

4.9 Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K

Una vez comprobada la expresión de HGH 20K, se procedió a la selección de la clona sobreproductora de HGH 20K.

Se eligieron 19 clonas al azar para realizar los ensayos de fermentación e inducción, teniendo en cuenta de seleccionar un mínimo de dos clonas por cada concentración de antibiótico probada. En este ensayo solo se incluyeron clonas de *P. pastoris* que fueron transformadas con el vector pPIC9khGH20K digerido con *Sal I*, ya que fueron las que presentaron las colonias más vigorosas y además crecieron en todas las dosis probadas. La Figura 28 muestra un ejemplo de las cinéticas de crecimiento encontradas en 5 de las clonas analizadas.

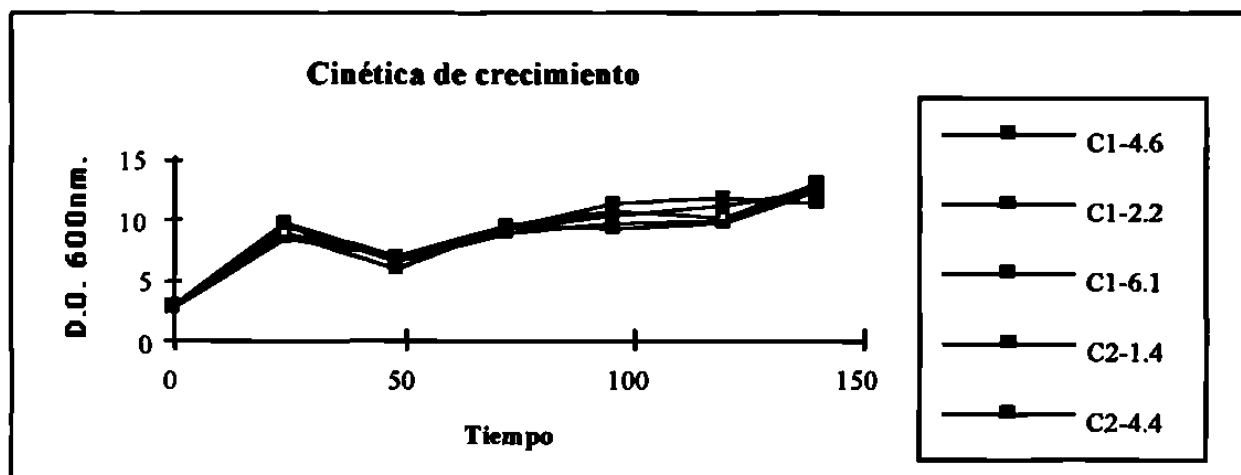


Figura No 28.- Cinética de crecimiento. Muestra un ejemplo de las cinéticas de crecimiento encontradas en 5 de las clonas analizadas.

Las 19 clonas recombinantes que fueron analizadas para seleccionar la clona sobreproductora, produjeron y secretaron HGH 20K. En la Figura 29 se muestra el análisis electroforético en gel de poliacrilamida donde se observa una banda de 20K. En este ensayo se utilizó la clona GS115pPIC9K-Sa/ I como control de expresión negativo bajo las mismas condiciones de fermentación que las demás clonas analizadas. Se puede apreciar que la expresión del gen heterólogo HGH 20K en cada una de las clonas analizadas es variable, así como en cual de ellas la banda de HGH 20K es más notoria.

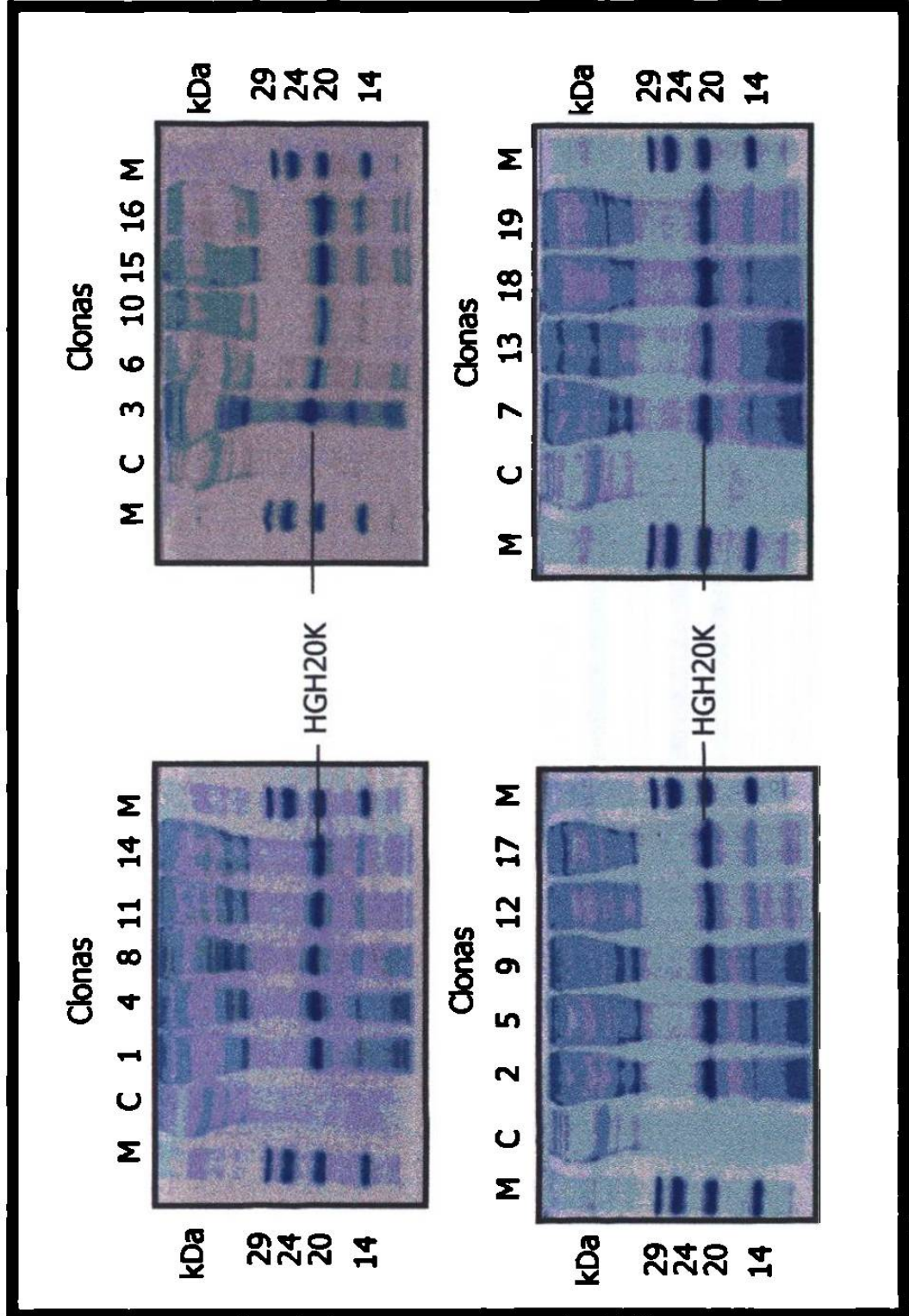


Figura 29.-Análisis electroforético en gel de poliacrilamida de proteínas presentes en los medio de cultivo. M, marcador de peso molecular de proteínas; C, Medio de cultivo de células transformadas solo con el vector (pPIC9K) e inducidas con metanol; los números representan las 19 clonas diferentes analizadas.

La concentración de proteínas totales del medio de cultivo presentó una variación entre 16.61 a 38.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La Figura 30 muestra una gráfica de los valores de proteínas totales encontrados. Se puede observar que las clonas en las cuales se encontraron finalmente los valores mas altos de producción de HGH 20K (barras oscuras) no fueron las clonas en las cuales se encontraron los valores mas altos de proteínas totales.

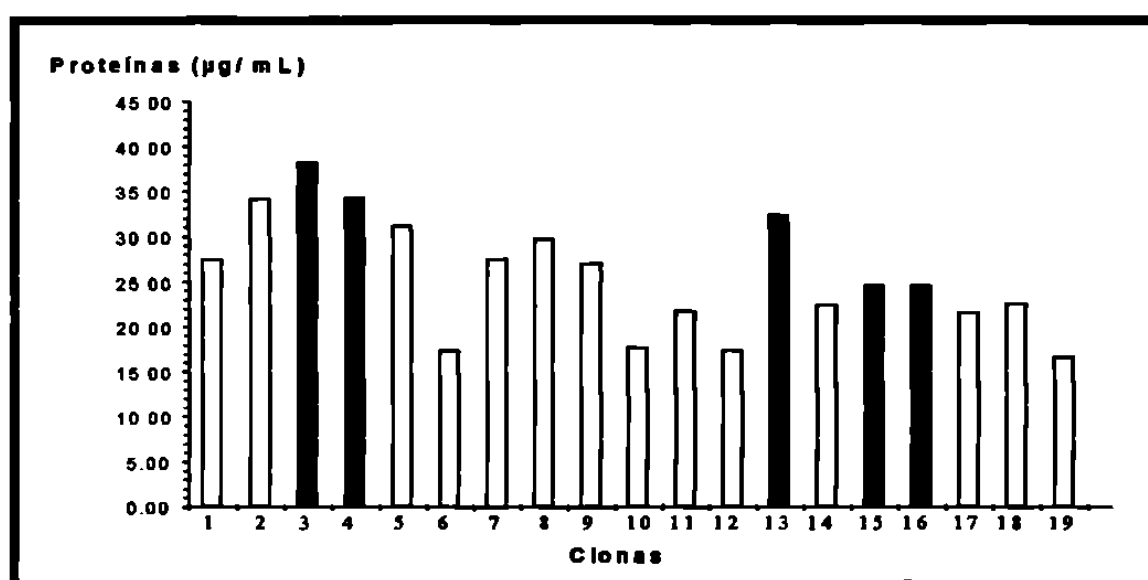


Figura No 30.- Determinación de proteínas totales de las 19 clonas analizadas. La determinación de proteínas totales se efectuó mediante el método de Bradford. Las barras oscuras corresponden a las 5 clonas que resultaron ser mejores productoras de HGH 20K, además se puede observar que estas clonas no presentaron los niveles más altos de proteínas totales. Los niveles totales de proteínas variaron entre 16.61 a 38.19 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El porcentaje relativo de HGH 20K con respecto a las proteínas totales, obtenido por el análisis densitométrico mediante el sistema de fotodocumentación Gel DOC 1000 de Bio Rad, varió entre 21.1 y 64.1% (Figura 31).

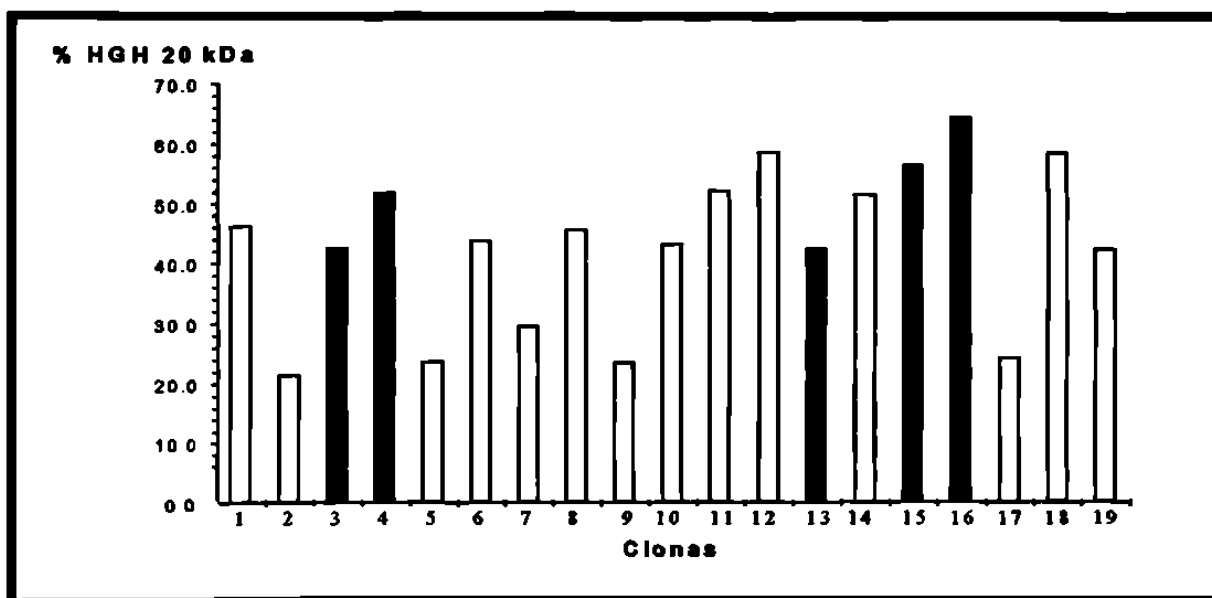
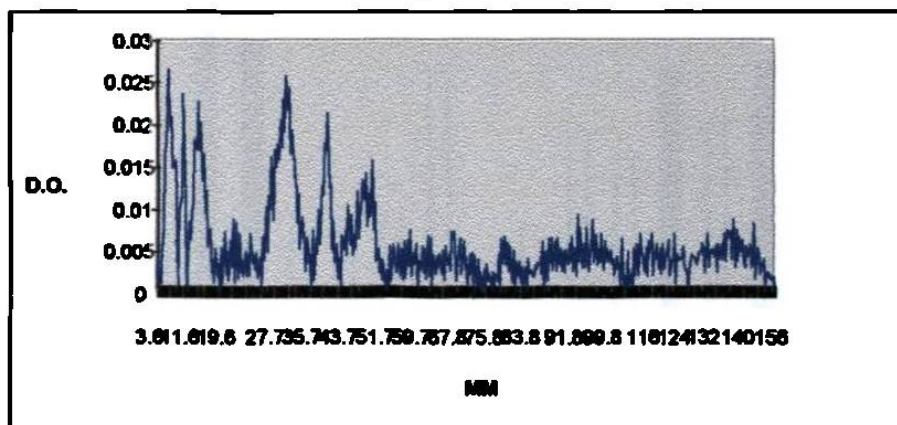


Figura No 31.- Porcentaje de HGH 20K respecto a las proteínas totales en el medio de cultivo. La determinación del porcentaje de HGH 20K con respecto a las proteínas totales se realizó mediante el sistema de fotodocumentación Gel DOC 1000 de Bio Rad. Estos porcentajes de HGH 20K variaron entre 21.1 y 64.1% . Las barras oscuras corresponden a las 5 clonas que resultaron ser mejores productoras de HGH 20K, además se observa que estas clonas no fueron las de mayor % relativo con respecto a las proteínas totales.

En la Figura 32 se muestran dos densitogramas; el superior representa las proteínas del medio de cultivo de células transformadas con el vector pPIC9K (sin el cassette de expresión, clona GS115pPi9cK [C3-6.6], ver Anexo 2), e inducidas con metanol; el inferior representa las proteínas del medio de cultivo de células transformadas con el vector pPIC9KhGH20K (portador del cassette de expresión para HGH 20K, clona GS115HGH20K-Sa/ I-2 [C1-1.2], ver Anexo 2), e inducidas con metanol. El pico sobresaliente del densitograma inferior corresponde a la banda de 20K identificada como HGH 20K. Estos son solo un ejemplo de los densitogramas obtenidos durante el análisis.

Células transformadas con pPIC9K e inducidas con metanol



Células transformadas con pPIC9KhGH20K e inducidas con metanol

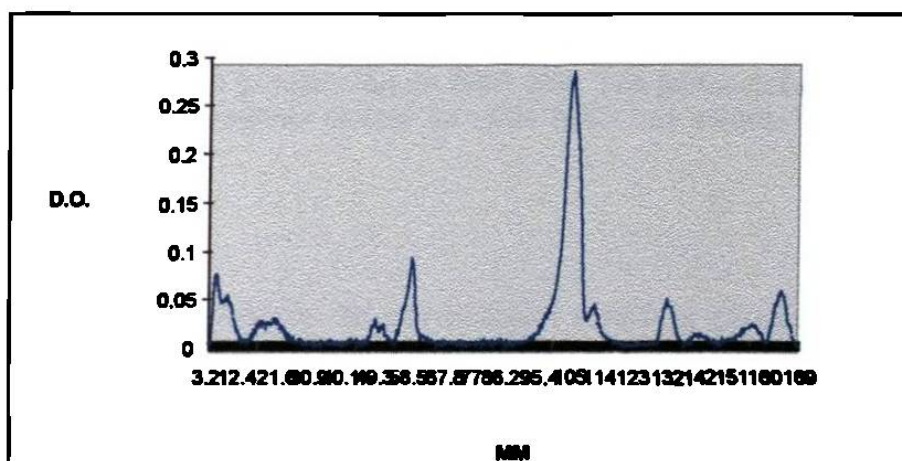


Figura No 32.- Análisis densitométrico de las proteínas de los medios de cultivo fermentados . El densitograma superior muestra el patrón de picos obtenido a partir de medio de cultivo de células inducidas transformadas con el vector pPIC9K, sin el cassette de expresión (clona GS115pPIC9K-Sa/ I). El densitograma inferior muestra el patrón de picos obtenido a partir de medio de cultivo de células inducidas transformadas con el plásmido pPIC9KhGH20K, portador del cassette de expresión para HGH 20K (clona GS115HGH20K-Sa/ I-2). Nótese el pico sobresaliente correspondiente a la expresión de HGH 20K.

La producción de HGH 20K tuvo valores de 5.13 a 17.63 mg/L. La Figura 33 muestra los resultados obtenidos de este ensayo, donde se resaltan con barras negras las clonas en las cuales se encontró mayor producción de HGH 20K.

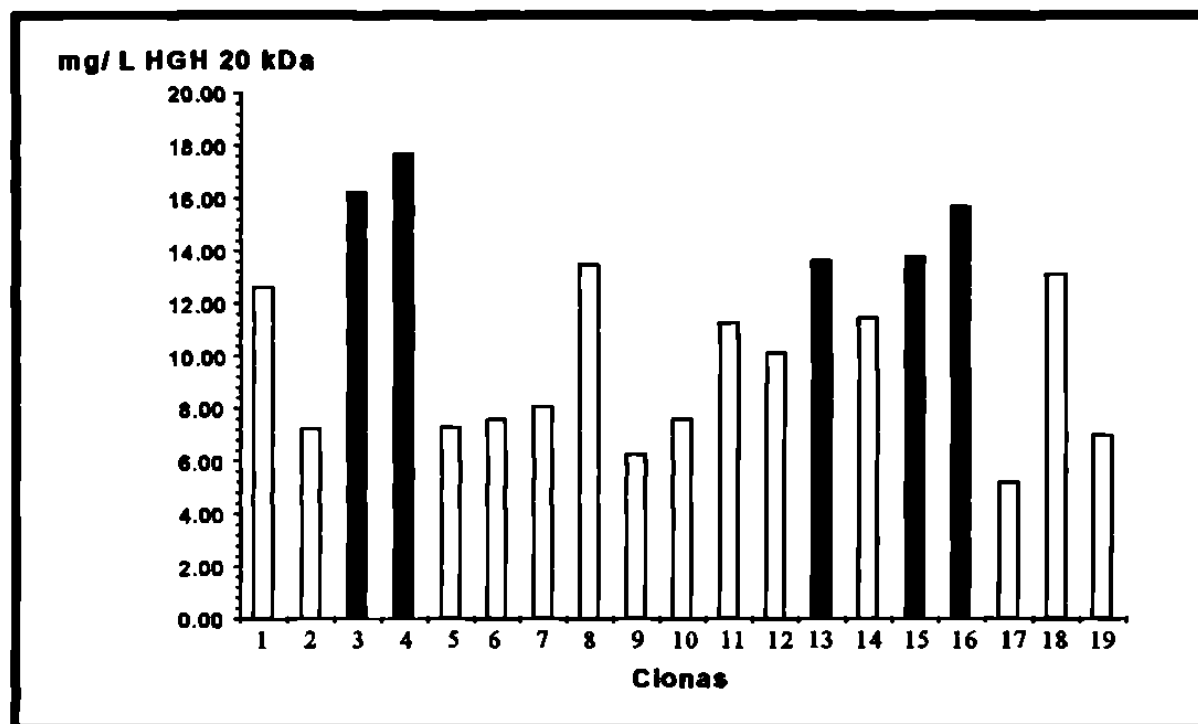


Figura No 33.- Niveles de producción de HGH 20K. Las barras oscuras corresponden a las 5 clonas que produjeron mayores niveles de HGH 20K. Los valores de producción variaron entre 5.13 a 17.63 mg/mL.

Se realizó un análisis de correlación entre la producción de HGH20K producida y el nivel de resistencia a G418, encontrando en este caso que no existe correlación alguna, ya que no existe linealidad entre la producción de HGH 20K y el aumento en la dosis del antibiótico G418 (Figura 34)

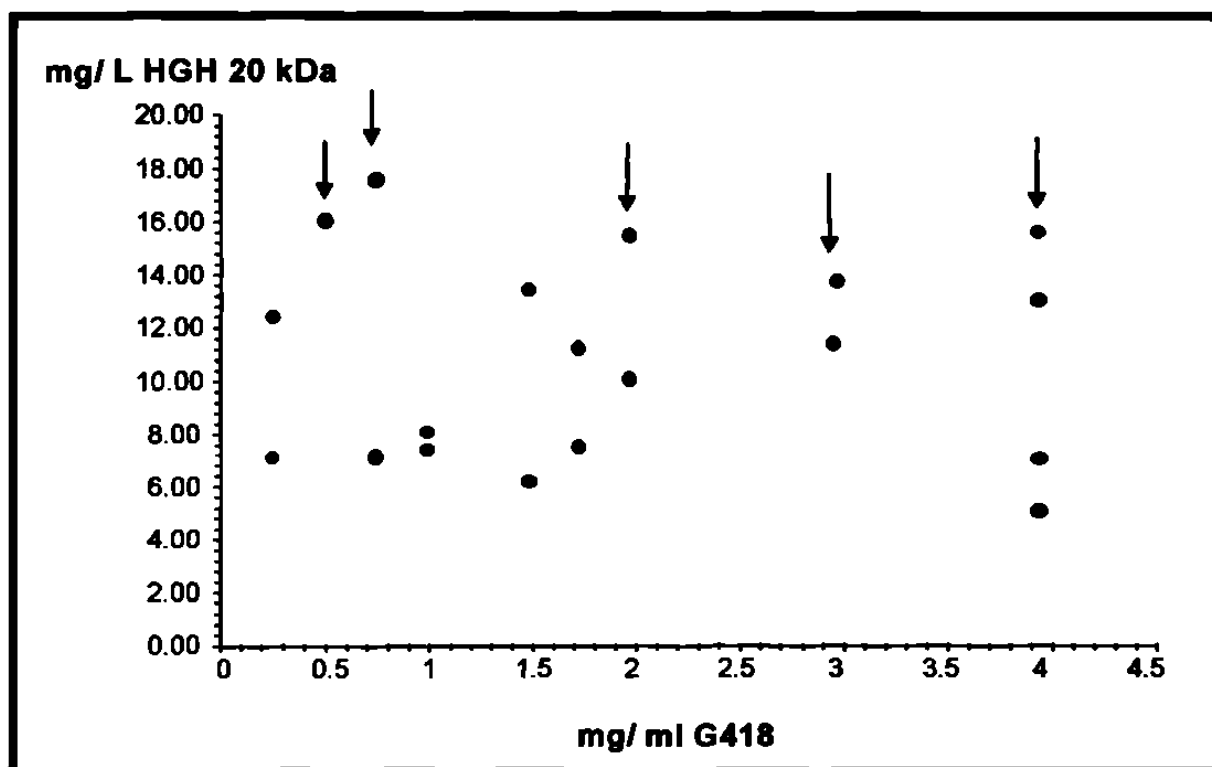


Figura No 34.- Correlación de la concentración inhibitoria de G418 y la producción de HGH 20K. Los resultados muestran que no existe correlación alguna entre el nivel de producción de HGH 20K con respecto a la concentración de G418, ya que las cepas de mayor producción de HGH 20K se encuentran distribuidas en las diferentes concentraciones de G418, tal como se muestra en el gráfico donde las clonas que presentaron mayor producción son indicadas por las flechas.

La Tabla XIII muestra un resumen de los resultados obtenidos con las 19 clonas analizadas en cuanto a la producción de proteínas totales, % relativo de HGH 20K, producción de HGH 20K (mg/L) y DO a 140 h de fermentación. Las clonas C1-4.6, C1-2.2, C1-3.6, C2-1.2 y C2-4.1 (ver Anexo 2) fueron las que presentaron mayores niveles de producción. Los niveles mayores de producción encontrados de HGH 20K variaron entre 13.77 y 17.63 mg/L.

Tabla XIII.- Niveles de producción de HGH 20K de 19 clonas seleccionadas

Muestra (Clona)	G418 mg/mL	Prot. Totales µg/mL.	% Línea Base	mg/L. HGH20k	DO a 140h
C1-5.2	0.25	27.38	45.94	12.58	9.2
C1-5.5	0.25	34.02	21.1	7.18	11.75
C2-1.2	0.5	38.19	42.4	16.19	13.05
C2-4.1	0.75	34.21	51.6	17.63	11.2
C2-5.4	0.75	31.02	23.3	7.23	11
C1-2.5	1.0	17.33	43.5	7.54	11.15
C2-5.3	1.0	27.4	29.2	8.01	11.4
C1-2.4	1.5	29.61	45.3	13.42	14.2
C2-3.1	1.5	26.93	23.1	6.22	14.85
C2-1.1	1.75	17.56	42.9	7.53	12.55
C2-1.3	1.75	21.63	51.9	11.22	15.3
C1-2.6	2.0	17.31	58.3	10.08	14.45
C1-3.6	2.0	32.28	42.1	13.58	16.8
C1-1.2	3.0	22.38	51.1	11.43	13.8
C1-4.6	3.0	24.53	56.2	13.77	12.4
C1-2.2	4.0	24.44	64.1	15.65	11.25
C1-6.1	4.0	21.55	23.8	5.13	12.85
C2-1.4	4.0	22.45	58.1	13.05	13.15
C2-4.4	4.	16.61	41.9	6.95	12.4

Nota: En negritas se resaltan las clonas que presentaron los valores más altos de HGH 20K.

CAPITULO 5

5. DISCUSION

5.1 Construcción del vector pPIC9khGH20K

La construcción de pPIC9KhGH20K involucró necesariamente la construcción de tres plásmidos adicionales: pBS20K, pBSPIC9, y pBSPIC20. La integridad de cada uno de los plásmidos fue corroborada mediante digestiones con un juego de enzimas de restricción diagnósticas. Cada uno de los fragmentos obtenidos en estas digestiones y para cada uno de los plásmidos, fueron los adecuados, ya que los tamaños teóricos (obtenidos por el programa *DNA Strider*) correspondieron a los tamaños obtenidos en los geles de agarosa.

En la última etapa de construcción, la cual daba como resultado la generación de pPIC9KhGH20K, se utilizó una estrategia de construcción diferente, donde los fragmentos implicados en dicha construcción no fueron purificados, y además se utilizaron enzimas adicionales de corte, tal como *Apa I* y *Sna B1* (ligaciones A y B). La diferencia entre estas estrategias de ligación radicó en el momento de la digestión con las enzimas adicionales. En la ligación A el corte adicional con *Apa I* y *Sna B1* se llevó a cabo posterior a la ligación y en la ligación B el corte adicional con estas enzimas se llevó a cabo antes de la ligación (Ver Figura 15). Ambos ensayos estaban diseñados con la

finalidad de seleccionar preferentemente al plásmido recombinante pPIC9KhGH20K, ya que debido a los cortes adicionales serían afectados solo los plásmidos originales (pBSPIC20 y pPIC9K), los cuales por ello no serían capaces de transformar las células de *E. coli* XL1-Blue. Los resultados obtenidos mostraron que en el caso de la ligación B y a pesar de que se obtuvo un número menor de colonias, se obtuvo un mayor número de colonias portadoras de pPIC9khGH20K.

El menor número de colonias obtenidas en la ligación A probablemente se debe a que la digestión con las enzimas adicionales (*Apa* I y *Sna* B1) fue menos eficiente que en la ligación B. En general se obtuvo una eficiencia de construcción del 77.5%, ya que de las 40 clonas analizadas, 31 resultaron positivas; es decir, presentaron el patrón adecuado correspondiente a pPIC9KhGH20K con la enzima de restricción *Pvu* II.

5.2 Transformación de *P. pastoris* con el vector pPIC9KhGH20K

Se obtuvo un total de 300 clonas mediante la técnica de transformación de esferoplastos, de las cuales 103 fueron analizadas mediante su resistencia a G418. A pesar de que la eficiencia de transformación no fue muy buena, ya que se reportan valores entre 10^3 y 10^4 colonias por μg de DNA, el número de colonias obtenido nos permitió llevar a cabo el análisis y selección de la clona sobreproductora de HGH 20K. La integración del gen heterólogo hGH 20K fue corroborada mediante el análisis por PCR. Dicho análisis demostró que a pesar de que no se determinó el número de copias integradas, se tiene la certeza de que al menos una copia del cassette de expresión fue integrado. Además, los resultados mostraron que en la mayoría de las clonas analizadas la inserción se llevó a cabo en el *locus his4*, mediante un evento de simple

entrecruzamiento. Ya que el *locus AOX1* no está involucrado, las clonas analizadas permanecieron con el fenotipo Mut⁺. Estos resultados fueron evidentes al realizar la PCR, con la cual se obtuvieron dos productos amplificados, uno de 1016 pb y otro de 2200 pb. Solo en uno de los casos se observó que hubo reemplazamiento, por la ausencia de la banda de 2200 pb y presencia de la banda de 1016 pb. En algunos de los casos se observó que era más intensa la banda de 1016 pb, lo que nos sugiere que existe la integración de más de una copia del cassette de expresión.

5.3 Selección mediante G418

En el ensayo de selección mediante el antibiótico G418, se encontró que de las 103 clonas analizadas, 51 de ellas fueron capaces de crecer en las diferentes concentraciones probadas. Esto representó el 49.51 %, lo que nos arrojaba un buen número de clonas para realizar la selección mediante la determinación de los niveles de producción. Se encontró que las clonas transformadas con el vector pPIC9KhGH20K digerido con *SaI* I, fueron resistentes a todas las dosis probadas de G418. En cambio, las clonas transformadas con el mismo vector pero digerido con *Dra* I, solo fueron resistentes a 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL de G418.

No se encontró correlación entre la producción de HGH 20K con respecto a la resistencia del antibiótico G418, y las clonas que mostraron mayor producción se encontraban distribuidas a lo largo de todas las dosis probadas.

5.4 Biosíntesis de HGH 20K en *Pichia pastoris*

Todas las clonas analizadas de *P. pastoris* transformadas con el vector pPIC9khGH20K expresaron y secretaron HGH de 20K. Durante el tiempo de inducción fue determinado el crecimiento celular y se encontró que no existía variación del crecimiento celular con respecto a la producción de HGH 20K, ya que todas las clonas analizadas se comportaron de forma similar. Una banda de aproximadamente 20K obtenida en los geles de poliacrilamida del medio de cultivo fue indicativa de la expresión de HGH 20K. La HGH recombinante parece genuina en relación a su tamaño y fue eficientemente secretada al medio de cultivo. Además, se observó variación clonal en cuanto a la producción de HGH 20K. Esto probablemente se deba a que posean diferentes números de copias del cassette de expresión integrado al genoma de la levadura.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar que la proteína mayoritaria en el medio de cultivo en los ensayos de fermentación realizados correspondía a HGH 20K, alcanzándose valores de un 64.1% de la expresión total de proteínas. Se comparó además el tamaño obtenido de HGH 20K con HGH22K (cepa unicopia) obtenidas de fermentaciones realizadas en paralelo, observándose que la diferencia de tamaño entre ellas es aproximadamente el correcto.

5.5 Selección de la cepa sobreproductora

En la selección de la clona sobreproductora de HGH 20K se tomó en cuenta la evaluación de la concentración de HGH 20K secretada hacia el medio de cultivo. La cepa que resultó ser más productora de HGH 20K (C2-4.1) alcanzó valores de proteínas totales de 34.21 $\mu\text{g/mL}$, de los cuales el 51.6 % correspondía a HGH 20K, obteniéndose un valor total de HGH 20K en el medio de cultivo de 17.63 mg/L. Dicha cepa fue capaz de crecer a dosis de hasta 0.75 mg/mL del antibiótico G418.

A pesar de que HGH 22K recombinante ha sido producida en diferentes hospederos con niveles de producción variables que van desde 0.28 mg/L hasta 69.0 mg/L (Escamilla-Treviño, 1996), ofreciendo además cada uno de los sistemas empleados diversas ventajas y desventajas, para el caso de HGH 20K existen muy pocos reportes.

El sistema de producción de HGH 20K en *P. pastoris* desarrollado en este trabajo tiene la ventaja de que esta proteína es producida en niveles relativamente altos y secretada hacia el medio de cultivo, en su forma auténtica de donde puede ser purificada con relativa facilidad. Sin embargo aun son necesarios estudios de actividad biológica y ensayos a nivel fermentador para documentar mejor dicha ventaja del sistema y perfeccionarlo.

Comparando además el sistema de producción desarrollado en este trabajo con otros sistemas ya empleados para la producción de HGH 20K, el sistema de *P. pastoris* tiene claras ventajas. Tal es el caso del sistema de producción en *E. coli* desarrollado por Adelman en 1983, Tinsley en 1986, y Ader en 1987, donde la forma recombinante de HGH 20K contiene un residuo

de metionil extra en el extremo amino, que se cree puede ocasionar un mal plegamiento de la proteína y eventualmente ocasionar rechazo con el uso prolongado de la hormona. También ofrece ventajas sobre el sistema de producción empleado por Uchida en 1997, en el cual HGH 20K es producida en *E. coli* y secretada al espacio periplásmico, obteniendo los mejores rendimientos de producción cuando se coexpresa con glutatión reductasa. En este sistema fue necesario emplear estrategias para incrementar la secreción de HGH 20K hacia el espacio periplásmico, como fue la modificación de la secuencia señal empleada y la coexpresión con la glutatión reductasa, éste último artificio incrementa posiblemente la dificultad de la purificación de HGH 20K.

Así, la ventaja más sobresaliente del sistema empleando a *Pichia pastoris* como hospedero, es que se obtiene HGH 20K secretada en el medio de cultivo con alto grado de pureza, ya que esta levadura secreta muy pocas proteínas endógenas.

Las cepas recombinantes de *Pichia pastoris* HGH 20K construidas en este trabajo producen niveles equivalentes a las cepas previamente construidas portando el DNAc de la variante de HGH 22K (Escamilla-Treviño, 1996; Sánchez-Dominguez, 1998). Además, producen niveles equivalentes a aquellas cepas construidas para otras proteínas que a nivel fermentador producen niveles de proteínas recombinantes económicamente factibles de producción.

CAPITULO 6

6. CONCLUSIONES

1.- Se logró la construcción del vector pPIC9KhGH20K, portador del DNAC de HGH madura, con los elementos genéticos requeridos para su integración en el genoma de *Pichia pastoris* y sobreexpresión.

2.- Se logró la construcción de cepas recombinantes de *P. pastoris* conteniendo en su genoma al menos una copia del DNAC de hGH 20k Da.

3.- Se logró la selección de cepas de *P. pastoris* sobreproductoras de HGH 20K, presentando niveles máximos de producción de hasta 17.63 mg/L de cultivo, representando el 51.5 % de las proteínas totales del medio de cultivo.

4.- Considerando que los niveles de proteína heteróloga obtenida a partir de cultivos en matraces en agitación de *P. pastoris* (tendiendo a ser bajos), a menudo no reflejan los niveles observados en cultivos de fermentador, un incremento del nivel de producción de HGH de 20K sería esperado en un cultivo de fermentador con el sistema de expresión de HGH 20K de *P. pastoris*.

5.- Las cepas de *P. pastoris* construidas pueden ser empleadas para producir grandes cantidades de la isoforma de HGH de 20K para ayudar en estudios futuros.

CAPITULO 7

7. BIBLIOGRAFIA

- Adelman, J. P., Hayflick, J. S., Vasser, M., Seeburg, P. H. (1983). Expression in *E. coli* of the HGH 20kDa obtained by site directed mutagenesis. *DNA*. **2**, 183-193.
- Ader, M., Agajanian, T., Finegood, D. T., Bergman, R. N. (1987). Recombinant deoxyribonucleic acid derived 22K, 20K human growth hormone generate equivalent diabetogenic effects during chronic infusion in dogs. *Endocrinology* **120**, 725-731.
- Barr, K. A., Hopkins, S. A., Sreekrishna, K. (1992). Protocol for efficient secretion of HAS developed from *Pichia pastoris*. *Pharm. Eng.* **12**, 48-51.
- Battista, M. C., Bergamini, G., Campanini, F., Landini, M. P., Ripaldi, A. (1996). Intracellular production of a major cytomegalovirus antigenic protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **176**, 197-201.
- Barrera-Saldaña, H. A., (1998). Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. *Gene*. **211**, 11-18.
- Baumann, G. (1991). Growth Hormone Heterogeneity: Genes, Isohormones, Variants, and Binding Proteins. *Endocrine Reviews*. Vol. 12, No. 4, 424-449.
- Becker, G. W., Hsiung, H. M. (1986). Expresión, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*: Purification and characterization. *FEBS Lett.* **204**, 145-150.
- Birnbaum, R. S., Goodman, H. M. (1976). Studies on the mechanism of the antilipolytic effects of growth hormone. *Endocrinology* **99**, 1336-1345.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brostedt, P., Roos, P. (1988). Isolation of four isomers of the 20,000 dalton variant of human pituitary growth hormone. *Prep Biochem.* **18**, 277-291.
- Buckholz, R. G., Gleeson, M. A. (1991). Yeast system for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology.* **9**, 1067-1072.
- Cab-Barrera. E. L., Barrera-Saldaña, H. A. (1988). Versatile Plasmid vectors for use in studies of eukaryotic gene expression. *Gene.* **70**:411-413.
- Cab-Barrera. E. L., Barrera-Saldaña, H. A. (1989). A General Method to optimize the amount of Enzyme in restriction and DNA modification reactions using the beta Galactosidase Blue-White plaques Assay. *BioTechniques* **7**, 2:132-134.
- Campbell, R. M., Kostyo, J. L., Scanes, C. G. (1990). Lipolytic and antilipolytic effects of human growth hormone, its 20-kilodalton variant, a reduced and carboxymethylated derivative, and human placental lactogen on chicken adipose tissue *in vitro*. *Proc. Soc. Experim. Biol. Med.* **193**, 269-273.
- Castro-Muñozledo, F., Barrera-Saldaña, H. A., Kuri-Harcuch, W. (1999). Proyecto genoma humano en la UANL. Parte V: El papel de la hormona del crecimiento en la diferenciación adipocítica. *Ciencia UANL*. Vol. II, No. 1, 70-78.
- Chang, C. N., Rey, M., Bochner, B., H. H., Gray, G. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. **55**, 189-196.
- Chapman, G. E., Rogers, K. M., Brittain, T., Bradshaw, R. A., Bates, O. J., Turner, C., Cary P. D., Crane-Robinson, C., (1981). The 20,000 molecular weight variant of human growth hormone: preparation and some physical and chemical properties. *J. Biol. Chem.* **256**, 2395-2401.
- Chawla, R. K., Parks, J. S., Rudman, D. (1983). structural variants of human growth hormone, Biochemical, Genetic and Clinical aspects. *Ann. Rev. Med.* **34**, 519-547.

- Clare, J. J., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Sreerikshna, K., Romanos, M. A. (1991a). High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* **9**, 455-460.
- Clewell, D. B., Helinski, D. R. (1970). Properties of a desoxyribonucleic acid-protein relaxation complex and strand specificity of the relaxation event. *Biochemistry* **9**:4428-4440.
- Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., Madden, K. R. (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3376-3385.
- Cregg, J. M., Higgins, D. R. (1995). Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Can. J. Bot.* **73** (Suppl. 1), S891-S897.
- Cregg, J. M., Madden, K. R., (1987). Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption. In "Biological Research on Industrial Yeast" (G. G. Stewart, I. Russell, R. D. Klein, R. R. Hiebsch, eds., Vol 2, pp.1-18. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Cregg, 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., Smiley, B. L., Creze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G., Thill, G. P. (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**, 479-485.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **11**, 905-910.
- Culler, F. L., Kaufman, S., Frigeri, L. G., Jones, K. L. (1987). Comparison of the acute metabolic effects of 22,000-dalton and 20,000-dalton growth hormone in human subjects. *Horm. Metab. Res.* **20**, 107-109.
- DeNoto, F. S., Moore, D. D., Goodman, H. M. (1981). Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* **9**, 3719-3730.

- Digan, M. E., Lair, S. V., Brierley, R. A., Siegel, R. S., Williams, M. E., Ellis, S. B., Kellaris, P. A., Provow, S. A., Craig, W. S., Velicelebi, G., Harpold, M. M., Thill, G. P. (1989) Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **7**,160-164.
- Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M., Gingeras, T. R. (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1111-1121.
- Escamilla-Treviño, L. L. (1996). Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHR) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina U. A. N. L.
- Escamilla-Treviño, L. L., Viader-Salvadó, J. M., Guerrero-Olazarán, M. (1999). Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*. *Ciencia UANL*, Vol II, No. 2, 155-161.
- Fernández, J. M., Hoeffler J. P. (1999). Gene Expression Systems: Using Nature for the art of expression. pp 157-191, Chapter 6. Academic Press. Invitrogen Corporation, Carlsbad California.
- Franchi, E., Maisano, F., Astrua, T. S., Galli, G., Toma, S., Parente, L., de Ferra, F., Grandi G. (1991). A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Biotechnology*. **18**, 41-54.
- Frigeri, L. G., Peterson, S. M., Lewis, U. J., (1979). The 20,000-dalton variant of human growth hormone: Lack of some early insulin-like effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 778-782.
- Goeddel, D. V. (1990). Gene expression technology in: *Methods in Ezymology. Academic Press, Inc. New York, N. Y. U.S.A.* **185**, 485-595.
- Goeddel, D. V., Heyneker, H. L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D. G., Ross, M. J., Miozzari, G., Crea, R., Seeburg, P. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* **281**, 544-548.

- Goodman, H. M., Grichting, G., Coiro, V. (1986). Growth hormone action on adipocytes. In: Human Growth Hormone: Tolman, Raiti, Ed. Plenum Publishing Co., New York, pp. 499-512.
- Grandi, G., Del Bue, M., Cosmina, P., Franchi, E., Toma, S. (1986). Construction and use of expression vector in *B. subtilis*. In: Physiological and Genetic Modulation of Product Formation. Proceedings of an International Symposium. Como (Italy) May 8th-10th, 105, 147-162.
- Hagenson, M. J., Holden, K. A., Parker, K. A., Wood, P. J., Cruze, J. A., Fuke, M. Hopkins, T. R., Stroman, D. W. (1989). Expression of streptokinase in *Pichia pastoris* yeast. *Enzyme Microb. Tecchnol.* 11, 650-656.
- Higgins, D. R. , Cregg, J. M. (1998). *Pichia* Protocols: Methods in Molecular Biology, Human Press, Totawa, N. J.
- Howland, D. S., Farrington, M. A., Taylor, W. D., Hymer, W. C. (1987). Alternative splicing model for the synthesis and secretion of the 20 kilodalton form of rat growth hormone. *Biochem. Res. Commun.* 147, 650-657.
- Hsiung, H. M., Cantarell, A., Luirink, J., Oudega, B., Veros, A. J., Becker, G. W. (1989). Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Biotechnology* 7, 267-271.
- Invitrogen, (1994). *Pichia* Expression Kit Protein Expression: A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Version 3.0. Catalog no. K1710-01.
- Invitrogene, (1996). pPIC9K : A *Pichia* Vector for Multicopy Integration and Secreted Expressión. Version B. Catalog no. V175-20.
- Izquierdo-Rojo, M. (1993). Ingeniería Genética. Ediciones Pirámide S. A. Madrid España.
- Kato, C., Kobayashi, T., Kudo, T., Furusato, T., Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Ohtssukaa, E., Ikeharaa, M., Yanagida, T., Kato, H., Moriyama, S., Horikoshi, K. (1987). Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. 54, 197-202.

- Kerr, D. E., Liang, F., Bondioli, K. R., Zhao, H., Kreibich, G., Wall, R. J., Sun, T.-T. (1998). The bladder as a bioreactor: Urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nature Biotechnology*. Vol. 16, 75-79.
- Koutz, P., Davis, G. R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J., Thill, G. (1989). Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* 5, 167-177.
- Kostyo, J. L. Cameron, Ch. M., Olson, K. C., Jones, A. J., Pai, R. C. (1985). Biosynthetic 20-kilodalton methionyl-human growth hormone has diabetogenic and insulinlike activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4250-4253.
- Kostyo, J. L., Skottner, A., Brostedt, P., Roos, P., Cameron, Ch. M., Forsman, A., Fryklund, L., Adamafio, N. A., Skoog, B. (1987). Biological characterization of purified native 20kDa human growth hormone. *Biochemica et Biophysica Acta*. 925, 314-324.
- Laroche, Y., Storme, V., De meutter, J., messens, J., Lauwereys, M. (1994). High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 12, 1119-1124.
- Lewis, U. J., Bonewald, L. F., Lewis, L. J. (1980). The 20,000-dalton variant of human growth hormone: Location of the amino acid deletion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 511-516.
- Lewis, U. J., Dunn, J. T., Bonewald, L. F. Seavey, B. K., Vander-Laan, W. P. (1978). A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 253, 2679-2687.
- Martínez-Soriano, J. P., Cab-Barrera, E. L., Tamez-González, R. y Leal-Klevezas, D. S. (1993). Detección de *Brucella abortus* por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Bioquímica*. 18,10-16.
- Martínez-Torrez, 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. U. A. N. L.

- McCarter, J., Shaw, M. A., Winer, L., Baumann, G. (1990). The 20,000 dalton variant of human growth hormone does not bind to growth hormones receptors in human liver. *Mol. Cell Endocrinol.* **73**, 11-14.
- McGrew, J. M., Leiske, D., Dell, B., Klinke, R., Krasts, D., Wee, S., Abbott, N., Armitage, R., Harrington, K. (1997). Expression of trimeric CD40 ligando in *Pichia pastoris*: use of a rapid method to detect high-level expressing transformants. *Gene.* **187**, 193-200.
- Morelle, G. (1989). A plasmid Extraction Procedure on a Miniprep Scale. *Focus.* Vol. II. Num. I.
- Morikawa, M., Green, H., Lewis, U. J. (1984). Activity of human growth hormone and related polypeptides on the adipose conversion of 3T3 Cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 228-231.
- Ohmae, Y., Yano, H., Umezawa, S., Tanaka, T., Hibi, I., Miyamoto, C., Furuichi, Y. (1989). Biological activities of synthesized 20K and 22K hGH in Nb₂ bioassay and IM-9 radioreceptor assay. *Endocrinol. (Japan)* **36**, 9-13.
- Ortíz-López, R. (1992). Obtención de líneas celulares productoras de las isoformas de 20 y 22 kDa de la hormona del crecimiento humano. Tesis. Facultad de Medicina, U.A.N.L.
- Phillips III, J. A., Vnencak-Jones, C. L. (1989). Genetics of the growth hormone and its disoreders. *Advances in human genetics.* **18**, 305-36.
- Rincón-Limas, D. (1990). Clonación Molecular de los DNAs complementarios que codifican para las hormonas de crecimiento de origen hipofisiario humano en *Escherichia coli*. Tesis de de Maestría, Facultad de medicina, U. A. N. L.
- Rincón-Limas, D., Reséndez-Pérez, D., Ortiz López, R., Alvidrez-Quiwi, L. E., Castro-Muñozledo, F., Kuri-Harcuch, W., Martínez-Rodríguez, H. G., Barrera-Saldaña, H. A. (1993). HGH isoforms: cDNA expression, adipogenic activity and production in cel culture. *Biochemica et Biophysica Acta* **1172**, 49-54.

- Rodríguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., de la Fuente, J. (1994). High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotechnol.* **33**, 135-146.
- Romanos, M. A., Clare, J.J., Beesley, K. M., Rayment, F. B., Ballantine, S. P., Makoff, A. J., Dougan, G., Fairweather, N. F., Charles, I. G. (1991). Recombinant *Bordetella pertussis* pertactin (P69) from the yeast *Pichia pastoris*: High-level production and immunological properties. *Vaccine* **9**,901-906.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A., Clare, J. J., (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* **8**, 423-428.
- Romero, P. A., Lussier, M., Sdicu, A. M., Bussey, H., Herscovics, A. (1997). Ktr1p is an α -1,2-mannosyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*. Comparison of the enzymic properties of soluble recombinant Ktr1p and Kre2p/Mnt1p produced in *Pichia pastoris*. *Biochem J.* **321**, 289-295.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Col Spring Harbor.
- Sánchez- Domínguez, C. N. (1998). Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de hormona del crecimiento humana recombinante y evaluación de esquemas de purificación. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina U. A. N. L.
- Sanger, F. S., Nicklen, A. R. (1977). ADN sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* **74**, 5463-5467.
- Scorer, C. A., Clare, J. J., McCombie, W. R., Romanos, M. A., Sreekrishna, K. (1994). Rapid selection using G418 of high copy number transformants of *Pichia pastoris* for high-level foreign gene expression. *BioTechnology* **12**, 181-184.
- Siegel, R. S., Brierley, R. A. (1989). Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng.* **34**, 403-404.

- Siegel, R. S., Buckholz, R. G., Thill, G. P., Wondrack, L. M. (1990). Production of epidermal growth factor in methylotrophic yeast cells. Eur. Pat. App. W090/10687.
- Singh, R. N. P., Seavey, B. K., Lewis, U. J. (1974). Heterogeneity of human growth hormone. *Endocrinol. Res. Commun.* **1**, 449-464.
- Sinha, Y. N., Gilligan, T. A. (1984). A "20K" form of growth hormone in the murine pituitary gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **177**, 465-474.
- Sinha, Y. N. (1987). Evidence for a "20K" form of growth hormone in the bovine pituitary gland. *Clin. Res.* **35**, 183A (Abstract).
- Sreekrishna, K., Kropp, K. E. (1996). *Pichia pastoris*, "In non conventional yeast in biotechnology". Ed. K. Wolf, Springer. 203-253.
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., Parker, K. (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* **28**, 4117-4125.
- Takano, K. (1983). Short term study of biosynthetical HGH in man. *Endocrinol. Japon.* **30**, 79-84.
- Tanaka, T., Shishiba, Y., Gout, P., Beer, C. Noble, R., Friesen, H. G. (1983). Radioimmunoassay and bioassay of human growth hormone and human prolactin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **56**, 18-20.
- Thill, G. P., Davis, G. R., Stillman, C., Holtz, G., Brierley, R., Engel, M., Buckholz, R. Kenney, J., Provow, S., Vedvick, T., Siegel, R. S. (1990). Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. In "Proceedings of the 6th International Symposium on Genetics of Microorganisms (H: Heslot, J. Davies, J. Florent, L. Bobichon, G. Durand, L. Penasse, eds.), Vol. 2, pp 477-490. Soc. Fr. Microbiol., Paris.

- Tinsley, F. C., Grinnan, E. L., Baker, S. H., Powell, J. G., Bemis, K. G., Shaar, C. J. (1986). The 20,000 dalton structural variant of recombinant DNA derived methionyl human growth hormone has early insulin-like effects in hypophysectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **138**, 342-348.
- Tokunaga, T., Iwai, S., Gomi, H., Kodama, K., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Chisaka, O., y Matsubara, K. (1985). Expression of synthetic human growth hormone gene in yeast. *Yeast.*, **39**, 117-120.
- Tschopp, J. F., Sverlow, G., Kosson, R., Craig, W., Grinna, L. (1987b). High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* **5**, 1305-1308.
- Uchida, H., Naito, N., Asada, M., Wada, M., Kobayashi, H., Asanagi, M., Mori, K., Fujita Y., Konda, K., Kusuhara, N., Kamioka, T., Nakashima, K., Honjo, M. (1997). Secretion of authentic twenty kilodalton human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *J. Biotechnol.* **55** (2), 101-12.
- Vedvick, T., Buckholz, R. G., Engel, M., Urcan, M., Kinney, J., Provow, S., Siegel, R. S., Thill, G. P. (1991). High-level secretion of biologically active aprotinin from the yeast *Pichia pastoris*. *J. Ind. Microbiol.* **7**, 197-202.
- Wallis, M. (1980). Biological characterization of purified native 20kDa human growth hormone. *Nature.* **284**, 512.
- Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. L Cregg, J. M. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**, 37-44.
- Watson, J. D., Gilman M., Witkowski, J., Zoller, M. (1998). Recombinant DNA. Segund Edition. pp 453-470. Chapter 23. Scientific American Books. W. H. Freeman and Company New York.
- Zavala-Díaz de la Serna, F. J. (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 Medicina U. A. N. L.

CAPITULO 8

8. ANEXOS

- ANEXO 1** Composición de los medios de cultivo
- ANEXO 2** Distribución en las cajas de Petri de las 108 clonas construidas para la selección con G418
- ANEXO 3** Concentración máxima de antibiótico alcanzada por cada una de las clonas analizadas
- ANEXO 4** "Ontogenia" de pJV
- ANEXO 5** Resumen de los plásmidos construidos
- ANEXO 6** Estrategia general de Construcción
- ANEXO 7** Mapa de restricción del plásmido pBS20K
- ANEXO 8** Mapa de restricción del plásmido pBSPIC9
- ANEXO 9** Mapa de restricción del plásmido pBSPIC20
- ANEXO 10** Mapa de restricción del plásmido pPIC9KhGH20K
- ANEXO 11** Mapa de restricción del plásmido pPIC9K
- ANEXO 12** Secuencia nucleotídica del fragmento de 724 pb conteniendo el DNAC de HGH 20K

ANEXO 1

Composición de medios de cultivo

YPD:

Extracto de levadura 1 %
Peptona 2 %
Dextrosa 2 %

YPD agar:

Extracto de levadura 1 %
Peptona 2 %
Dextrosa 2 %
Agar 1.5 %

MD agar:

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

BMG:

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

BMM:

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

LB:

Triptona 1 %
Cloruro de Sodio 0.5 %
Dextrosa 1 %

LB agar:

Triptona 1 %
Cloruro de Sodio 0.5 %
Dextrosa 1 %
Agar 1.5

ANEXO 2

Distribución en las cajas de Petri de las 108 clonas construidas para la selección con G418

Caja No.1						
Inicio	1	2	3	4	5	6
1	C1-1.1	C1-1.2	C1-1.3	C1-1.4	C1-1.5	C1-1.6
2	C1-2.1	C1-2.2	C1-2.3	C1-2.4	C1-2.5	C1-2.6
3	C1-3.1	C1-3.2	C1-3.3	C1-3.4	C1-3.5	C1-3.6
4	C1-4.1	C1-4.2	C1-4.3	C1-4.4	C1-4.5	C1-4.6
5	C1-5.1	C1-5.2	C1-5.3	C1-5.4	C1-5.5	C1-5.6
6	C1-6.1	C1-6.2	C1-6.3	C1-6.4	C1-6.5	C1-6.6

Arreglo de la clona 1 a la 36 Final

Caja No.2						
Inicio	1	2	3	4	5	6
1	C2-1.1	C2-1.2	C2-1.3	C2-1.4	C2-1.5	C2-1.6
2	C2-2.1	C2-2.2	C2-2.3	C2-2.4	C2-2.5	C2-2.6
3	C2-3.1	C2-3.2	C2-3.3	C2-3.4	C2-3.5	C2-3.6
4	C2-4.1	C2-4.2	C2-4.3	C2-4.4	C2-4.5	C2-4.6
5	C2-5.1	C2-5.2	C2-5.3	C2-5.4	C2-5.5	C2-5.6
6	C2-6.1	C2-6.2	C2-6.3	C2-6.4	C2-6.5	C2-6.6

Arreglo de la clona 37 a la 72 Final

Caja No.3						
Inicio	1	2	3	4	5	6
1	C3-1.1	C3-1.2	C3-1.3	C3-1.4	C3-1.5	C3-1.6
2	C3-2.1	C3-2.2	C3-2.3	C3-2.4	C3-2.5	C3-2.6
3	C3-3.1	C3-3.2	C3-3.3	C3-3.4	C3-3.5	C3-3.6
4	C3-4.1	C3-4.2	C3-4.3	C3-4.4	C3-4.5	C3-4.6
5	C3-5.1	C3-5.2	C3-5.3	C3-5.4	C3-5.5	C3-5.6
6	C3-6.1	GS115	Multicopia	Unicopia	pPIC9KDral	pPIC9KSall

Arreglo de la clona 72 a la 103, además de los 5 controles. Final

C1 , C2 y C3 = Número de la caja
1.1 a 6.6= ubicación en la caja

En negritas se resaltan las 19 clonas que fueron utilizadas en los ensayos de fermentación e inducción. A partir de C3-2.1 hasta C3-6.1, corresponde a las clonas con *Dra* I (por ejemplo GS115HGH20K-*Dra* I-1). El resto son clonas *Sal* I (por ejemplo GS115HGH20K-*Sal* I-1).

ANEXO 3

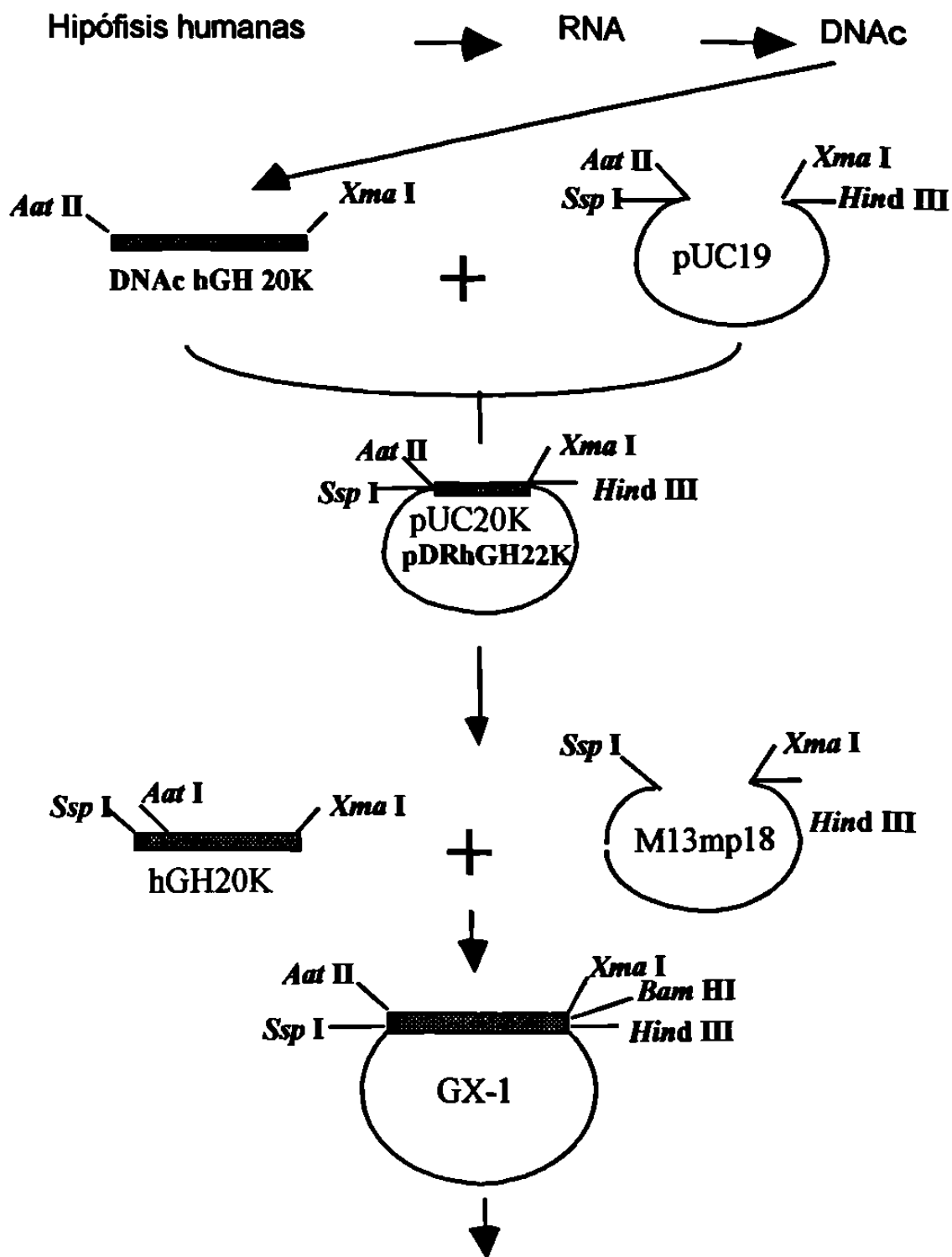
Concentración máxima de antibiótico inhibitoria para cada una de las clonas analizadas

Concentración de G418 (mg/mL.)	Caja No.1	Caja No.2	Caja No.3	Colonias obtenidas
0.0 (Solo YPD)	Todas	Todas	Todas	Todas
0.25	C1-1.3,C1-5.2, C1-5.5,C1-6.5 C1-6.4	C2-1.5,C2-2.3 C2-3.3,C2-5.1	C3-2.1,C3-2.3, C3-2.4,C3-4.6 C3-5.2,C3-5.4, C3-6.6	16
0.5	C1-3.3,C1-4.3	C2-1.2,C2-4.3	C3-4.3,C3-5.1	6
0.75	C1-1.6,C1-2.6 C1-4.5,C1-6.2 C1-6.6	C2-4.1,C2-5.4 C2-6.1		8
1.0	C1-2.5,C1-3.5	C2-5.3,C2-6.3	C3-1.1	5
1.5	C1-2.4	C2-3.1,C2-6.5	C3-4.5,C3-6.1	5
1.75		C2-1.1,C2-1.3		2
2.0	C1-2.6,C1-3.6			2
3.0	C1-1.2,C1-4.6			2
4.0	C1-2.2,C1-6.1	C2-1.4,C2-4.4		4
Número total de clonas resistentes a G418				51

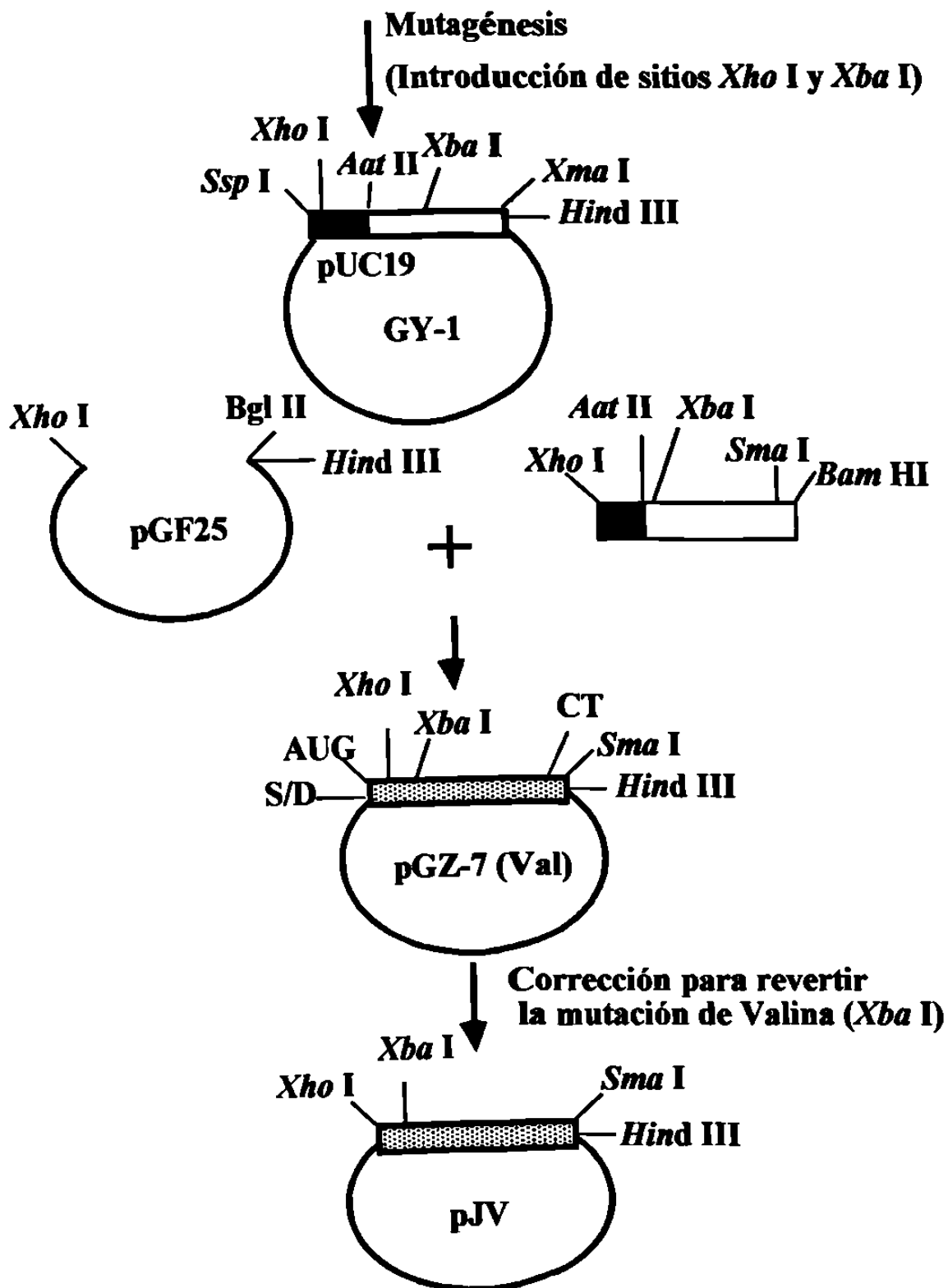
En negritas se resaltan las 19 clonas que fueron utilizadas en los ensayos de fermentación e inducción.

ANEXO 4

"Ontogenia" de pJV



Continuación ANEXO 4



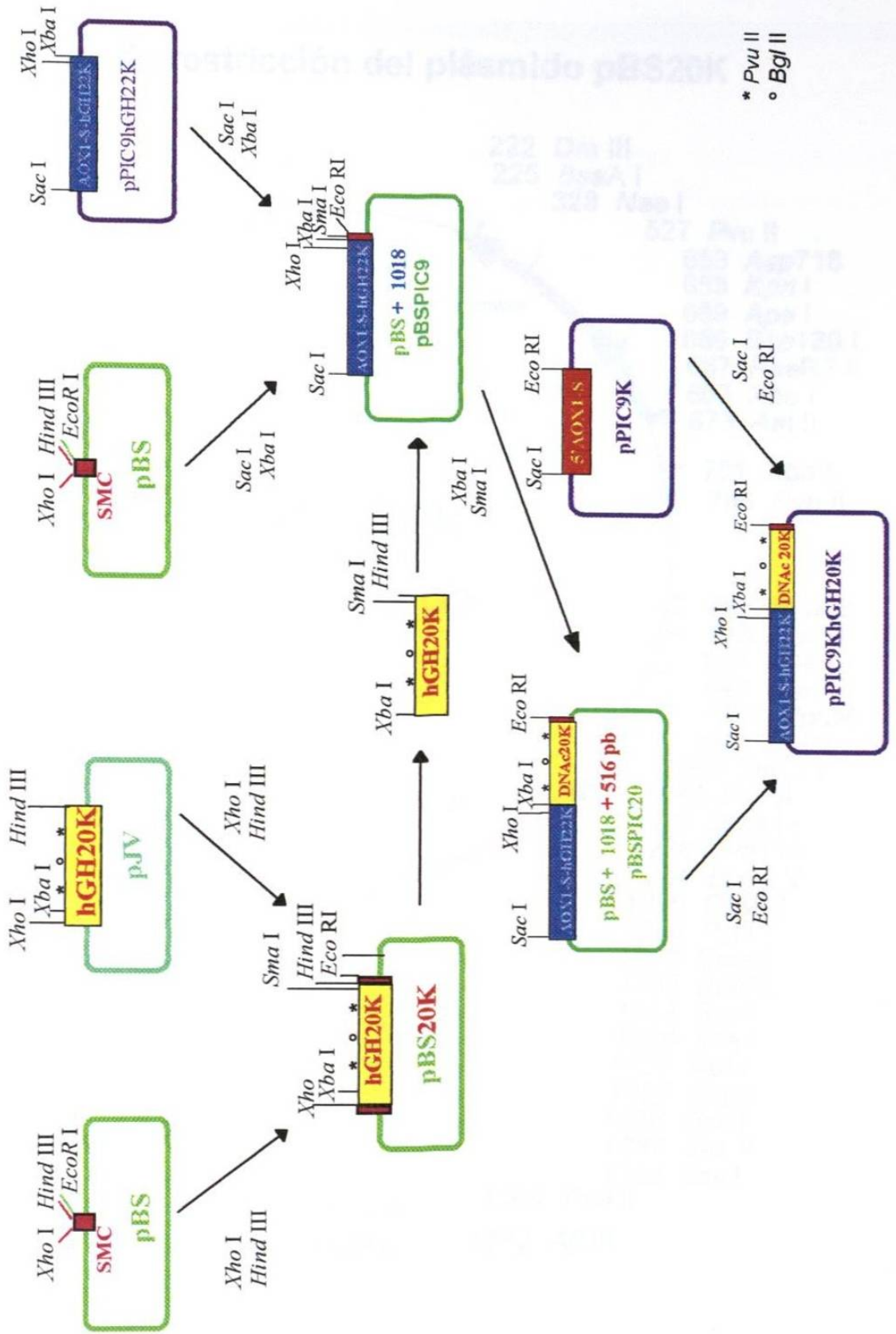
ANEXO 5

Resumen de plásmidos contruidos

Vector construido	Plásmido donador	Plásmido receptor	Fragmentos ligados	Fragmento insertado
pBS20K□(3649 pb) Enzimas utilizadas Fragmentos liberados	pJV Xho I y Hind III 545, 5320 pb	pBS Xho I y Hind III 21, 2940 pb	545 y 2940 pb	545 pb DNAC de hGH 20K
pBSPIC9 Enzimas utilizadas Fragmentos liberados	pPIC9hGH22K Sac I y Xba I 1018, 1377 y 6194 pb	pBS Sac I y Xba I 24, 2937 pb	1018 y 2934 pb	1018 pb Este fragmento incluye 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9K desde la posición 209 hasta la posición 948. La secuencia señal de levadura: factor α de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Por último posee 19 pb del extremo 5' del DNAC de hGH 22K.
pBSPIC20 Enzimas utilizadas Fragmentos liberados	pBS20K Xba I y Sma I 18, 35, 516, y 2980 pb	pBSPIC9 Xba I y Sma I 18, 3937 pb	516 y 3937 pb	516 pb Este fragmento incluye a partir del codón 7 del DNAC de hGH 20K de la proteína madura.
pPIC9khGH20K Enzimas utilizadas Fragmentos liberados	pBSPIC20 Sac I y Eco RI 1546, 2907 pb	pPIC9K Sac I y Eco RI 1018, 8258 pb	1546 y 8258 pb	1546 pb Este fragmento incluye 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9K desde la posición 209 hasta la posición 948. La secuencia señal de levadura: factor α de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Por último posee 19 pb del extremo 5' del DNAC de hGH 22K e incluye a partir del 7° codon del DNAC de hGH 20K de la proteína madura.

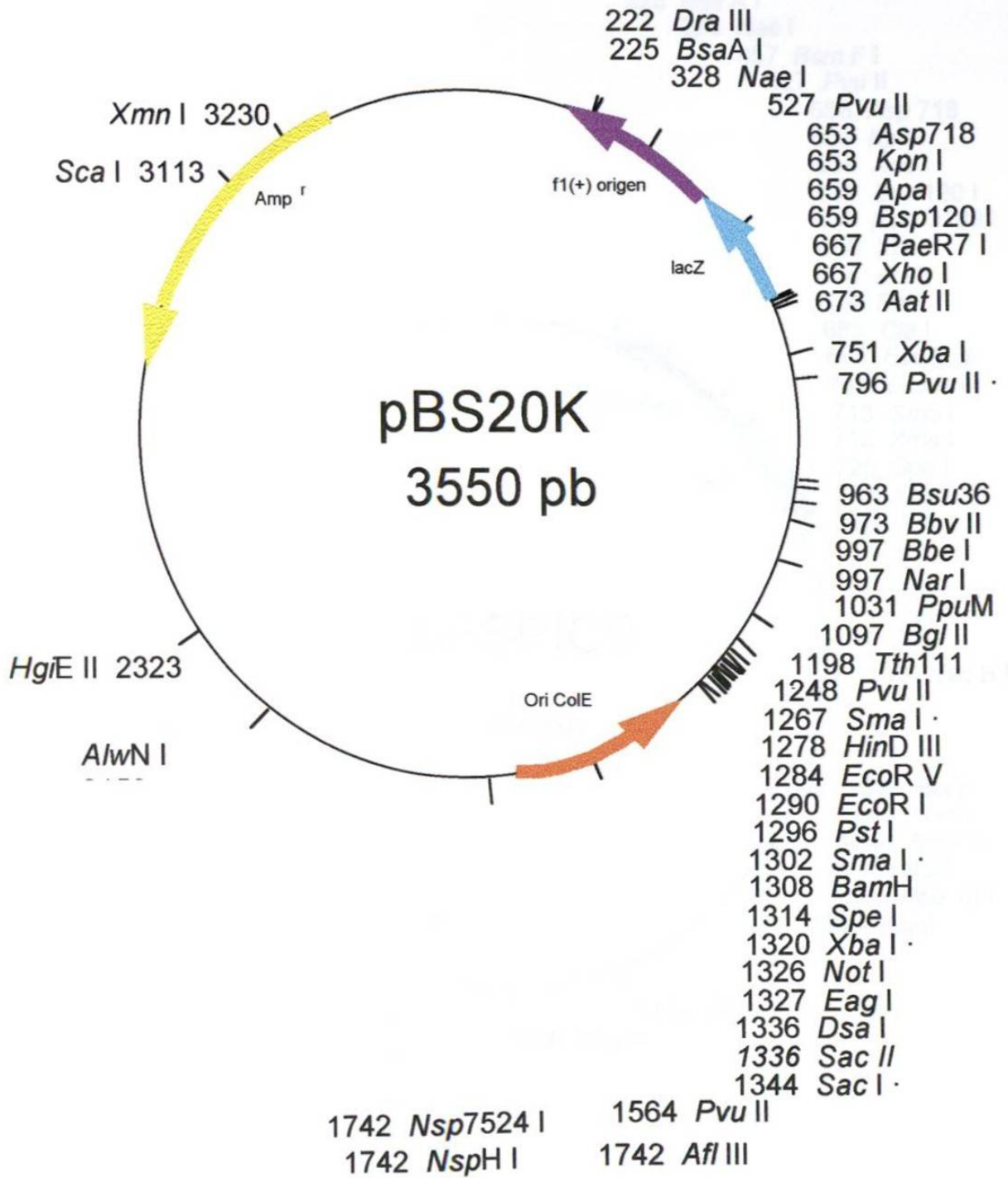
ANEXO 6

Estrategia general de construcción



ANEXO 7

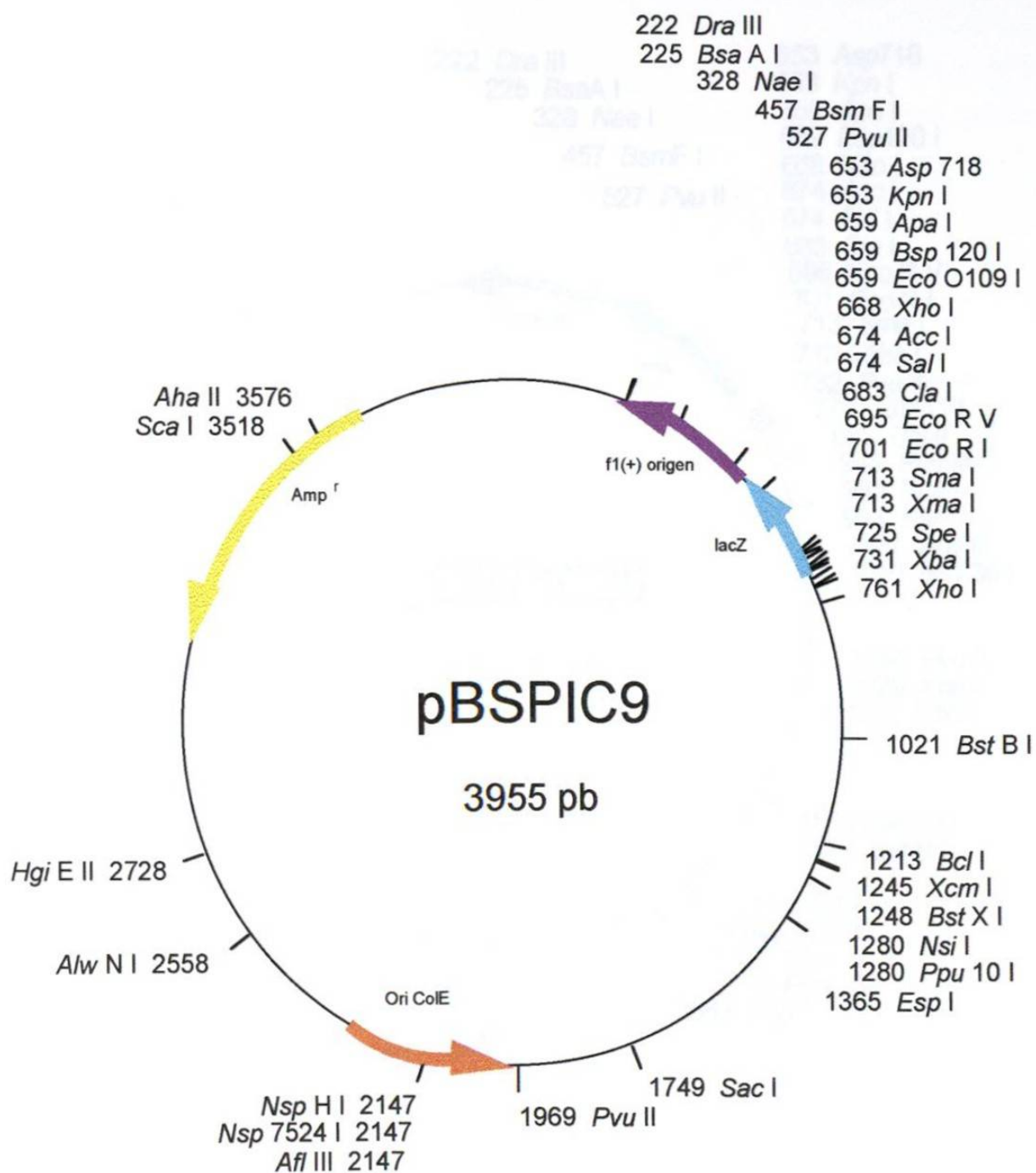
Mapa de restricción del plásmido pBS20K



Muestra los sitios únicos de corte.

ANEXO 8

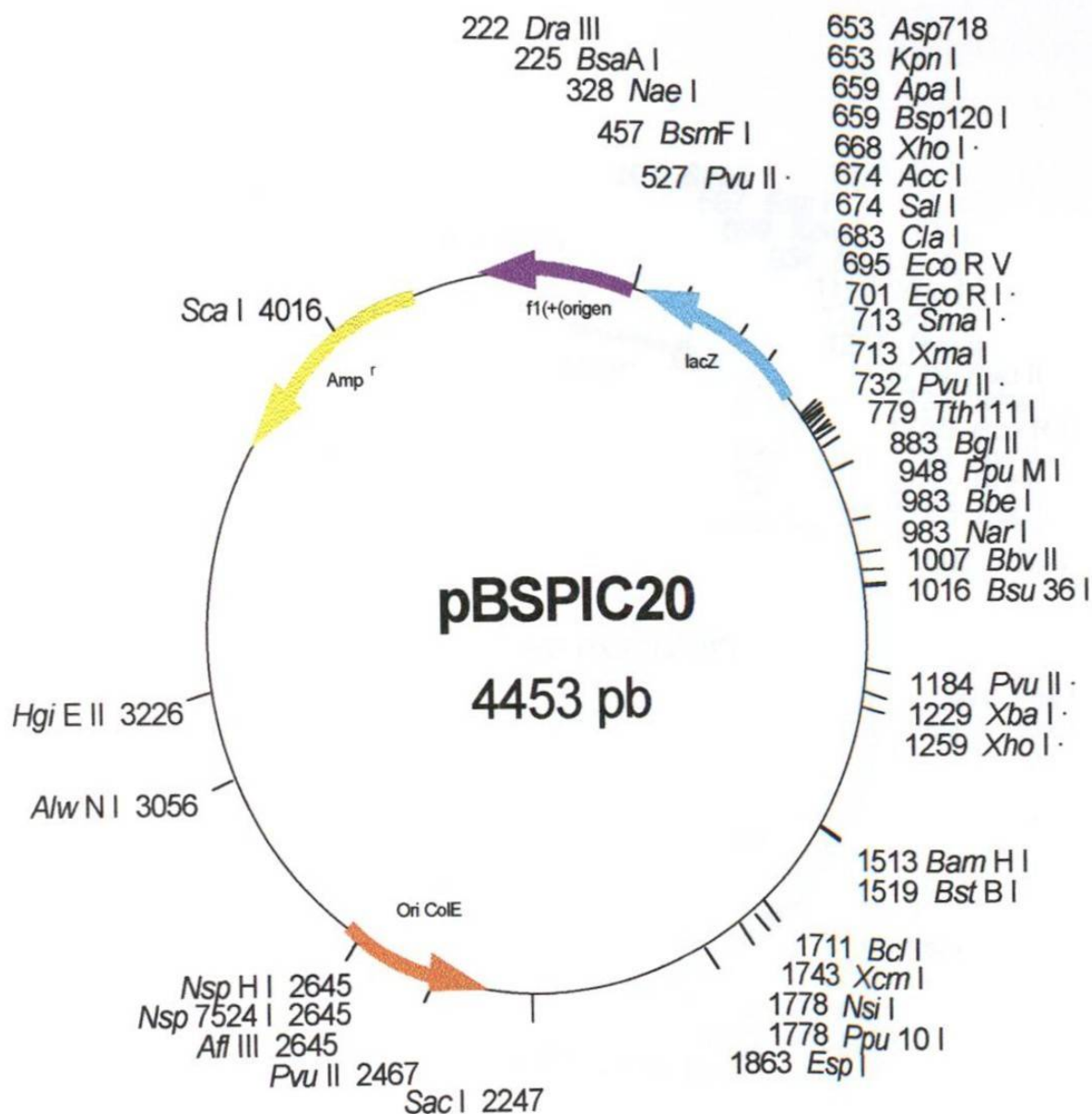
Mapa de restricción del plásmido pBSPIC9



Muestra los sitios únicos de corte.

ANEXO 9

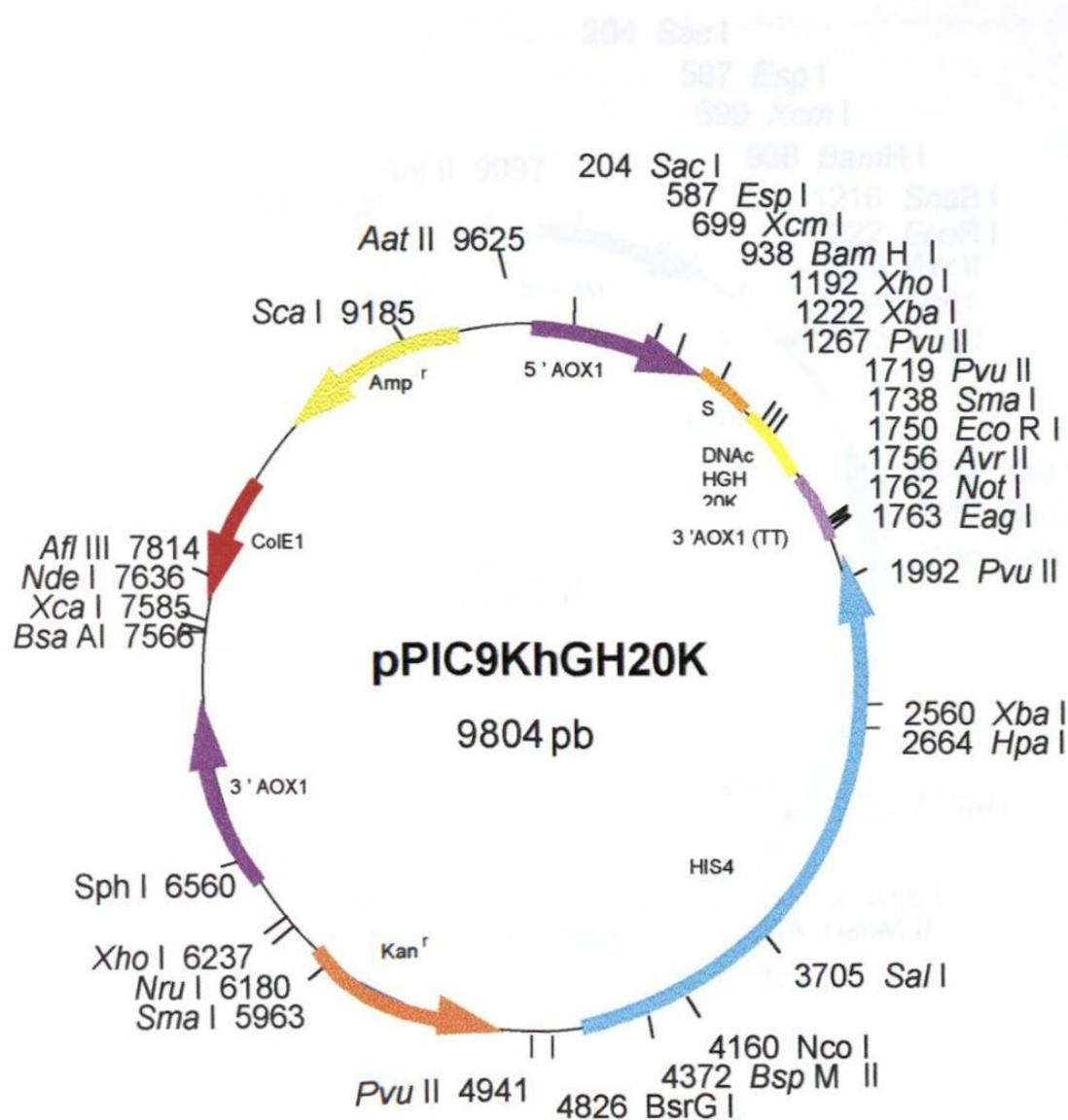
Mapa de restricción del plasmido pBSPIC20



Muestra los sitios únicos de corte.

ANEXO 10

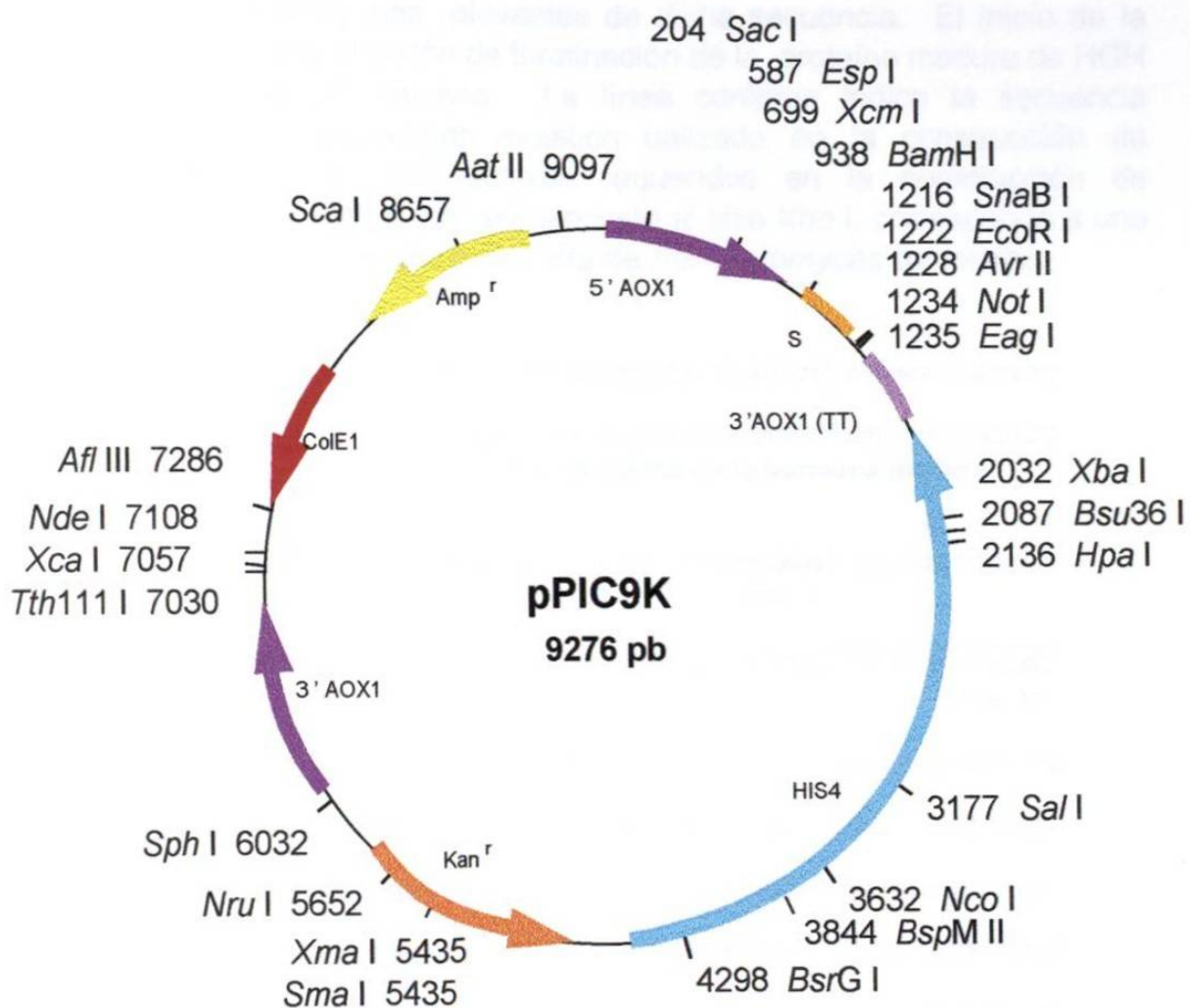
Mapa de restricción del plásmido pPIC9KhGH20K



Muestra los sitios únicos de corte.

ANEXO 11

Mapa de restricción del plásmido pPIC9K



Muestra los sitios únicos de corte.

ANEXO 12

Secuencia nucleotídica del fragmento de 724 pb conteniendo el DNAC de HGH 20K

Muestra los sitios más relevantes de dicha secuencia. El inicio de la transcripción, así como el codón de terminación de la proteína madura de HGH 20K son señalados por flechas. La línea continua indica la secuencia nucleotídica del oligonucleótido sintético utilizado en la construcción de pPIC9hGH22K, uno de los vectores requeridos en la construcción de pPIC9KhGH20K. Del extremo 5' secuenciado al sitio *Xho* I, corresponde a una parte de la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

EXTREMO 5'

GAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTC

GATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACT

Primer codón de la hormona madura



ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGATTCCCAAC

***Xho* I**

CATCCCTTATCTAGACTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGC

***Xba* I**

***Pvu* II**

TGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAGTCTA

TTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCA

TCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGCAAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCG

CCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGTCATGACCTCCTAAAGGACCTAG

AGGAAGGCATCCAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGACTGGGCAGA

TCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACACAACGATGACGCACTACTCA

AGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCTGC

GCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGctgcccgggctgca

***Pvu* II**

***Sma* I**

***Eco* RI**

EXTREMO 3'

Codón de terminación

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Eddy Luz Cab Barrera

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: "Construcción de una cepa de *Pichia pastoris* sobreproductora de la isoforma de 20 kDa de la hormona del crecimiento humano".

Campo de estudio: Biotecnología

Biografía:

Datos personales: Nacida en Cd. Miguel Alemán Tamaulipas, el 2 de Febrero de 1963, hija de Raúl C. Cab Berzunza y Elva Barrera de Cab.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1987 con mención especial en el examen profesional.

Experiencia Profesional: Asistente de investigación en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina desde 1987.



