC9KhGH22K, preparación y posterior transformación en *Pichia pastoris*, selección de posibles cepas multicopia, ensayos de PCR y fermentación, selección de cepa sobreproductora y finalmente evaluación de esquemas de purificación.

2.3. Métodos

2.3.1 Construcción del vector pPIC9KhGH22K

2.3.1.1 Propagación y caracterización de los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K

Se efectuaron transformaciones de los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K en bacterias calcio-competentes *Escherichia coli* XL1-Blue, de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y cols. (74), que se describe a continuación. A 100 μ L de bacterias calcio-competentes *Escherichia coli* XL1-Blue se añadieron 10 ng de plásmido y se incubó en hielo por 30 min. Se dió un choque térmico a 37°C por 1 min, se incubó en hielo por 2 min y se añadieron 900 μ L de medio LB. Finalmente se incubó 1 h a 37°C con agitación constante (250 r.p.m.) antes de distribuir en cajas LB-agar con ampicilina (100 μ g/mL) y tetraciclina (5 μ g/mL). Se incubaron a 37°C por 12 a 16 h hasta observar colonias.

Se seleccionaron al azar colonias y se extrajo el ADN con la técnica de minipreparación por lisis alcalina en miniescala (75). Cada colonia se inoculó en 3 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y tetraciclina (5 μ g/mL) y se incubó a 37°C y con agitación (250 r.p.m.) de 12 a 16 h. El contenido de cada tubo se colectó en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL mediante centrifugaciones sucesivas a 14000 r.p.m. por 2 min, en una microcentrifuga Eppendorf modelo 5415. La pastilla se resuspendió en 200 μ L de la solución I y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente se añadieron 400 μ L de solución II, se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min en hielo. Se agregaron 300 μ L de solución III, se mezcló suavemente por inversión y se incubó 20 min en hielo. Se centrifugó 9 min a 14000 r.p.m. y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un tubo eppendorf de 2 mL estéril. A éste se le añadieron 650 μ L de isopropanol y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 15 min a 14000 r.p.m. y la pastilla se lavó 2 veces con etanol al 70 %. Se efectuó un lavado final con etanol al 100 % y se secó la pastilla de ADN en un concentrador marca Labonco Corporation modelo 78100-00 .

El ADN se resuspendió en TE (10 mM Tris-HCl, pH 8) con RNasa 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para verificar la integridad del ADN, se resolvió en geles de agarosa al 0.6 % en una cámara de electroforesis horizontal a 90 V hasta aproximadamente 3/4 del gel. Las bandas se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio en un transiluminador y en el sistema Gel Doc de Bio Rad.

Para verificar la identidad de los plásmidos se efectuaron cortes con las enzimas de restricción *Bgl II*, *Sac I* y *Not I*. Para *Bgl II* se realizó lo siguiente:

Reactivo	μL
Amortiguador Gibco BRL 3 10 X	1.0
Agua	6.75
<i>Bgl II</i> (10 U/ μL)	0.25
ADN (500 ng/ μL)	2.0

Se incubó a 37°C por 2 h. Para las enzimas de restricción *Sac I* y *Not I* se realizó lo siguiente:

Reactivo	μL
Amortiguador NEB 4 10 X	1
Agua	6.25
<i>Sac I</i> (20 U/ μL)	0.25
ADN (500 ng/ μL)	2.0

Se incubó 2 h a 37°C, se añadió 0.5 μL de *Not I* (10 u/ μL) y se incubó 2 h más.

2.3.1.2 Cortes preparativos de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K

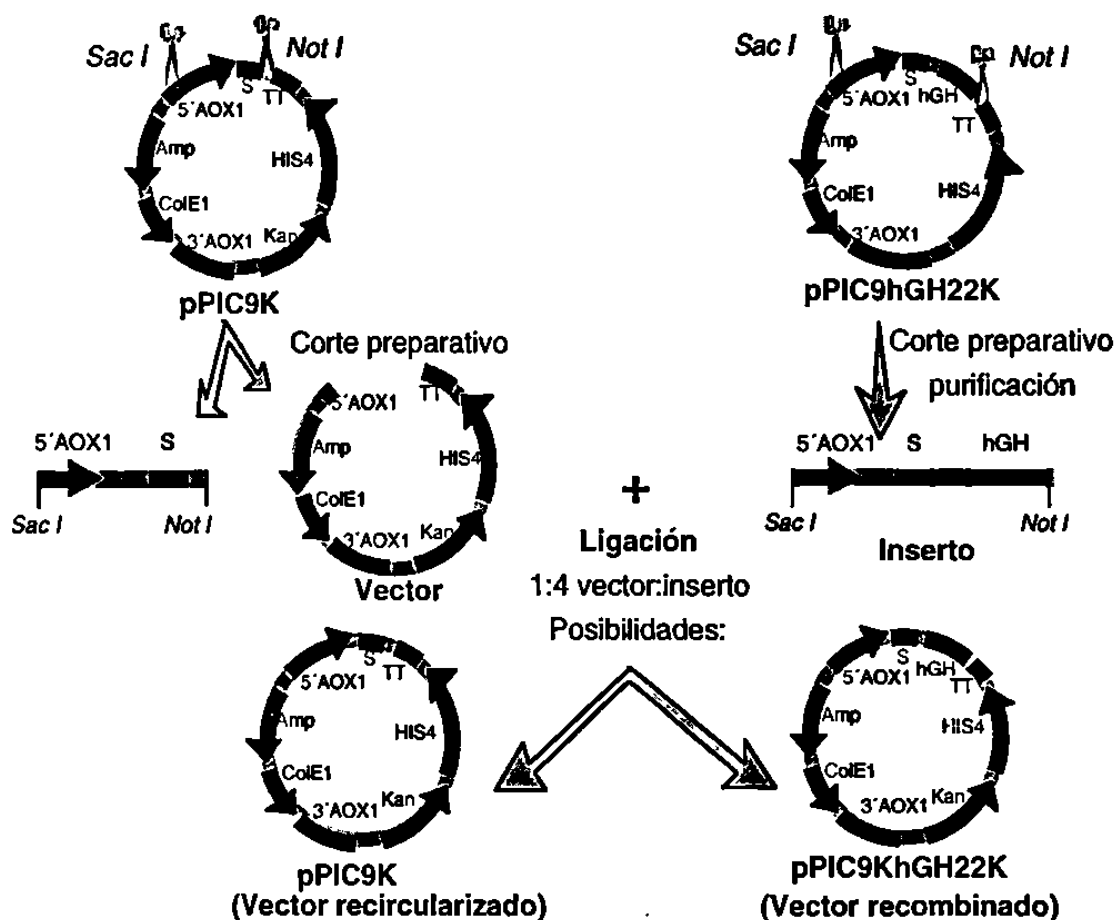


Figura 5. Estrategia efectuada para la construcción del vector pPIC9KhGH22K. Se representan los cortes efectuados con las enzimas *SacI* y *NotI* para liberar del vector pPIC9hGH22K al fragmento de 1597 pb que contiene el ADNc de HGH, así como para preparar el vector pPIC9K para la ligación posterior. Se muestran además los posibles resultados de la reacción de ligación.

Para liberar del vector pPIC9hGH22K el fragmento de 1597 pb que contiene el ADNc de HGH, así como preparar el vector pPIC9K para la ligación posterior, se efectuaron digestiones analíticas para encontrar las condiciones óptimas de corte con las enzimas *SacI* y *NotI*. Este corte libera parte de la región 5' AOX1, la secuencia señal y el ADNc de HGH (hasta el sitio de policlonación). Una vez establecidas, las digestiones preparativas se realizaron de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	pPIC9K	pPIC9hGH22K
Amortiguador NEB 4 10X	10 μ L	10 μ L
Agua	73.75 μ L	48.75 μ L
ADN	10 μ L (5 μ g) 65°C 20 min	30 μ L (15 μ g) 65°C 20 min
<i>Sac I</i>	0.7 μ L 4 h + 0.55 μ L toda la noche	1.9 μ L 4 h + 1.85 μ L toda la noche.
<i>Not I</i>	2.5 μ L 4 h + 2.5 μ L toda la noche	3.8 μ L 4 h + 3.7 μ L toda la noche

Los cortes fueron analizados en geles de agarosa al 0.6 %.

2.3.1.3 Purificación del fragmento de 1567 pb

El fragmento de 1597 pb que contiene el ADNc de HGH (9.5 μ g de la digestión de pPIC9hGH22K) se purificó en un gel preparativo de agarosa al 1 %. La banda de 1597 se recuperó del gel cortando con un bisturí. El fragmento se recuperó de la agarosa mediante la técnica de electroelución (Schleider and Schuell). Se colocó el fragmento en una cámara con amortiguador TE estéril, se sometió a 100 V por 2 h y se recuperó el amortiguador del compartimiento. Se precipitó con etanol al 70 % a -70°C por 2 h. Se centrifugó 15 min a 14000 r.p.m. a 4°C. Se efectuaron dos lavados con etanol al 70% y se verificó la recuperación en un gel de agarosa al 1 %.

2.3.1.4 Reacción de ligación

Se realizó la ligación del ADNc de HGH en el vector pPIC9K, para lo cual se empleó una proporción 1:4 vector:inserto purificado. La mezcla de ligación fue la siguiente:

Amortiguador 5X	4 μ L
Vector cortado sin purificar	6.0 μ L (300 ng)
Inserto purificado	3.9 μ L (290 ng)
Agua	4.1 μ L
Ligasa (1 u/ μ l, Gibco-BRL)	2.0 μ L

El volumen final de la reacción fue 20 μL . La ligación se llevó a cabo a 16°C por 16 h. El resultado de la ligación se verificó en un gel de agarosa al 1 %.

2.3.1.5 Transformación de bacterias calcio-competentes con la reacción de ligación, obtención del ADN y caracterización.

La transformación se efectuó en bacterias calcio-competentes *Escherichia coli* XL1-Blue, de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y cols. (74). En un tubo se colocaron 5.5 μL del producto de la ligación (equivalente a 75 ng del vector) y se llevó a 10 μL con TE pH 8, y se utilizaron los siguientes controles: vector digerido (75 ng), testigo negativo (amortiguador TE pH 8) y testigo positivo (1 ng pUC19), y se incubaron en hielo por 15 min. Se transfirieron 100 μL de las bacterias calcio-competentes a cada tubo y se incubaron en hielo por 30 min, 1 min a 37°C, y nuevamente en hielo por 2 min. Se añadieron 900 μL de medio LB y se incubó una hora a 37°C a 250 r.p.m. El volumen de la reacción de la transformación se repartió en 4 placas LB-agar con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y tetraciclina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se incubó a 37°C por 16 h.

De las colonias obtenidas se levantaron 36 al azar y se extrajo el ADN con la técnica de minipreparación por lisis alcalina en miniescala (75). Los ADNs fueron caracterizados con la enzima *Bgl II*, se seleccionó el ADN de una clona el cual fue caracterizado más exhaustivamente con las enzimas de restricción *Sac I-Not I*, *Pst I*, *Pvu II*. Estas enzimas permitieron distinguir fácilmente al comparar el patrón de restricción de pPIC9KhGH22K contra pPIC9K y pPIC9hGH22K.

2.3.2 Construcción de la cepa recombinante de *Pichia pastoris*

2.3.2.1 Preparación del plásmido pPIC9KhGH22K para la transformación en *Pichia pastoris*

Para efectuar la transformación de *Pichia pastoris*, se linearizó el vector construido pPIC9KhGH22K. Adicionalmente, se linearizó pPIC9K como control.

Se efectuaron las digestiones preparativas de la siguiente manera:

	pPIC9K	pPIC9KhGH22K
Amortiguador NEB 1 10X	10 μ L	10 μ L
Agua	36 μ L	36 μ L
ADN	50 μ L (25 μ g)	50 μ L (25 μ g)
65°C 20 min		
Sac I 20 u/ μ L	4 μ L	4 μ L
Vol. Final	100 μ L	100 μ L

Se incubó a 37°C por 16 h. El corte se corroboró en gel de agarosa al 1 %.

2.3.2.2 Transformación de *Pichia pastoris* mediante la técnica de esferoplastos

Se efectuó de acuerdo a lo descrito por Invitrogen (64). Se empleó la mitad de un cultivo fresco de *Pichia pastoris* GS115 para efectuar una cinética con el fin de obtener el tiempo óptimo para la formación de un 70 % de esferoplastos. Posteriormente se procedió a la preparación de esferoplastos para la transformación con la otra mitad del cultivo fresco.

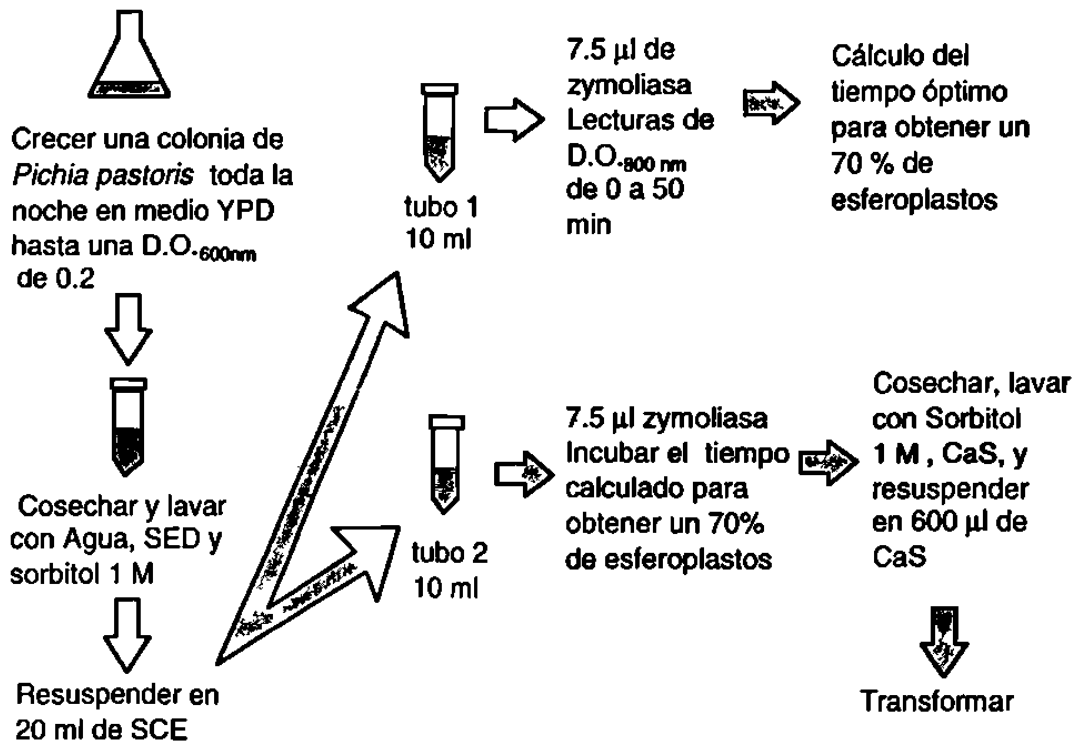


Figura 6. Proceso seguido para obtener un 70 % de formación de esferoplastos, empleando la cepa GS115 de *Pichia pastoris*.

a) Cinética de esferoplastos

Se sembró por estría la cepa GS115 *Pichia pastoris* en placa YPD y se incubó la placa a 30°C por 2 días. En un tubo cónico de 50 mL conteniendo 10 mL de YPD, se inoculó una colonia de GS115 de la placa YPD y se creció toda la noche a 28-30°C y 250 r.p.m. Se colocaron 200 mL de YPD en tres matraces de 500 mL, se inocularon con 5, 10, y 20 µL de células del cultivo anterior y se incubaron toda la noche a 30°C y 250 r.p.m., se cosecharon las células del cultivo con D.O._{600nm} entre 0.2 y 0.3 por centrifugación a temperatura ambiente por 5-10 min a 1500 X g, en una centrífuga Beckman TJ-6. Estas células se usaron para la formación de esferoplastos. Se lavaron las células por resuspensión de la pastilla en 20 mL de agua estéril y se transfirieron a un tubo cónico estéril de 50 mL. Las células se empastillaron por centrifugación a 1500 X g por 5 min a temperatura ambiente. Se efectuaron 2 lavados más de la pastilla, con 20 mL de SED y sorbitol 1 M. Finalmente se resuspendieron en 20 mL de amortiguador SCE y se dividió la suspensión en dos tubos cónicos de 50 mL (~10 mL cada uno): el tubo 1 se

utilizó para efectuar la cinética de esferoplastos, y el tubo 2 se dejó en hielo para la transformación con el ADN.

Para la cinética se realizó lo siguiente:

Se ajustó el espectrofotómetro UV/Vis DU50 Beckman a 800 nm con el blanco que consistió de 800 μ L de SDS 5 % y 200 μ L de SCE. Se prepararon 17 tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Se rotularon como 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 y se añadieron 800 μ L de SDS al 5 % a cada tubo.

Del tubo cónico de células marcado como 1 se tomaron 200 μ L de la suspensión y se colocaron en el tubo de microcentrifuga marcado "0", siendo éste el tiempo cero y se dejó el tubo en hielo.

Se añadieron 7.5 μ L de zymoliasa al mismo tubo cónico de células marcado como 1, se mezcló por inversión y se incubó 30°C. Se monitoreó la formación de esferoplastos tomando 200 μ L a los tiempos 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50 min a partir de que se añadió la zymoliasa, colocando las alícuotas en hielo. Se leyó la D.O.800nm para cada tubo.

El porcentaje de esferoplastos para cada punto del tiempo se determinó usando la ecuación:

$$\% \text{ de esferoplastos} = 100 - [(D.O.800nm \text{ al tiempo } t / D.O.800nm \text{ al tiempo } 0) \times 100]$$

Se determinó así el tiempo de incubación mínimo necesario para obtener el 70 % de esferoplastos.

b) Transformación

Al tubo cónico de células marcado como 2 que se dejó aparte en hielo, se añadieron 7.5 μ L de zymoliasa y se incubó a 30°C el tiempo calculado para obtener el 70 % de esferoplastos. Se cosecharon los esferoplastos por centrifugación a 750 X g por 10 min a temperatura ambiente. Se lavaron con 10 mL de sorbitol 1 M (sin usar vórtex). Los esferoplastos se colectaron por centrifugación a 750 X g por 10 min a temperatura ambiente, y se lavaron con 10 mL de CaS. Finalmente se resuspendieron en 0.6 mL de CaS. Se usaron inmediatamente para la transformación debido a que no se pueden almacenar.

Se empleó para transformar el vector pPIC9KhGH22K digerido con *Sac I*, así como pPIC9K digerido con *Sac I* y además amortiguador TE, estos dos

como controles. Se colocaron 100 μL de esferoplastos en un tubo de microcentrífuga estéril de 2 mL. Se añadieron 10 μg de ADN linearizado o TE y se incubó el tubo a temperatura ambiente por 10 min. Se añadió 1.0 mL de solución fresca de PEG/CaT a las células y ADN, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se centrifugó el tubo a 750 X g por 10 min a temperatura ambiente y se extrajo el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla de células transformadas en 150 μL de medio SOS y se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente se añadió 850 μL de sorbitol 1 M. se mezclaron 200 μL de cada transformación de esferoplastos-ADN con 10 mL de agarosa-RDB fundida y se vertió en las placas RDB. cada transformación rindió para 5 placas. Una vez que la agarosa se gelificó, se invirtieron las placas y se incubaron a 30°C por 6 días.

Se comprobó la viabilidad de las células, para lo cual se mezclaron 100 μL de esferoplastos con 900 μL de sorbitol 1 M y 100 μL de esta dilución se mezclaron a su vez con 10 mL de agarosa fundida RDBH y se vertió en una placa RDBH, para demostrar que los esferoplastos pueden ser regenerados a células.

2.3.2.3 Verificación de la integración por PCR

La verificación genotípica de algunas cepas se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Figura 7). Se utilizaron extractos crudos de algunas de las cepas obtenidas por el tratamiento con liticasa (76). Se tomó un trozo de la colonia al tamaño de la cabeza de un alfiler con una puntilla estéril, y se resuspendió en 10 μL de agua contenidos en un tubo de microcentrífuga de 500 μL . Se añadió 5 μL de liticasa (5 $\mu/\mu\text{L}$) y se incubó 10 min a 30°C. Posteriormente se sumergieron los tubos en nitrógeno líquido por un min. De este extracto crudo se tomaron directamente 5 μL para llevar a cabo el PCR.

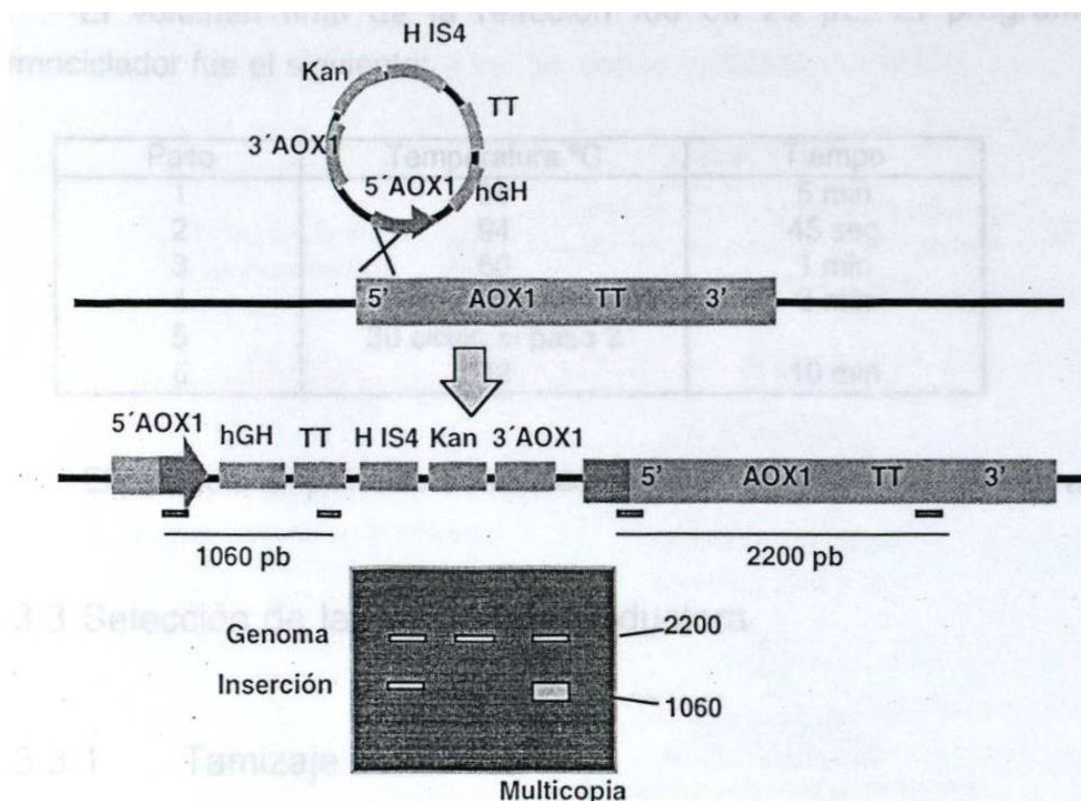


Figura 7. Verificación de genotipos de las transformantes de *Pichia pastoris* mediante PCR. Se muestra la integración del cassette de expresión, el sitio donde se aparean los iniciadores y los productos de PCR que se generan.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa se realizó empleando los iniciadores recomendados por Invitrogen (64), siguiendo las siguientes especificaciones:

Reactivo	μL	Conc. final
Amortiguador (10 X)	2.5	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	200 μM
Primer 5' (5 μM)	2.5	0.5 μM
Primer 3' (5 μM)	2.5	0.5 μM
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.5 mM
Agua	10.0	*
Taq (5 U/ μL , Perkin-Elmer)	0.5	2.5 U
Extracto crudo	5.0	*

El volumen final de la reacción fue de 25 μ L. El programa del termociclador fue el siguiente:

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	94	5 min
2	94	45 seg
3	60	1 min
4	72	2 min
5	30 ciclos al paso 2	
6	72	10 min

El producto amplificado se verificó con 5 μ l en un gel de agarosa al 1 %.

2.3.3 Selección de la cepa sobreproductora

2.3.3.1 Tamizaje con G418

Para seleccionar las posibles cepas multicopias, se efectuó el tamizaje a concentraciones crecientes de G418, debido a que a mayor número de copias del cassette de expresión integrado, la levadura es capaz de crecer a concentraciones mayores de G418..

Se añadieron 200 μ L de YPD a cada pozo de una placa de microtitulación y se inoculó cada pozo con cada una de las transformantes de pPIC9KhGH22K His⁺ obtenidas mediante la técnica de esferoplastos, así como los siguientes controles: una cepa transformada con pPIC9K, una cepa transformada con pPIC9hGH22K sin resistencia a G418, y GS115 sin transformar, usando palillos de dientes estériles y agitando para resuspender las células. Se incubó a 30°C por dos días. Después en un segundo juego de placas se añadió 190 μ L de YPD a cada pozo y se inoculó con 10 μ L del primer juego de placas. Se incubó el segundo juego de placas a 30°C por toda la noche. Al siguiente día, se repitió el pase en un tercer juego de placas. Después de la incubación toda la noche, se resuspendieron las células en cada pozo por pipeteo, se tomaron 3 μ L de cada pozo y se colocaron en placas de YPD conteniendo G418 a concentraciones finales de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/mL en un patrón regular usando una plantilla numerada.

Se dejó secar el líquido y se incubaron las placas a 30°C. Se revisaron después de 2, 3, 4, y 5 días para ver las cepas resistentes a G418.

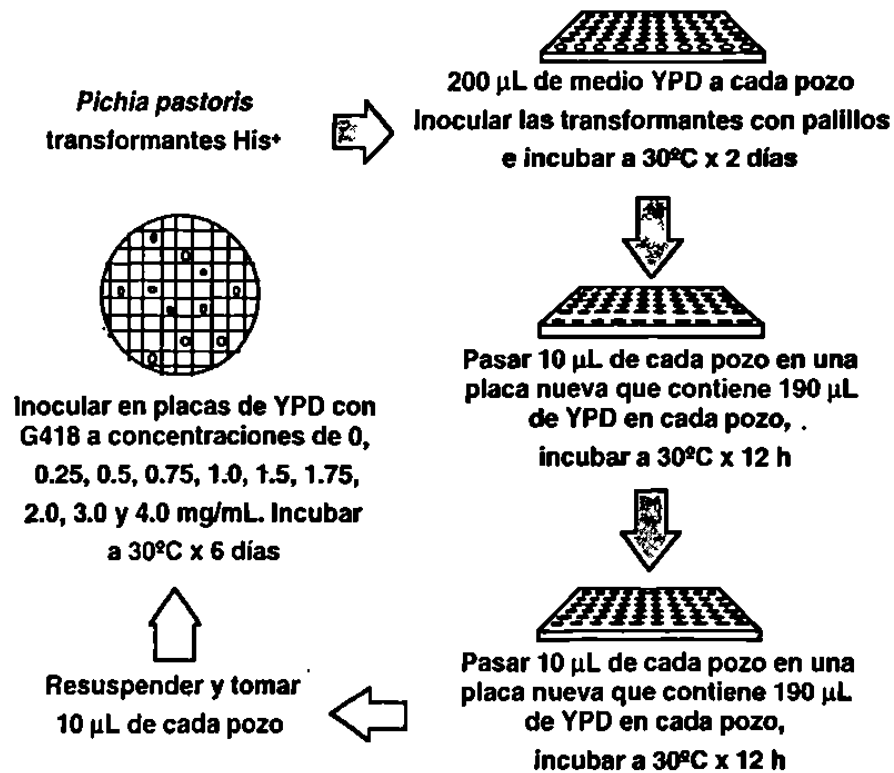


Figura 8. Tamizaje con G418 de la cepas de *Pichia pastoris* obtenidas. Consiste en una primera etapa de homogenización de las densidades celulares, para posteriormente inocular en placas con concentraciones crecientes del antibiótico G418.

2.3.3.2 Estimación semicuantitativa del número de copias por PCR

Después de incubar por 5 días, se revisaron las placas y se seleccionaron las colonias que crecieron a una concentración ≥ 0.75 mg/mL de G418. Se efectuaron ensayos de PCR en condiciones tales que permitieran evaluar las intensidades relativas de las bandas de 2200 y 1060 pb, que podrían sugerir más de una copia del gen de hGH, comparadas con la cepa construida anteriormente (GS115hGH22K-unicopia).

El ADN se extrajo mediante la técnica de TSNT (33). Se inoculó una colonia en 4 mL de YPD y se creció a 30°C y 250 r.p.m. por 24-48 h. Se cosechó en un tubo de microcentrifuga de 2 mL a 14000 r.p.m. 1 min y se lavó

la pastilla con 500 μL de agua milli-Q. Se añadieron 300 μL de amortiguador TSNT (Tritón X-100 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8) y se mezcló, se añadió posteriormente 650 μL de fenol saturado y se agitó por 5 min. Se agregó 150 μL de Sevag y nuevamente se agitó en vórtex por 30 min. Se agregó 300 μL de amortiguador TE pH 8 y se agitó 10 seg. Se centrifugó 5 min a 14,000 r.p.m. y la fase acuosa se transfirió a un tubo de 2 mL. El ADN se precipitó con 1.3 mL de etanol absoluto. Se efectuaron 2 lavados con 1 mL de etanol al 70 %, la pastilla se secó en un evaporador centrífugo al vacío y finalmente se resuspendió en 500 μL de TE pH 8.

Se verificó la integridad del ADN en geles de agarosa al 0.6 % y la calidad por la relación espectrofotométrica 260/280. La cantidad aproximada se determinó por la fórmula $\text{Abs} \times \text{Dilución} \times 50 = \mu\text{g/mL}$ de ADN, y se comparó en el sistema Gel Doc contra un ADN estándar.

Las condiciones experimentales del PCR semicuantitativo (78) se describen a continuación. La primera parte de la mezcla de reacción para el PCR consistió en lo siguiente:

Reactivo	μL	Conc. final
DMSO	1.25	5 %
Amortiguador 10 X	2	1X
dNTP's 10 mM	0.5	200 μM
Primer 5' 5 μM	2.5	0.5 μM
Primer 3' 5 μM	2.5	0.5 μM
MgCl ₂ 25 mM	1.5	1.5 mM
Agua	8.75	*

Se añadió 50 ng de ADN y se calentó a 94°C por 5 min. Posteriormente se añadió la segunda parte de la mezcla de reacción:

Reactivo	μL	Conc. final
Taq 5 u/ μL (Perkin Elmer)	0.2	0.04 u/ μL
Agua	4.3	*
Amortiguador 10X	3.5	1X

El volumen final de la reacción fue de 25 μ L. El programa del termociclador se muestra a continuación:

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1	94	5 min
2	94	45 seg
3	60	1 min
4	72	2 min
5	18 ciclos al paso 2	
6	72	10 min

El producto amplificado se verificó en un gel de agarosa al 0.8 %. Se efectuó el análisis de las intensidades relativas de las bandas de 2200 y 1060 pb empleando el sistema Gel Doc de Bio Rad como a continuación se describe.

Para el análisis de la intensidad de cada banda en particular, se recurre a "Volume Analysis" (Figura 9). Esta herramienta se empleó en geles de SDS-PAGE y agarosa. Con "Volume Tools" se selecciona la forma de un rectángulo y se dibuja encima de cada banda. Si se desea comparar entre bandas del mismo carril o de carriles distintos, es conveniente encontrar la banda de mayores dimensiones para dibujar el rectángulo, y a partir de él copiarlo en el resto de las bandas, para eliminar el error debido a diferencias en las dimensiones.

Se marcan todas las bandas, y una zona sin bandas como blanco. Los resultados se obtienen en "Analysis volume object list". El valor numérico de Adjust volume en Cuentas X mm^2 equivale a la intensidad de la banda.

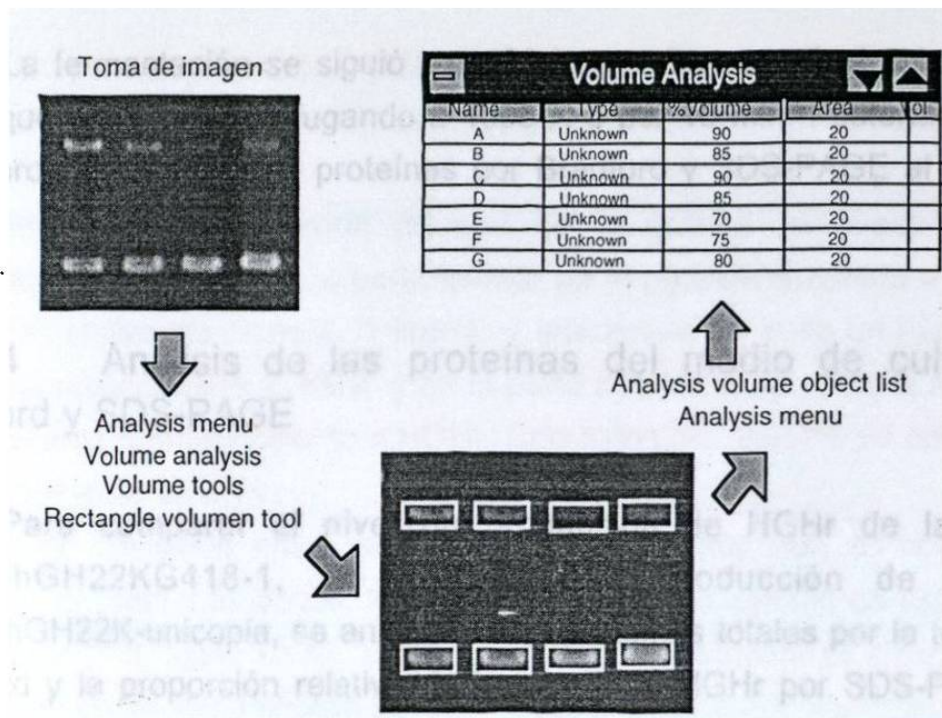


Figura 9. Secuencia de pasos requeridos para el análisis de los geles en el sistema Gel Doc de Bio Rad. Mediante esta secuencia de pasos se obtiene la intensidad de cada banda en Cuentas X mm².

2.3.3.3 Ensayos de fermentación

Se seleccionaron 3 cepas de *Pichia pastoris* denominadas GS115hGH22KG418, que crecieron a las mayores concentraciones de G418, y con ellas se efectuaron fermentaciones por triplicado, con el fin de verificar la producción de HGhr y seleccionar una cepa sobreproductora.

A partir de un stock en glicerol al 15 %, se estriaron placas de agar YPD de las 3 cepas, así como de la cepa unicopia, y se incubaron por 3 días a 30°C. Posteriormente, se inoculó una colonia y se resuspendió en 25 mL de medio BMG. Se incubó a 30°C y 250 r.p.m. hasta alcanzar una D.O.600nm de 4. Se efectuó una dilución en medio BMG fresco a una D.O.600nm final de 0.5. Se incubó a 30°C y 250 r.p.m. hasta alcanzar una D.O.600nm de 1.4. Finalmente, se obtuvo el paquete celular de cada matraz centrifugando a 4000 X g por 10 min y el paquete se resuspendió en 25 mL de medio BMM con una concentración de metanol de 0.75 %. La inducción se llevó a cabo a 30°C y 250 r.p.m., se añadió metanol cada 24 h para compensar la pérdida por evaporación. Se siguió el crecimiento registrando la D.O.600nm.

La fermentación se siguió por 120 horas. Se separó el sobrenadante del paquete celular centrifugando a 4000 X g por 10 min. Posteriormente se efectuaron los análisis de proteínas por Bradford y SDS-PAGE al medio de cultivo.

2.3.3.4 Análisis de las proteínas del medio de cultivo por Bradford y SDS-PAGE

Para comparar el nivel de producción de HGhr de las cepas GS115hGH22KG418-1, 19 y 76 con la producción de la cepa GS115hGH22K-unicopia, se analizaron las proteínas totales por la técnica de Bradford y la proporción relativa de la banda de HGhr por SDS-PAGE. Se dializaron 10 mL de cada medio de cultivo contra 4 L de agua milli-Q a 4°C y con agitación, efectuando 2 cambios de agua más cada 2 h.

Para la técnica de Bradford, se tomaron 600 µL del medio dializado y se mezclaron con 2.4 mL del reactivo de Coomassie. Se incubó por 3 min a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm. Se realizó una curva de calibración empleando albúmina sérica bovina (Sigma) como estándar.

Se llevaron a sequedad 200 µL de medio de cultivo dializado en un evaporador centrifugo al vacío por 4 h. El residuo se resuspendió en 20 µL de amortiguador de muestra 1X, se aplicaron en un gel de acrilamida al 12 % y se corrió utilizando una cámara de electroforesis Mini Protean II Cell Bio Rad a 80 V hasta que las muestras entraron al gel separador, y posteriormente a 120 V hasta que se salió el frente del colorante. El gel se tiñó con Coomassie sumergiendo 20 min en solución fijadora, 20 min en solución de Coomassie y el tiempo y los cambios necesarios en solución decolorante hasta eliminar el exceso de colorante. Todo el tiempo se mantuvo en agitación a 60 r.p.m. en una plataforma agitadora Orbital Shaker Lab line Mod 3520. El gel se analizó en el sistema Gel Doc de Bio Rad de la siguiente manera:

En la figura 10 se muestra como se obtiene el % de HGh respecto al resto de las proteínas presentes. Después de tomar la imagen del gel SDS-PAGE en el Sistema Gel Doc de Bio Rad, se procede a efectuar el análisis del perfil de bandas de cada carril. Mediante la herramienta de Profile analysis denominada "Averaging Rectangle Tool" se dibuja un rectángulo cuyas dimensiones sean las de un carril a analizar. Posteriormente en "Analyze

Profile" proporciona el reporte gráfico donde cada pico representa una banda, cuya área y altura son directamente proporcionales a la intensidad de cada banda.

Efectuando un barrido manual de la gráfica utilizando el modo "integrative-interactive", en la parte inferior de la pantalla presenta el valor del área total. Utilizando el modo "Integrative-Interactive" se hace un barrido de la banda correspondiente a HGhr, y en la parte inferior de la pantalla muestra el valor del área correspondiente a HGhr. Con éstos dos valores se calcula el % correspondiente a HGhr.

Para comparar entre los carriles de un mismo gel, es conveniente identificar el carril más ancho, formar el rectángulo al tamaño de este carril, y copiar este rectángulo en los demás carriles para eliminar el error debido a diferencias en las dimensiones de los carriles.

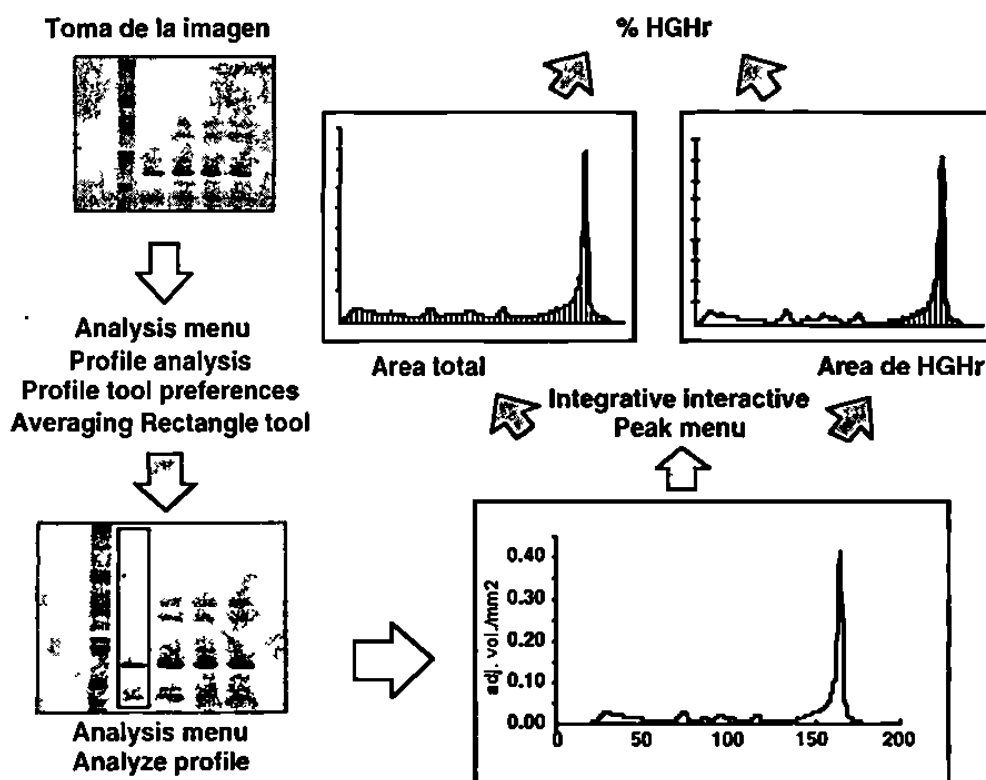


Figura 10. Secuencia que se sigue para el análisis de los gels en el sistema Gel Doc de Bio Rad. Mediante esta secuencia de pasos se obtiene la pureza de la banda correspondiente a HGhr, al calcular su porcentaje respecto al perfil del resto de las proteínas presentes en el carril que se analiza.

2.4 Sistemas de purificación

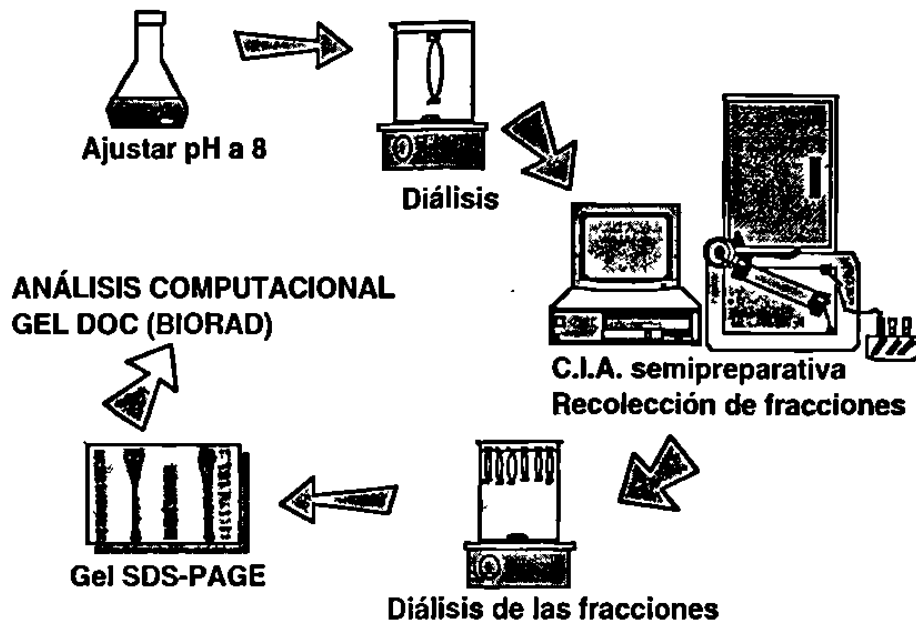


Figura 11. Esquema general de la purificación de HGHR. Partiendo de un medio de cultivo ajustado a pH 8 y dializado, se efectuaron distintos ensayos cromatográficos de intercambio iónico, durante los cuales se recolectaron fracciones que se analizaron por SDS-PAGE.

Una vez seleccionada la cepa sobreproductora de acuerdo al nivel de producción de HGHR, se procedió a efectuar los ensayos de purificación mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico (Figura 11).

2.4.1 Precipitación con sulfato de amonio

La precipitación con sulfato de amonio se realizó con 90 mL del medio de cultivo libre de células (pH de 2.5), ajustado a pH 5 con NH_4OH 1 N y se precipitaron con 10.2 g de sulfato de amonio que corresponde a un 20 % de saturación. El sulfato de amonio se agregó lentamente a 4°C sin dejar de agitar, el pH se mantuvo monitoreando con el potenciómetro y ajustando con NH_4OH 1 N cuando fue necesario. Al terminar de añadir el sulfato de amonio se dejó agitando 1 h.

El precipitado se recuperó por centrifugación en una centrífuga Beckman J2-MI, empleando un rotor JA-18, a 4470 X g por 30 min. El sobrenadante se transfirió a tubos cónicos y el precipitado se resuspendió y aforó a 5 mL con agua milli-Q.

Se dializaron 10 mL del sobrenadante y 2 mL del precipitado. Se tomó lo equivalente a 200 μ L del sobrenadante y 100 μ L del precipitado (teniendo en cuenta el aumento de volumen debido a la diálisis), se llevaron a sequedad en un evaporador centrífugo al vacío, se reconstituyeron en 20 μ L de amortiguador de muestra 1X y se analizaron en un gel SDS-PAGE al 12 %.

Para calcular la recuperación de HGhr en el precipitado y en el sobrenadante; así como su pureza, se consideró los volúmenes finales de cada uno, la cantidad que se colocó en el gel, así como el porcentaje de HGhr presente en el carril correspondiente. Para los cálculos se empleó la siguiente fórmula:

$$\left(\text{Vol. total ml} \times \text{cuentas D.O.} \times \text{mm}^2 \right) \times 1000 / \text{Vol al gel } \mu\text{l}$$

2.4.2 Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico se llevó a cabo en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (System Gold de Beckman), empleando una columna de intercambio aniónico Protein Pak DEAE 8HR, cat. no. PN35650, AP-1, de dimensiones 10 X 100 mm, 8 μ m, 1000 \AA (Waters, Chromatography Division Millipore). La fase móvil A consistió en Tris 25 mM, EDTA 1 mM a pH 8. La fase móvil B consistió en la fase móvil A más 1 M de NaCl. La detección se realizó a doble canal, 215 y 280 nm. El volumen de inyección fue de 1 mL y se efectuaron distintos programas de elución.

Ensayo A: Se empleó un medio obtenido de una fermentación a nivel fermentador de la cepa GS115hGH22K-unicopia, que contiene cantidades mayores de HGhr. A partir de este medio ajustado a un pH de 8 y dializado, se empleó el siguiente sistema de elución:

0.3 M de NaCl durante 7 min, 0.3-1 M en 7 min, 20 min a 1 M de NaCl, y 1-0.3 M en 7 min. El flujo permaneció constante a 1 mL/min.

Ensayo B: Se empleó el medio producido a nivel matraz con la cepa GS115hGH22KG418-sobreproductora. Se tomaron 10 mL del medio, se concentraron en un evaporador centrífugo al vacío y se ajustaron a 1 mL con la fase móvil A. El sistema de elución fue el anterior.

Ensayo C: Se empleó el medio del Ensayo B. Se tomaron 10 mL del medio, se concentraron en un evaporador centrífugo al vacío y se ajustaron a 1 mL con la fase móvil A. El sistema de elución fue el siguiente: 20 min a 0.3 M de NaCl y un flujo de 0.1 mL/min. 10 min a 0.3 M de NaCl y 0.4 mL/min, 0.3-1 M de NaCl en 30 min a 0.4 mL/min, 10 min a 1 M de NaCl y 1 mL/min, y finalmente 1-0.3 M de NaCl en 5 min y 1 mL/min.

En cada ocasión, las fracciones fueron recolectadas, dializadas contra agua y analizadas por SDS-PAGE. El % de recuperación se calculó de acuerdo al volumen recolectado y aplicado en el gel SDS-PAGE y a la intensidad de la banda de HGhr presente en cada fracción. Se consideró como un porcentaje del total de las Cuentas X mm² proporcionadas por el sistema Gel Doc de bio Rad.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Construcción del vector pPIC9KhGH22K

3.1.1 Caracterización de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K

La caracterización de los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K de los cuales se partió para la construcción de pPIC9KhGH22K, presentaron los patrones de restricción esperados para las enzimas *Sac I-Not I*, *Bgl II*, *Pst I* y *Pvu II* (TABLA 4, Figuras 14 y 15).

3.1.2 Transformación de bacterias calcio-competentes con la reacción de ligación, obtención del ADN y caracterización

De la purificación por electroelución del fragmento de 1567 pb obtenido a partir del vector pPIC9hGGH22K, el cual contiene el ADNc de HGH, se logró recuperar el 20 %. De la transformación de las bacterias *E. coli* XL1-Blue calcio-competentes con la reacción de ligación, se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA 3

RESULTADOS DE LA TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS CALCIO-COMPETENTES, ASÍ COMO EL NÚMERO DE COLONIAS OBTENIDAS EN CADA EXPERIMENTO.

Transformación	No. de colonias
Testigo positivo (pUC19, 1 ng):	912
pPIC9K linearizado (300 ng):	12
Reacción de ligación (75 ng):	1009

Debido a que se esperaba un plásmido de mayor tamaño (9843 pb), se seleccionaron 20 de las 36 colonias seleccionadas al azar, de acuerdo al corrimiento esperado de los ADN en gel de agarosa al 0.6 % (Figura 12).

Estas clonas se caracterizaron con la enzima de restricción *Bgl II*, presentando los patrones esperados (Figura 13). pPIC9K posee 2 sitios de reconocimiento para *Bgl II*, mientras que el ADNc de HGH posee un sitio extra para *Bgl II*. Como referencias se usaron los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K. Este último genera también tres fragmentos, pero el fragmento mayor es de menor tamaño que en el plásmido pPIC9KhGH22K.

La caracterización la clona *Escherichia coli* XL1-Blue No. 34 con otras enzimas de restricción presentó los patrones esperados debido a que al introducir en el vector pPIC9K el ADNc de HGH, se libera un fragmento de 1597 pb en la digestión *Sac I-Not I* en lugar de un fragmento de 1030 pb, se introduce un sitio de reconocimiento extra para las enzimas *Bgl II* y *Pst I*, y dos sitios extra para el reconocimiento de *Pvu II* (TABLA 4, Figuras 14 y 15).

TABLA 4

PATRONES DE DIGESTIÓN EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pPIC9K, pPIC9KhGH22K Y pPIC9hGH22K.

	pPIC9K	pPIC9KhGH22K	pPIC9hGH22K
Tamaño del plásmido	9276	9843	8589
Enzimas:	8246	8246	6992
<i>Sac I - Not I</i>	1030	1597	1597
<i>Bgl II</i>	6873 2403	5828 2403 1612	4574 2403 1612
<i>Pst I</i>	3653 2555 1827 1241	3855 2555 1827 1241 365	6397 1827 365
<i>Pvu II</i>	6327 2949	6130 2949 497 267	4877 2948 497 267

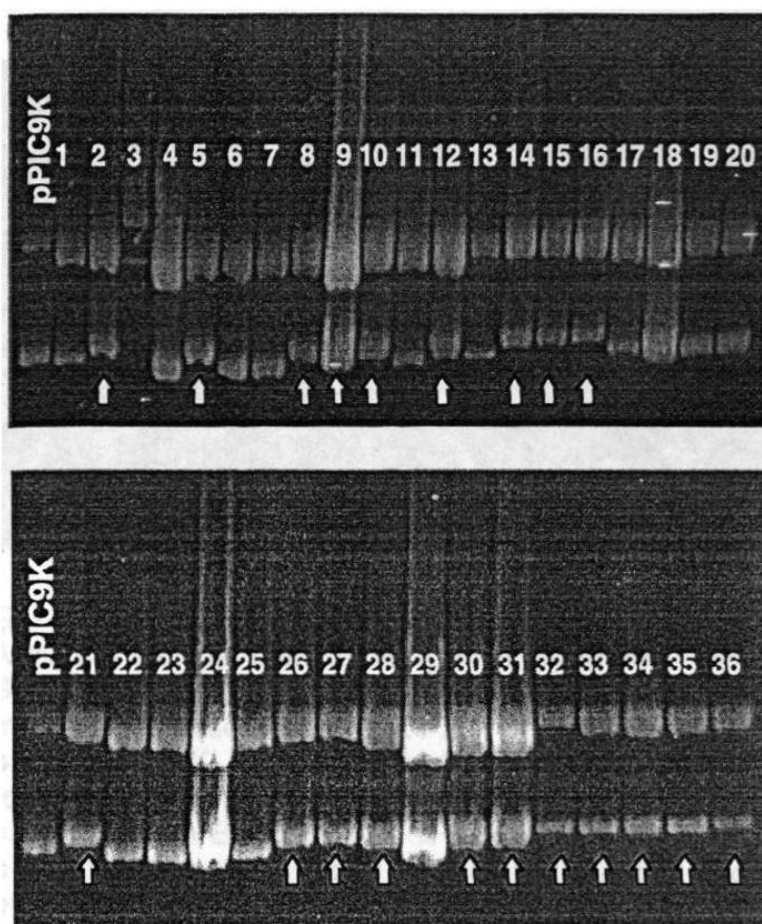


Figura 12. Gel de agarosa al 0.6 % de los ADN plasmídicos de las 36 colonias de *Escherichia coli* XL1-Blue, provenientes de la transformación con la reacción de ligación. Se marca con flechas las posibles clonas portadoras del plásmido pPIC9KhGH22K, debido a que el plásmido pPIC9KhGH22K por ser de mayor tamaño (9843 pb) debe presentar un menor desplazamiento electroforético que pPIC9K (9276 pb).

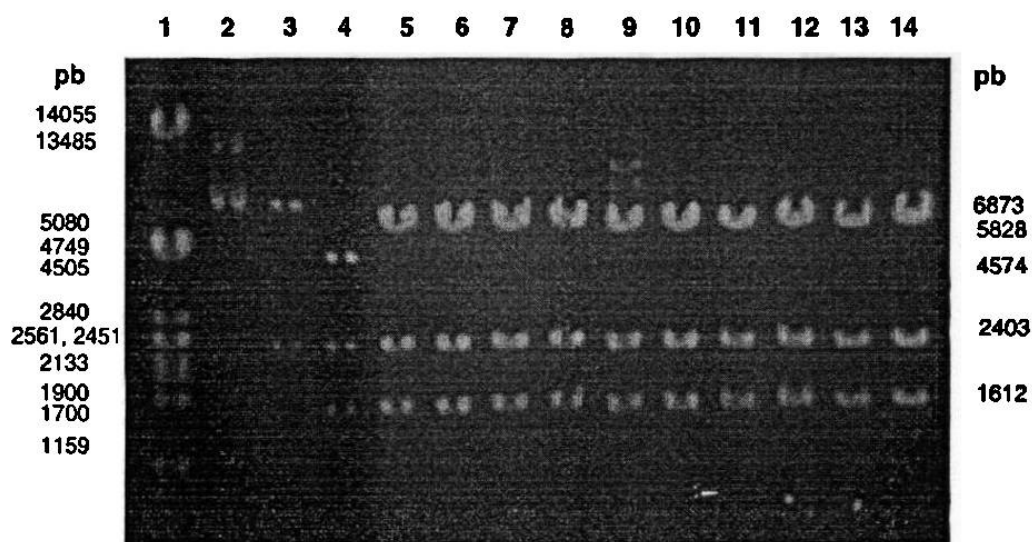


Figura 13. Gel de agarosa al 1 % de la caracterización enzimática con *Bgl II* de los ADN plasmídicos. Las clonas analizadas fueron *Escherichia coli* XL1-Blue 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36 (carriles 5 a 14). carril 1: marcador de peso molecular λ *Pst I*, carriles 2, 3 y 4: pPIC9K, pPIC9K y pPIC9hGH22K superenrollados. pPIC9K posee 2 sitios de reconocimiento para *Bgl II*, mientras que el ADNc de HGH posee un sitio extra para *Bgl II*. pPIC9hGH22K genera también tres fragmentos, pero el fragmento mayor es de menor tamaño que en el plásmido pPIC9KhGH22K.

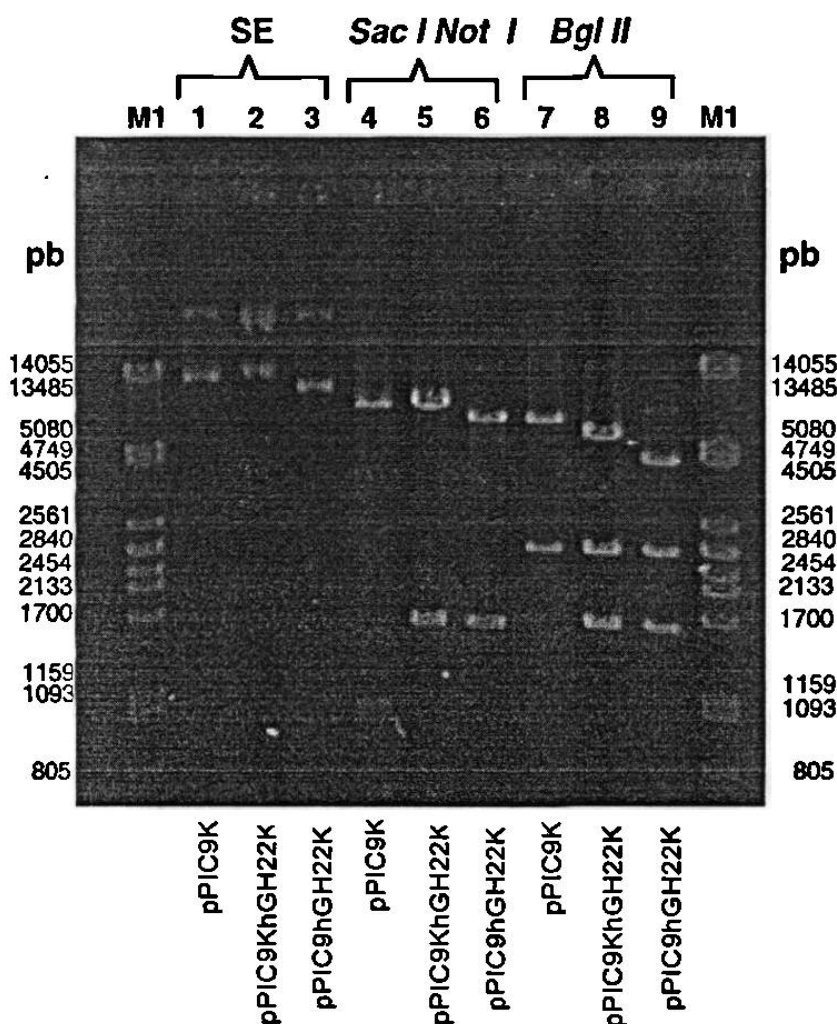


Figura 14. Gel de agarosa al 1 % de la caracterización de los plásmidos pPIC9K, pPIC9KhGH22K y pPIC9hGH22K, superenrollados (SE, carriles 1, 2 y 3) y con las enzimas de restricción *Sac I-Not I* (carriles 4, 5 y 6) y *Bgl II* (carriles 7, 8 y 9). El marcador de peso molecular (M1) es λ *Pst I*. Se observa una diferencia en los corrimientos de los ADN superenrollados debido a las diferencias en los tamaños. Al introducir en el vector pPIC9K el ADNc de hGH, se libera un fragmento de 1597 pb en la digestión *Sac I-Not I* en lugar de un fragmento de 1030 pb, además se introduce un sitio de reconocimiento extra para la enzima *Bgl II*.

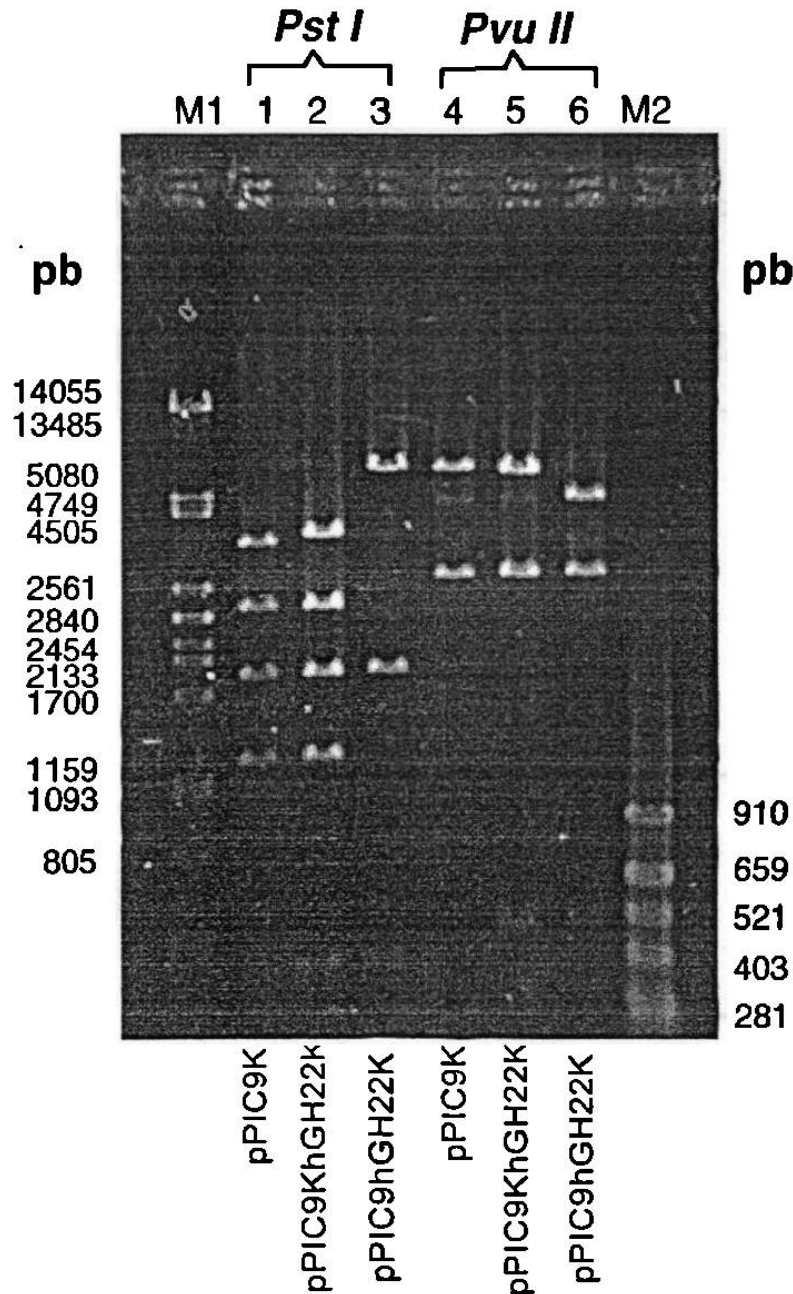


Figura 15. Gel de agarosa al 1 % de la caracterización de los plásmidos pPIC9K, pPIC9KhGH22K y pPIC9hGH22K con las enzimas de restricción *Pst* I (carriles 1, 2 y 3) y *Pvu* II (carriles 4, 5 y 6). Los marcadores de peso molecular son λ *Pst* I (M1) y pBR *Alu* I (M2). Con la incorporación del ADNc de HGH al vector pPIC9K se gana un sitio de reconocimiento extra para la enzima *Pst* I, y dos sitios extra para el reconocimiento de *Pvu* II.

3.2 Construcción de la cepa recombinante de *Pichia pastoris*

3.2.1 Transformantes de *Pichia pastoris* obtenidas mediante la técnica de esferoplastos

A partir de la cinética de formación de esferoplastos por la acción de la enzima zymoliasa, se calculó 20 min a 30°C como el tiempo óptimo de incubación para obtener un 70 % de esferoplastos de acuerdo a la gráfica mostrada en la Figura 16 y a los siguientes cálculos:

$$\begin{aligned} \text{\% de esferoplastos} &= 100 - [(DO_{800\text{nm}} \text{ al tiempo } t / DO_{800\text{nm}} \text{ al tiempo } 0) \times 100] \\ 70 &= 100 - [(0.063 / 0.215) \times 100] \end{aligned}$$

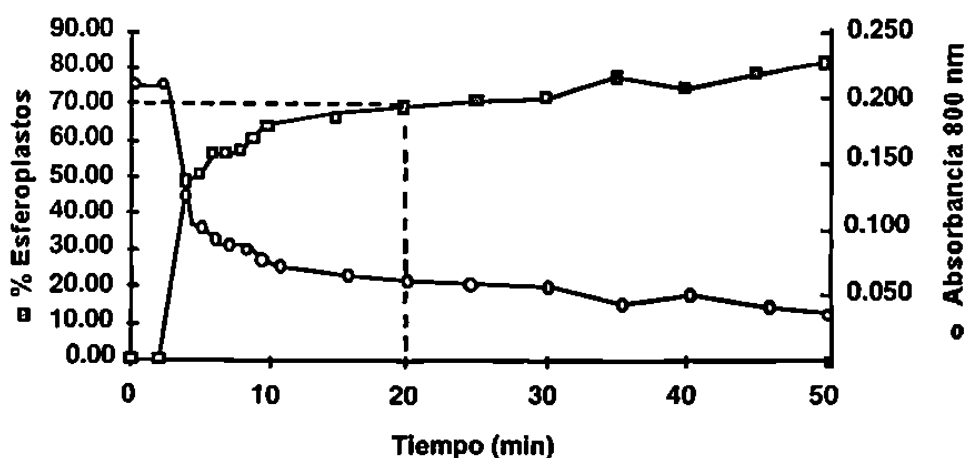


Figura 16. Gráfica de la cinética de formación de esferoplastos. Se muestra el porcentaje de esferoplastos obtenidos con el tiempo (■), y la D.O. 800nm (○). La interpolación con línea punteada muestra que a los 20 min se obtiene un 70 % de esferoplastos.

Después de 6 días de incubación en placas carentes de histidina a partir de la transformación de GS115, se obtuvieron 80 cepas de *Pichia*

pastoris His⁺ con el vector construido pPIC9KhGH22K, 110 cepas con el vector pPIC9K, y ninguna con el control con amortiguador TE. Las 80 cepas se emplearon para los análisis posteriores.

3.2.2 Verificación de la integración por PCR

La PCR de algunas cepas transformantes de *Pichia pastoris* seleccionadas al azar a partir de los extractos crudos de ADN mostraron las bandas de 2200 y 1060. La primera corresponde al gen *AOX1* del genoma de la levadura, y la segunda al cassette de expresión que contiene el ADNc de HGH. Como control se muestra el ADN de la cepa GS115hGH22K-unicopia (Figura 17).

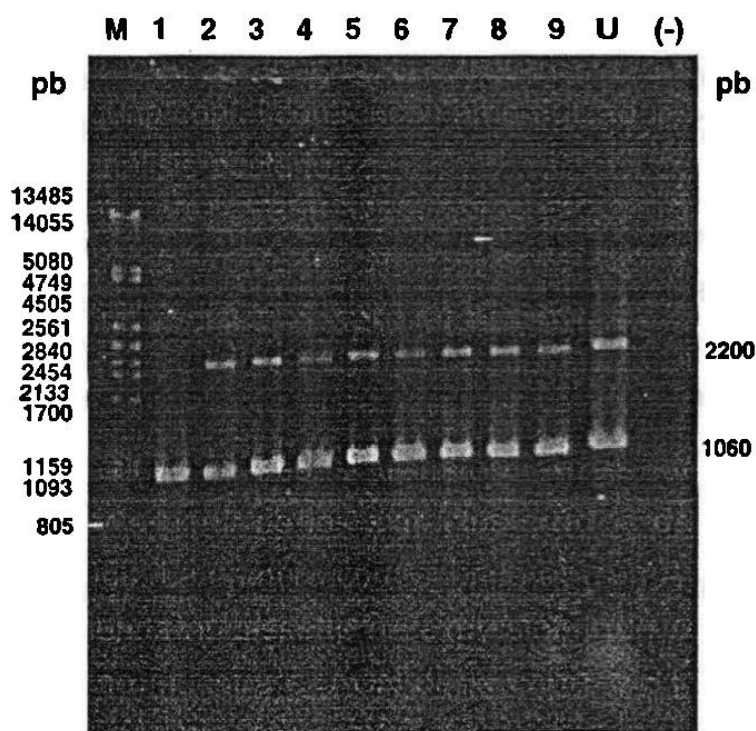


Figura 17. Gel de agarosa al 1 % para la verificación de la integración del cassette de expresión por PCR de cepas transformantes de *Pichia pastoris*. M: marcador de peso molecular λ -*pst* I. 1 al 9 cepas obtenidas por esferoplastos. U: cepa unicopia, (-) control negativo de la PCR.

3.3 Selección de la cepa sobreproductora

3.3.1 Tamizaje con G418.

Los resultados obtenidos del tamizaje fueron los siguientes:

- a) Control con 0 mg/ml de G418. Crecieron las transformantes con pPIC9K, pPIC9hGH22K y GS115 sin transformar, además de todas las cepas de pPIC9KhGH22K.
- b) 0.25 y 0.5 mg/ml de G418. Crecieron todas las cepas de pPIC9KhGH22K y la transformante con pPIC9K. No presentaron crecimiento la cepa transformada con pPIC9hGH22K ni GS115 sin transformar.
- d) Concentración ≥ 0.75 mg/ml de G418. Crecieron las cepas de pPIC9KhGH22K designadas como 1, 10, 19, 34, 66 y 76.

Se seleccionaron las cepas que crecieron a concentraciones iguales o mayores de 0.75 mg/ml como posibles multicopia, para efectuar el análisis de PCR semicuantitativo y la fermentación. Después de un primer ensayo de fermentación, las cepas que presentaron mayor producción de HGhr fueron 1, 19 y 76.

3.3.2 Estimación semicuantitativa del número de copias por PCR

Las posibles cepas multicopia poseen más de un cassette del ADNc de HGh (banda de 1060 pb). El análisis de la intensidad de la banda de 1060 respecto a la de 2200 pb (Figura 18, TABLA 5) muestra que la primera es mucho mayor en las cepas obtenidas por selección con G418 respecto a la cepa unicopia.

