

Volumen	25 $\mu$ L
Taq DNA pol	0.1u/ $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
DNA	2.0 ng/ $\mu$ L

FIGURA 24. Condiciones de reacción fijadas por Escamilla en 1995. Se muestra el primer factor que se modificó en esta tesis: la concentración de la DNA polimerasa Taq.

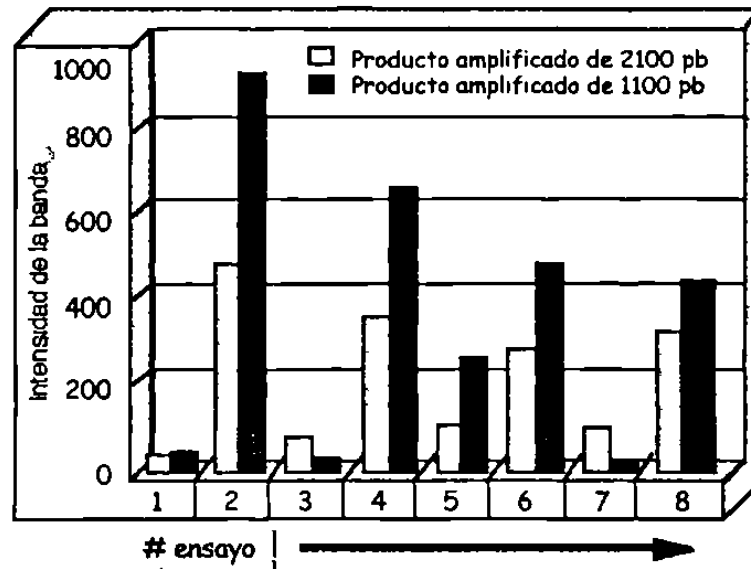
Programa A	Programa B	Programa C
94°C 5 min	94°C 5 min	94°C 5 min
94°C 1 min	94°C 45 seg	94°C 45 seg
60°C 1 min	60°C 1 min	60°C 1 min
72°C 1 min	72°C 1 min	72°C 2 min
72°C 7 min	72°C 10 min	72°C 10 min

FIGURA 25. Programas de amplificación usados en este trabajo. El programa A es el inicial. Los programas B y C fueron los utilizados para ajustar el cociente de la intensidad de las bandas producto de la amplificación; es decir, para hacer la PCR lo más semicuantitativo posible.

# exp	Variables		
	DNA (ng/ $\mu$ L)	% DMSO	T <sub>extensión</sub> min
1	4	---	1 min
2	4	---	2 min
3	4	5%	1 min
4	4	5%	2 min
5	2	---	1 min
6	2	---	2 min
7	2	5%	1 min
8	2	5%	2 min

FIGURA 26. Optimización de la PCR. Las variables involucradas en los 8 experimentos de PCR realizados fueron: la concentración del DNA, la presencia o ausencia de DMSO y el tiempo de extensión.

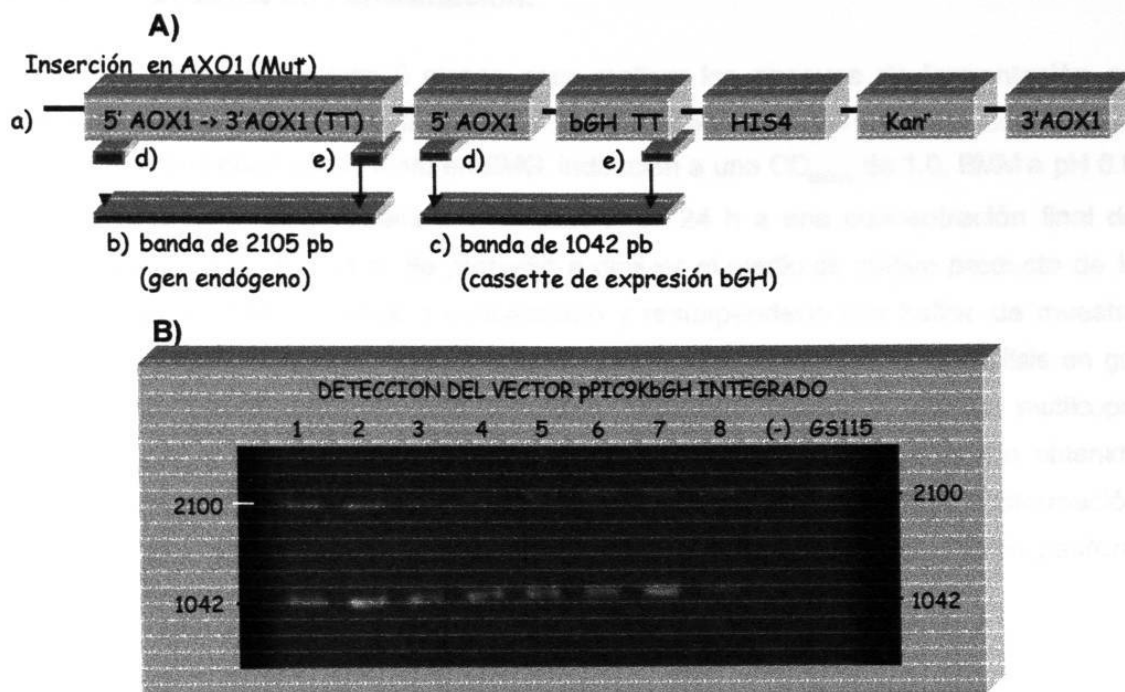
Al analizar los resultados obtenidos de los ensayos, se determinó que el ensayo número 8 (FIGURAS 26 y 27) presentó las condiciones mas favorables para obtener una cantidad aceptable de producto amplificado y un cociente cercano a 1, siendo éstas una unidad de *DNA polimerasa Taq* por reacción, 5% de DMSO, 2 ng/μl de *DNA genómico de Pichia*, y un tiempo de extensión de 2 minutos a 72°C (FIGURA 26).



**FIGURA 27.** Gráfica donde se ilustra la intensidad y proporción de los productos amplificados para cada ensayo. El cociente resultante de los productos amplificados de cada ensayo fue 1.193 para el ensayo 1; 1.923 para el 2; 0.000 para el 3; 1.824 para el 4; 2.477 para el 5; 1.700 para el 6; 0.309 para el 7; 1.373 para el 8. El ensayo #1 presentó el cociente mas cercano a 1, pero la intensidad del producto amplificado es muy baja. El ensayo 8 presentó un cociente de 1.4 y una intensidad de producto amplificado aceptable.

### 3.2.3 Confirmación de la Integración del Vector pPIC9KbGH en GS115 por PCR.

Para corroborar la integración del vector pPIC9KbGH se realizó la amplificación con las condiciones de reacción del método 2 (descrito en materiales y métodos), usando lisado celular, de 7 clonas seleccionadas al azar que crecieron en ausencia de histidina. Se logró comprobar la integración del cassette de expresión en todas ellas (FIGURA 28), pues la PCR generó la banda de 1042 pb.



**FIGURA 28.** A) Ilustración de los sitios donde se aparean los oligonucleótidos en el genoma de GS115 (a), b) Amplicón de 2105 pb, c) Amplicón de 1042 pb, d) Oligonucleótido 5'AOX1, e) Oligonucleótido 3'AOX1. B) Detección del vector pPIC9KbGH integrado al genoma de las clonas seleccionadas; 1) clona pPIC9hGH22k, (-) control de contaminación, GS115 cepa de *P. pastoris* y las siguientes son clonas GS115 del vector pPIC9bGH, 2) A3, 3) A7, 4) A11, 5) A12, 6) B2, 7) B5 y 8) B7. La reacción de amplificación se realizó con las condiciones del método 2 de amplificación establecido.

### 3.2.4 Tamizaje de Clonas Multicopias en G418.

Los resultados del tamizaje con geneticina (G418) realizado a las 348 clonas de *Sac I* y las 44 clonas obtenidas con *Bgl II* (un total de 392 clonas) se muestra en la TABLA 19. Solamente 133 clonas crecieron a una concentración de 2 mg/mL.

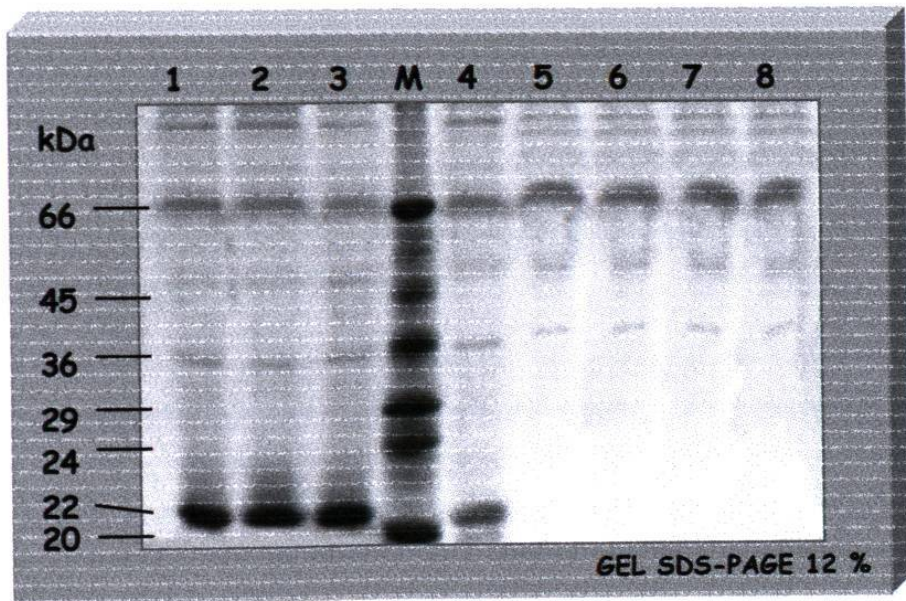
**TABLA 19.**

**NÚMERO DE CLONAS RESISTENTES A CUATRO CONCENTRACIONES DE GENETICINA.**

Concentración de G418	Clonas <i>Sac I</i>	Clonas <i>Bgl II</i>
0.25 mg/mL	348	0
0.75 mg/mL	250	0
1.5 mg/mL	182	0
2.0 mg/mL	133	0

### 3.2.5 Ensayos de Fermentación.

Se seleccionaron 3 clonas para realizar los ensayos de fermentación en matraces de 250 mL con 1/10 de volumen de medio de cultivo (25 mL). Las condiciones fueron las siguientes: crecimiento en BMG, inducción a una  $OD_{600nm}$  de 1.0, BMM a pH 6.0 y con 0.75% de metanol, añadiendo metanol cada 24 h a una concentración final de 0.75%, por un total de 144 h. Se procedió a dializar el medio de cultivo producto de la fermentación de 144 h y luego a concentrarlo y resuspenderlo con buffer de muestra 1X en un volumen 20 veces menor al original, para después someterlo al análisis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Los controles utilizados fueron 3 clonas multicopia obtenidas con el vector pPIC9KhGH22k (Sánchez 1998), una clona unicopia obtenida con el vector pPIC9hGH22K (Escamilla 1996), y una clona obtenida de la transformación del vector pPIC9K; todas estas clonas obtenidas a partir de la cepa de *Pichia pastoris* GS115 (FIGURA 29).



**FIGURA 29.** Análisis del medio de cultivo fermentado (144 h). Carriles 1), 2) y 3) corresponden a medios de cultivo de clonas pPIC9khGH22k-GS115 resistentes a concentraciones de geneticina mayores a 25 mg/mL; M) marcador de peso molecular; 5) clona pPIC9K-GS115; 6), 7) y 8) clonas pPIC9KbGH-GS115 resistentes a concentraciones de geneticina mayores a 0.25 mg/mL. Las fermentaciones se realizaron en medio BMG pH 6.0 (16 h) en la etapa inicial de fermentación y BMM pH 6.0 (144 h) en la inducción con metanol (0.75% de metanol cada 24 h).



### 3.3 Tercera Fase.

#### 3.3.1 Análisis del Medio de Cultivo.

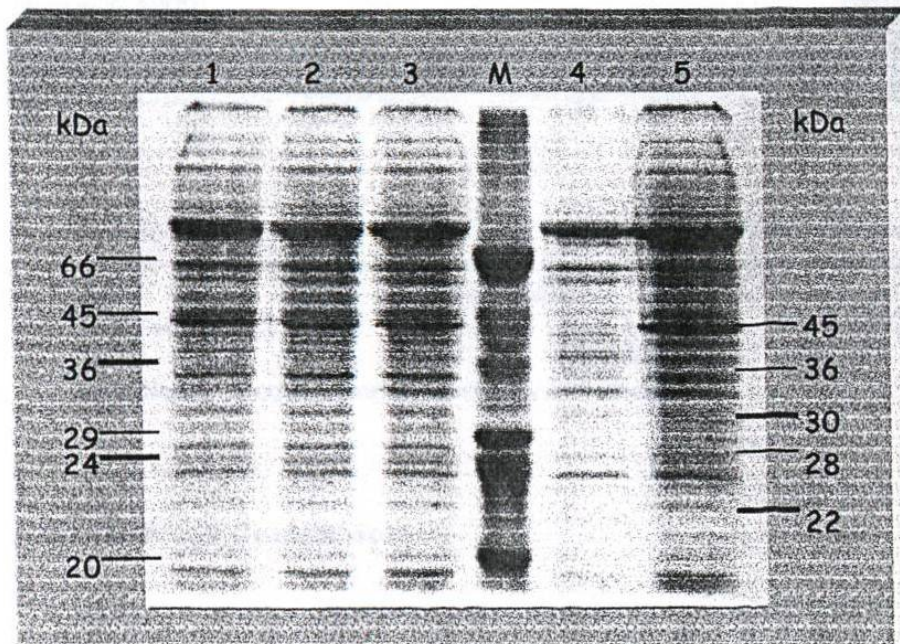
El corrimiento del gel de poliacrilamida SDS-PAGE (12%) para el análisis de las proteínas del medio de cultivo de las fermentaciones anteriormente mencionadas, no reveló la presencia de *BGHr* (FIGURA 29). Como no se detectó producción de *BGHr* en el medio de cultivo se plantearon posibles causas que explicarían la ausencia de producción o detección de la hormona:

- 1) Una producción de *BGHr* a un nivel no detectable en gel SDS-PAGE.
- 2) Ineficiente o nulo procesamiento del *péptido señal*, debido a impedimento estérico en el sitio de corte, impidiendo la secreción de la hormona madura al medio de cultivo.
- 3) Codones presentes en el *DNAc de bGH* infrecuentes o indeseables para *Pichia*.
- 4) Estructura secundaria de alta energía de enlace en el *RNA<sub>m</sub>* transcrito cerca del codón de *inicio de la traducción*, que interfiere con el acceso de éste por los ribosomas.
- 5) Una región de alto contenido de A+T en el *DNAc de bGH*, la cual emularía una *señal de terminación de la transcripción*.

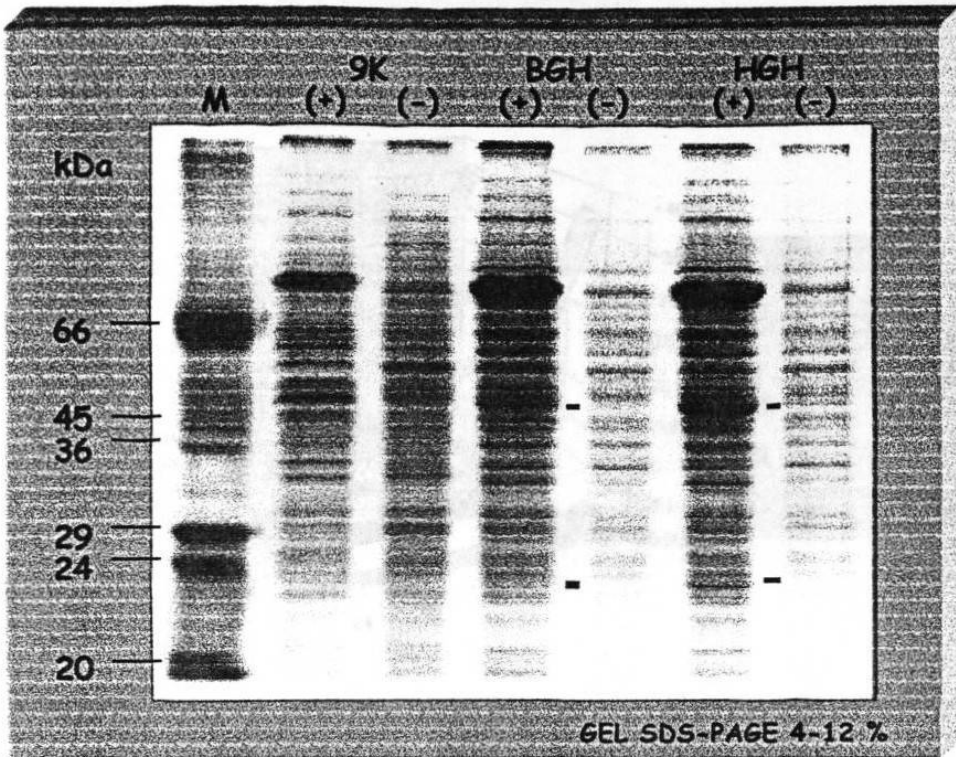
Se procedió a determinar si existía un problema de bajos niveles de producción, concentrando el medio de cultivo 30 veces, con lo cual no se logró visualizar *BGHr* en el gel. Se realizaron nuevamente fermentaciones a nivel matraz (matraces de 250 mL, con 25 ml de medio BMM pH 6.0). Para explorar la segunda alternativa, se procedió a analizar las proteínas producto de lisados celulares de células inducidas y de células control no inducidas (Clonas pPIC9K, pPIC9hGH22K, pPIC9KhGH22K, pPIC9KbGH), con lo que tampoco se logró determinar la producción de pre-*BGHr* (de 30.646 kDa).

### 3.3.2 Análisis de los Lisados Celulares.

Para verificar si la *BGhr* estaba siendo producida pero permanecía en el espacio intracelular, se procedió a analizar los lisados celulares. En los geles SDS-PAGE de los lisados de células inducidas se visualizó una banda tenue a la altura de 22 kDa que al parecer no se encontraba en las células pPIC9K-GS115 inducidas y sin inducir, en las clonas pPIC9KbGH-GS115 sin inducir y en las clonas pPIC9hGH22k-GS115 sin inducir. Dicha banda podría corresponder al producto de la expresión del *DNAc* de *bGHr* o *hGH22kr* según el caso, sin embargo no se pudo comprobar su identidad como *bGHr* o *hGH22kr*, respectivamente, debido a la carencia de anticuerpos específicos capaces de diferenciarlas (FIGURAS 30 y 31).



**FIGURA 30.** Análisis proteico de lisados celulares de tres clonas pPIC9KbGH-GS115. Se logró determinar la presencia de la banda presumiblemente correspondiente a la proteína *pre-BGH* de 30.6 kDa y una banda a la altura aproximada a 22 kDa.

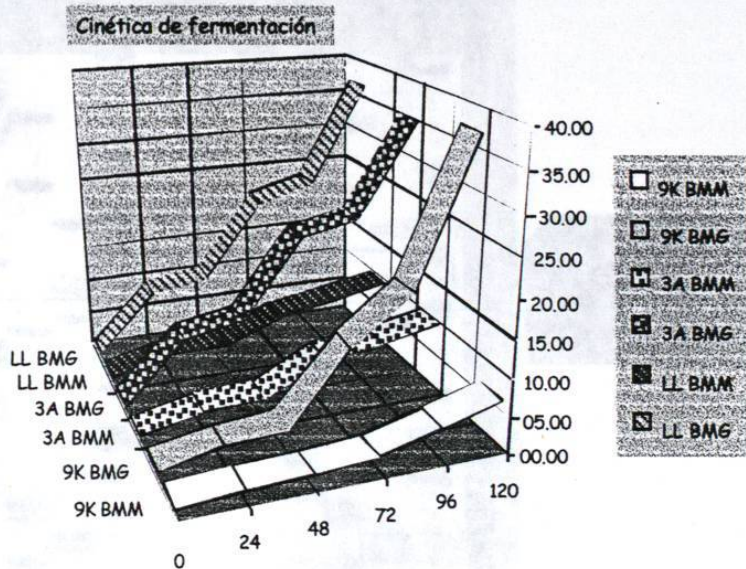


**FIGURA 31.** Lisados celulares de tres clones pPIC9KbGH-GS115 inducidas y sin inducir, en donde aparentemente aparece la banda correspondiente a *BGHR*, en la clona pPIC9KbGH-GS115 inducida, y no en la clona pPIC9KbGH-GS115 no inducida, al igual que en la clona pPIC9hGH22K. Dicha banda no se detectó en pPIC9K-GS115, pero no se pudo establecer si correspondía a la *BGHR* intracelular.

### 3.3.3 Cinéticas de Crecimiento.

A su vez se realizó una cinética de crecimiento comparativa entre las clonas pPIC9K-GS115, pPIC9KbGH-GS115, pPIC9hGH22k-GS115 inducidas y sin inducir, no encontrándose diferencias de crecimiento significativas entre las clonas inducidas, o entre las clonas sin inducir; solo se encontró un aletargamiento normal entre las clonas inducidas y sin inducir, debida al tipo de fuente de carbono suministrada (FIGURA 32).



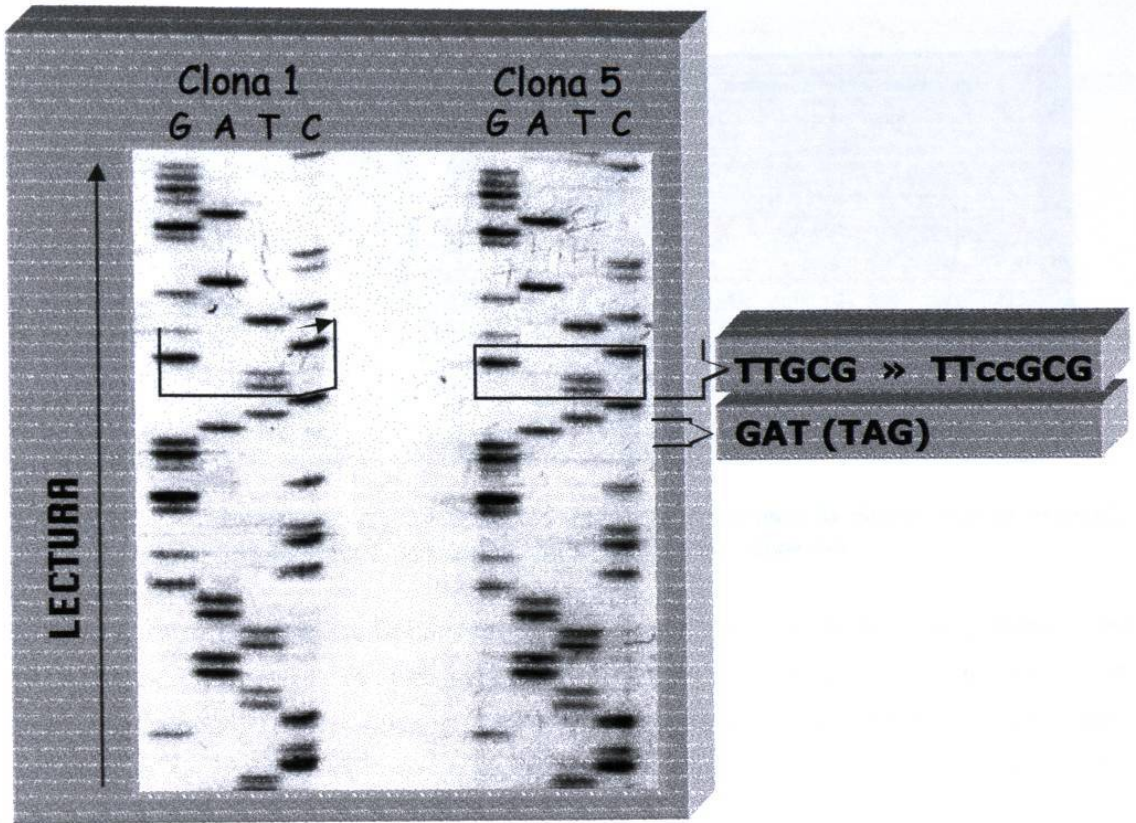


**FIGURA 32.** Cinética de crecimiento de las clonas inducidas (BMM) y sin inducir (BMG) pPIC9K-GS115 (9K), pPIC9hGH22K-GS115 (LL), pPIC9KbGH-GS115 (3A). Las determinaciones de la densidad óptica se realizaron cada 24 h.

### 3.3.4 Re-verificación de la Secuencia de las Clonas pPIC9KbGH.

Al revisar nuevamente la secuencia que se utilizó para reemplazar el área mutada (3' del *DNAc de bGH*) de las clonas pPIC9KbGH se encontró una delección de dos citosinas dos codones antes del codón de terminación (FIGURA 33), con lo cual se corre el marco de lectura y no se reconoce el codón de terminación. Al correrse el marco de lectura se dedujo que la proteína presentaría 8 codones adicionales, variando el peso molecular total, de los 21,731 Da originales a 22,602 Da (FIGURA 34).





**FIGURA 33.** Autorradiografía de gel de secuenciación en donde se muestra la secuencia de dos clones pPIC9kbGH con la delección de las dos citosinas antes del codón de terminación. Como la mutación está presente en dos clones, se concluyó que la delección proviene del vector pMALcbGH (Martinez, 1994).

Comparación de codones:		nuc/aa
BGH nativa/BGH mutada		571/191
BGH Nativa	gcc agc tgc gcc ttc tag ala ser cys ala phe AMB	
BGH Mutada	gcc agc tgc gtt cta ggc cgg cgc cga att aat tgc cct tag ala ser cys val leu gly arg pro arg ile asn ser pro AMB	571/191
BGH Nativa	191 codones/21,731 Da	
BGH Mutada	199 codones/22,602 Da	

**FIGURA 34.** Comparación de los codones de la *BGH nativa* y la *BGHr* con la deleción de las dos citosinas antes del codón de terminación.

Al analizarse los datos obtenidos se concluyó que la deleción provenía del *DNAc* de *bGH* proveniente del vector pMALcbGH construido por Martínez-Torres (1994). Sin embargo esta mutación puede encontrarse solo en este lote de plásmido, con el cual se trabajó; de esta manera la mutación puede no provenir del vector pMALcbGH original.

Aun así, el hallazgo de estas últimas mutaciones pareciera que tampoco justifica la nula producción extracelular de la proteína recombinante *BGH*.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

En el presente trabajo se generaron cepas de *Pichia pastoris* portadoras del *DNAc de bGH*, que sin embargo al fermentarlas e inducir la expresión del cassette con metanol, no produjeron *BGHr*, detectable al menos en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y teñido con azul de Coomassie.

#### **4.1 Construcción de los Vectores pPIC9bGHTaq y pPIC9kbGH-02:**

##### **4.1.1 El Vector de Integración pPIC9bGHTaq:**

Se produjeron clonas de *E. coli XL1-Blue* portadoras de este vector sin problema alguno ni en la clonación ni en su caracterización. Pero al secuenciar 6 de ellas se encontraron mutaciones en el *DNAc de bGH*, distintas en cada clona. Se determinó que tales mutaciones se generaron debido a los errores introducidos por la *DNA polimerasa Taq* en el producto amplificado, por lo cual no se utilizaron estos plásmidos así generados para la transferencia completa del *DNAc de bGH* al vector pPIC9k (Apéndices A y B).

##### **4.1.1.1 Notas Sobre los Problemas por el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa en la Construcción del Vector de Expresión.**

Existe una dificultad en el empleo de la *DNA polimerasa Taq* en la PCR: carece de actividad correctora. El promedio de errores en la replicación celular del *DNA* en la naturaleza es aproximadamente 1 en  $10^9$  nucleótidos. En el tubo de ensayo, usando condiciones típicas de amplificación, la *DNA polimerasa Taq* incorpora un nucleótido incorrecto por cada 5000 nucleótidos incorporados (Error =  $2 \times 10^{-4}$ ). Esto



no es un problema serio en algunas aplicaciones de la *PCR*, a causa de que las moléculas con el mismo error están en proporción pequeña respecto al número total de moléculas sintetizadas. Pero los errores son importantes en los fragmentos de *PCR* que luego se requiere desempeñen una función, como en el caso de la producción de proteínas recombinantes.

El uso de *DNA polimerasas* de alta fidelidad en la *PCR* es esencial para reducir la introducción de errores en la amplificación de productos de *PCR* que serán clonados y expresados. Varias *DNA polimerasas* con actividad correctora dependiente de *exonucleasa 3' → 5'* (*Pfu*, *Vent*, *Deep Vent* y *UITma*) han sido introducidas para amplificaciones por *PCR* de alta fidelidad (Cline *et al.*, 1996; Flaman *et al.*, 1994; Ling *et al.*, 1991)(TABLA 8). Flaman *et al.*, (1994) ha reportado que el error promedio de *Pfu* es de 5 a 30 veces mas bajo que enzimas correctoras como *Deep Vent* y *UITma*. Usando diferentes ensayos de fidelidad, se encontró que el error promedio de *Pfu* es mas bajo que la enzima no correctora de origen recombinante *Taq* (Cline *et al.*, 1996; Barnes, 1994; Flaman *et al.*, 1994; Lundberg *et a.*, 1991).

Se han estudiado algunos de los parámetros que contribuyen en la fidelidad de la replicación, pero se requiere seguir investigándolos. La importancia de la actividad correctora ("proofreading") en la fidelidad de la replicación del *DNA* fue demostrada en el fragmento *Klenow* (Kunkel, 1988) y para *Vent* (Mattila *et al.*, 1991), en las cuales el error promedio se incrementa 10 y 5 veces respectivamente, cuando la actividad *exonucleasa 3' → 5'* es suprimida. El error promedio de las *polimerasas* varía con la composición del amortiguador, pH incluido, concentración de  $Mg^{2+}$  y concentración de nucleótidos (Ling ,1991; Ekert *et al.*, 1990; Eckert *et al.*, 1993) (TABLAS 7 y 8).

Otras variables que afectan son el número de ciclos de la *PCR*, la concentración del templado y las unidades de polimerasa en la reacción. La concentración del templado influye directamente en las duplicaciones del templado y esto en el error promedio (Cline *et al.*, 1996).

Es posible reducir el porcentaje de error de la *DNA polimerasa Taq recombinante* (carente de actividad *exonucleasa 3' → 5'*), con el consecuente incremento de la fidelidad *in vitro*. Bajo condiciones de reacción definidas, el error promedio por nucleótido polimerizado a 70°C puede alcanzar a ser tan bajo como  $10^{-5}$ . La frecuencia de mutaciones producidas responde a los cambios en la concentración de dNTPs, pH y de  $MgCl_2$ . El error promedio tan bajo observado se obtuvo a pH 5-6 (a

70°C) o cuando el  $MgCl_2$  y los dNTPs están presentes a concentraciones equimolares. Lamentablemente estas condiciones no son prácticas, pues el rendimiento del producto amplificado se ve afectado (Eckert y Kunkel, 1990; Mattila, 1991).

**TABLA 20.**  
**ERROR PROMEDIO DE LAS DNA POLIMERASAS TERMOESTABLES Pfu,**  
**Deep Vent, Vent, Taq Y UITma.**

Polimerasa	Error promedio ( $\times 10^{-6}$ ) $\pm$ Desviación estándar
<i>Pfu</i>	$1.3 \pm 0.2$
<i>P.BG-D (Deep Vent®)</i>	$2.7 \pm 0.2$
<i>T. lit (Vent®)</i>	$2.8 \pm 0.9$
<i>Taq</i>	$8 \pm 3.9$
<i>Tma (ULTma®)</i>	$55 \pm 2$

Fuente: Cline *et al* 1996.

#### 4.1.2 El Vector de Integración pPIC9kbGH-02:

Para la construcción de este vector fue necesario recurrir a una estrategia alternativa, diseñada para poder transferir y al mismo tiempo reparar el *DNAc de bGH* mutado de una clona pPIC9bGH*Taq* seleccionada. Para esto se eligió la clona #22, de la cual se usó la porción del vector construido comprendida entre los sitios *Sac I* y *Apa I*, la cual abarca todo la región 5' de *bGH* que no presentó modificación de los aminoácidos codificados. Para reponer la porción 3' de *bGH* con una de secuencia correcta, se usó el vector pMALcbGH (Apéndices A y B). En tal clonación (*E. coli XL1-Blue*) no hubo contratiempos, se corroboró la reparación por secuenciación y se procedió a transformar por electroporación, se obtuvieron 1018 colonias con la digestión del vector con *Sac I* y 44 colonias con la digestión de *Bgl II*. La diferencia en la eficiencia de transformación con las endonucleasa de restricción es semejante a lo reportado en la literatura. No obstante, la eficiencia de transformación por  $\mu g$  de DNA fue muy baja (50.9 clonas por microgramo de DNA digerido con *Sac I*, y de 2.2 clonas por microgramo de DNA digerido con *Sac I*); con esta técnica se reportan eficiencias de transformación de 1000-10,000 clonas por  $\mu g$  de DNA. Sin embargo, hay que considerar que a mayor cantidad de DNA transformante, menor eficiencia de transformación (se recomienda transformar con 5-20  $\mu g$  de DNA) y que se opta mas por un exceso de DNA debido a que a mayor cantidad de DNA, existe mayor probabilidad de eventos múltiples de integración (clonas multicopias). En la eficiencia de transformación también influye el

contenido de sales de la solución del *DNA*, la cual afecta la conductividad y el tiempo de descarga del voltaje, durante la electroporación.

Los resultados del tamizaje con geneticina (G418) realizado a 348 clonas de *Sac* I y las 44 clonas obtenidas con *Bgl* II (un total de 392 clonas) se indican en la TABLA 19. Solamente 133 clonas crecieron a una concentración de 2 mg/mL. Con los resultados obtenidos se puede asumir que el alto porcentaje de clonas que crecieron a una concentración mayor de 0.25 mg/ml podría deberse a dificultades en la homogeneización de las densidades celulares, sin embargo por el número de clonas analizadas es probable que entre las 133 clonas que crecieron a 2.0 mg/ml debe haber clonas multicopia. Sin embargo, el tamizaje solo se realizó con cuatro concentraciones de geneticina (0.25, 0.75, 1.5, y 2.0 mg/mL).

Se seleccionaron 3 clonas para realizar los ensayos de fermentación. A éstas se les dializó el medio de cultivo producto de la fermentación de 120 h y luego se concentró 20 y 30 veces y se analizó en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 5-12%, pero no se logró detectar la *BGHr*. Se procedió a analizar los lisados celulares, pero en éstos tampoco no se pudo determinar la presencia de *BGHr*.

Se postularon varias hipótesis para la ausencia o deficiencia de producción de *BGHr*, pero para comprobarlas era necesario realizar mas ensayos. Al volver a revisar la secuencia nucleotídica se encontró que la secuencia proveniente del vector pMALcbGH presentaba una deleción de un par de citosinas dos codones antes del codón de terminación que había pasado desapercibida en la secuenciación inicial (FIGURAS 33 y 34). Debido a éstas, se corre el marco de lectura, ganando 8 codones adicionales, 7 traducibles. A causa de este hallazgo y a la posibilidad de otra mutación no determinada en la secuencia del *DNA* de *bGH*, se decidió descartar los vectores pPIC9kbGHrep construidos.



## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- I. Se logró cumplir con el objetivo general propuesto, pero descubrimos que el *DNAc* de *bGH* insertado en el genoma de la levadura no condujo a la producción de *BGhr*, no al menos a los niveles de detección de las técnicas empleadas. En cuanto a los objetivos específicos, se logró cumplir con los primeros 5; el sexto objetivo fue cumplido parcialmente debido al descubrimiento de una delección de dos citosinas dos codones antes del codon de terminación; por ello ya no se procedió a verificar los resultados del tamizaje de multicopias con geneticina y por *PCR*. El séptimo objetivo particular tampoco fue cumplido debido a que no se logró detectar *BGhr* en el medio de cultivo con las técnicas empleadas. A continuación se enumeran los resultados correspondientes a los objetivos específicos planteados.
  - 1 Se diseñaron oligonucleótidos que permitieron la amplificación por *PCR* del *DNAc* de *bGH*, y que al mismo tiempo lo modificaron para facilitar su manipulación.
  - 2 Se Insertó el *DNAc* de *bGH* modificado en el vector de expresión pPIC9K de *Pichia pastoris* .
  - 3 Se verificó la integridad del plásmido de expresión resultante del objetivo anterior (pPIC9kbGH), por cortes con enzimas de restricción y por secuenciación nucleotídica.
  - 4 Se introdujo el cassette de expresión de *BGH* (presente en pPIC9K) mediante recombinación homóloga con el genoma de *Pichia* .
  - 5 Se caracterizó el genotipo y fenotipo de las clonas de *Pichia pastoris* resultantes de la recombinación homóloga.

- 6 Dichas clonas fueron sometidas a selección para identificar aquellas con múltiples copias del cassette de expresión.
  - 7 No se lograron derivar clonas sobreproductoras de *BGHr*.
- II. Como fruto de los resultados obtenidos al desarrollar el trabajo se obtuvo lo siguiente:
1. Se construyeron dos vectores recombinantes con el fin de obtener cepas productoras de *BGHr*, sin embargo no fue posible detectar la producción de *BGHr*.
  2. Se establecieron dos protocolos eficientes de detección y semicuantificación del cassette de expresión integrado en *P. pastoris*.
- III. Como sugerencias futuras para lograr la producción de *BGHr* será necesario tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:
- Reamplificar y clonar el *DNAc de bGH* con una polimerasa de alta fidelidad.
  - Realizar ensayos de fermentación con varias condiciones y con un mayor número de cepas, con el fin de comprobar si en efecto existe producción de *BGHr* aunque sea a muy bajos niveles; de ser así, debería ser posible incrementarla manipulando los parámetros de la fermentación.
  - Probar la técnica de inmunodetección por Western blot, para aumentar la sensibilidad.
  - Verificar si el gen en efecto se está transcribiendo y a que nivel.
  - Verificar si el producto pudiera no estarse secretando eficientemente.
- IV. Si con los ensayos de fermentación anteriormente mencionados no se logra la producción de la hormona recombinante, otros factores que pudieran explorarse son: 1) el contenido de A+T, 2) estructuras secundarias del *RNA<sub>m</sub>*, 3) abundancia de codones ajenos al código genético de *P. pastoris*, 4) impedimento estérico del sitio de corte creado para *KEX2* y 4) posible toxicidad para la levadura inducida por la *BGHr*.

## CAPÍTULO 6

### REFERENCIAS

1. Abdel S.S., Shieh H.S., Smith W.W., Dayringer H.E., Violand B.N., y Bentle L.A. (1987). Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc Natl Acad Sci.* 84 (18):6434-6437.
2. Alvidrez, L. E. (1990). Subclonación y Expresión transitoria de los DNAs complementarios de las hormonas del crecimiento humana y bovina. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL.
3. Amaya, F. (1988) Obtención del DNA complementario al RNAm de la hormona del crecimiento bovina. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UANL.
4. Barnes, W.M. (1994). PCR amplification of up to 35 Kb DNA with fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91 (6) 2216-2220.
5. Barr, K.A., Hopkins, S.A. y Sreekrishna, K. (1992). Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* 12, 48-51.
6. Bauman, D.E. (1995) IGF-1 Fact Sheet, Cornell University, Department of Animal Science
7. Bauman, D.E. (1990) "Bovine Somatotropin: Review of an Emerging Animal Technology," commissioned background paper for the Office of Technology Assessment, Washington. DC. .
8. Bauman, D.E. et al. (1989), "Regulation of Nutrient Partitioning: Homeostasis, Homeorhesis and Exogenous Somatotropin," keynote lecture in: Seventh International Conference on Production Disease in Farm Animals, F.A. Kallfelz (ed.) (Ithaca, NY: Cornell University), pp. 306-323.
9. Bell J.A., Moffat K., Vonderhaar B.K., y Golde D.W. (1985). Crystallization and preliminary x-ray characterization of bovine growth hormone. Purification of bovine prolactin and growth hormone. *J Biol Chem.* 260 (14):8520-8525
10. Brankamp, R.G., Sreekrishna, K., Smith, P.L., Blankenship, D.T. y Cardin, A.D. (1995). Expression of a synthetic gene encoding the anticoagulant-antimetastatic protein ghlanten by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 6, 813-820.
11. Brems, D.N., Plaisted, S.M., Havel, H.A., y Tomich, C-S. C. (1988). Stabilization of an associated folding intermediate of bovine growth hormone by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:3367-3371.
12. Brierley, R.A., Davis, G.R., y Holtz, G.C. (1994). Production of insulin-like growth factor 1 in methylotrophic yeast cells. United States Patent, No. 5,324,639.
13. Burvenich C. (1988). Bovine Somatotropin and Acute *Escherichia coli* Mastitis. *Ann. Med. Vet.*, 132, 601-606
14. Butler, J.S., Sadhale, P.P. y Platt, T. (1990). RNA processing in vitro produces mature 3' ends of a variety of *Saccharomyces cerevisiae* mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2599-2605.
15. Carlacci, L., Chou, K.C., Maggiora, G.M. (1991). A heuristic approach to predicting the tertiary structure of bovine somatotropin *Biochemistry* 7; 30 (18) 4389-4398.
16. Clare, J.J., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Sreekrishna, K. y Romanos, M.A., (1991a). High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integration of the gene. *Bio/Technology* 9:455-460.
17. Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M. Sreekrishna, K. y Henwood, C.A. (1991b). Production of mouse epidermal growth factor in yeast:



- high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105, 205-212.
18. Cline, J., Braman, J.C. y Hogrefe, H.H. (1996). PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermoestable DNA polimerases. *Nucleic Acids Research*. Vol. 24, No 18. 3546-3551.
  19. Collier, Robert J., Hauser, Scott D., Krivi, Gwen G., Lucy y Matthew C. (1992). Allelic variants of bovine somatotropin gene: genetic marker for superior milk production in bovine. Patente de EUA número 9267859.
  20. Costigan D.M., Guyda HJ y Posner BI. (1988). Free Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) and IGF-II in Human Saliva. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 66, 1014-1018
  21. Creeg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P. y Stillman, C.A. (1989). Funcional caracterización of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 9:1316-1323.
  22. 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 teh methyloptropic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology*. 5, 479-485.
  23. Creeg, J.M., Vedvick, T.S., y Raschke, W.C. (1993). Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* Vol. 11 August, 905-910.
  24. Chalupa, W. y Galligan, D T., "Nutritional Implications of Somatotropin for Lactating Cows," *J. Dairy Sci.* 72:2510-2524, 1989.
  25. Chilliard, Y. (1989). "Long-Term Effects of recombinant Bovine Somatotropin (rbST) on Dairy Cow Performances: A Review," *Use of Somatotropin in Livestock Production*, K. Sejrsen, M. Vestergaard, and A. Neimann-Sorensen (eds.) (New York, NY: Elsevier Applied Science), pp. 61-87.
  26. Cho J.M., Lee, T.H., Chung, H.H., Lee, Y.B., Lee, T.G., Park, J.W., Han, K.B. (1994). Method for production of bovine growth hormone using a synthetic gene. Patente USA, núm. 05366976.
  27. De Vos A.M., Ultsch, M. y Kossiakoff, A.A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of this receptor: crystal structure of the complex. *Science*, 255; 306-312.
  28. Despreaux C.W. Manning R.F. (1993). The dacA gene of *Bacillus stearothermophilus* for D-alanine carboxipertidase: cloning, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Gene* 131:35-41.
  29. Díaz, F.J.Z. (1995). Clonación molecular de un fragmento de DNA genómico candidato a ser el gen de la hormona del crecimiento del tlacuache (*Didelphis marsupialis* L.), un marsupial americano. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias Biológicas, UANL.
  30. Digan, M.E., Lair, 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). Continuous Production of a novel lisozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology*. 7, 160-164.
  31. Eckert, K.A. y Kunkel, T.A (1990). High fidelity DNA syntehsis by the *Thermus aquaticus* DNA polimerase. *Nuclei Acids Res.* Jul 11;18(13):3739-3744
  32. Eckert, K.A. y Kunkel, T.A. (1993). Effect of reaction pH on the fidelity and processivity of exonuclease-deficient Klenow polymerase. *J. Biol. Chem.*, 268. 13462-13471.
  33. Ellis, S. B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. y Gingeras, T.R. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* 5:1111-1121.
  34. Escamilla-Treviño, L.L., (1996). Biosintesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHR) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis. Facultad de Medicina. UANL.
  35. Faber, K.N., Harder, W, AB, G. y Veenhuis, M (1995). Review: Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. *Yeast* Vol. 11: 1131-1344
  36. Flaman, J.M., Frebourg, T., Moreau, V., Charbonnier, F., Martin, C., Ishioka, C., Friend, S.H. y Iggo, R. (1994). A rapid PCR fidelity assay. *Nucleic Acids Res.* 11;22(15):3259-3260.

37. Fraser; T.H., Bruce, y Barbara J. (1984). A process for expression of the gene for bovine growth hormone in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Bovine growth hormone can be used to increase milk production in cows. Patente de EUA 4,443,539.
38. Fryxell B., O'Donoghue K., Graeff R.M., Lee H.C., y Branton W.D. (1995). Functional expression of Soluble Forms of Human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Prot Express and Purif* 6: 229-336.
39. Gallardo, H.L. (1995). Mutagénesis sitio-dirigida en la secuencia señal de la proteína de unión a maltosa. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias Biológicas, UANL.
40. George, H.J., L'italien, J.J., Pilacinski, W.P., Glassman, D.L. y Krzyzek, R.A. (1985). High-Level Expression in *Escherichia coli* of Biologically Active Bovine Growth Hormone. *DNA*. 4. 273-281.
41. Gilbert, D. (1993). The future remains bright for biotech stocks. *Biotechnology*. 11, 654-655.
42. Gray, G., Selzer, G., Buell, G., Shaw, P., Escanez, S., Hofer, S., Voegeli, P., y Thompson., C.J. (1984). Synthesis of bovine growth hormone by *Streptomyces lividans*. 32:21-30.
43. Guo W., González-Candelas L., y Kolattukudy P.E. (1995). Cloning of a new Pectate Lyase Gene pe/C from *Fusarium solani f. sp. pisi* (*Nectria haematococca*, Mating Type VI) and Characterization of the Gene Product Expressed in *Pichia pastoris*. *Arch of Biochem and biophys* 323: 352-360.
44. Hansen O.C., y Stougaard P. (1997). Hexose Oxidase from the Red Alga *Chondrus crispus*. Purification, Molecular Cloning, and Expression in *Pichia pastoris*. *The J of Biolog Chem* 272:11581-11587.
45. Henikoff, S., y Cohen, E.H. (1984). Secuencias responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 1515-1520.
46. Hocquette J. F., Postel-Vinay M.C. Kayser C. de Hemptinne B. y Amar-Costesec A. (1989). The human liver growth hormone receptor. *Endocrinol.*, 125, 2167-2174
47. Hsiung, H. M., y MacKellar., W. C. (1987). Expression of bovine growth hormone derivatives in *Escherichia coli* and the use of the derivatives to produce natural sequence growth hormone by cathepsin C cleavage. *Meth. Enzymology.*, 153, 390-401.
48. IFST: Institute of Food Science / Technology, 5 Cambridge Court, 210 Shepherd's Bush Road, London W6 7NJ, UK.
49. Invitrogen Corporation. (1994). *Pichia* Expression Kit (Protein expresion). A manual of Methods for Expression of Recombinants Proteins in *Pichia pastoris*. Version 3.0. San Diego, CA 92121.
50. Invitrogen Corporation. (1996). pPIC9K: A *Pichia* Vector for Multicopy Integration and Secreted Expression; Instruction Manual, Version B. San Diego, CA 92121.
51. Irniger, S., Egli, C.M. y Braus, G.H. (1991). Different classes of polyadenylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3060-3069.
52. Juskevich, J.C., y Guyer., C.G. (1990). Bovine growth hormone: Human food safety evaluation. *Science*. 249, 875-884.
53. Keshet, E., Rosner, A., Berstein, Y., Gorecki, M. y Aviv, H., (1981). Cloning of bovine growth hormone gene and its expression in bacteria. *Nucl. Acids Res.* 9: 19-21.
54. Klein, B.K., Hill, S.R., Devine, C.S., Rowold, E., Smith, C.E., Galosy, S., y Olins, P.O. (1991). Secretion of active bovine somatotropin in *Escherichia coli*. 9, 869-872.
55. Kopchick, J.J. y Chen, W.Y. (1992). Growth hormone antagonists. Patente de EUA 05350836.
56. Koutz, P., Davis, G R., Stillman, C., Barringer, K., Creeg, J. y Till, G. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* 5:167-177.
57. Kunkel, T.A. (1988). Exonucleolytic proofreading. *Cell*. 53(6).837-840.
58. Lai, S.K., Tulasiram P, y Jameel S. (1997). Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. *Gene* 190:63-67.
59. Lam L.P.Y., y Berger S.A. (1997). Intracellular Expression and Purification of the c-kit Receptor Kinase Domain in *Pichia pastoris*. *BioTechniques* 23:82-86.

60. Laroche Y., Storme V., de Meutter J., Messens J. y Lauwereys M. (1994). High-level Secretion and Very Efficient Isotopic Labeling of Tick Anticoagulant Peptide (TAP) Expressed in the Methylotrophic Yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 12:1119-1124.
61. Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. (1993). Principles of Biochemistry. Worth Publishers N.Y. Second Edition. 278, 929, 933-934.
62. Li, C.H. y Evans, H.M. (1994). The isolation of pituitary growth hormone. *Science*. 99, 183-184 citado en: Felman, E.C. y Nelson, R.W.; 1987; Growth Hormone en Canine and Feline endocrinology and reproduction; W.B. Saunders Co.; 29-54.
63. Ling, L.L., Keohavong, P., Dias, c., y Thilly, W.G. (1991). Optimization of the polymerase chain reaction with regard to fidelity: modified T7, Taq, and vent DNA polymerases. *PCR Methods Applicat.*, 1, 63-69.
64. Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W.W., Short, J.M., Sorge, J.A. y Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*. 180. 1-6.
65. Martínez, 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.
66. Mattila P., Korpela J., Tenkanen T. y Pitkanen K. (1991). Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase—an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* 25;19(18):4967-4973
67. McGrew J.T., Leiske D., Dell B., Klinke R., Krasts D., Wee S.F., abbot N., Armitage R. y Harrington K. (1997). Expression of trimeric ligand in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressin transformants. *Gene* 187: 193-300.
68. Mistry A.R., Falciola L., Monaco L., Tagliabue R., Acerbis G., Knight A., Harbottle R.P., Soria M., Bianchi M.E., Coutelle C. y Hart S.L. (1997). Recombinant HMG1 Protein Produced in *Pichia pastoris*: A Nonviral Gene delivery Agent. *Biotechniques* 22: 718-729.
69. Mohanraj D., Olson T. y Ramakrishnan S. (1995). Expression of Biologically Active Human Vascular Endothelial Growth Factor in Yeast. *Growth Factors* 12: 17-27.
70. Moore WV, Draper S. y Hung C.H. (1985). Species variation in the binding of hGH of hepatic membranes. *Horm. Res.*, 21, 33-45
71. Morelle, G. (1989). A plasmid Extraction Procedure on a Miniprep Scale. *Focus*. Vol II. Numero 1.
72. Mueller, H.W. y Duclos, J.M. (1993). Facile Oligomer Concentration and Tm Determination for Estimation of PCR Annealing Temperature. *PERKIN ELMER amplifications*. pp: 10-11.
73. Ono, M., Takajama, Y., Rand-Weaver, M., Sakata, S., Yasunaga, T., Noso, T. y Kawachi, H. (1990). cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin; *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 87, 4330-4334.
74. Paladini, A.C., Pena, C. y Poskus E. (1983), Molecular biology of growth hormone. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 15 (1): 25-56.
75. Payne M.S., Petrillo K.L., Gavagan J.E., DiCosimo R., Wagner W. y Anton D.L. (1997). Engineering *Pichia pastoris* for biocatalysis: co-production of two active enzymes. *Gene* 194. 179-182.
76. Payne, W.E., Gannon, P.M. y Kaiser, C.A. (1995). An Inducible Acid-Phosphatase from the yeast *Pichia pastoris*-Characterization of the Gene and Its Product. *Gene* 163(1), 19-26.
77. Peel, C.J. y Bauman, D.E., "Somatotropin and Lactation," *J. Dairy Sci.* 70:474-486,1987.
78. Press, M. (1988). Growth hormone and metabolism. In: *Diabetes/Metabolism Reviews*. John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y., U.S.A. 4: 391-414.
79. Ramirez, V. (1991). (Expresión en *Escherichia coli* del DNA complementario de la hormona del crecimiento bovino. Tesis de Maestría Facultad de Medicina. UANL.
80. Ridder R., Schmitz R., Legay F. y Gram H. (1995). Generation of Rabbit Monoclonal Antibody Fragments from a Combinatorial Phage Display Library and Their Production in the Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 13: 255-260.

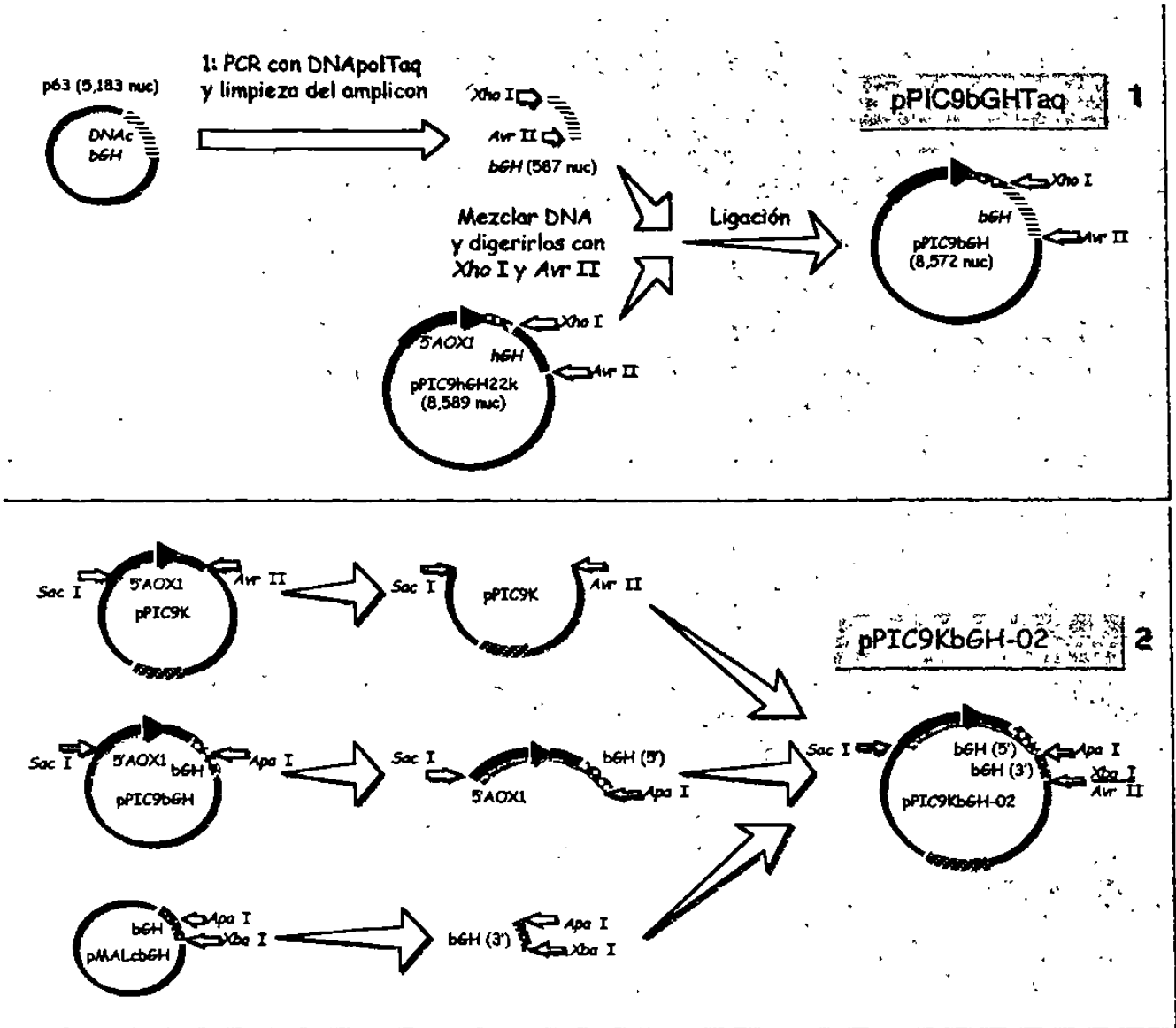
81. Romanos, M.A., Clare, J.J., Beesley, K.M., Rayment, F.B., Ballantine, S.P., Makoff, A.J., Dougan G., Fairweather, N.F. y Charles, I.G. (1991). Recombinant Bordetella pertussis petracin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: high-level production and immunological properties. *Vaccine* 9: 901-906.
82. Romanos, M.A., Makoff, A.J., G. Dougan, N.F., Fairweater, y I.G. Charles. (1991b). Expresión of tetanus fragment C ni yeast: gene synthesis is required to eliminate fortuitous polyadenylation sites in AT-rich DNA. *Nucleic Acid Res.* 19:1461-1467.
83. Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloninig: A Laboratory Manual*. Segunda Edición. Cols. Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
84. Sami A.J., Wallis, O.C. y Wallis, M. (1990). Effect of changes in 5' coding sequence on level of expression of ovine growth hormone cDNA in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions.* 18: 567-568.
85. Sánchez, C.N. (1998). Producción de hormona del crecimiento humana recombinante biológicamente activa en *Pichia pastoris*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UANL.
86. Santomé, J.J.A., Dellacha, J.M., Paladini, A. C., Peña, C., Biscoglio, M. J., Daurt, S. T., Poskus, E., y Wolfenstein, C. E. M. (1973). Primary structure of bovine growth hormone. *Eur. J. Biochem.* 37, 164-170.
87. Sato, N., Watanabe, K., Murata, K., Sakaguchi, M., Kariya, Y., Kimura, S., Nonaka, M., y Kimura, A. (1988). Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochem. Biophys Acta.* 949, 35-42.
88. Scorer, C.A., Buckholz, R.G., Clare, J.J., y Romanos, M.A. (1993) The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* 136: 111-119
89. Scorer, C.A., Clare, J.J., McCombie, W.R., Romanos, M.A. y Sreekrishna, K. (1994). Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high level foreign gene expression. *Bio/Technology.* 12, 181-184.
90. Schonner, B.E., Hsiung, H.M., Belagaje, R.M., Mayne, N.G. y Schoner, R.G. (1984). Role of mRNA translational efficiency in bovine growth hormone expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:5403-5407.
91. Seeburg, P.H., Sias, S., Adelman, J., de Boer, H.A., Hayflick, J. y Jhurani, P. (1983). Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormone. *DNA.* 2: 37-45.
92. Sharrocks, A.D. y Shaw, P.E. (1992). Improved primer design for PCR-based, site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Research.* Vol. 20. N°5. 1147.
93. Sreekrishna K., y Hopkins S.A. Datos no publicados.
94. Sreekrishna K., y Parker K.A. Datos no publicados.
95. Sreekrishna, K. (1993). Strategies for optimizing protein expression and secretion in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. In: Blatz R.H., Hegeman G.D. Skatrud, P.L. (eds) "Industrial microorganisms: basic and applied molecular genetics" American Society of Microbiology, Washington, D.C. 119-126.
96. Sreekrishna, K., Brankamp R.G., Kropp, K.E., Blankenship, Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. y Birkenberger, L.A. (1997). Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologus proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene.* 190, 55-62.
97. Sreekrishna, K., McCombie W.R., Potenz, R., Parker, K.A., Mazzaferro, P.K., Maine, G M., Lopez, J.L., Divelbiss, D.K. Holden, K.A., Barr, R.D y Fuke, M. (1988a). Clonal variation in the expression of human tumor necrosis factor (TNF) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Presented at the 5th Annual Biotech USA Industry Conference and Exhibition, San Francisco.
98. Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps D., Wood, P., y Parker, K. (1989b). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry.* 28, 4117-4125.
99. Sreekrishna, K., y Kropp, K. (1990). *Pichia pastoris*. In: Wolf, K. (Ed.), *Non-Conventional Yeasts in Biotechnology*. Springer, Berlin. 203-252.

100. Steinlein L.M., Graf T.N. y Ikeda R.A. (1995). Production and Purification of N-Terminal Half-Transferrin in *Pichia pastoris*. *Prot Express and Purif.* 6: 619-624.
101. Stratagene, catálogo 1997-1998, pp 154-155
102. Thill, G.P., Davis, G.R., Stillman, G.R., Holtz, C., Brierly, R., Engel, M., Kholz, R., Kinney, J., Provo, S., Vedvik, T., y Siegel, R.S. (1990). Positive and negative effects of multicopy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. In: Heslot, H., Davies, J., Florent, J., Bobichon, L., Durand, G., and Paris, P.L., (Eds.). *Proceedings of the Sixth International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms*, Strasbourg, France, 1990. Société Française de Microbiologie, Paris. 477-490.
103. Tomich, C.S., Olson, E.R., Olsen, M.K., Kaytes, P.S., Rockenback, S.K. y Hatzenbuehler, N.T. (1989). Effect of Nucleotide sequences directly downstream from the AUG on the expression of bovine somatotropin in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 17 (8). 3179-3197.
104. Tschopp J.F., Sverlow G., Kosson R., Craig W., y Grinna L. (1987). High Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 5:1305-1308.
105. U.S. dairy indust. At a crossroad: biotech & pol...part 1 of 5 (1993). Collection; new technology. Congress of the United States, Office Of Technology Assessment. Fuente: The Biotechnology Information Center (<http://www.nal.usda.gov/bic/>)
106. Vallette, F., Mege, E., Reiss, A. y Adenik, M. (1988). Construction of mutant and chimeric genes using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*. Vol. 17. Number 2. 723-733.
107. Vedvik, T., Buckholz, R.G., Engel, M., Urcan, M., Kinney, J., Provo, S., Siegal, R.S. y Thill, G.P. (1991). High-Level Secretion of Biologically Active Aprotinin from the Yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology*. 1, 197-202.
108. Vernon, R.G. (1989), "Influence of Somatotropin on Metabolism," *Use of Somatotropin in Livestock Production*, K. Sejrsen, M. Vestergaard, and A. Neimann-Sorensen (eds.) (New York, NY: Elsevier Applied Science), pp. 31-50.
109. Vize, P. D., y Wells, J. R. (1987). Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene. *Gene*. 55 (2-3): 339-344.
110. Voza L.A., Wittwer L., Higgins D.R., Purcell T.J., Bergseid M., Collins-Racie L.A., LaValle E.R., y Hoeffler J.P. (1996). Production of a Recombinant Bovine Enterokinase catalytic Subunit in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* 14: 77-81.
111. Wallis, O. C., y Wallis, M. (1989). Production of plasmids giving high expression of recombinant DNA-derived ovine growth hormone variants in *Escherichia coli*. , 250, 371-376.
112. Watson, N., y Olson, E.R. (1990) Point mutations in a pBR322-based expression plasmid resulting in increased synthesis of bovine growth hormone in *Escherichia coli*. *Gene*. 86 (2): 137-144.
113. Wuebbens M W., Roush E D., Decastro C.M. y Fierke C A (1997). Cloning, Sequencing and Recombinant expression of the Porcine inhibitor of Carbonic Anhydrase: A Novel Member of the Transferrin Family. *Biochemistry*. 36: 4327-4336.
114. Zaret, K.S. y Sherman, F. (1984). Mutationally altered 3' ends of yeast CYC1 mRNA affect transcript stability and translational efficiency. *J. Mol. Biol* 177 107-136.
115. Zhu A., Monahan C., Zhang Z., Hurst R., Leng L. y Goldstein J. (1995) High-Level Expression and Purification of Coffee Bean  $\alpha$ -Galactosidase Produced in the Yeast *Pichia pastoris*. *Arch of Biochem and Biophys*. 324: 65-70.
116. Zoller, M.J. y Smith, M. (1983). Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol*. 100, 486-500.



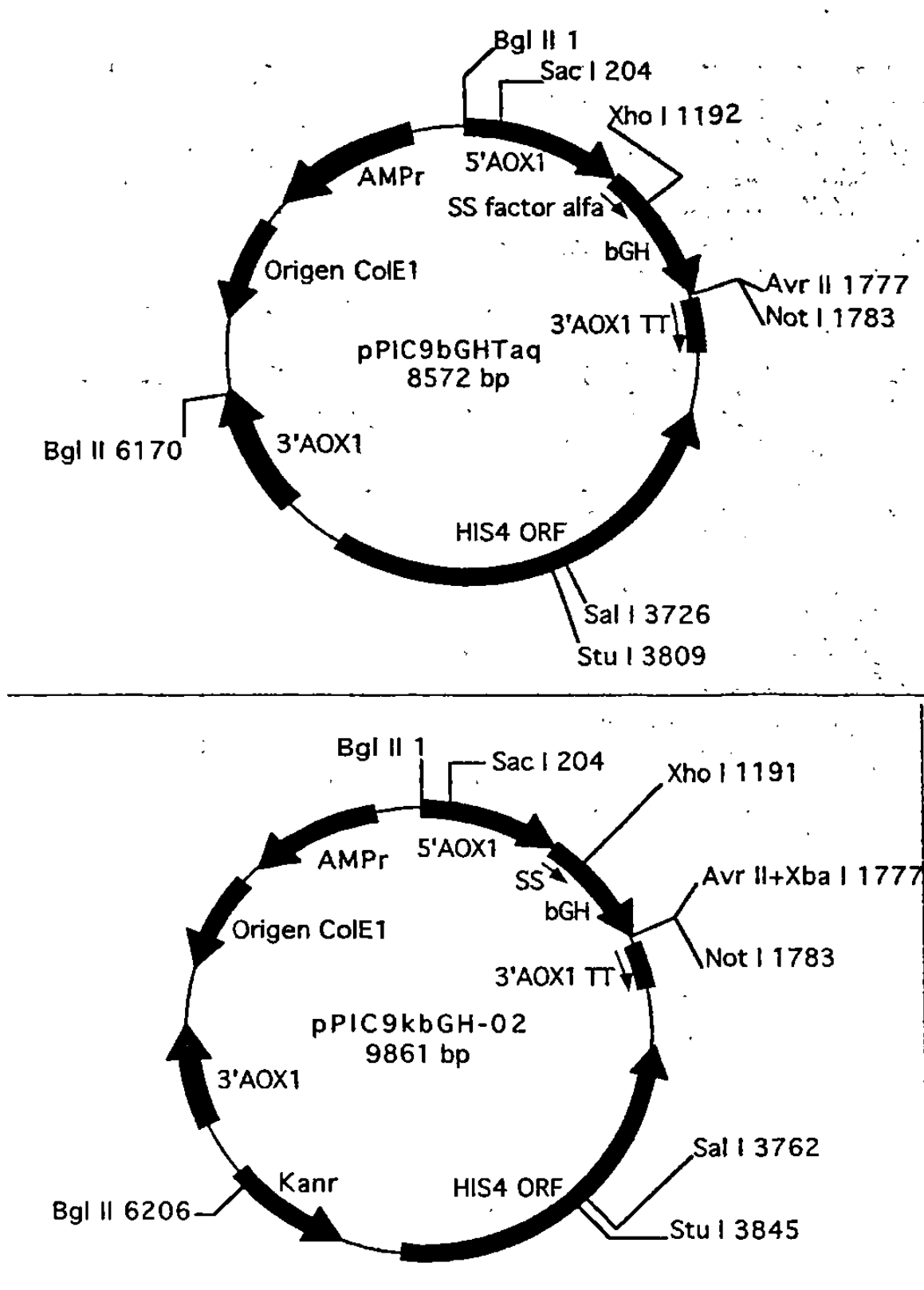
APÉNDICE A

Ontogenia de los Vectores Construidos.



## APÉNDICE B

## Mapas Gráficos de los Vectores Construidos; pPIC9bGHTaq y pPIC9KbGH-02.



## APÉNDICE C

Secuencia del *RNAm* Teórico Producto del Cassette de Expresión pPIC9bGHTaq y pPIC9kbGH-02.Secuencia teórica del *RNAm* producto del cassette de expresión pPIC9bGHPfuACAGCA ATATATAAAC AGAAGGAAGC TGCCCTGTCT  
Oligonucleótido 5' AOX1TAAACCTTTT TTTTATCAT CATTATTAGC TTA~~CTTT~~CAT AATTGCGACT GGTTCCAATT GACAAGCTTTTGATTTTAAC GACTTTTAAC GACA~~ACTT~~GGA GAAGATCAAA AAACA~~ACTAA~~ TTATTCGAAG GATCCAAACG  
Inicio de la secuencia señal del factor  $\alpha$ ▶ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCA GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT  
Met arg phe pro ser ile phe thr ala val leu phe ala ala ser ser ala leu ala alaCCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT  
pro val asn thr thr thr glu asp glu thr ala gln ile pro ala glu ala val ile glyTAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT  
tyr ser asp leu glu gly asp phe asp val ala val leu pro phe ser asn ser thr asn  
Oligonucleótido del Factor  $\alpha$ AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA  
asn gly leu leu phe ile asn thr thr ile ala ser ile ala ala lys glu glu gly val

Sitio de corte para la peptidasa señal

TCT CTC GAG AAA AGA ~~AGA~~ cca gcc atg tcc ttg tcc ggc ctg ttt gcc aac gct gtg ctc  
ser leu glu lys arg phe pro ala met ser leu ser gly leu phe ala asn ala val leu  
Codon inicial del DNAc de bGHcgg gct cag cac ctg cat cag ctg gct gct gac acc ttc aaa gag ttt gag cgc acc tac  
arg ala gln his leu his gln leu ala ala asp thr phe lys glu phe glu arg thr tyratc ccg gag gga cag aga tac tcc atc cag aac acc cag gtt gcc ttc tgc ttc tct gaa  
ile pro glu gly gln arg tyr ser ile gln asn thr gln val ala phe cys phe ser gluacc atc ccg gcc ccc acg ggc aag aat gag gcc cag cag aaa tca gac ttg gag ctg ctt  
thr ile pro ala pro thr gly lys asn glu ala gln gln lys ser asp leu glu leu leucgc atc tca ctg ctc ctc atc cag tcg tgg ctc ggg ccc ctg cag ttc ctc agc aga gtc  
arg ile ser leu leu leu ile gln ser trp leu gly pro leu gln phe leu ser arg valttc acc aac agc ttg gtg ttt ggc acc tcg gac cgt gtc tat gag aag ctg aag gac ctg  
phe thr asn ser leu val phe gly thr ser asp arg val tyr glu lys leu lys asp leugag gaa ggc atc ctg gcc ctg atg cgg gag ctg gaa gat ggc acc ccc cgg gct ggg cag  
glu glu gly ile leu ala leu met arg glu leu glu asp gly thr pro arg ala gly glnatc ctc aag cag acc tat gac aaa ttt gac aca aac atg cgc agt gac gac gcg ctg ctc  
ile leu lys gln thr tyr asp lys phe asp thr asn met arg ser asp asp ala leu leuaag aac tac ggt ctg ctc tcc tgc ttc cgg aag gac ctg cat aag acg gag acg tac ctg  
lys asn tyr gly leu leu ser cys phe arg lys asp leu his lys thr glu thr tyr leu

Codón de terminación

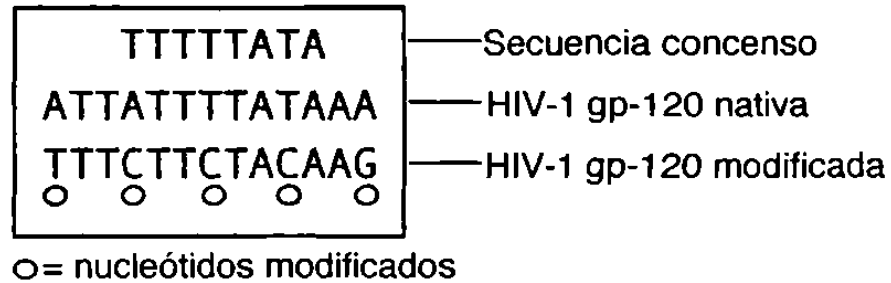
agg gtc atg aag tgc cgc cgc ttc ggg gag gcc agc tgc gcc ttc tag  
arg val met lys cys arg arg phe gly glu ala ser cys ala phe AMBCCTAGGGCGG CCGGAATTA ATTGCCTTA GACATGACTG TTCTCAGTT CAAGTTGGGC ACTTACGAGA  
Oligonucleótido 3' AOX1

AGACCGGTCT TGCTAGATTC TAATCAAGAG GATGTCAGAA TGCCATTTGC CTGAGAGATG CAGGCTTCAT

TTTTGATACT TTTTATTG TAACCTATAT AGTATAGGAT TTTTTTGTIC A

## APÉNDICE D

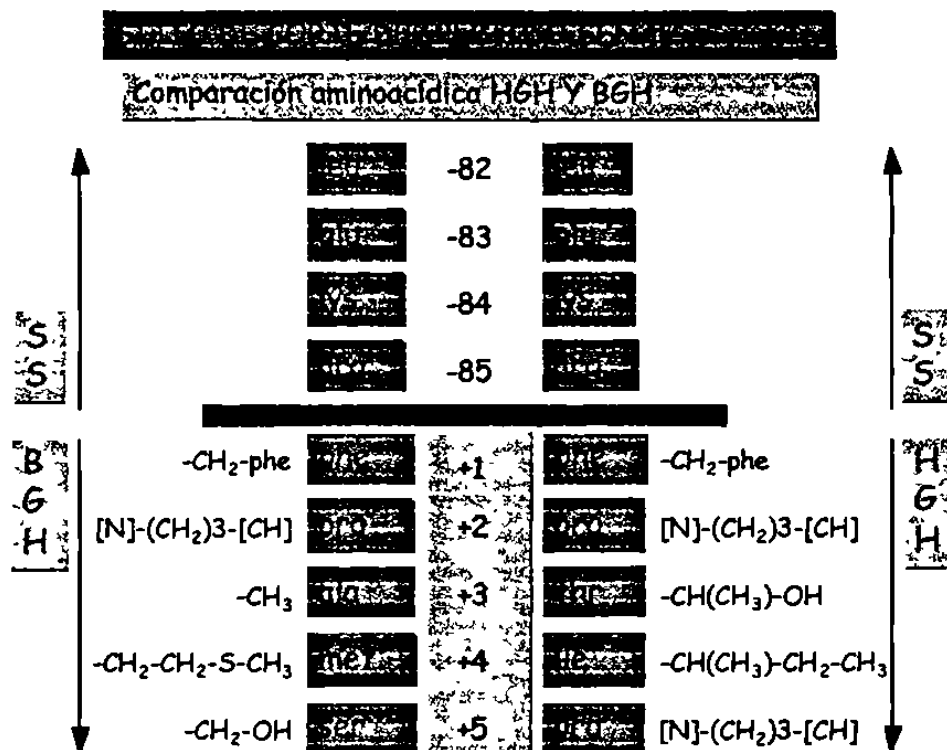
### Secuencia Codificante de *HIV-1 gp120* que Emula la Señal de Terminación de la Transcripción en *P. pastoris*.



Secuencia codificante de *HIV-1 gp120* que bloquea la transcripción en *P. pastoris*, pero no en *S. cerevisiae*. Se ilustra la secuencia modificada y la secuencia consenso también.

## APÉNDICE E

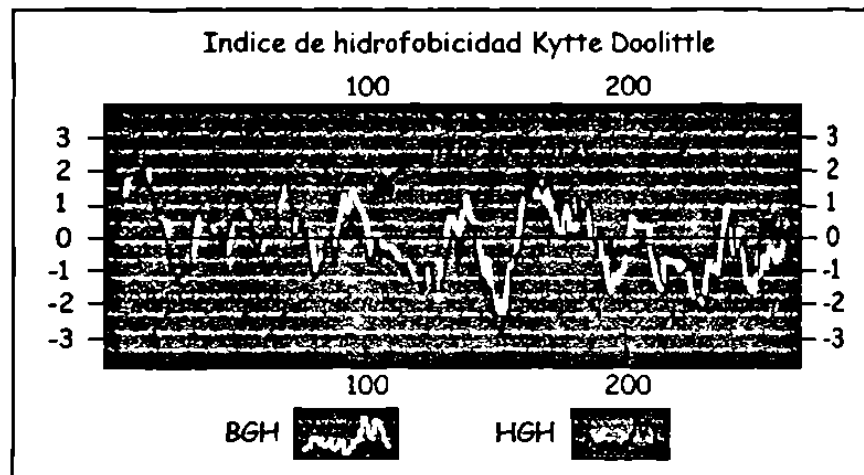
## Hidrofobicidad de los Sitios de Corte para KEX2.



Comparación aminoacídica del sitio de reconocimiento para la *peptidasa señal* creados en las construcciones: *secuencia señal del factor alfa + bGH*, y para *secuencia señal del factor alfa + hGH22K*, lo único que se observó fue una diferencia de cargas en los aminoácidos del *N-terminal* de *BGH* y el *N-terminal* de *HGH22K*, la cual podría influir en el anclaje de la *peptidasa señal*.

Se analizaron los aminoácidos del extremo *N-terminal* codificante en el *DNAc* de *hGH22Kr* y en la *bGHr*, involucrados en la formación del sitio de reconocimiento para la *peptidasa señal*, con lo cual no se pudo concluir un impedimento estérico, debido a la semejanza con *HGH22Kr*. Las cargas de los aminoácidos en cuestión presentaron diferencias en los extremos *N-terminal* de *HGH22Kr* y *BGHr*.





Analizando el índice de hidrofobicidad del sitio de reconocimiento para la *peptidasa señal*, se encontró diferencia del índice de hidrofobicidad en el sitio creado para *BGH* en comparación con el de *HGH22K*.

Este análisis así como la construcción de las secuencias aminoácidas de fusión fue realizado en el DNA Strider 1.1. La gráfica de Kyte Doolittle es la estimación de la energía de cambio (energía libre de transferencia) para la movilidad de residuos hidrofóbicos en un solvente como el agua. La energía libre de transferencia es muy exergónica para residuos polares cargados y muy endergónica para aminoácidos con cadenas hidrocarbonadas alifáticas y aromáticas. Para estimar la hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos, se suma las energías libres de transferencia para estos residuos obteniéndose el índice de hidropatía de esa región (Lehninger *et al.*, 1993).

Se nota claramente el cambio de movilidad entre los residuos de los aminoácidos de la secuencia señal (señalados con flechas) y sus secuencias de fusión (*hGH22k* y *bGH*).

## APÉNDICE F

### **Características Generales de las Secuencias Señal:**

- a) Longitud de 13 a 36 aminoácidos.
- b) La parte amino-terminal de la secuencia señal contiene por lo menos un aminoácido de carga positiva.
- c) El núcleo de la secuencia señal está constituido por un centro muy hidrofóbico de 10 a 15 aminoácidos. La sustitución de un aminoácido no polar de este núcleo hidrofóbico por un aminoácido eléctricamente cargado destruye normalmente la actividad orientadora de la secuencia señal. Los aminoácidos más frecuentes de esta región son: alanina, leucina, valina, isoleucina y fenilalanina.
- d) Generalmente el punto de escisión se sitúa al extremo carboxilo-terminal y está precedido de una secuencia de unos 5 aminoácidos más polares que los del núcleo hidrofóbico. Sin embargo, el residuo anterior al punto de escisión (-1 hacia el extremo amino-terminal) y el situado en la posición -3 tienen cadenas laterales cortas y neutras. El aminoácido más frecuente en estas posiciones es la alanina, aunque también se encuentra en ellas cisteína, treonina, serina y glicina (Gallardo H, 1995).

## APÉNDICE G

### Preparación de Reactivos y Medios

#### EDTA 500 mM pH 8.

Agregar 186.1 g de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O a 800 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8 con NaOH 10 N y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min.

#### NaOH 10 N

Disolver 40 g de NaOH y aforar a 100 mL con agua destilada estéril.

#### Tris-HCl 2 M pH 8

Disolver 242.2 g de Trisma en 700 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con HCl y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min.

#### TE 100X pH 8 (EDTA 100 mM, Tris-HCl 1 M)

Para preparar 100 mL mezclar 50 mL de Tris-HCl 2 M pH 8 y 20 mL de EDTA 500 mM pH 8. Aforar a 100 mL con agua destilada. Autoclavear 20 min (Para preparar una solución de trabajo efectúe una dilución 1:100).

#### Solución I (50 mM glucosa 25 mM Tris-HCl (pH 8) 10 mM EDTA 4 mg/mL de lisozima)

Para 100 mL disolver 0.9 g de glucosa, añadir 1.25 mL de Tris-HCl 2M y 2 mL de EDTA 500 mM. Autoclavear 20 min.

#### Solución II (0.2 N NaOH 1 % SDS)

Para 100 mL, agregar 2 mL de NaOH 10 N y 10 mL de SDS 10 %. Aforar a 100 mL con agua destilada. Esta solución se emplea recién preparada.

#### Solución III (7.5 M Acetato de amonio pH 7.8)

Pesar 57.8 g de acetato de amonio y disolver en 100 mL de agua destilada estéril.

#### Medio LB (1 % Triptona, 0.5 % Extracto de levadura, 1 % NaCl, pH 7.0)

Para 1 L disolver: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl en 950 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con NaOH y aforar a 1 L. Autoclavear 20 min. enfriar a 55°C y añadir los antibióticos deseados. Almacenar a temperatura ambiente o a 4°C.

#### 10X YNB (13.45 % de base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio sin aminoácidos)

Disolver 134 g de base nitrogenada de levadura (YNB) con sulfato de amonio sin aminoácidos en 1 L de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

#### 500X B (0,02 % biotina)

Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

#### 100XH (0.4 % histidina)

Disolver 400 mg de L-histidina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

#### 10X D (20 % dextrosa)

Disolver 200 g de D-glucosa en 1 L de agua destilada, autoclavear por 15 min o esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

**10X GY (10 % glicerol)**

Mezclar 100 mL de glicerol con 900 mL de agua. Esterilizar por filtración o autoclave. guardar a temperatura ambiente. La vida media de esta solución es mayor de un año.

**100X AA (0.5 % de cada aminoácido)**

Disolver 500 mg de cada aminoácido: ácido L-glutámico, L-metionina, Hisina, L-leucina y L-isoleucina en 100 mL de agua destilada y esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C. La vida media de esta solución es de un año.

**Amortiguador de fosfato de potasio 1 M pH 6.0.**

Combinar 132 mL de 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 868 mL de 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Confirmar el pH (si es necesario ajustar con ácido fosfórico o KOH). Esterilizar por autoclave y almacenar a temperatura ambiente. La vida media de esta solución es mayor de un año.

**YPD (1 % extracto de levadura 2 % peptona 2 % Dextrosa 20 g/L de agar)**

Para preparar 1 L, agregar 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona a 900 mL de agua destilada. Si se van a preparar placas, incluir 20 g de agar. Autoclavear 20 min en ciclo líquido. Agregar 100 mL de 10XD. El medio líquido se almacena a temperatura ambiente. las placas se guardan a 4°C. Duran varios meses.

**RDB (Medio de Regeneración-Dextrosa)**

1 M Sorbitol, 1 % Dextrosa, 1.345 YNB, 4 X 10<sup>-5</sup> % Biotina, 0.005 % Aminoácidos.

Disolver 186 g de sorbitol en 700 mL de agua. Para preparar placas añadir 20 g de agar. Autoclavear 20 min en un ciclo líquido. Enfriar y mantener a 45°C.

Preparar una solución precalentada a 45°C de una mezcla de las siguientes soluciones stock:

100 mL de 10X D, 100 mL de 10 X YNB, 2 mL de 500X B, 10 mL de 100X AA, 88 mL de agua destilada estéril. Añadir a la solución de sorbitol.

Para preparar RDBH añadir además 10 mL de 100X H a la mezcla precalentada.

Para preparar top agarosa añadir 10 g de agarosa con el sorbitol, mantener la solución autoclaveada a 60°C en un baño de agua antes de la adición de la mezcla precalentada. Durante la transformación usar una solución fundida a 45°C.

**BMG (Medio mínimo amortiguado con Glicerol)**

100 mM de Amortiguador de potasio, pH 6.0, 1.34 % de YNB, 4 X 10<sup>-5</sup> % de Biotina, 1 % de glicerol  
Mezclar 700 mL de agua destilada, 100 mL de Amortiguador de fosfatos pH=6.0, y 100 mL de glicerol 10X. Esterilizar por autoclave y después agregar 100 mL de YNB 10X y 2 mL de biotina 500X. Almacenar a 4°C, la vida media es de un año.

**BMM (Medio mínimo amortiguado con metanol)**

100 mM de Fosfato de potasio, pH 6.0, 1.34 % de YNB, 4 X 10<sup>-5</sup> % de Biotina, 0.75 % de Metanol  
Mezclar 792.5 mL de agua destilada y 100 mL de Amortiguador de fosfatos pH=6.0. Esterilizar por autoclave y después agregar 7.5 mL de metanol, 100 mL de YNB 10X y 2 mL de biotina 500X. Almacenar a 4°C, la vida media es de un año.

**MD y MDH (Medio Mínimo Dextrosa ± Histidina)**

1.34 % de YNB, 4 X 10<sup>-5</sup> % de Biotina, 1 % de Dextrosa

Autoclavear 800 mL de agua destilada y enfriar a 60°C. Agregar 100 mL de YNB 10X, 2 mL de biotina 500X y 100 mL de Dextrosa 10X. Para preparar MDH añadir 10 mL de 100XH, mezclar y almacenar a 4°C. Para preparar placas agregar 15 g de Agar antes de esterilizar el agua.

**1.5 M Tris-HCl pH 8.8**

Disolver 18.2 g de tris base en 80 ml de agua y ajustar el pH a 8.8 con HCl. Aforar a 100 ml.

**Acilamida-bisacrilamida**

30 g de acrilamida y 0.8 g de bisacrilamida y aforar a 100 ml.

**0.5 M Tris-HCl pH 6.8**

Disolver 6.1 g de tris base en 80 ml de agua y ajustar el pH a 6.8 con HCl. Aforar a 100 ml.



**SDS 10%**

10 g de SDS aforar a 100 ml.

**Buffer de muestra 2X:**

Agua 4.8 ml

0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1.2 ml

SDS 10% 2 ml

Glicerol 1 ml

Azul de bromofenol 0.5% 0.5 ml

Antes de usarse añadir 50 ml de  $\beta$ -mercaptoetanol a 950 ml de la mezcla anterior.

**Persulfato de amonio 10%**

50 mg a 500  $\mu$ l de agua destilada.

**Buffer de corrida 5X**

1 lt

Tris 15 g

Glicina 72 g

SDS 5 g

Aforar a 500 ml y verificar el pH (8.3  $\pm$  0.2). No ajustar.

De aquí se prepara 1X 200 ml a 1 lt. De ser posible no ajustar el pH.

**Solución fijadora**

Metanol 50% y ácido acético 10%.

500 ml de metanol + 100 ml de ácido acético y aforar a un litro con agua destilada.

**Solución colorante de Coomassie**

Azul brillante de Coomassie G 0.05%, Metanol 50%, ácido acético 10%.

Azul brillante de Coomassie G 0.25 g, Metanol 500 ml, ácido acético 100 ml. Aforar a un litro con agua destilada

**Solución decolorante**

Metanol 5%, ácido acético 7%.

50 ml de metanol + 70 ml de ácido acético aforar a 1 litro con agua destilada.

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

**Biólogo Hugo Leonid Gallardo Blanco**

**Candidato para el Grado de  
Maestro en Ciencias con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Tesis:** CONSTRUCCION DE CEPAS DE *Pichia pastoris* PORTADORAS DEL DNAc DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO BOVINO.

**Campo de Estudio:** Biotecnología

**Biografía:**

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo Leon el 12 de Junio de 1971, hijo de Hugo F. Gallardo González y Elvira Blanco Flores.

**Educación:** Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas (1989-1993), grado obtenido Biólogo, Título de tesis de licenciatura: Mutagénesis Sitio-Dirigida en la secuencia señal de la proteína de unión a maltosa (MBP), presentada en Junio de 1995.

**Experiencia Profesional:**

**Ayudante de Investigador Nacional Nivel III desde Septiembre de 1998 en el Depto. de Bioquímica de la ULIEG.**

**Trabajos Presentados en Congresos:**

- 1) "Detección molecular de brucella melitensis en caprinos". XI encuentro de investigación biomédica. Facultad de Medicina, UANL. Mty N.L. Oct. 1993.
- 2) Colaborador en el curso practico internacional de biología molecular en medicina (octubre 10 al 14, de 1994). ULIEG, Depto de Bioquímica, Fac. de Medicina, UANL.
- 3) "Mutagénesis sitio-dirigida en la secuencia señal de la proteína de unión a maltosa". XIII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, 23 de octubre de 1995. ULIEG, Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.
- 4) "Construcción de cepas de *Pichia pastoris* sobreproductoras de *hormona recombinante del crecimiento bovino*" (57). Exposición oral. XV Congreso Nacional de Investigación Biomédica, 21 de octubre de 1997. ULIEG, Depto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.



