

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

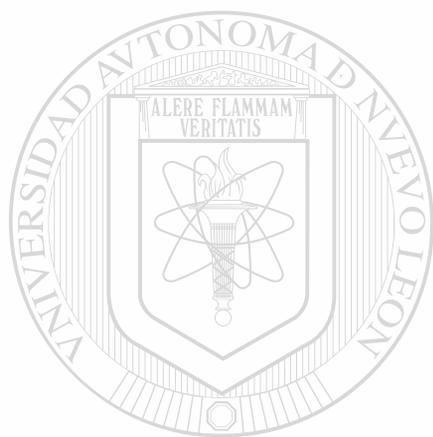
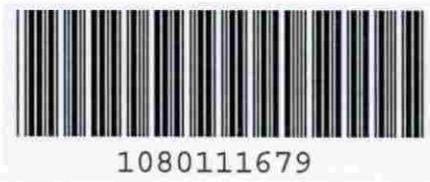


CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris*
SOBREPRODUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa
DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

Por
Q. B. P. EDDY LUZ CAB BARRERA

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

Octubre 2000

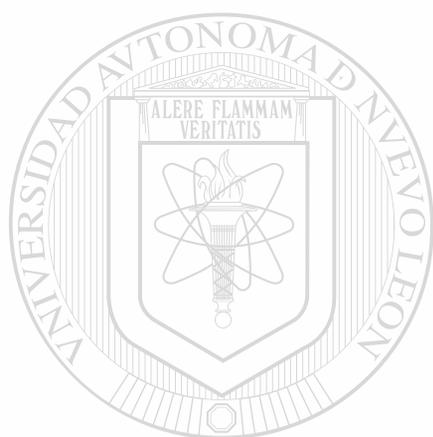


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

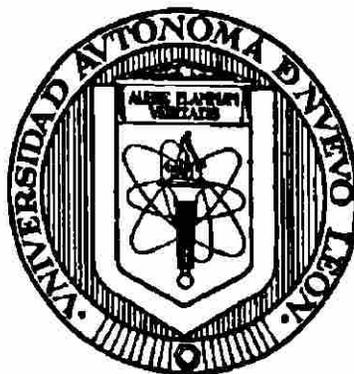
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris*
SOBREPRODUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa
DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

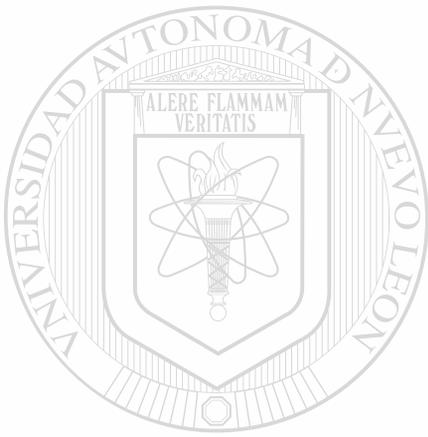
®

Q. B. P. EDDY LUZ CAB BARRERA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

Octubre, 2000

Q1445
.C3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris*
SOBREPRODUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa
DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO**

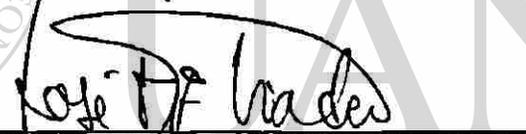
Aprobación de la Comisión de Tesis:



DRA. MARTHA GUERERO OLAZARAN
Asesor de Tesis



DR. HUGO A. BARRERA SALDANA
Co-Asesor de Tesis



DR. JOSÉ MA. VIADER SALVADO
Comisión de Tesis



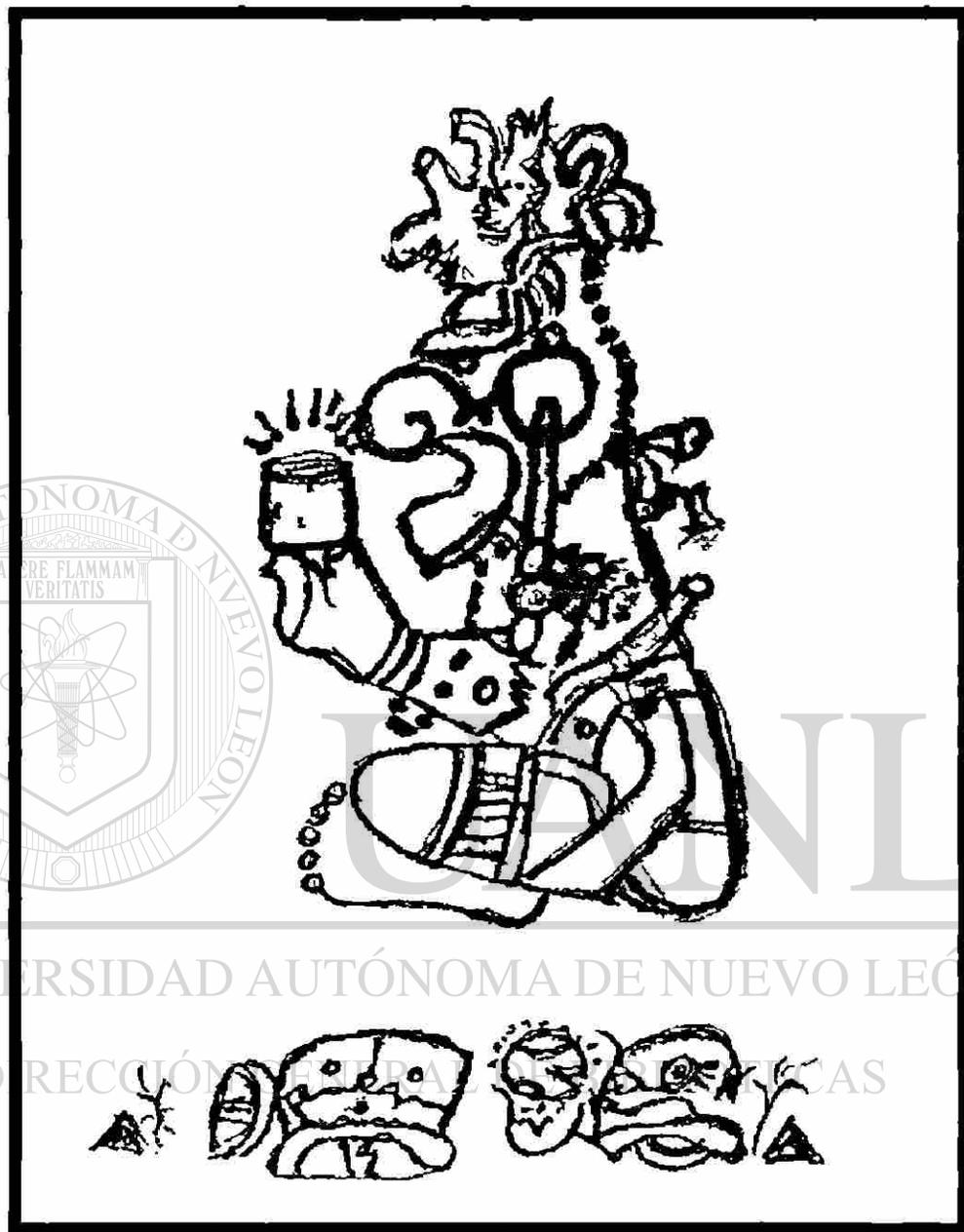
DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Comisión de Tesis



M.C. NORMA ESTHER GUERRA RODRIGUEZ
Comisión de Tesis



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado



KI' IMAK IN WÓOL

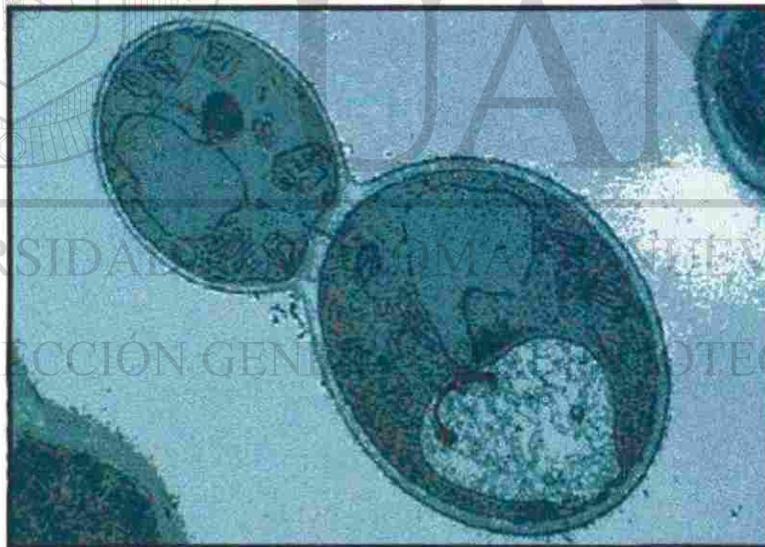
IN NÍIB-OOLAL

KÍ' ICHKELEM YUUM

MA' ALOB TUÚN

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo titulado "CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris* SOBREPDUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO" se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., bajo la Asesoría de la Dra. Martha Guerrero Olazarán y la Co-asesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña.



Micrografía electrónica de una célula de *P. pastoris* en gemación (Cregg y Higgins, 1995).

La investigación científica consiste en ver lo que todos han visto, pero pensar lo que nadie más pensó.

Albert Szent-Gyorgyi

DEDICATORIA

A Dios por todo lo bello que me ha dado.

Con gran amor a mis padres, Elva Barrera de Cab y Raúl C. Cab Berzunza. Gracias por fomentar en mí ese espíritu de superación, por su apoyo incondicional, comprensión y palabras de aliento,

A mis GRANDES TESOROS, Ingrid, Karen y Jenni por ser el mejor regalo que me ha dado la vida, el motor que me impulsa a seguir adelante, mis mayores alegrías.

Especialmente a Jorge con quien comparto mi vida, sueños y metas. Gracias por tu comprensión, sin tu apoyo esto sería solo una idea.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Guerrero por su gran apoyo, su ejemplo de tenacidad y constancia para resolver los contratiempos y sobre todo su valiosa asesoría.

Al Dr. Hugo Barrera por darme la oportunidad de realizar una meta mas en mi vida, por su asesoría y por ser un ejemplo de constancia y trabajo.

Al Dr. José Ma. Viader por su gran disponibilidad y sus comentarios siempre tan acertados y oportunos.

A la Dra. Herminia Martínez y a la M. C. Norma Guerra por las correcciones y comentarios hechos a la tesis.

A la Dra. Agnès de Mendoza y a la M. C. Irma A. Martínez Dávila por el apoyo brindado en la secuenciación de DNAc de hGH 20 K.

A mis compañeros de laboratorio, Luis, Flor y Hugo, por compartir conmigo su experiencia y formar un equipo de trabajo.

A mis compañeros de generación, Flor, Maribel, Sandra, Dolores, Víctor, Mario y Fermín, por compartir una meta un sueño.

A Claudio, Martín y Andrés, por su invaluable ayuda en los programas computacionales.

A todos los integrantes de la U.L.I.E.G., quienes de una u otra manera contribuyeron a que este proyecto saliera adelante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

RESUMEN

Q.B.P. Eddy Luz Cab Barrera

Fecha de Graduación Octubre, 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris* SOBREPRODUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO.

Número de páginas: 125

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Area de Estudio: Biotecnología.

Propósito y Método de Estudio: La isoforma de 20 kDa (20K) de la hormona del crecimiento humano (HGH 20K), es la segunda hormona más abundante en la pituitaria, posee una cadena sencilla de 176 aminoácidos, y un peso molecular de 20,269 Da. A pesar de que las propiedades biológicas de la HGH de 20K han sido investigadas desde su descubrimiento en 1978, éstas son aún controversiales. Esto debido en buena parte a la dificultad de su preparación en cantidades y pureza suficientes. En el presente trabajo, empleando técnicas estándares de biología molecular, se construyó el plásmido pPIC9KhGH20K, conteniendo la secuencia completa del DNAc de hGH 20K, el cual fue utilizado para transformar la cepa GS115 de *Pichia pastoris* mediante la técnica de formación de esferoplastos. La integración por recombinación homóloga del plásmido en el genoma de la levadura fue verificada mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las clonas conteniendo multicopias del cassette de expresión fueron seleccionadas mediante la determinación de la cinética de su crecimiento a dosis crecientes del antibiótico G418 (geneticina). La identificación de la HGH recombinante (HGHR) de 20K secretada al medio de cultivo, se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PA-SDS). La amplificación por PCR de una banda de 1016 pb confirmó la integración del plásmido al genoma de la levadura. La identidad de HGHR de 20K fue confirmada por su peso molecular en geles de PA-SDS. Todas las clonas analizadas sintetizaron y secretaron al medio de cultivo la hormona. 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 51.6% de las proteínas totales de medio de cultivo.

Contribuciones y Conclusiones: En este trabajo se lograron obtener clonas recombinantes de *Pichia pastoris* sobreproductoras y secretoras de la forma madura de HGHR de 20K.

FIRMA DEL ASESOR:


Dra. Martha Guerrero Olazarán

FIRMA DEL CO-ASESOR


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 <i>P. pastoris</i> : un nuevo hospedero biotecnológico	2
1.1.1 Vectores de expresión para <i>P. pastoris</i>	6
1.1.2 Integración del vector al genoma de <i>P. pastoris</i>	8
1.1.3 Producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	12
1.1.4 Fermentación	14
1.2 Hormona del crecimiento humano de 20kDa	15
1.2.1 Actividad biológica y propiedades terapéuticas	16
1.2.2 Síntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGH 20 y 22K).....	18
1.2.3 Potencial farmacológico de HGH 20K y perspectivas para su producción.....	20
1.3 Justificación.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo general.....	22
2.1.1 Objetivos particulares	22
3. MATERIAL Y METODOS.....	23
3.1 Area de Trabajo, Reactivos y Material Biológico..	23
3.2 Equipo.....	24
3.3 Métodos.....	25
3.3.1 Estrategia general.....	25
3.3.1.1 Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGH22K en <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	27

3.3.1.2	Construcción del plásmido pBS20K.....	28
3.3.1.2.1	Preparación de los fragmentos de ligación.....	29
3.3.1.2.2	Reacción de ligación.....	30
3.3.1.2.3	Selección y análisis de clonas de <i>E. coli</i> XL1-Blue portadoras de pBS20K.....	31
3.3.1.3	Construcción del plásmido pBSPIC9.....	32
3.3.1.3.1	Preparación de los fragmentos de ligación.....	33
3.3.1.3.2	Reacción de ligación.....	34
3.3.1.3.3	Selección y análisis de clonas de <i>E. coli</i> XL1-Blue portadoras de pBSPIC9.....	35
3.3.1.4	Construcción del plásmido pBSPIC20.....	35
3.3.1.4.1	Preparación de los fragmentos de ligación.....	37
3.3.1.4.2	Reacción de ligación.....	39
3.3.1.4.3	Selección y análisis de clonas <i>E. coli</i> XL1-Blue portadoras de pBSPIC20.....	39
3.3.1.5	Construcción del vector pPIC9KhGH20K.....	40
3.3.1.5.1	Preparación de los fragmentos de ligación.....	41
3.3.1.5.2	Reacción de ligación.....	45
3.3.1.5.3	Selección y análisis de clonas de <i>E. coli</i> XL1-Blue portadoras de pPIC9KhGH20K.....	46
3.3.1.5.4	Aislamiento a mediana escala del DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K	47
3.3.1.5.5	Secuenciación.....	48
3.3.2	Transformación de <i>P. pastoris</i> GS115.....	49
3.3.2.1	Crecimiento celular.....	49
3.3.2.2	Formación de esferoplastos.....	50
3.3.2.3	Transformación.....	51
3.3.2.4	Selección de recombinantes.....	52
3.3.3	Caracterización de genotipos y fenotipos de las clonas recombinantes.....	53
3.3.3.1	Extracción de DNA.....	53
3.3.3.2	Análisis de DNA por espectrofotometría.....	54
3.3.3.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	55
3.3.3.4	Inducción de la expresión del DNAc de HGH 20K.....	56

3.3.4	Selección de clonas conteniendo copias múltiples del cassette de expresión.....	57
3.3.5	Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K.....	59
3.3.5.1	Análisis de proteínas.....	60
4.	RESULTADOS.....	62
4.1	Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGH22K en <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	62
4.2	Construcción del plásmido pBS20.....	63
4.3	Construcción del plásmido pBSPIC9.....	65
4.4	Construcción del plásmido pBSPIC20.....	67
4.5	Construcción del vector pPIC9KhGH20K.....	70
4.5.1	Secuenciación.....	75
4.5.2	Aislamiento a mediana escala del DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K.....	76
4.6	Transformación de <i>P. pastoris</i> GS115.....	76
4.7	Selección de clonas multicopias del cassette de expresión, mediante su crecimiento a dosis crecientes del antibiótico G418 (geneticina).....	78
4.8	Caracterización genotípica y fenotípica de las cepas obtenidas.....	81
4.8.1	Extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	81
4.8.2	Fermentación	84
4.9	Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K.....	85
5.	DISCUSION.....	94
5.1	Construcción del vector pPIC9KhGH20K.....	94
5.2	Transformación de <i>P. pastoris</i> con el vector pPIC9KhGH20K.....	95
5.3	Selección mediante G418	96
5.4	Biosíntesis de HGH 20K en <i>Pichia pastoris</i>	97
5.5	Selección de la cepa sobreproductora.....	98

6. CONCLUSIONES.....	100
7. BIBLIOGRAFIA.....	101
8. ANEXOS.....	111

ANEXO 1	Composición de los medios de cultivo.....	112
ANEXO 2	Distribución en las cajas de Petri de las 108 clonas construídas para la selección con G418.....	113
ANEXO 3	Concentración máxima de antibiótico inhibitoria para cada una de las clonas analizadas.....	114
ANEXO 4	"Ontogenia" de pJV.....	115
ANEXO 5	Resumen de los plásmidos construídos.....	117
ANEXO 6	Estrategia general de construcción....	118

ANEXO 7	Mapa de restricción del plásmido pBS20K.....	119
ANEXO 8	Mapa de restricción del plásmido pBSPIC9.....	120
ANEXO 9	Mapa de restricción del plásmido pBSPIC20.....	121
ANEXO 10	Mapa de restricción del plásmido pPIC9KhGH20K.....	122
ANEXO 11	Mapa de restricción del plásmido pPIC9K.....	123
ANEXO 12	Secuencia nucleotídica del fragmento de 724 pb conteniendo el DNAC de HGH 20K.....	124

LISTA DE TABLAS

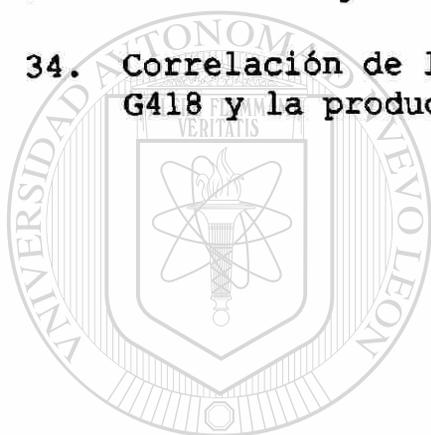
Tabla	Página
I Ventajas y desventajas del sistema de expresión de <i>P. Pastoris</i>	3
II Niveles de producción de proteínas recombinantes sintetizadas en <i>P. pastoris</i> a nivel fermentador.....	13
III Descripción de los controles.....	58
IV Rendimiento y calidad de las preparaciones plasmídicas.....	62
V Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBS20K.....	63
VI Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBSPIC9.....	65
VII Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBSPIC20.....	68
VIII Resultados obtenidos con la transformación del plásmido pPIC9KhGH20K.....	71
IX Rendimiento y calidad de las preparaciones plasmídicas a mediana escala.....	76
X Transformación por la técnica de formación de esferoplastos.....	77
XI Porcentaje de clones que crecieron a concentraciones crecientes de G418.....	81
XII Rendimiento y calidad de las preparaciones de DNA genómico y plasmídico.....	82
XIII Niveles de producción de HGH 20K de las 19 clones seleccionadas.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Vía metabólica para la oxidación del metanol en levaduras.....	5
2. El plásmido pPIC9K como vector modelo para la producción de proteínas recombinantes en <i>P. Pastoris</i>	7
3. Integración del vector de expresión dentro del genoma de <i>P. Pastoris</i>	9
4. Inserción génica del cassette de expresión en el <i>locus AOX1</i>	11
5. Múltiples eventos de inserción génica.....	12
6. Etapas de la producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	14
7. Representación esquemática de la estrategia general.....	26
8. Representación esquemática de la construcción del vector pBS20K.....	28
9. Representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC9.....	33
10. Representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC20.....	36
11. Corte enzimático de pBS20K con <i>Xba I</i> y <i>Sma I</i>	38
12. Representación esquemática de la construcción del vector pPIC9KhGH20K.....	41
13. Estrategias de ligación.....	42

14.	Digestión adicional con las enzimas de restricción <i>Apa</i> I y <i>Sna</i> B1	44
15.	Caracterización enzimática del plásmido pBS20K.....	64
16.	Caracterización enzimática del plásmido pBSPIC9.....	66
17.	Verificación de la liberación del fragmento de 516 pb producto de la doble digestión de pBS20K con <i>Xba</i> I y <i>Sma</i> I.....	67
18.	Caracterización enzimática del plásmido pBSPIC20.....	69
19.	Reacción de ligación para generar a pPIC9KhGH20K.....	70
20.	DNAs superenrollados de las clonas de pPIC9KhGH20K.....	72
21.	Clonas de pPIC9KhGH20K caracterizadas con <i>Pvu</i> II.....	73
22.	Caracterización enzimática del plásmido pPIC9KhGH20K.....	74
<hr/>		
23.	Secuencia de pPIC9KhGH20K de 724 pb.....	75
24.	Crecimiento en RDB agar sin histidina para corroborar la selección de transformantes <i>HIS4</i> ⁺	79
25.	Selección por G418 de las clonas obtenida.....	80
26.	Extracción de DNA genómico y PCR de ocho clonas elegidas al azar.....	83
27.	Fermentación e inducción de cuatro clonas, en las cuales se comprobó la integración del gen heterólogo.....	84
28.	Cinéticas de crecimiento	85

29.	Análisis electroforético en gel de poliacrilamida de proteínas en los medios de cultivo.....	87
30.	Determinación de proteínas totales de las 19 clonas analizadas.....	88
31.	Porcentaje de HGH 20K respecto a las proteínas totales en el medio de cultivo.....	89
32.	Análisis densitométrico de las proteínas de los medios de cultivo fermentados	90
33.	Niveles de producción de HGH 20K	91
34.	Correlación de la concentración inhibitoria de G418 y la producción de HGH 20K.....	92



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

AOX	Alcohol oxidasa
AOX1	Gen codificante para la AOXI
AOX2	Gen codificante para la AOXII
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BMG	Medio amortiguado y con glicerol
BMM	Medio amortiguado y con metanol
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNAm
dNTPs	Trifosfatos de desoxirribonucleósidos
DO600nm	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Acido etilendiamino-tetraacético
g	Fuerza de gravedad
G418	Geneticina
GHs	Hormonas del crecimiento
h	Hora
HGH	Hormona del crecimiento humano
<i>hGH</i>	Gen o DNA complementario de la hormona del crecimiento humano
His ⁺	Clonas que poseen el gen <i>HIS4</i> funcional
<i>his4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
<i>his4</i>	Gen disfuncional de la histidinol deshidrogenasa
IPTG	Isopropil β-tiogalactósido
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
L	Litro
LB	Caldo de cultivo Luria-Bertani
M	Molar
MD	Medio mínimo con dextrosa
MDH	Medio mínimo con dextrosa e histidina
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
MM	Medio de cultivo mínimo con metanol
mM	Milimolar
MMH	Medio de cultivo mínimo con metanol e histidina
Mut ⁺	Mutante que posee el gen <i>AOX1</i> funcional
Mut ^s	Mutante que carece del gen <i>AOX1</i> funcional
µg	Microgramo
ng	Nanogramo

nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
RDB	Medio de cultivo con biotina y dextrosa para regeneración celular
RDBH	Medio de cultivo con biotina, dextrosa e histidina para regeneración celular
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	Sorbitol-citrato de sodio-EDTA
SDS	Dodecil sulfato de sodio (lauril sulfato de sodio)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SE	Sorbitol-EDTA
SED	Sorbitol-EDTA-Ditiotrietol
s	Segundo
SOS	Sorbitol-YPD-CaCl ₂
SS	Secuencia señal
TBE	Amortiguador Tris-Boratos-EDTA
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-HCl
TT	Terminador de la transcripción
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltio
X	Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo
X-Gal	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-galactopiranosido
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa

CAPITULO 1

1. INTRODUCCION

Hoy en día se ofrecen en el mercado internacional toda una variedad de proteínas fabricadas empleando a la Ingeniería Genética. Estas van desde factores de crecimiento hasta anticoagulantes. La lista de estos productos crece día a día, lo que ha llegado a constituir toda una revolución en el mercado biofarmacéutico y a la vez ha impulsado la investigación en este campo (Escamilla-Treviño, L. ,1996).

En 1976 la nueva Biotecnología llega a ser una realidad, ya que metodologías para clonación del DNA, síntesis de oligonucleótidos y expresión de genes, convergen en un solo experimento, en el cual una proteína de un gen humano es producida en forma recombinante por primera vez. La proteína fue somatostatina, un neurotransmisor de escasos 14 aminoácidos. El gen que codifica para este péptido no fue el natural, sino uno sintetizado químicamente y clonado en un vector para su expresión en *E. coli*. Posterior a este primer logro, el siguiente éxito fue la producción bacteriana de la insulina humana primer producto comercial de la nueva industria biotecnológica.

Esta nueva tecnología ha revolucionado la investigación en la biología y medicina, desarrollándose así una nueva industria enfocada a la clonación y producción de proteínas de importancia tanto para la industria como para la medicina. Ahora las proteínas son producidas mediante la tecnología del DNA recombinante para el tratamiento de numerosas enfermedades, tales como cáncer, alergias, enfermedades autoinmunes, desórdenes neurológicos, infecciones, quemaduras y enfermedades genéticas, así como para otro tipo de

enfoque como es el uso de enzimas en detergentes de lavandería y producción de alimentos (Watson, J. D., 1998).

En la actualidad para lograr producir proteínas recombinantes se dispone de una gran variedad de sistemas de expresión, los cuales emplean sendos hospederos que van desde bacterias hasta células en cultivo de mamíferos o de insectos. La bacteria más empleada para estos fines ha sido *Escherichia coli*, aunque también se han utilizado *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp.*, y otras. Considerando las levaduras, la más empleada ha sido *Saccharomyces cerevisiae*, aunque recientemente se ha incrementado notablemente el empleo de *Pichia pastoris*, gracias a la disponibilidad de un estuche comercial y a una serie de características favorables que posee esta levadura. También han sido empleadas *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha*, *Trichoderma reesei*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus nidulans*, etc. Por lo que respecta a las células de mamífero en cultivo, también existe una gran variedad de líneas celulares empleadas para estos fines (Escamilla-Treviño, L., 1996).

Una expresión eficiente de proteínas heterólogas no siempre es fácil de conseguir, por lo que se requiere tanto de un vector como de un sistema de expresión adecuados (Marta Izquierdo, 1993).

1.1 *Pichia pastoris*: un nuevo hospedero biotecnológico

Durante la época de los noventa se desarrollaron herramientas eficientes para convertir a la levadura *P. pastoris* en un sistema de producción de proteínas recombinantes. En la Tabla I se citan algunas de las ventajas y desventajas de *P. pastoris* como hospedero biotecnológico (Fernández-Hoeffler, 1999).

Tabla I.-Ventajas y desventajas del sistema de expresión de *P. pastoris*

Ventajas:	Desventajas:
<p>Cultivo Crecimiento rápido Alta densidad celular: > 100g /litro Medios simples compuestos de sales, biotina, y una fuente de carbono. Fácil escalamiento a volúmenes grandes, cultivos en fermentadores con alta densidad celular</p> <p>Genética Métodos de Genética Clásica disponibles Métodos Moleculares similares a <i>S. cerevisiae</i> Integración estable de los vectores de expresión</p> <p>Promotores AOX1p- Promotor fuerte, regulado de forma precisa y fácilmente regulado GAPp- Promotor fuerte y de expresión constitutiva</p> <p>Expresión Medio ambiente eucariótico que ayuda al plegamiento de proteínas heterólogas de eucariotes superiores Altos niveles de expresión</p> <p>Secreción Modificaciones postraduccionales adecuadas Formación de enlaces sulfhidrílos Procesamiento de secuencia señal Plegamiento adecuado</p> <p>Glicosilación Altos niveles de expresión (g/l) en cultivos de fermentadores Pocas proteínas en el medio y por ende alta pureza inicial de la proteína heteróloga</p>	<p>Frecuentemente se necesitan cultivos en fermentadores para producir altas cantidades de la proteína heteróloga</p> <p>Disponibilidad limitada de vectores</p> <p>Modificaciones postraduccionales inapropiadas</p> <p>Las señales nativas no siempre son procesadas Algunas proteínas son plegadas incorrectamente, afectando su secreción</p> <p>Glicosilación es del tipo de los eucariotes inferiores (alto contenido de manosa) Proteasas en el medio que degradan proteínas, incluyendo la de interés</p>

Fernández y Hoeffler, 1999.

Al ser *Pichia pastoris* un microorganismo eucariote, posee muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de eucariotes superiores, tales como procesamiento y plegamiento de proteínas, modificaciones postraduccionales, además de ser tan fácil de manipular como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. El sistema que emplea a *Pichia pastoris* como hospedero es más sencillo y menos costoso que otros sistemas de expresión basados en eucariotes superiores, y con el se obtienen generalmente niveles de expresión mayores que en estos últimos, alcanzando densidades celulares de hasta ~100 g /L de peso seco (Siegel y Brierley, 1989). Como levadura, *P. pastoris* comparte las ventajas de manipulación genéticas y moleculares con *S. cerevisiae*, pero además posee la ventaja de alcanzar niveles de producción 10 a 100 veces mayores de proteínas heterólogas que esta última (Invitrogen, 1994).

Pichia pastoris pertenece a la familia de los ascomicetos y su característica fundamental resulta ser su habilidad para utilizar el metanol como fuente de carbono y energía, por lo que se le denomina metilotrófica. La ruta metabólica para la conversión del metanol a bióxido de carbono y agua involucra a las enzimas alcohol oxidasa (AOX), catalasa, formaldehído deshidrogenasa, S-formil-glutación hidrolasa y formato deshidrogenasa (Ellis, 1985). En la primera etapa del metabolismo del metanol, éste se oxida a formaldehído empleando la enzima alcohol oxidasa y oxígeno molecular como donador de electrones, produciendo peróxido de hidrógeno (Figura 1). La AOX tiene poca afinidad por el O₂, lo cual es compensado con la síntesis de grandes cantidades de la enzima, llegando a representar el 35% de la proteína total celular (Invitrogen, 1994).

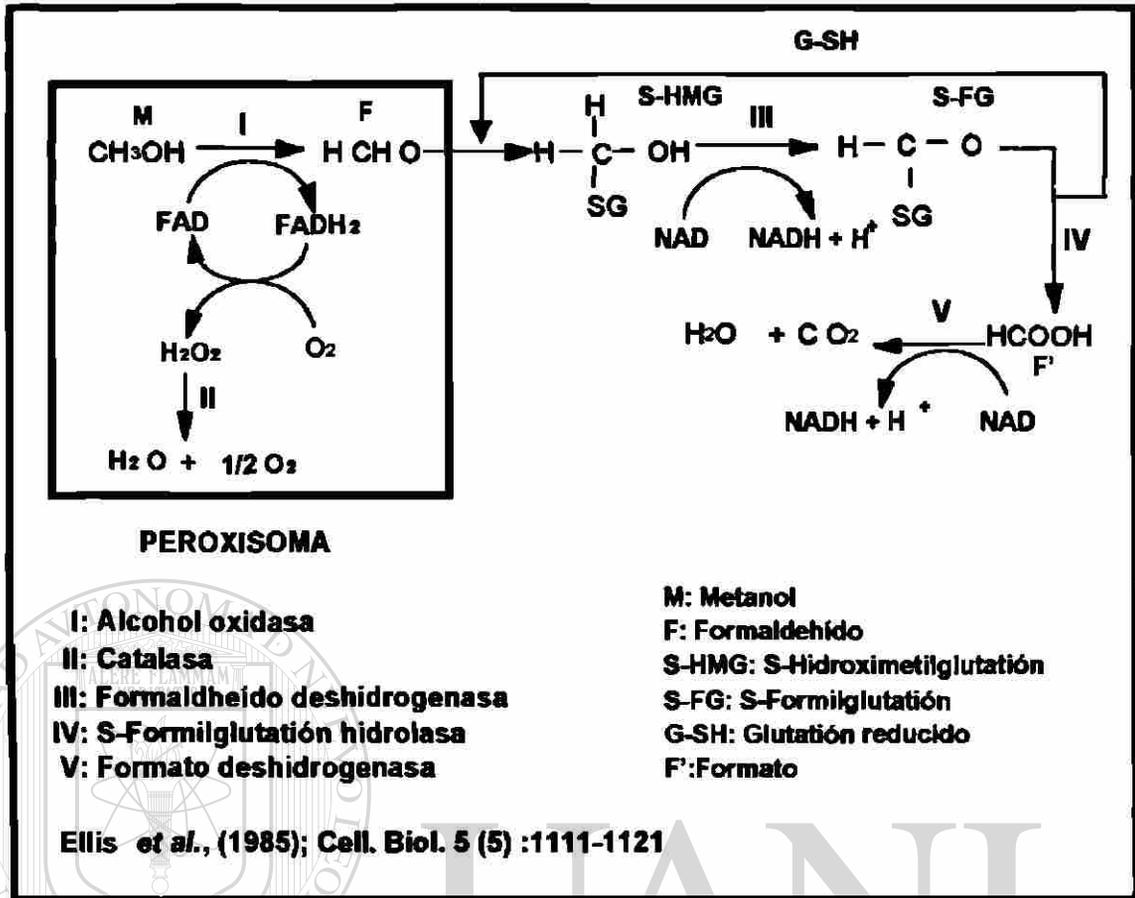


Figura 1.- Vía metabólica para la oxidación del metanol en levaduras. Las enzimas participantes están representadas por números Romanos y sus productos mediante abreviaciones.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La expresión del gen que codifica la enzima está regulada de modo que es reprimida en presencia de otras fuentes de carbono que no sean el metanol, (sea etanol, glicerol, o glucosa), pero es estimulada por éste (Buckholz y Gleeson, 1991), lo que permite que el empleo del promotor de dicho gen confiera un control fino de la producción de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris* (Cregg et al., 1993).

Existen dos genes en *P. pastoris* que codifican para la AOX, los genes *AOX1* y *AOX2*. Las proteínas producto de ambos genes tienen una similitud del 97% y poseen aproximadamente la misma actividad específica. Sin embargo, la gran mayoría de los transcritos provienen del gen *AOX1*. Por lo tanto, la enzima

que es responsable de casi toda la degradación del metanol es la codificada por el gen *AOX1* (Cregg *et al.*, 1993).

Otra ventaja que ofrece *P. pastoris* es el hecho que al crecer en medios minerales simples y secretar bajas cantidades de proteínas endógenas, la proteína heteróloga puede ser secretada al medio de cultivo para encontrarse relativamente pura (>50% de la proteína extracelular total).

1.1.1 Vectores de expresión para *Pichia pastoris*

Debido a que *P. pastoris* no posee plásmidos nativos, se han desarrollado varios vectores de expresión, los cuales se integran en el *locus* genómico *AOX1* o *His4* por recombinación homóloga, generando cepas genéticamente estables. Todos los vectores de expresión para *P. pastoris* están diseñados para transformar tanto a *E. coli* como a *P. Pastoris* (son vectores transformadores). Para propagarse en *E. coli*, los plásmidos contienen un origen de replicación y un gen de selección que confiere resistencia a ampicilina. Para *P. pastoris*, como marcador de selección, la mayoría de los vectores contienen el gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*), el cual es utilizado en combinación con cepas hospederas de *P. Pastoris* auxotrófas para histidina a causa de defectos en el gen *his4* (Cregg *et al.*, 1985).

Para la expresión de los genes heterólogos, los vectores contienen un cassette de expresión compuesto por una región de DNA de aproximadamente 0.9 kb el cual contiene la secuencia 5' (promotor) del gen *AOX1* (*AOX1p*) y un fragmento de aproximadamente 0.3 kb que contiene la secuencia 3' del gen (terminador de la transcripción o *tt*) (Koutz *et al.*, 1989). Los fragmentos del promotor y terminador están separados por uno o más sitios únicos de

clonación. Además, para la secreción de las proteínas heterólogas, los vectores cuentan con secuencias codificantes para las señales de secreción como la del factor α -MF pre-pro de *S. cerevisiae* o bien la de la fosfatasa ácida de *P. pastoris*. Ambas se han utilizado fusionándolas de forma adecuada a *AOX1p*. La Figura 2 muestra una representación gráfica del vector pPIC9K.

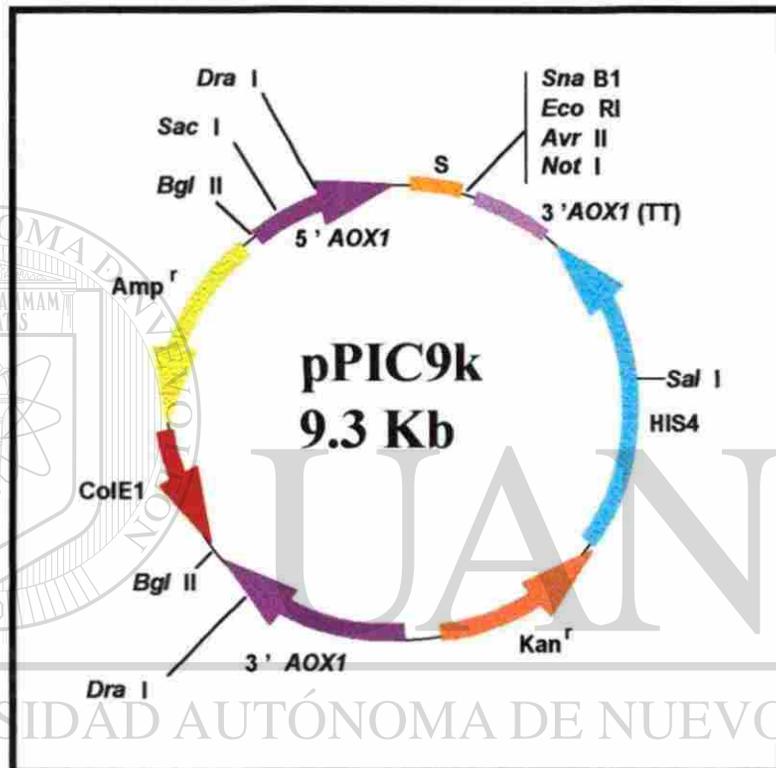


Figura 2.- El plásmido pPIC9K como vector modelo para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Se representan en forma esquemática las diferentes regiones que componen el plásmido: Promotor y terminador de la transcripción del gen *AOX1* de *P. pastoris* (regiones 5' *AOX1* y 3' *AOX1* y TT, respectivamente), región 3' del mismo gen (3' *AOX1*), gen de la histidinol deshidrogenasa (*HIS4*) de *P. pastoris*, la secuencia señal (S). También contiene secuencias necesarias para propagación del plásmido en *Escherichia coli*, tales como el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación (ColE1), además de un sitio de policlonación precedido de la secuencia señal.

Se cuenta también con vectores de expresión que poseen como promotor alternativo (Waterham *et al.*, 1997; Invitrogen, Carlsbad, CA); al *GAPp*, un promotor fuerte constitutivo derivado del gen de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAP*). En cultivos suplementados con glucosa, los

niveles de expresión obtenidos con *GAPp* son similares a aquellos observados con *AOX1p* en cultivos crecidos con metanol. Una ventaja de *GAPp* sobre *AOX1p* es que, debido a que es constitutivo, no es necesario cambiar el cultivo de un medio a otro para inducir la expresión. Sin embargo, el uso de *GAPp* es apropiado solo para genes cuyos productos no sean tóxicos para la célula. Además, los niveles de expresión de *AOX1p* son frecuentemente incrementados en cultivos con condiciones limitantes de crecimiento alimentados con metanol. Un fenómeno similar no es observado con *GAPp*

Además se ha desarrollado toda una familia de vectores para *P. pastoris* que contienen el gen *Sh ble*, el cual confiere resistencia a la droga llamada Zeocina (Higgins *et al.*, 1998). En estos vectores, el gen *Sh ble* o Zeo es el marcador de selección tanto para *E. coli* como para *P. pastoris*, contribuyendo a reducir el tamaño de dichos vectores.

1.1.2 Integración del vector al genoma de *Pichia pastoris*

Para mantener la estabilidad de la expresión de las cepas, los vectores de expresión de *Pichia* son integrados al genoma de la célula hospedera mediante recombinación homóloga. El modo más común de inserción es linearizar los vectores antes de la transformación, utilizando uno de los diferentes sitios de restricción únicos localizados dentro de las secuencias para *HIS4* o *5'AOX1p*. El DNA linear estimula los eventos de recombinación homóloga entre el DNA transformante y las regiones de homología dentro del genoma de la levadura, dando como resultado un tipo de entrecruzamiento simple (integración). La integración dentro de este *locus* se lleva a cabo con una alta frecuencia (50–80% de transformantes His⁺) (Figura 3A). Sin embargo, una alta proporción de las células transformadas no integran el vector, sino que

parecen sufrir un evento de conversión del gen, en el cual sólo el gen *HIS4* del vector es integrado dentro del locus mutado *his4*, por lo que no expresan el gen heterólogo y representan un evento de conversión génica (Fernández y Hoeffler, 1999).

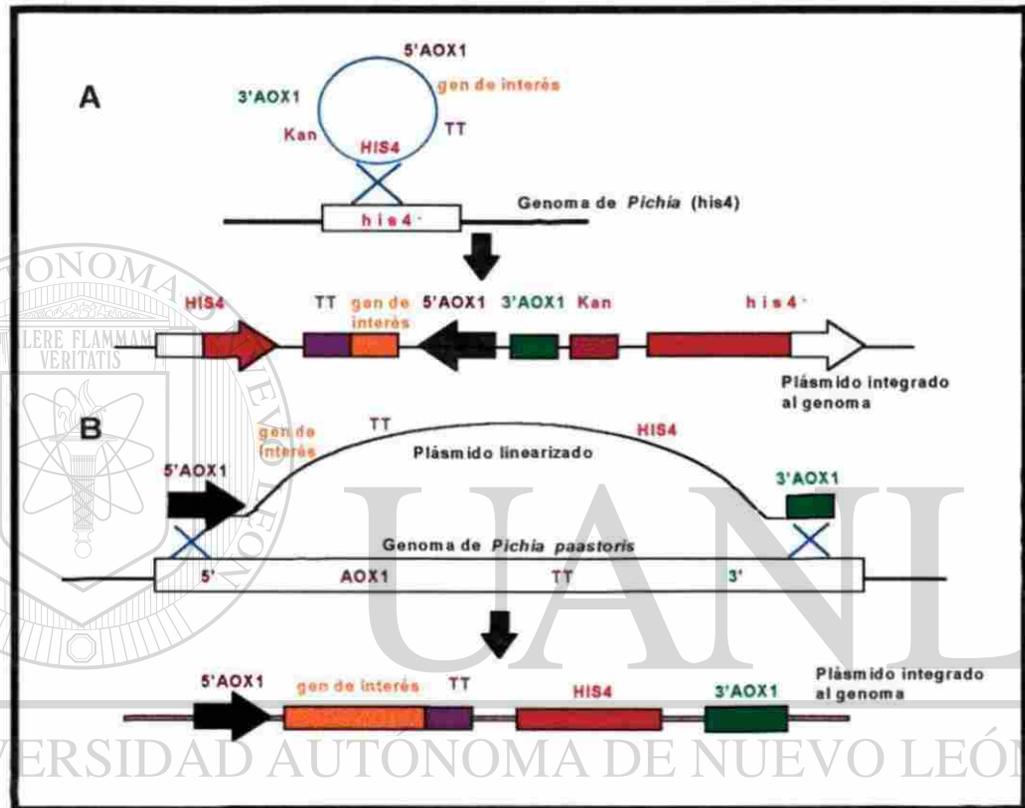


Figura 3.- Integración del vector de expresión dentro del genoma de *P. pastoris*. (A) Integración génica del cassette de expresión en el locus *his4*⁻; (B) Reemplazamiento del cassette de expresión vía un evento de recombinación doble.

En la estrategia de integración, se cuenta con vectores de expresión para *P. pastoris* que portan un fragmento adicional derivado de la secuencia 3' del gen *AOX1* (Cregg *et al.*, 1987). Estos vectores pueden ser cortados con una enzima de restricción seleccionada que libere al cassette de expresión (por ejemplo, desde el fragmento que contiene el promotor, pasando por el gen heterólogo, y hasta la secuencia del terminador) y al gen *HIS4* en un mismo

fragmento de DNA que está flanqueado por las secuencias *AOX1* 5' y 3' terminal. Los tipos de mutantes que se pueden obtener son dos :

a) **Mut^S**: Son aquellas que sufrieron delección en el gen *AOX1*, y que por lo tanto crecen lentamente en metanol (**Mut^S**: "*Metanol utilization slow*"), al depender de la enzima codificada por el gen *AOX2* para degradar éste. Aproximadamente del 10-20% de los eventos de transformación His⁺ con estos vectores, son la consecuencia de un evento de reemplazamiento del gen en el cual el gen *AOX1* es suprimido y reemplazado por la expresión del cassette y el gen *HIS4* (Figura 3B). Las cepas resultantes por lo tanto son forzadas a contar con la débil transcripción del gen *AOX2* para crecer en metanol y, como resultado, metabolizan el metanol a una velocidad reducida. Las cepas con reemplazamiento de este gen se identifican fácilmente de aquellas colonias transformadas His⁺ mediante su réplica en placa con metanol y selección de aquellas que tienen una capacidad reducida de crecer sobre metanol (fenotipo **Mut^S**). Una ventaja potencial de las cepas **Mut^S** es que en algunos de los casos los niveles de expresión de la proteína heteróloga son mayores que en el caso de cepas silvestres (**Mut⁺**), especialmente si se utilizan cultivos a nivel de matraz (Cregg *et al.*, 1987).

b) **Mut⁺**: Este otro tipo de mutantes es el que conserva el gen *AOX1* genómico intacto (Figura 4) y por lo tanto emplean eficazmente el metanol como única fuente de carbono, al igual que una cepa silvestre de *Pichia pastoris* (**Mut⁺**) (Invitrogen, 1994).

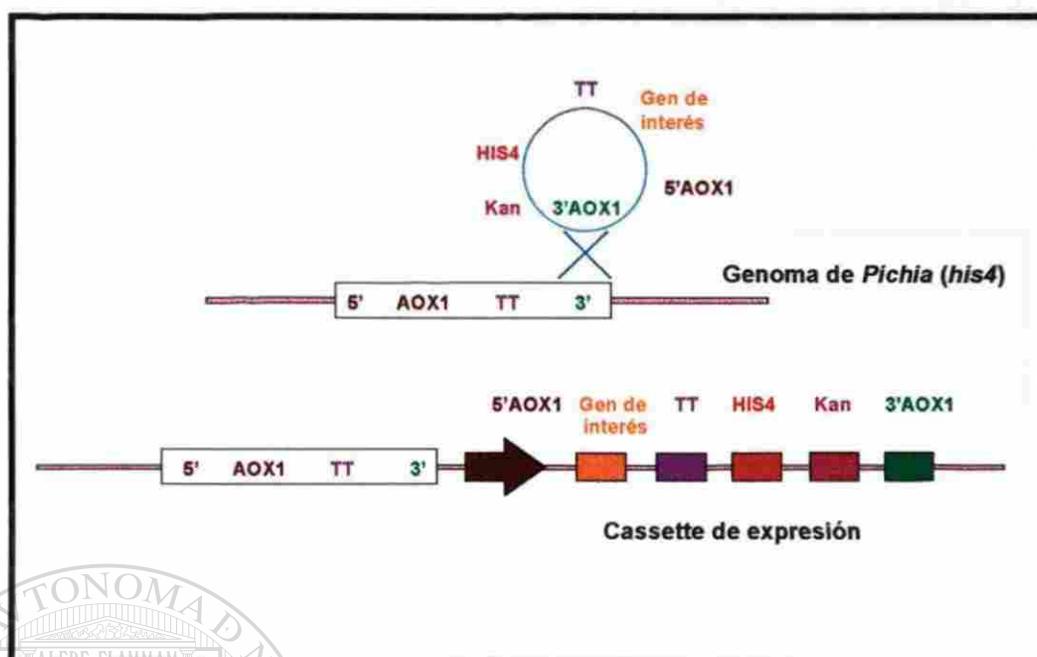


Figura 4.- Inserción génica del cassette de expresión en el locus AOX1. Los eventos de inserción génica en el locus AOX1 surgen de un evento de entrecruzamiento simple entre el locus AOX1 en el cromosoma y alguna de las tres regiones AOX1 en el vector (5', 3' o TT). El resultado es la inserción de una o más copias del vector, mientras que el gen AOX1 nativo queda intacto (Mut^+).

Los eventos de entrecruzamiento simple (inserciones) tienen mayor probabilidad de ocurrir que los eventos de entrecruzamiento doble (reemplazamiento). Eventos múltiples de inserción ocurren espontáneamente en cerca del 1 al 10% de los transformantes y son mucho más frecuentes que dos eventos independientes de entrecruzamiento simple (Invitrogen, 1994).

Se ha encontrado que del 5 al 10% de las transformantes presentan integraciones múltiples del cassette de expresión de la proteína recombinante. Para la selección de estas cepas multicopias se ha desarrollado un sistema que utiliza un plásmido transformante portando el gen Tn903 kan^r que confiere resistencia a G418 (Scorer *et al.*, 1994).

Las transformantes son propagadas en placas de agar conteniendo cantidades crecientes de G418. El nivel de resistencia de las cepas a G418

está en relación al número de copias del plásmido integradas en el genoma (Figura 5). Mediante este sistema se ha encontrado que es posible detectar hasta 30 copias por genoma.

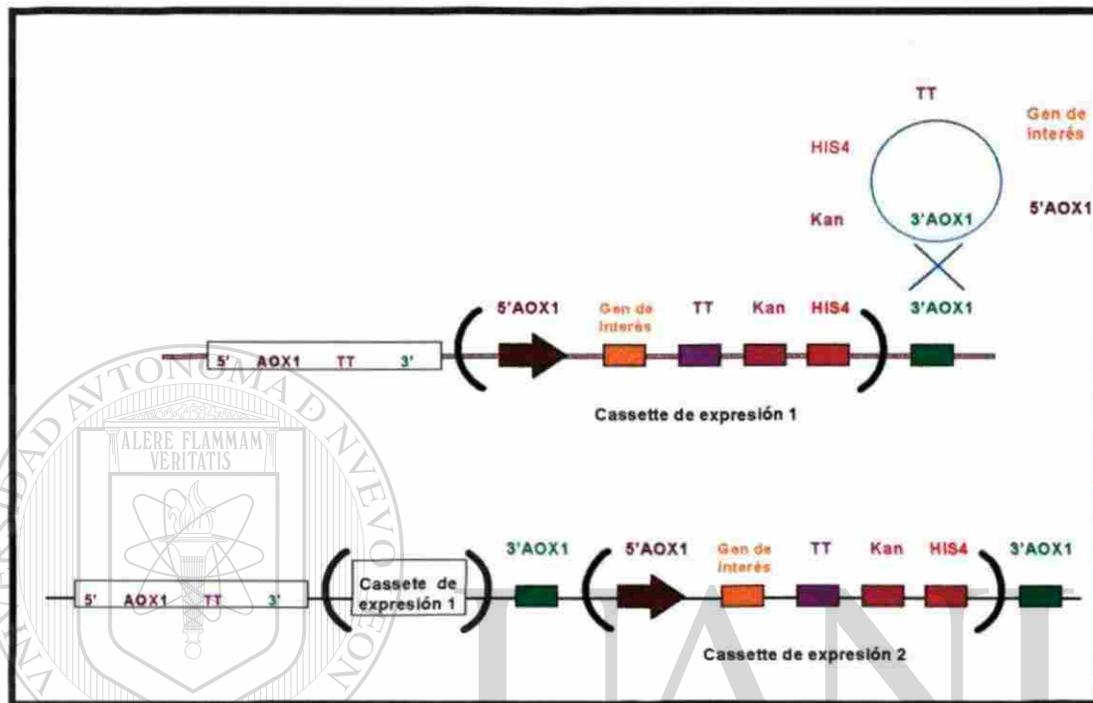


Figura No 5.- Múltiples eventos de inserción génica. Estos pueden ocurrir espontáneamente con baja frecuencia, que va desde el 1 al 10% de los transformantes His⁺. Los eventos de múltiples-copias pueden ocurrir como inserciones, ya sea en el locus AOX1 o en el his4.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS 1.1.3 Producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*

P. pastoris es una levadura de las más empleadas actualmente como hospedero para la expresión de genes recombinantes. Sólo de 1987 a 1998 se publicaron más de 300 artículos relacionados con *P. pastoris*, de los cuales alrededor del 70% tienen que ver con la producción de alguna proteína heteróloga (Escamilla-Treviño *et al.*, 1999).

Con el sistema de expresión génica de *P. pastoris* se han logrado producir proteínas heterólogas de forma intracelular, de secreción hacia el medio de cultivo, y como proteínas de membrana. En 1999 Fernández y Hoffler reportan un compendio de 73 proteína heterólogas, donde dichas proteínas provienen de la expresión de genes tanto de bacterias, hongos, plantas, invertebrados, mamíferos (diferentes al humano) y de humano.

En la Tabla II se muestran algunas de las proteínas heterólogas producidas en *P. pastoris* y los niveles de producción alcanzados (Escamilla-Treviño *et al.*, 1999).

Tabla II.- Niveles de producción de proteínas recombinantes sintetizadas en *P. pastoris* a nivel fermentador

Proteína	NC	I/S	Rend. (g/L)	Referencia
HBsAg	1	I	0.4	Cregg <i>et al.</i> , (1987)
F. de Necrosis Tumoral	>20	I	8.0	Sreekrishna <i>et al.</i> , (1989)
Lisozima Bovina c2	1	S	0.58	Digan <i>et al.</i> , (1989)
Frag. C Toxina tetánica	14	I	12.0	Clare <i>et al.</i> , (1991a)
Albúmina Humana	1	S	4.0	Barr <i>et al.</i> , (1992)
P. Anticoag. (TAP)	1	S	1.7	Loewen <i>et al.</i> , (1997)
P. Anticoag. de pez	II	S	0.04	Laroche <i>et al.</i> , (1994)
Peractina (P69)	>10	I	3.0	Romanos <i>et al.</i> , (1991)
Interleucina Humana-2	II	I	4.0	Cregg <i>et al.</i> , (1993)
Interleucina Humana-2	II	S	1.0	Cregg <i>et al.</i> , (1993)
EGF de Humano	M	S	0.5	Siegel <i>et al.</i> , (1990)
Invertasa	1	S	2.5	Tschopp <i>et al.</i> , (1987b)
Ligando trimérico CD40	1	I	0.26	McGrew <i>et al.</i> , (1997)
Estreptoquinasa	II	I	0.08	Hagenson <i>et al.</i> , (1989)
Superóxido dismutasa	1	I	0.33	Sreekrishna <i>et al.</i> , (1996)
Superóxido dismutasa	2	I	0.74	Sreekrishna <i>et al.</i> , (1996)
Aprotinina	1	S	0.14	Vedvick <i>et al.</i> , (1991)
Aprotinina	2	S	0.32	Vedvick <i>et al.</i> , (1991)
Aprotinina	5	S	0.93	Vedvick <i>et al.</i> , (1991)
Horm. crecim. salmón	18	I	0.30	Sreekrishna <i>et al.</i> , (1996)
Antígeno BM86	II	S	1.5	Rodríguez <i>et al.</i> , (1994)

NC: Número de copias del cassette de expresión
 I/S Producto intracelular o secretado
 Rend.: Rendimiento
 II: Número de copias indeterminado
 M: Número de copias múltiple, mas no determinado

Escamilla-Treviño *et al.*, (1999).

1.1.4 Fermentación

Las fermentaciones con cepas recombinantes de *P. pastoris* se llevan a cabo en dos fases (Figura 6): En la primera fase se busca el aumento de masa celular empleando un medio de cultivo mínimo, pero suplementado con glicerol o glucosa como fuente única de carbono y energía. En esta etapa se encuentra reprimida la producción de la proteína recombinante debido a que el promotor que dirige la síntesis se encuentra apagado. En la segunda fase, se activa el promotor de AOX1, al reemplazar la fuente de carbono y energía por el metanol. En esta etapa se produce la proteína recombinante, (Invitrogen, 1994).

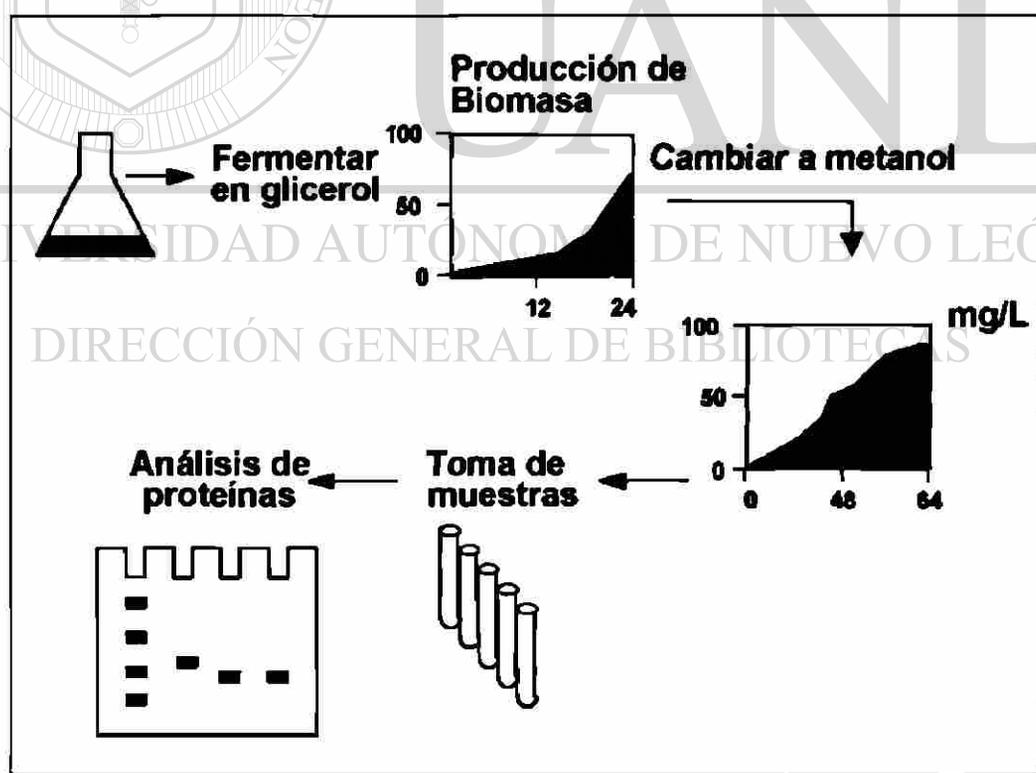


Figura 6.- Etapas de la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. Se muestra en un inicio el aumento de la masa celular y posteriormente la inducción mediante metanol de la proteína de interés, así como el análisis de muestras.

1. 2 Hormona del crecimiento humano de 20kDa

Las primeras observaciones de la existencia de la isoforma de 20 kilodaltons de la hormona del crecimiento humano (HGH 20K), fueron hechas a mediados de la década de los 70s (Singn, Seavey y Lewis, 1974) y luego confirmadas por diferentes estudios (Lewis *et al.*, 1978; Lewis *et al.*,1980; Chapman *et. al.*, 1981; DeNoto *et al.*,1981).

La HGH 20K es la segunda hormona más abundante en la pituitaria, posee una cadena sencilla de 176 aminoácidos, con un peso molecular de 20,269, un $pI=5.5$ y dos enlaces disulfuro, los mismos que ocurren en la isoforma de HGH de 22K (Bauman, 1991).

Los estudios moleculares demostraron que la HGH 20K no es el resultado de la ruptura proteolítica de alguna de las porciones terminales de la cadena de HGH 22K y tampoco se encontró un gen adicional que codificara para ésta y que pudiera explicar su existencia (Kostyo, 1987; Wallis, 1980). Lo que se descubrió, fue que la HGH 20K es una isoforma natural de HGH que resulta de una vía alternativa de maduración del transcrito primario del gen hGH-N, misma que conduce a la generación de un RNAm carente de los codones correspondientes a los residuos 32 y 46 de la HGH 22K (De Noto *et al.*, 1981). En la glándula pituitaria del 5 al 10% de la producción de HGH corresponde a esta isoforma.

La HGH 20K, al igual que la isoforma de 22K, se sintetiza como una prehormona de 202 aminoácidos con un péptido señal de 26 residuos hidrofóbicos en el extremo amino terminal de la proteína madura. Su estructura terciaria aún no ha sido determinada, ya que es muy propensa a formar homodímeros y heterodímeros con HGH 22K (Lewis *et al.*, 1978; Chapman *et*

al., 1981). La HGH 20K fue primero aislada a partir de una fracción dimérica (Lewis *et al.*, 1978) y se demostró que consistía de cuatro variantes moleculares (Brostedt, 1988). Se desconoce si estas variantes son productos nativos o son generados por los procesos de extracción. HGH 20K se encuentra evolutivamente conservada, habiéndosele ya descrito en otras especies (Sinha, 1984; Howaland *et al.*, 1987; Sinha, 1987).

1.2.1 Actividad biológica y propiedades terapéuticas

Aunque las propiedades biológicas de la HGH 20K han sido investigadas desde su descubrimiento en 1978, éstas son distintas a las reportadas para la HGH de 22K y controversiales. Esto es debido a la dificultad para preparar cantidades suficientes de HGH de 20K purificada y con su estructura auténtica (Uchida *et al.*, 1997).

Lewis y cols., mencionan que la HGH de 20K tiene una actividad similar de promover el crecimiento a la de HGH 22K (Lewis *et al.*, 1978). Frigeri y cols. describen que HGH 20K carece de actividad parecida a insulina (Frigeri *et al.*, 1979). Aunque otros autores describieron que tanto la forma recombinante como la natural poseen un efecto metabólico parecido a insulina marcadamente disminuido (Goodman *et al.*, 1986; Kostyo *et al.*, 1985).

En un intento por probar el efecto insulino-agonista, se han comparado las formas metionil de las dos hormonas de 20 y 22K, sin encontrar diferencias en las respuestas (Tinsley *et al.*, 1986; Ader *et al.*, 1987). Más tarde Ohmae y cols. las utilizaron para probar la actividad promotora del crecimiento, encontrando el 10.7% y 93.5% de actividad para HGH 20 y 22K,

respectivamente, con respecto a la hormona derivada de hipófisis (Ohmae *et al.*, 1989).

En estudios hechos con ratas hipofisectomizadas se ha encontrado que las dos formas de HGH (20 y 22K) tienen potencia similar para promover el crecimiento y generar somatomedinas (Chawla *et al.*, 1983; Kostyo *et al.*, 1985). Pero se les han encontrado efectos diferentes sobre el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos libres, tanto "*in vitro*" como "*in vivo*" (Kostyo *et al.*, 1985; Culler *et al.*, 1987; Campbell *et al.*, 1990).

En contraste con la 22K, la isoforma de 20K no acelera el empleo de glucosa y tiene actividad marcadamente disminuída, aunque no ausente, en sus efectos lipogénico e hiperglicemiante. La capacidad de HGH para aumentar la secreción de insulina y el consecuente aumento en la captación de glucosa por las células, reside principalmente en los residuos aminoacídicos 32 al 38, lo que puede explicar la disminución de este efecto en HGH 20K (Ortíz-López, 1992).

Se ha determinado que la secuencia Tyr-Ile-Pro presente en la región removida en la variante, está presente en la insulina y se piensa que ésta podría ser la responsable de este efecto. Sin embargo, aun no está claro si GH tiene este efecto insulino-agonista *per se* o si tiene un efecto potenciador sobre la insulina (Phillips III y Vnencak-Jones, 1989).

El glutamato, normalmente presente en la posición 33 de HGH 22K es el principal residuo responsable de la unión de esta hormona con algunos receptores hepáticos, en un proceso mediado por calcio. La ausencia de este residuo en la HGH 20K altera la alta dependencia del ion calcio en la unión de HGH 20K con dichos receptores y estos hallazgos son consistentes con el bajo efecto insulino-agonista de HGH 20K (Phillips III y Vnencak-Jones, 1989).

En un modelo que utiliza la conversión de fibroblastos preadipocíticos a adipocitos, Morikawa y cols. (1984) encontraron que HGH 20K es capaz de inducir el fenómeno de diferenciación adipocítica, proporcionando a esta variante una actividad adipogénica.

1.2.2 Síntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGH 20 y 22K)

Las limitaciones que se han presentado para el estudio de HGH 20K radican principalmente en su obtención en forma abundante, pura y activa. Una alternativa para superar estos problemas fue la producción de esta variante mediante la tecnología del DNA recombinante para evitar la heterogeneidad e incrementar las cantidades disponibles. La producción de HGH recombinante (HGHr) ha sido reportada principalmente en *E. coli* (Barrera-Saldaña, 1998) y de forma particular para HGH 22K, no siendo así para HGH 20K, ya que son pocos los reportes que se tienen acerca de ésta. Adelman y cols. (1983) y posteriormente otros grupos (Tinsley *et al.*, 1986; Ader *et al.*, 1987) obtuvieron biosintéticamente en bacterias la forma recombinante metionil-HGH 20K, lo cual trajo como consecuencia el estudio de esta hormona, utilizando la forma recombinante en lugar de la natural obtenida de la hipófisis. La isoforma HGH 20K recombinante también ha sido utilizada para analizar algunas de sus actividades biológicas (Kostyo *et al.*, 1985; Mc Carter *et al.*, 1990), pero aún persisten controversias sobre las mismas.

La producción de met-HGHr 20K fue una alternativa muy útil para evitar los problemas de contaminación y escasez antes mencionados, sin embargo, la molécula producida en bacterias tiene un residuo metionil extra en el extremo amino y existen varios informes en la literatura que indican que aparentemente

este residuo puede eventualmente ocasionar rechazo inmune con el uso prolongado de la hormona (Tinssley *et al.*, 1986; Ohmae *et al.*, 1989).

La HGHr también ha sido producida en *S. cerevisiae* por Tokunaga y cols., quienes en 1985 reportaron la expresión de un gen sintético para HGH y pre-HGH bajo el control del represor del promotor de la fosfatasa ácida. Los genes fueron expresados con una producción de 2.5 a 8.5 mg/L, a pesar de haber sido contruídos con un uso preferencial de los codones de *E. coli* (Tokunaga *et al.*, 1985).

Otro sistema de hospedero utilizado para expresar HGH es el que emplea *Bacillus subtilis*. En 1991, Franchi y cols. reportan una producción de HGH hacia el medio de cultivo de *Bacillus subtilis* de 35 mg/L.

En 1990 Rincón-Limas logró la clonación de los DNAs codificantes de la HGH de 22K como de la variante de 20K (Rincón-Limas, 1990). Posteriormente, en 1992, Ortíz-López logra por primera vez la obtención de una línea celular eucariótica productora de HGH 20K (Ortíz-López, 1992).

En 1993, Rincón-Limas y cols. transfectaron células COS-7 con minigenes expresores de ambas isoformas (Rincón-Limas *et al.*, 1993). Los niveles secretados de HGH de 20K en el medio de estas células resultaron mucho más bajos en comparación con los de HGH de 22K. Los valores secretados de HGH de 22K fueron en promedio de 1259 ng en una placa de 60 mm de células COS-7, mientras que los de HGH 20K fueron 41 ng. Esta diferencia se explicó en parte por la diferencia de los sistemas de inmunodetección empleado en la cuantificación, mismo que era específico para la isoforma 22K.

Escamilla-Treviño en 1996 (cepa unicopia) y mas tarde Sanchez-Domínguez en 1998 (cepa multicopia) logran la construcción de cepas

productoras de HGH 22K utilizando como hospedero a *Pichia pastoris*. En este sistema de expresión se obtuvieron valores de producción de 12.3 mg/L y 32.18 mg/L (cepa unicopia y cepa multicopia respectivamente).

Recientemente H. Uchida y cols., utilizando el gen de la proteasa neutra de *Bacillus amyloliquefaciens* (npr), construyó un sistema de secreción de HGH 20K en *E. coli*, logrando una producción de 28.2 mg/L de HGH 20K secretada. En este sistema se encontró que la co-expresión de glutatión reductasa notablemente incrementaba la acumulación de los niveles de HGH 20K en periplasma (76.1 mg/L) y se confirmó que la HGH 20K secretada fué correctamente procesada (Uchida *et al.*, 1997)

Recientemente Kerr y cols. (1998) reportan la generación de un ratón transgénico el cual expresa HGH en el epitelio de vejiga, dando como resultado la secreción en orina de HGH a niveles de 100-500 ng/ml. Los niveles de concentración de HGH en orina permanecen constantes durante más de 8 meses. Mencionan además, que debido a que la orina posee pocas proteínas y lípidos, el utilizarla como material de partida facilita la purificación de la proteína recombinante.

1.2.3 Potencial farmacológico de HGH 20K y perspectivas para su producción

En el campo farmacológico, HGH 22K ha demostrado ser útil para el tratamiento de niños con enanismo hipofisiario (Phillips III y Vnencak-Jones, 1989), en ancianos parece contrarrestar algunos de los efectos de la vejez, en pacientes con quemaduras de piel, úlceras y fracturas óseas, acelera el metabolismo y la regeneración tisular, en personas que sufren hipoglicemia su

actividad hiperglicemiante se ha aprovechado (Birnbaum y Goodman, 1976), y entre los atletas ha despertado gran interés por su potencial anabólico (Takano, 1983).

Sin embargo, se ha reportado que el tratamiento prolongados con HGH 22K puede desencadenar diabetes mellitus, hipertensión arterial y/o aterosclerosis, como consecuencia de la actividad diabetogénica y lipogénica de esta hormona. Por lo que se ha contemplado utilizar a la variante de 20K como alternativa para el tratamiento, con la finalidad de disminuir los efectos secundarios mencionados, ya que algunos autores manifiestan la carencia del efecto diabetogénico en esta variante (Culler *et al.*, 1987; Campbell *et al.*, 1990).

1.3 Justificación

Para examinar la actividad biológica de la forma nativa de HGH 20K, es esencial construir un sistema eficiente de producción con su estructura auténtica. Con ello se aportaría una fuente apropiada para la purificación de la hormona en cantidades suficientes para realizar estudios fisiológicos y farmacológicos que contribuyan al conocimiento de su función.

CAPITULO 2

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Construir clonas de *Pichia pastoris* sobreproductoras de la isoforma de HGH 20K.

2.1.1 Objetivos particulares

1. Construir un vector plasmídico de integración para *P. pastoris* portador del cassette de expresión del DNAc de la hGH de 20K.
2. Integrar de forma sitio dirigida el vector recombinante construido, en el genoma de *P. pastoris*
3. Verificar la integración y caracterizar las clonas recombinantes obtenidas.
4. Seleccionar las clonas que integraron múltiples copias del cassette de expresión.
5. Caracterizar el producto recombinante.
6. Seleccionar la cepa sobreproductora de HGH de 20K

CAPITULO 3

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Area de Trabajo, Reactivos y Material Biológico

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

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

Los reactivos para las diferentes soluciones provienen de Sigma Chemical Co. (St Louis Mo, EUA), Merck de México (Monterrey, N.L.) y Reactivos Monterrey (Monterrey, N.L.). El plásmido pPIC9hGH22K (Escamilla-Treviño, L. L. 1996) y la cepa XL1-Blue de *E. coli* provienen de la colección de plásmidos y bacterias del laboratorio de Biotecnología de la U.L.I.E.G., Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina, de la U.A.N.L. El sistema de expresión de *Pichia pastoris* el cual incluye la cepa GS115, GS115-Albúmina, GS115- β -

Galactosidasa, la cepa de *E. coli* TOP10F', vectores, iniciadores y el Kit para formación de esferoplastos, se adquirieron de Invitrogen Corporation (San Diego Ca, EUA).

3.2 Equipo

Se utilizó un horno de microondas GoldStar modelo MA-857M (Seul, Corea), microcentrifugas Eppendorf modelos 5402 y 5415 (Westbury, N. Y.), una fuente de poder Biorad 200/2.0 (Nebraska, EUA), un agitador de tubos Barnstead/Thermolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, Iowa, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un ultracongelador marca So-Low Enviromental Equipment (Cincinnati, Ohio, EUA) y una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (K.C., Missouri, EUA), una báscula digital marca Sartorius modelo 1206MP (Camibh Göttingm Germany), un concentrador centrífuga al vacío marca Labconco Corporation modelo 78100-00 (K.C., Missouri, EUA). El termociclador utilizado fue el modelo PT 150 de MJ Research (Watertown, Mass., EUA).

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

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

Los programas computacionales de Biología Molecular fueron: *Amplify* versión 1.2b (Bill Engeles © 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI EUA), *DNA Strider*™ 1.1 (© Ch. Marck and C.E.A. 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *OLIGO* versión 4.0 (© 1992, Plymouth, MN, EUA), *Clustal* versión 1.5 (Multiple Sequence Alignments) y el servicio Basic Local Alignment Search Tool de NCBI, secuencias *Blast* versión 2.0.

Para la determinación del % relativo de HGH con respecto a las proteínas totales se utilizó un aparato de fotodocumentación de imágenes Gel DOC 1000 de Bio-Rad (Hercules, CA)

3.3 Métodos

3.3.1 Estrategia general

La parte experimental fue realizada de acuerdo a las siguientes etapas:[®]

- Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGh22K en *E. coli* XL1-Blue;
- Construcción del vector pPIC9KhGH20K;
- Análisis de los vectores construidos mediante caracterización enzimática y secuenciación;
- Transformación de *P. pastoris* GS115 con el vector pPIC9KhGH20K;
- Caracterización de los genotipos y fenotipos de las transformantes obtenidas;
- Selección de clones conteniendo multicopias del cassette de expresión; y
- Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K. Una representación esquemática de la estrategia general y sus etapas se muestra en la Figura 7.

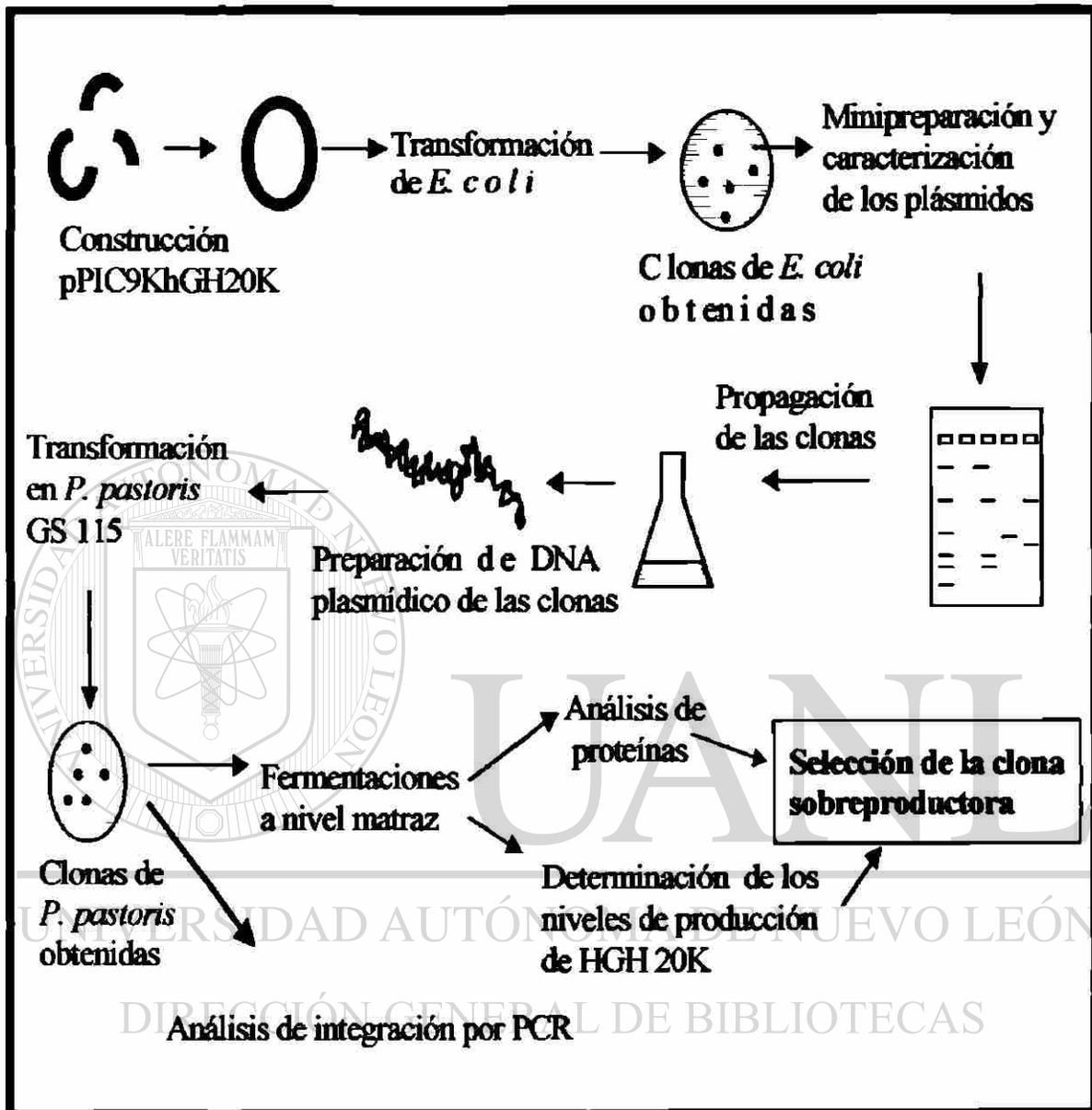


Figura 7.- Representación esquemática de la estrategia general. Muestra cada una de las etapas realizadas para la construcción de la clona de *P. pastoris* sobreproductora de HGH 20K.

3.3.1.1 Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGH22K en *E. coli* XL1-Blue

Células calcio-competentes de *E. coli* XL1-Blue fueron transformadas con los plásmidos: pBS (Stratagene, Co.), pJV (construido por H. Barrera y D. Baty, resultados no publicados; ver Anexo 4), pPIC9K (Invitrogen) y pPIC9hGh22K (Escamilla-Treviño, 1996). La preparación de las bacterias calcio-competentes, así como la transformación se realizaron de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook y cols. en 1989. Posteriormente se levantaron las colonias de bacterias portando cada uno de los plásmidos (pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGh22K) y se cultivaron en 1L de caldo LB para después realizar el aislamiento de DNA plasmídico a gran escala utilizando ultracentrifugación en gradiente de densidad en cloruro de cesio, de acuerdo a una modificación al método descrito por Clewell y Helsinki en 1970 (Cab-Barrera y Barrera-Saldaña, 1988). De esta manera se obtuvo una fuente de plásmidos de buena calidad para llevar a cabo la construcción del plásmido pPIC9KhGH20K.

Para la construcción del vector pPIC9KhGH20K fue necesaria la fabricación adicional de tres plásmidos: pBS20K, pBSPIC9, y pBSPIC20 (Ver Anexos 5 y 6). La construcción de cada uno de estos plásmidos se describe a continuación.

3.3.1. 2 Construcción del plásmido pBS20K

Para construir pBS20K, se utilizó al plásmido pBluescript SK (pBS) como receptor y a pJV como donador. Mientras que el primero es un vector simple

depropagación, el segundo contiene la secuencia completa del DNAC de hGH de 20K. Tanto pBS como pJV se digirieron con las endonucleasas de restricción: *Xho* I y *Hind* III, generando así extremos compatibles para su ligación. La digestión de pBS con *Xho* I y *Hind* III generó dos fragmentos: uno pequeño de 21 pb (correspondiente a la región de policlación) y otro mayor de 2940 pb (resto del plásmido). Mientras que la digestión de pJV con *Xho* I y *Hind* III generó también dos fragmentos: uno pequeño de 609 pb (correspondiente al DNAC de hGH 20K) y el otro mayor de 5253 pb (correspondiente al resto del plásmido). La ligación se llevó a cabo entre el fragmento de 609 pb (DNAC hGH20K) y el fragmento de 2940 pb (vector pBS), generando así el primer plásmido: pBS20K (3549 pb, que contiene la secuencia completa del DNAC de hGH 20K). Las clonas recombinantes se analizaron mediante digestión con las endonucleasas de restricción: *Pvu* II, *Xba* I y *Bgl* II, principalmente. En la Fig. 8 se muestra una representación esquemática de la construcción de este vector.

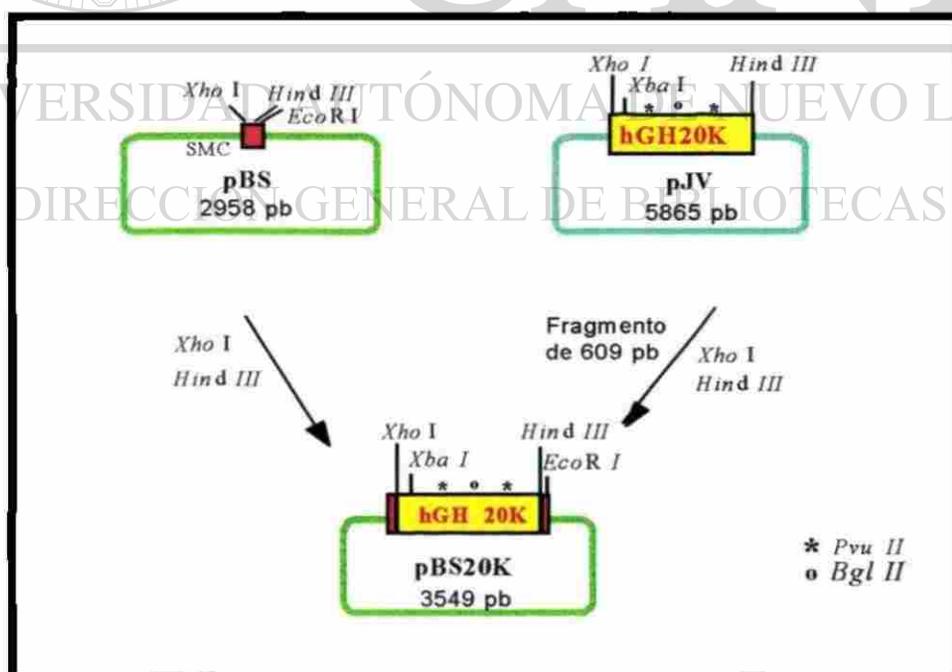


Figura 8.- Representación esquemática de la construcción del vector pBS20K. Para esta clonación se utilizó como plásmido donador a pJV y como plásmido receptor a pBS. El tamaño del fragmento clonado fue de 609 pb, el cual contenía el DNAC de hGH 20K.

3.3.1.2.1 Preparación de los fragmentos de ligación

Las digestiones preparativas de pBS y pJV con *Xho* I (NEB) y *Hind* III (NEB), se llevaron a cabo bajo las recomendaciones de las casas comerciales que distribuyen dichas enzimas de restricción, y se integraron mezclando lo siguiente:

	pJV μL	pBS μL
Solución amortiguadora #2 10X (NEB)	20	10
Agua ultrapura	58	64
BSA 100X	2	1
DNA	100 (200 ng/μL)	15 (700 ng/μL)
Enzima <i>Xho</i> I (4 U/μL)	10	5
Enzima <i>Hind</i> III (10 U/μL)	10	5
Volumen total de reacción	200	100

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante toda la noche y las digestiones fueron verificadas por el análisis de alícuotas de 4 μL mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%. Una vez verificada la digestión completa, se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a nivel preparativo. El gel fue teñido con bromuro de etidio (2 μg/mL en TBE). Los fragmentos de 609 pb de la digestión de pJV con *Xho* I y *Hind* III y de 2940 pb de la digestión de pBS con *Xho* I y *Hind* III, fueron recuperados del gel cortando las bandas correspondientes con ayuda de un bisturí. Estos fragmentos fueron extraídos de la matriz de agarosa utilizando la técnica de fibra de vidrio siliconizada (Zavala-Díaz de la Serna, 1995) y se resuspendieron en el amortiguador TE de pH=7.4 y se almacenaron a -20°C hasta su empleo.

3.3.1.2.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo en una proporción 1:5 (vector de 2940 pb:fragmento de 609 pb) utilizando la DNA ligasa del fagoT4 (BRL) y los siguientes reactivos.

	Vector + fragmento μL	Vector <i>Xho</i> I- <i>Hind</i> III μL	Vector <i>Hind</i> III μL
Amortiguador de ligación 5X	3	2	2
Agua ultrapura	—	2	2
Vector (pBS)	6 (200 ng/ μL)	5	5
Fragmento (hGH 20K + <i>Xho</i> I + <i>Hind</i> III)	5 (200 ng/ μL)	—	—
Enzima Ligasa (1 U/ μL)	1	1	1
Volumen total de reacción	15 (26.66 ng/ μL)	10	10

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 16°C y se corroboró la ligación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y tinción del mismo con bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TBE). Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* XL1-Blue con 5 μL del producto de ligación utilizando bacterias calcio-competentes de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook y cols. 1989. Las células transformadas fueron crecidas en placas que contenían además del medio de cultivo y los antibióticos (ampicilina y tetraciclina), IPTG y X-Gal. Se tomaron 5 μL de cada una de las reacciones antes de agregar la enzima ligasa, para utilizarlos como controles al correr el gel (2.5 μL para la verificación de la ligación), así como para la

transformación (2.5 μ L). Además se utilizaron como controles: Amortiguador TE (Tris-EDTA), pUC18 (para determinar la eficiencia de transformación), la reacción de ligación de ambos fragmentos pero sin la enzima ligasa, el vector (pBS)+ *Hind* III con y sin ligasa y el vector (pBS) + *Xho* I + *Hind* III con y sin ligasa.

3.3.1.2.3 Selección y análisis de clonas de *E. coli* XL1-Blue portadoras de pBS20K

La selección de colonias transformantes se realizó tomando en cuenta dos parámetros: a) su crecimiento en medios de cultivo que contenían tetraciclina y ampicilina como marcadores de selección, ya que solamente las células que integrarán el plásmido serían capaces de crecer en medios de cultivo que contenían ambos antibióticos; b) su coloración, ya que se utilizó el ensayo de colonias azules y blancas (Cab-Barrera y Barrera-Saldaña, 1989) para determinar de forma visual las clonas que aceptaron el plásmido recombinante (blancas) de la que no lo hicieron (azules).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

De las colonias obtenidas por transformación (selección por resistencia a tetraciclina y ampicilina) se levantaron colonias blancas para su posterior análisis. Se inocularon de forma individual en tubos con 4 mL de caldo LB con ampicilina (100 μ g/mL) y tetraciclina (50 μ g/mL) y se incubaron a 37°C a 250 rpm durante toda la noche. Posteriormente se tomaron 3 mL de cada cultivo y se realizó aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala (minipreparación) de acuerdo al método descrito por Gilles Morelle (Morelle, 1989). El DNA plasmídico aislado de cada una de las colonias fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y las clonas que mostraron el patrón esperado mediante la migración del DNA de forma superenrollada, fueron sometidas a

digestión con un juego de endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Hind* III, *Sac* I, *Xho* I, *Pst* I, *Xho* I-*Hind* III, *Pvu* II, *Xba* I, y *Xba*-*Sma* I. Finalmente, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar cada una de las digestiones. Los fragmentos teóricos fueron obtenidos mediante el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* alimentado con la secuencia del plásmido pBS20K.

3.3.1.3 Construcción del plásmido pBSPIC9

Se utilizó el plásmido pBluescript SK (pBS), como plásmido receptor y a pPIC9hGH22K como plásmido donador, el cual contiene la secuencia completa del DNAC de hGH 22K. Tanto pBS como pPIC9hGH22K fueron digeridos con las enzimas de restricción *Sac* I y *Xba* I generando así extremos compatibles para su ligación. La digestión de pBS con *Sac* I y *Xba* I generó dos fragmentos: uno pequeño de 24 pb (correspondiente a la región de policlonación) y otro mayor de 2937 pb (resto del plásmido). La digestión de pPIC9hGH22K con *Sac* I y *Xba* I generó tres fragmentos: el primero de 1018 pb (este fragmento incluye 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9K desde la posición 209 hasta la posición 948; la región codificante para la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y por último posee 19 pb del extremo 5' de DNAC de hGH 22K, correspondientes a la proteína madura); el segundo de 1377 pb (este fragmento incluye el resto de la secuencia de la proteína madura de hGH de 22K, con todo y su codón de terminación, además de 17 pb de la región de policlonación de pPIC9hGH22K y 333 pb de la región de terminación de la transcripción del extremo 3' AOX1) y el tercero y último de 6194 pb (resto del vector pPIC9). La ligación se llevó a cabo entre el fragmento de 1018 pb (pPIC9hGH22K) y el fragmento de 2937 pb (vector pBS), generando así el segundo plásmido: pBSPIC9 (3955 pb). Las clonas recombinantes se

analizaron mediante digestión con las endonucleasas de restricción: *Pvu* II, *Xba* I, y *Bgl* II, principalmente. En la Figura 9 se muestra una representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC9.

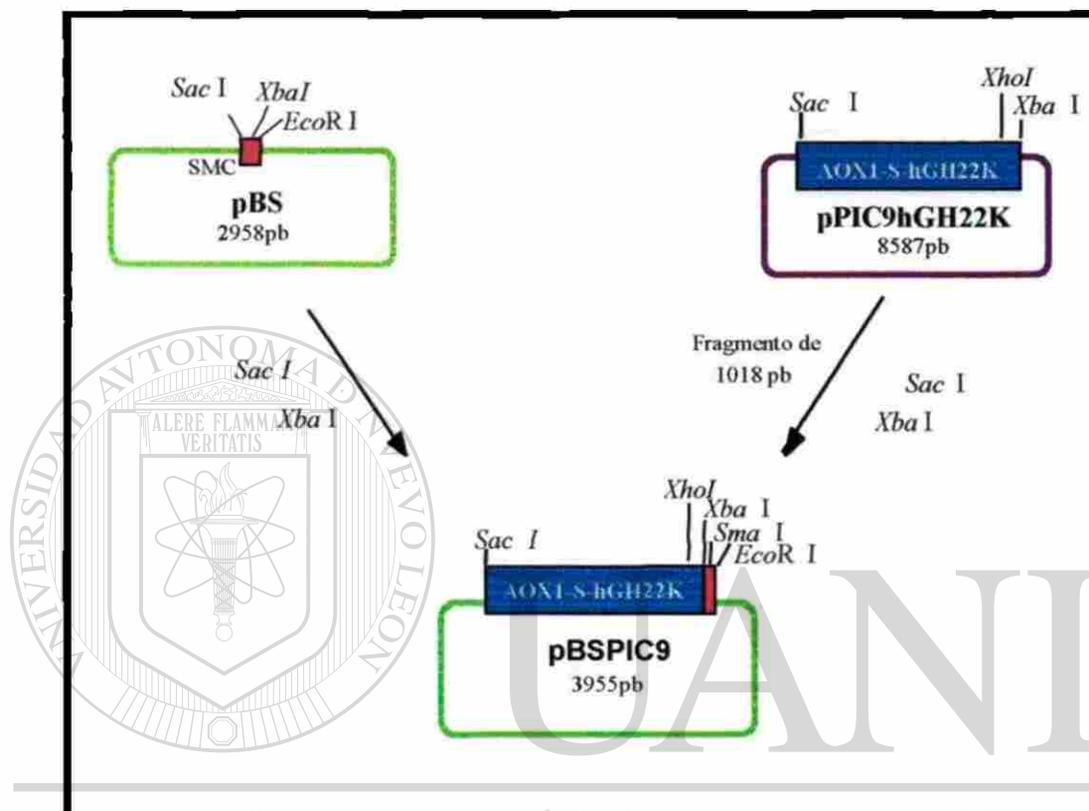


Figura 9.- Representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC9. Se utilizó como plásmido donador a pPIC9hGH22K y como receptor a pBS. El fragmento clonado fue de 1018 pb.

3.3.1.3.1 Preparación de los fragmentos de ligación

Las digestiones preparativas de pBS y pPIC9hGH22K con *Sac* I (NEB) y *Xba* I (NEB), se llevaron a cabo bajo las recomendaciones de las casas comerciales que distribuyen dichas enzimas de restricción y fueron preparadas como sigue:

	pBS μL	pPIC9hGH22K μL
Solución amortiguadora #4 10X (NEB)	5	10
Agua ultrapura	23	60
DNA	16 (500 ng/μL)	20 (1 μg/μL)
Enzima Sac I (10 U/μL)	3	5
Enzima Xba I (10 U/μL)	2	5
Volumen total de reacción	50	100

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante toda la noche y las digestiones fueron verificadas por el análisis de alícuotas de 1 μL de la mezcla de reacción siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el punto 3.3.1.2.1 para pBS20K. En este caso los fragmentos recuperados fueron de 1018 pb y 2937 pb de la digestión de pPIC9hGH22K y pBS con Sac I y Xba I, respectivamente.

3.3.1.3.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación se integró como sigue:

	μL
Amortiguador de ligación 5X	3.0
Agua ultrapura	5.3
Vector (pBS + Sac I + Xba I)	3.0 (285 ng/μL)
Fragmento (1018pb de Sac I + Xba I)	2.7 (100 ng/μL)
Enzima Ligasa (1 U/μL)	1.0
Volumen total de reacción	15.0 (75 ng/μL)

La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 16°C, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el punto 3.3.1.2.2, para pBS20K. En este caso se utilizaron como controles de transformación: 1) amortiguador de TE; 2) la reacción de ligación de ambos fragmentos pero sin la enzima ligasa y 3) pUC18 para determinar la eficiencia de transformación.

3.3.1.3.3 Selección y análisis de clonas de *E. coli* XL1-Blue portadoras de pBSPIC9

De las colonias obtenidas por transformación (selección por resistencia a tetraciclina y ampicilina) se levantaron solamente colonias blancas y se analizaron como se describe en el punto 3.3.1.2.3. Las clonas que mostraron el patrón esperado fueron sometidas a digestión con un juego de endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Sac* I, *Sma* I, *Xba* I, *Sac* I-*Sma* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Xho* I y *Xba* I-*Sma* I. Finalmente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar cada una de las digestiones. Los fragmentos teóricos fueron obtenidos mediante el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* alimentado con la secuencia del plásmido pBSPIC9[®]

3.3.1.4 Construcción del plásmido pBSPIC20

Se utilizó el plásmido pBSPIC9, como plásmido receptor y como plásmido donador del fragmento de interés a pBS20K. Tanto pBSPIC9 como pBS20K se cortaron con *Xba* I y *Sma* I, generando así extremos compatibles para su ligación. La digestión de pBSPIC9 con *Xba* I y *Sma* I genera dos fragmentos: uno pequeño de 18 pb (de la región de policonación) y otro mayor de 3937 pb

(resto del vector). La digestión de pBS20K con *Xba* I y *Sma* I genera cuatro fragmentos: uno de 18 pb (región de policonación), otro de 35 pb (vector), uno mas de 516 pb (que incluye el fragmento a partir de 7° codon del DNAC de hGH 20K de la proteína madura) y por último uno de 2980 pb (resto del vector). La ligación se llevó a cabo entre el fragmento de 516 pb (DNAC hGH 20K) y el de 3937pb (vector pBSPIC9), generando así el tercer plásmido: pBSPIC20 (4453 pb). Las clonas recombinantes se analizaron mediante digestión con las endonucleasas de restricción: *Pvu* II, *Xba* I, y *Bgl* II, principalmente. En la Figura 10 se muestra una representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC20.

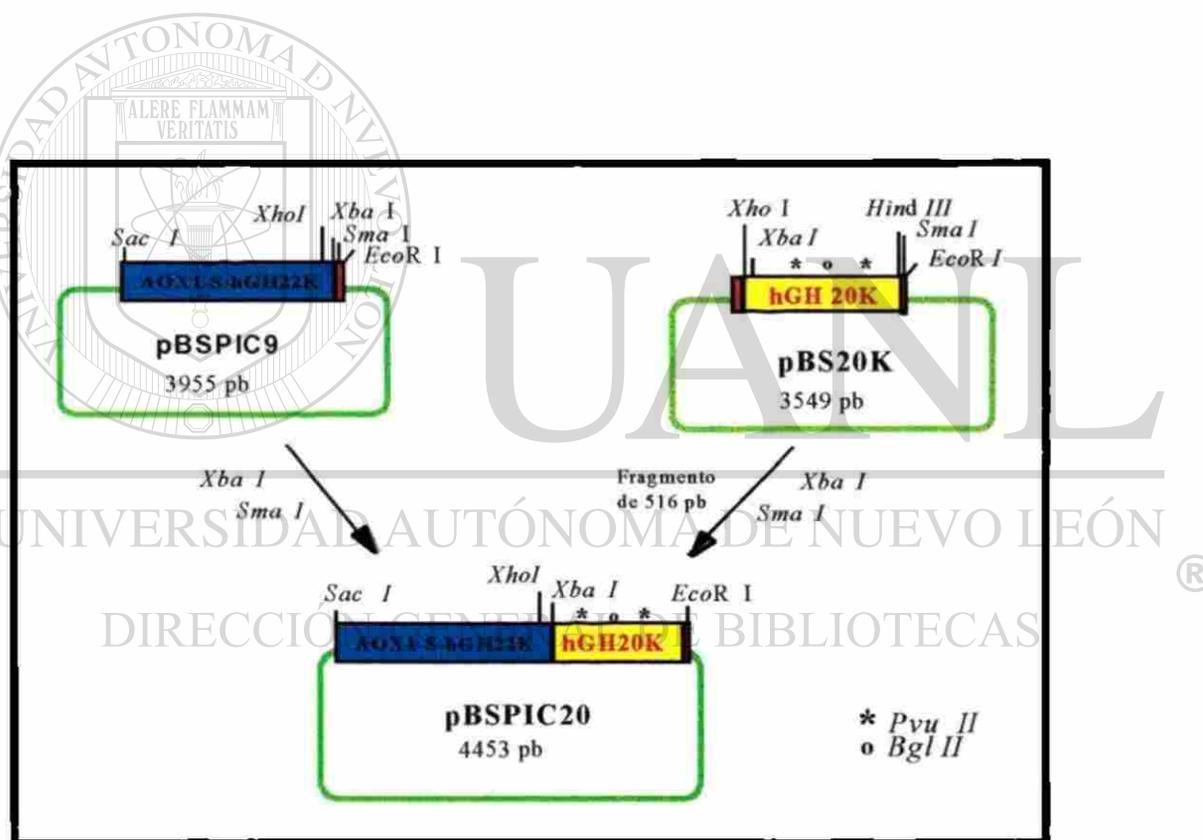


Figura 10.- Representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC20. Se utilizó como plásmido donador a pBS20K y como plásmido receptor a pBSPIC9. El fragmento clonado fue de 516 pb, el cual contenía el DNAC de hGH 20K.

3.3.1.4.1 Preparación de los fragmentos de ligación

Las digestiones preparativas de pBS20K y pBSPIC9 con *Xba* I y *Sma* I, se ensamblaron como sigue:

	pBS20K μL	pBSPIC9 μL
Solución amortiguadora #4 10X (BRL)	5	10
Agua ultrapura	36	60
DNA	6 (1.8 μg/μL)	20 (1 μg/μL)
Enzima <i>Xba</i> I (10 U/μL)	3	5
Volumen total de reacción	50	100

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se verificó la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Además se guardó una pequeña alícuota (de 5μL la cual fue utilizada como referencia de corte, ya que la digestión de pBS20K con *Xba* I, libera dos fragmentos: uno de 2980 pb y otro de 569 pb, y este último fragmento es el que posteriormente se corta con la enzima *Sma* I, generando los fragmentos de 516 pb, 35 pb y 18 pb. El fragmento de 516 pb (DNAc de hGH 20K) se utiliza para la construcción del plásmido pBSPIC20 por lo que fue necesario asegurar que ambas enzimas cortaran de forma adecuada (Ver Figura 11).

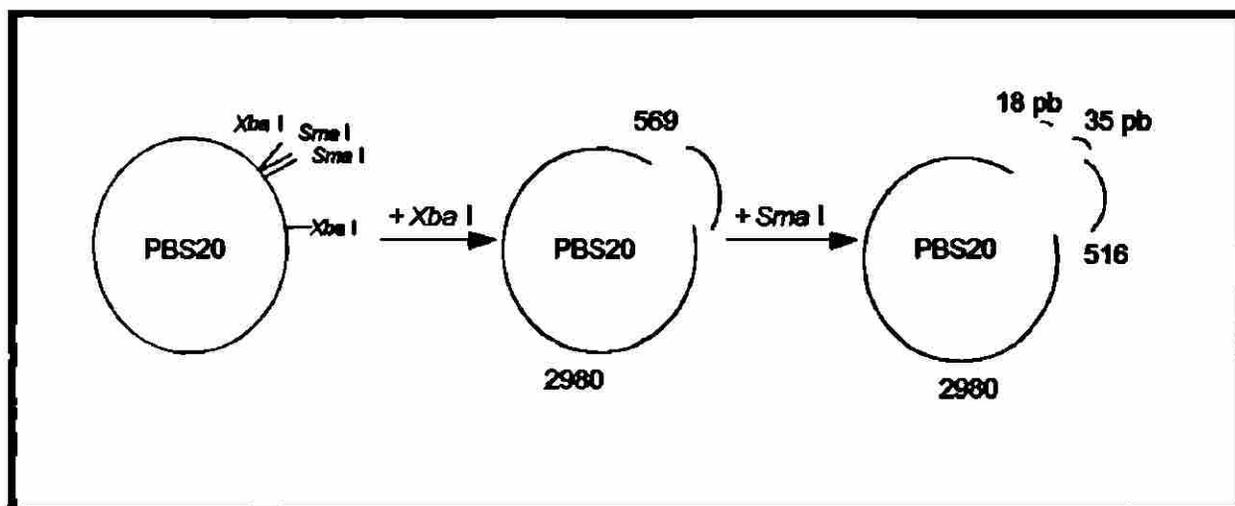


Figura 11.- Corte enzimático de pBS20K con *Xba* I y *Sma* I. Muestra una representación esquemática de la liberación del fragmento de 516pb (DNAC de hGH 20K).

Posteriormente a la mezcla de reacción se le agregó:

	pBS20K μL	pBSPIC9 μL
Solución amortiguadora #4 10X (NEB)	1	1
Agua ultrapura	6	6
Enzima <i>Sma</i> I (10 U/μL)	3	3
Volumen final de reacción	10	10

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las mezclas de reacción se incubaron en este caso a 25°C durante toda la noche y las digestiones fueron verificadas por el análisis de alícuotas de 1.5 μL mediante electroforesis en geles de agarosa 1.0%, siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el punto 3.3.1.2.1 para pBS20K. En este caso los fragmentos recuperados fueron de 516 pb y 3937 pb de la digestión de pBS20K y pBSPIC9 con *Sma* I y *Xba* I respectivamente.

3.3.1.4.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo tal como se describe en el punto 3.3.1.2.2 pero en una proporción 1:5 (vector de 3937 pb: fragmento de 516 pb). Se llevó a cabo la transformación de *E. coli* XL1-Blue con 5 µl del producto de ligación utilizando bacterias calcio-competentes. Se utilizaron como controles de transformación: 1) amortiguador de TE; 2) la reacción de ligación solo del vector (sin el fragmento) y 3) pUC18 para determinar la eficiencia de transformación.

3.3.1.4.3 Selección y análisis de clonas de *E. coli* XL1-Blue portadoras de pBSPIC20

De las colonias obtenidas por transformación (selección por resistencia a tetraciclina y ampicilina) se levantaron colonias blancas y se analizaron de igual manera como se describe en el punto 3.3.1.2.3. Las clonas que mostraron el patrón esperado mediante la migración del DNA de forma circular, fueron sometidas a digestión con una batería de endonucleasas de restricción dentro de las que destacan: *Xba* I, *Bgl* II y *Pvu* II. Finalmente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar cada una de las digestiones. Los fragmentos teóricos fueron obtenidos mediante el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* alimentado con la secuencia del plásmido pBSPIC20.

3.3.1.5 Construcción del vector pPIC9KhGH20K

Se utilizó a pPIC9K como vector receptor y como plásmido donador a pBSPIC20. Tanto pPIC9K como pBSPIC20 se cortaron con las enzimas de restricción *Sac* I y *Eco* RI, generando así extremos compatibles para su ligación. La digestión de pBSPIC20 con *Sac* I y *Eco* RI generó dos fragmentos: uno de 1546 pb (este fragmento incluye 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9K desde la posición 209 hasta la posición 948; la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, además 19 pb del extremo 5' de DNAC de hGH 22K, correspondientes a la proteína madura y por último contiene a partir del codón 7 del DNAC de hGH 20K) y el otro de 2907 (resto del vector). La digestión de pPIC9K con *Sac* I y *Eco* R I genera dos fragmentos: uno de 1018 pb (este fragmento incluye 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9K desde la posición 209 hasta la posición 948; la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y además posee el sitio de policlonación para la enzima *Sna* B1) y el último de 8258 pb (resto del vector pPIC9K). La ligación se llevó a cabo entre el fragmento de 1546 pb (secuencia señal y DNAC hGH 20K) y el fragmento de 8258 (vector pPIC9K), generándose así el vector pPIC9KhGH20K (9804 pb). Las clonas recombinantes se analizaron mediante digestión con las endonucleasas de restricción: *Pvu* II, *Xba* I, y *Bgl* II. En la Figura 12 se muestra una representación esquemática de la construcción de pPIC9KhGH20K.

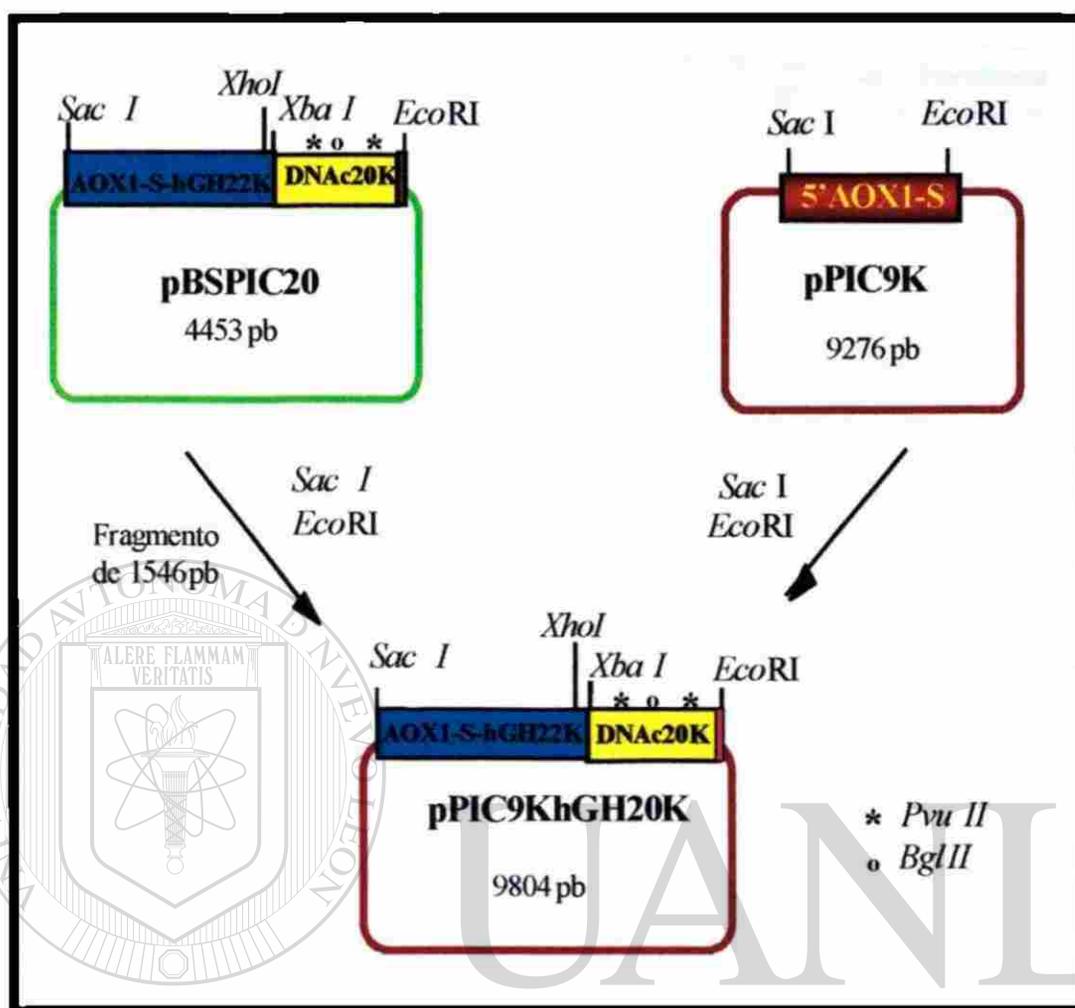


Figura No 12.- Representación esquemática de la construcción del vector pPIC9KhGH20K. Se utilizó como plásmido donador a pBSPIC20 y como plásmido receptor a pPIC9K. El fragmento clonado fue de 1546 pb que corresponde a la secuencia señal y DNAc hGH 20K.

3.3.1.5.1 Preparación de los fragmentos de ligación

En este caso se llevaron a cabo dos estrategias experimentales de ligación tal como se muestra en la Figura 13.

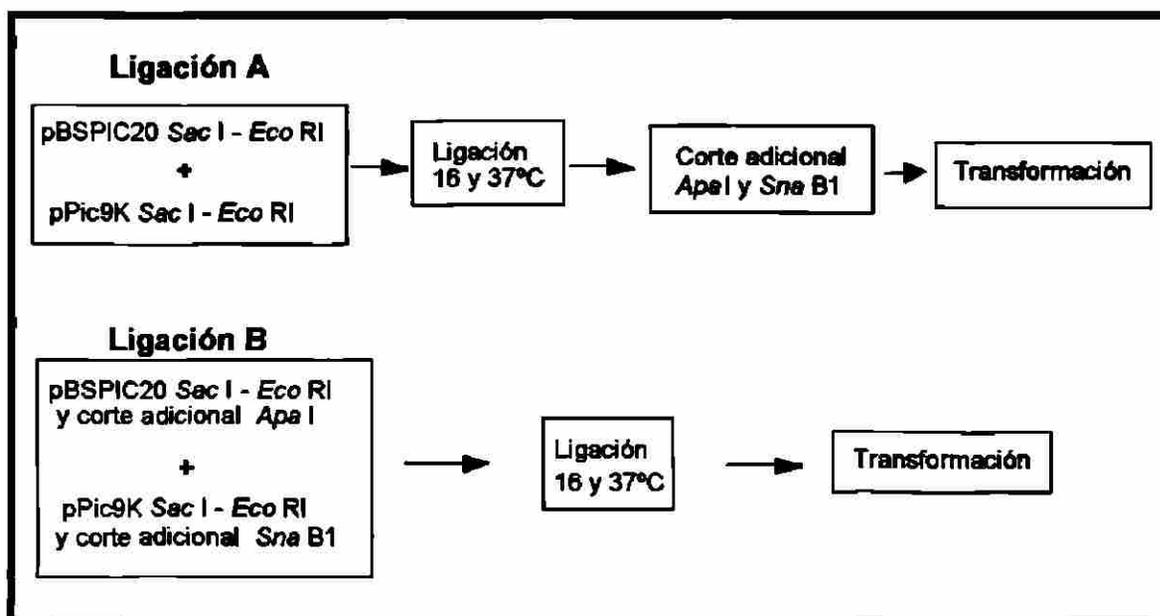


Figura 13.- Estrategias de ligación. Muestra un diagrama de flujo de las estrategias de ligación utilizadas. En la ligación A el corte adicional con *Apa I* y *Sna B1* se llevó a cabo posterior a la ligación. En la ligación B el corte adicional con estas enzimas se llevó a cabo antes de la ligación. Además se utilizaron dos temperaturas (16 y 37°C) de incubación en ambas ligaciones.

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo a escala semipreparativa para ambos DNAs (pBSPIC20 y pPIC9K) con las enzimas *Sac I* y *Eco RI*, bajo las recomendaciones de las casas comerciales que distribuyen dichas enzimas de restricción, tal y como se ilustra a continuación:

	pBSPIC20 μL	pPIC9K μL
Solución amortiguadora #3 10X (BRL)	2	2
Agua ultrapura	9	3
DNA	8 (1 μg/μL)	4 (1 μg/μL)
Enzima <i>Eco RI</i> (10 U/μL)	1	1
Volumen total de reacción	20	100

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche y al día siguiente se verificó la digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al

0.8%. Posteriormente a la mezcla de reacción se le agregó 10 μL de acetato de amonio 7.5 M y 50 μL de etanol absoluto, esto con el fin de precipitar el DNA y después realizar la digestión con Sac I.

El DNA precipitado se resuspendió en:

	pBSPIC20 μL	pPIC9K μL
Solución amortiguadora #3 10X (BRL)	2	2
Agua ultrapura	17	17
Enzima Sac I (20 U/ μL)	1	1
Volumen total de reacción	20	20

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche y se verificó el éxito de la digestión, mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Posteriormente se separaron 10 μL del volumen total de la reacción de digestión de pBSPIC20 los cuales fueron sometidos adicionalmente a digestión con la enzima de restricción *Apa* I (NEB). Esta enzima de restricción solamente corta el plásmido original pBSPIC920 y no el plásmido recombinante pPIC9KhGH20K. Los 10 μL restantes de la mezcla de reacción se utilizaron de igual manera para llevar a cabo la reacción de ligación, pero en este caso la digestión adicional con *Apa* I (NEB) se realizó después de la ligación.

En el caso de pPIC9K la enzima adicional de corte utilizada fue *Sna* B1 (NEB). Esta enzima de restricción solamente corta el plásmido original pPIC9K y no el plásmido recombinante pPIC9KhGH20K. Los 10 μL restantes de la

mezcla de reacción se utilizaron de igual manera para llevar a cabo la reacción de ligación, pero en este caso la digestión adicional con *Sna* B1 (NEB) se realizó después de la ligación.

Las digestiones adicionales con las enzimas *Apa* I y *Sna* B1 se realizaron debido a que los fragmentos involucrados en la ligación no fueron purificados previamente (es decir se encontraban en la reacción de ligación junto con el resto del plásmido). Al cortar con estas enzimas se digerían los DNAs de los plásmidos originales (pBSPIC20 y pPIC9K) y no el plásmido recombinante (pPIC9KhGH20K), de esta manera al momento de transformar tendríamos selectivamente transformación solo con el plásmido recombinante, ya que los plásmidos originales por estar en forma linearizada no son capaces de transformar. En la Figura 14 se muestra una representación esquemática de la estrategia de digestión.

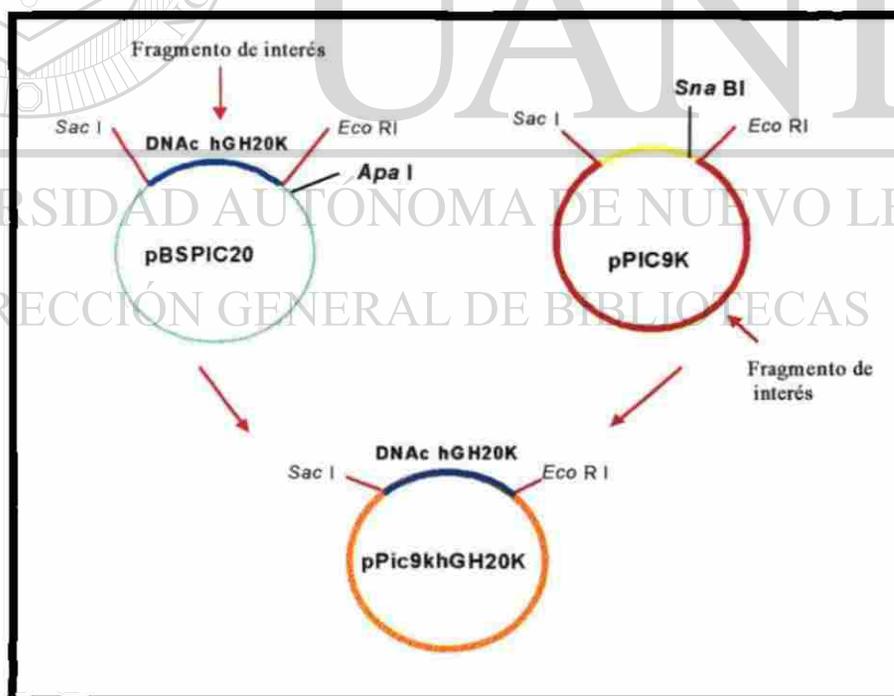


Figura 14.- Digestión adicional con las enzimas de restricción *Apa* I y *Sna* B1. El plásmido pPIC9KhGH20K no es cortado con las enzimas *Apa* I y *Sna* B1, solo los plásmidos que le dan origen. Debido a esto, el plásmido pPIC9KhGH20K permanece intacto en la reacción de ligación y es capaz de transformar las células de *E. coli* XL1-Blue. Los plásmidos originales (pBSPIC20K y pPIC9K) son digeridos por estas enzimas y no son capaces de transformar las células de *E. coli* XL1-Blue.

Las digestiones fueron verificadas por el análisis de alícuotas de 0.5 μL mediante electroforesis en geles de agarosa 0.6%. El gel fue teñido con bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en TBE).

3.3.1.5.2 Reacción de ligación

La reacción de ligación se llevó a cabo en una proporción 1:4 (fragmento de 8258 pb:fragmento de 1546 pb). Una alícuota de la mezcla de reacción se incubó 1 h con T4 DNA ligasa (BRL) a 37°C y la otra durante toda la noche a 16°C. Las características de las variantes de estas reacciones de ligación se muestran a continuación:

	Ligación A: Sin corte adicional <i>Apa</i> I, <i>Sna</i> B1	Ligación B: Con corte adicional <i>Apa</i> I, <i>Sna</i> B1
	μL	μL
Agua ultrapura	7	7
Amortiguador de ligasa 5X	3	3
Vector (pPIC9K + <i>Eco</i> RI + <i>Sac</i> I)	2	2
Fragmento (pBSPIC20 + <i>Eco</i> RI+ <i>Sac</i> I)	2	2
Enzima Ligasa (1 U/ μL)	1	1
Volumen total de reacción	15	15

Se tomaron 5 μL antes de agregar la enzima ligasa, como control de ligación y transformación y se corroboró la ligación mediante electroforesis en

gel de agarosa al 0.8% y tinción del mismo con bromuro de etidio ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$ en TBE). Posteriormente se llevó a cabo la transformación de *E. coli* XL1-Blue con el producto de ligación utilizando bacterias calcio-competentes. Como controles de transformación se utilizaron cada una de las reacciones de ligación a probar, pero sin la enzima ligasa, además el amortiguador de TE y los plásmidos pBS322 y pPIC9K para verificar la eficiencia de transformación.

3.3.1.5.3 Selección y análisis de las clonas de *E. coli* XL1-Blue portadoras de pPIC9KhGH20K.

De las colonias obtenidas por transformación (selección por resistencia a kanamicina, ampicilina y tetraciclina) se levantaron colonias para su posterior análisis. Se inocularon de forma individual en tubos con 4 mL de caldo LB con ampicilina ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$), kanamicina ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) y tetraciclina ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) y se analizaron de igual manera como se describe en el punto 3.3.1.2.3. Las clonas que mostraron el patrón esperado mediante la migración del DNA de forma superenrollada, fueron sometidas a digestión con las siguientes endonucleasas de restricción: *Sal* I, *Dra* I, *Sac* I-Eco RI, *Sac* I Avr II, *Bgl* II, *Pst* I, *Xba* I, *Xho* I, *Bgl* II y *Pvu* II. Finalmente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para verificar cada una de las digestiones. Los fragmentos teóricos según el análisis computacional empleando el programa *DNA Strider* alimentado con la secuencia del plásmido pPIC9KhGH20K.

3.3.1.5.4 Aislamiento a mediana escala del DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K

Una vez asegurada la identidad de pPIC9KhGH20K, se realizó una preparación a mediana escala (Sambrook y cols., 1989) del mismo, y de esta manera se obtuvo una fuente de plásmidos de buena calidad para llevar a cabo la transformación de *Pichia pastoris*. Células de *E. coli* cepa XL1-Blue conteniendo el plásmido pPIC9KhGH20K se cultivaron en 100 mL de caldo LB a 37°C y 250 rpm durante 18 h. Las células fueron cosechadas por dos centrifugaciones sucesivas en tubos falcon de 50 mL a 5000 rpm por 5 min (Centrífuga IEC Centra MP4R Rotor 854). El paquete celular se resuspendió en 15 mL de Solución I (50 mM de Glucosa, 25 mM de Tris-HCl pH=8, 10 mM de EDTA, y 4 mg/mL de lisozima), se agregaron 15 mL de la Solución II (solución de lisis: 0.2N de NaOH, y 1% de SDS) y se mezcló por inversión. Posteriormente se añadió 15 mL de la Solución III (Acetato de amonio 7.5 M pH=7.8) y se mezcló por inversión varias veces y se centrifugó a 5000 rpm por 15 min. El sobrenadante claro se transfirió por filtración (a través de una malla de gasa) a dos tubos nuevos falcon de 50 mL. Se agregó 0.6 volúmenes de isopropanol y se mezcló por inversión a temperatura ambiente para precipitar el DNA plasmídico. Los tubos se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min a 4°C. se descartó el sobrenadante, la pastilla de DNA se resuspendió en 2 mL de TE (10 mM de Tris-HCl pH=8 y 1 mM de EDTA) y se sometió a tratamiento con RNAsa (20 µg/mL) y proteinasa K (100 µg/mL). Se agregó 1/2 volumen de fenol y se agitó muy bien durante 1 min y luego se agregó 1/2 volumen de cloroformo y se continuó extrayendo por 1 min. Se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm. Después se transfirió la fase acuosa (superior) a otro tubo. Además se realizó otra extracción con un volumen de cloroformo durante 1 min, nuevamente se centrifugó a 5000 rpm y se transfirió la fase acuosa a otro tubo. En ambas extracciones se descartó la fase orgánica (fase inferior).

Posteriormente el DNA fue precipitado con 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla fue centrifugada a 14,000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf durante 15 min. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70 %, el DNA fue resuspendido en el amortiguador TE (10 mM de Tris-HCl pH=8 y 1 mM de EDTA) y almacenado a 4°C hasta su uso.

Una vez verificada la identidad del plásmido pPIC9KhGH20K y preparado a mediana escala, éste fué sometido a secuenciación.

3.3.1.5.5 Secuenciación

La secuenciación del DNAc de hGH 20K contenido en el plásmido pPIC9KhGH20K fue realizada con el apoyo del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina.

La técnica utilizada para la secuenciación es una adaptación de la descrita por Sanger y cols. en 1977. La secuenciación enzimática se realizó siguiendo las especificaciones del Kit AmpliCycle (Perkin Elmer). Los fragmentos sintetizados se marcaron al incorporar P^{32} - α -dATP y se resolvieron en un gel de electroforesis de acrilamida 6%-urea 50%. La lectura de la secuencia se realizó sobre la autorradiografía.

3.3.2 Transformación de *P. pastoris* GS115

Una vez obtenido el plásmido pPIC9KhGH20K a mediana escala, se realizaron digestiones preparativas con las endonucleasas de restricción *Sa*I y *Dra*I y de esta manera poder llevar a cabo la transformación de la cepa GS115 de *P. pastoris*. El plásmido linearizado con *Sa*I favorece la inserción en el *locus HIS4*, mientras que el corte con *Dra*I genera reemplazamiento en el *locus AOX1* (Invitrogene, 1996). Las células de *Pichia pastoris* cepa GS115 fueron transformadas por la técnica de formación de esferoplastos (Invitrogen, 1994) con el plásmido (pPIC9KhGH20K) previamente digerido (*Sa*I y *Dra*I).

3.3.2.1 Crecimiento celular

Células de *Pichia pastoris* cepa GS115 se inocularon por estría en placas con YPD para aislar colonias sencillas y posteriormente crecerlas de forma individual, la placa se incubó a 30°C por dos días. Se transfirió una colonia de *Pichia pastoris* cepa GS115 a un matraz de 100 mL, conteniendo 10 mL de YPD caldo y se dejó crecer durante toda la noche con agitación a 250 rpm a 30°C. Posteriormente se inocularon tres matraces diferentes de 500 mL cada uno, conteniendo 200 mL de medio YPD caldo, con 5, 10 y 20 μ L de células del cultivo de toda la noche. Los matraces se incubaron nuevamente durante toda la noche a 30°C con agitación a 250 rpm. Al día siguiente se midió la D.O._{600nm} de cada uno de los tres cultivos, las células que alcanzaron una D.O._{600nm} entre 0.2 y 0.3 se cosecharon por centrifugación a temperatura ambiente durante 10 min a 1500 g. La pastilla de células se resuspendió en 20 mL de agua estéril y se cosechó nuevamente por centrifugación a 1500 g

durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, y la pastilla de células se utilizó para preparar los esferoplastos (Invitrogen, 1994).

3.3.2.2 Formación de esferoplastos

Primeramente se lavó la pastilla con 20 mL de SED (19 ml de SE: 1M sorbitol, 25 mM de EDTA, pH 8 y 1 mL de DTT 1M) preparado en fresco, y se centrifugó a 1500 g durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se lavó nuevamente ahora con 20 mL de sorbitol 1 M y se centrifugó como anteriormente se menciona. Las células se resuspendieron finalmente en 20 mL del amortiguador SCE (1 M sorbitol, 1 mM de EDTA y 10 mM de amortiguador de citrato de sodio, pH 5.8) por agitación suave. La suspensión se dividió en dos tubos falcon de 50 mL, uno de ellos se mantuvo en hielo (tubo A), mientras que el otro (tubo B) se utilizó para monitorear la formación de esferoplastos mediante el tratamiento con zimolasa. La zimolasa es una enzima que digiere pared celular y hace extremadamente frágiles las células por lo que se deben manejar con cuidado. Al momento de la adición de la zimolasa la digestión de la pared celular empieza. Se prepararon 20 mL de solución de SDS al 5% los cuales se utilizaron posteriormente. Se ajustó el espectrofotómetro en UV/Vis a 800 nm, utilizando como blanco 800 μ L de SDS al 5% y 200 μ L de SCE (Sorbitol 1 M, EDTA 1 mM y amortiguador de citrato de sodio 10 mM, pH 5.8). Se preparó un juego de 17 tubos de microcentrífuga estériles y marcados como: 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50, a los cuales se les agregó 800 μ L de SDS al 5%. Se retiraron 200 μ L de células contenidas en el tubo B y se añadieron al tubo marcado como "0". Esta muestra se utilizó como tiempo cero. Al resto de la suspensión de células del tubo B se le añadió 7.5 μ L (3 mg/mL) de zimolasa (es importante mezclar la suspensión antes de su uso para asegurar una cantidad consistente de

zimolasa), se mezcló perfectamente y se incubó las células a 30°C. La formación de esferoplastos se monitoreó de la siguiente manera: a los dos minutos de tiempo, se retiraron 200 µL de células (tubo B + zimolasa) y se añadieron al tubo marcado "2" (con 800 µL de SDS al 5%). Esto mismo se repitió para cada uno de los diferentes tiempos; $t = 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, \text{ y } 50$. Cada una de las muestras fue leída D.O._{600 nm}. Finalmente, se determinó el porcentaje de esferoplastos para cada punto del tiempo utilizando la ecuación:

$$\% \text{ de esferoplastos} = 100 - [(D.O._{600nm} \text{ al tiempo } t / D.O._{600nm} \text{ al tiempo } 0) \times 100]$$

Una vez determinado el tiempo mínimo de incubación donde se formaron el 70% de esferoplastos se procedió al tratamiento con zimolasa del tubo remanente (tubo A en hielo). Se agregó 7.5 µL de zimolasa (3mg/mL) al tubo A y se incubó a 30°C durante el tiempo establecido para la formación de un 70% de esferoplastos. Los esferoplastos fueron cosechados por centrifugación a 750g durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y los esferoplastos se lavaron con 10 mL de sorbitol 1M (mezclando suavemente). Se centrifugó como se menciona anteriormente y los esferoplastos se resuspendieron en 0.6 mL de CaS (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCL, pH 7.5 y 10 mM de CaCl₂). Esta preparación debe ser utilizada inmediatamente (hasta 30 min) para su transformación (Invitrogen, 1994).

3.3.2.3 Transformación

Se colocaron 100 µL del preparado de esferoplastos en tubos falcon de 15 mL y se agregaron 10 µg de DNA (tanto de pPIC9KhGH20K, como de pPIC9K en otro tubo, ambos cortados con *Sal I* y *Dra I*, además amortiguador

TE pH=7.4), incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Transcurrido este tiempo, se añadieron 10 mL de solución de PEG/CaT preparada en fresco (mezcla 1:1 de poetilenglicol al 40% y CaT [20 mM Tris, pH 7.5 y 20 mM CaCl_2]) y se mezcló por inversión, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, se obtuvieron los esferoplastos por centrifugación a 750g durante 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y los esferoplastos se resuspendieron en 150 μL de medio SOS (1 M sorbitol, 0.3X YPD, y 10 mM CaCl_2) y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. Finalmente, se les agregó 850 μL de sorbitol 1 M y se procedió a sembrar en la placa (Invitrogen, 1994).

3.3.2.4 Selección de recombinantes

Se mezclaron 200 μL de cada una de las soluciones de esferoplastos-DNA preparadas con 10 mL de agarosa fundida y se vaciaron en placas con RDB-agar (sin histidina, solo las transformantes crecen en este medio). Una vez solidificada la agarosa, las placas se invirtieron e incubaron a 30°C. La aparición de transformantes se controló durante 4 a 6 días. Además se realizó una prueba de viabilidad celular, la cual se llevó a cabo de la siguiente manera: Se mezclaron 100 μL de esferoplastos (sin DNA) con 900 μL de sorbitol 1 M. Posteriormente se mezclaron solamente 100 μL de esta dilución con 10 mL de agarosa fundida, esta mezcla se vertió en placas con RDHB-agar (con histidina). Una vez solidificada la agarosa, las placas se invirtieron e incubaron a 30°C. La aparición de colonias se observó durante 4 a 6 días. Este método proporciona una selección inicial de transformantes HIS4^+ , ya que solamente las células que integraron en su genoma el vector de integración (conteniendo el cassette de expresión), podrán crecer en medio carente de histidina (Invitrogen, 1994).

3.3.3 Caracterización de genotipos y fenotipos de las clonas recombinantes

La caracterización genotípica se realizó verificando la integración del cassette de expresión en el genoma de levadura mediante ensayos de PCR, y la caracterización fenotípica mediante la inducción del gen clonado y la caracterización de su producto recombinante.

3.3.3.1 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA genómico de *Pichia pastoris* se utilizó la técnica previamente descrita por Martínez-Soriano y cols. en 1993. Las levaduras se crecieron en 4 mL de caldo YPD durante 24 h a 30°C. El paquete celular de 3 mL, se obtuvo mediante dos centrifugaciones sucesivas de 1.5 mL, en tubos Eppendorf a 16000g durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y al paquete celular se le agregaron 200 µL de solución amortiguadora de lisis TSNT (Tritón X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH=8), se agitó perfectamente por inversión y después se le añadieron 500 µL de Fenol saturado (con Tris-HCl, pH=8), agitando nuevamente por inversión. Posteriormente, se agregaron a la mezcla 100 µL de Sevag (cloroformo:alcohol isoamílico, 24:1), se mezcló al vortex durante 5 min y se agregó 200 µL de TE 1X (10 mM de Tris-HCl, pH=8, y 1 mM de EDTA, pH=8) y se procedió a centrifugar por 10 min a 16000 g. Se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. El DNA se precipitó al agregar 1 mL de etanol al 100% y mezclar lentamente por inversión hasta la aparición de una hebra blanca. El DNA se recuperó por centrifugación a 16000 g durante 10 min descartando el sobrenadante. Después, la pastilla de DNA se lavó con 500 µL

de etanol al 70%, y se centrifugó nuevamente a 16000 g durante 5 min. Finalmente la pastilla se secó a 37°C durante 15 min y se resuspendió en 48 μL de TE y 2 μL de RNAsa (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Las muestras obtenidas de DNA genómico fueron almacenadas a 4°C hasta su empleo.

3.3.3.2 Análisis de DNA por espectrofotometría

Una vez obtenido el DNA genómico, se realizó una estimación cuantitativa del mismo mediante espectrofotometría, tomando en cuenta un factor de conversión de 50, ya que una D.O.=1 corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de doble cadena. Además la calidad del DNA se estima mediante la relación de absorbancia a 260 nm y a 280 nm (D.O._{260 nm}/D.O._{280 nm}). Una preparación de DNA con alto grado de pureza se caracteriza por presentar valores de D.O._{260 nm}/D.O._{280 nm} entre 1.8 y 2.0. De las muestras de DNA genómico se realizó una dilución de la preparación del DNA (1:200 y 1:400) en TE 1X pH=7.4. Se calibró el espectrofotómetro a cero con amortiguador TE 1X pH=7.4. Se realizaron las lecturas a 260 nm y 280 nm de cada una de las diluciones preparadas. Finalmente, se determinó la concentración de la preparación empleando el factor de conversión 50 y la pureza de la muestra, mediante la relación de las absorbancias a 260 nm y a 280 nm (D.O._{260 nm}/D.O._{280 nm})

3.3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El DNA genómico de diferentes clonas fue analizado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar una zona específica del cassette de expresión y de esta manera verificar la integración del plásmido pPIC9KhGH20K al genoma de *P. pastoris*. El iniciador sentido o 5' (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') se aparea en la región 5'AOX1 (nucleótido 855-875) del plásmido pPIC9K, mientras que el iniciador antisentido o 3' (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') se aparea en la región 3'AOX1 TT (nucleótido 1327-1347) del mismo. La PCR en el plásmido pPIC9K trae como resultado la amplificación de un fragmento de 449 pb, mientras que en pPIC9KhGH20K el fragmento generado es de: 1016 pb. Por otro lado la PCR del DNA genómico de *P. pastoris* no recombinante da como resultado un producto de 2200 pb, correspondiente a la amplificación del gen AOX1, mientras que en la amplificación del DNA genómico de las cepas recombinantes de *P. pastoris* da como resultado la amplificación de dos bandas: una de 2200 pb y otra de 1016 pb, debido a que *P. pastoris* recombinante aún conserva el gen AOX1 (Mut⁺) pero además posee el cassette de expresión integrado al genoma de la levadura.

Las condiciones de reacción para la PCR se llevaron a cabo mediante modificaciones a las condiciones establecidas por Escamilla Treviño en 1996. Estas condiciones son las siguientes: amortiguador de PCR (Promega 10X), MgCl₂ 1.5 mM, DNA genómico a 25 ng/μL, dNTP's a 200 mM, iniciador 5' a 0.5 mM, iniciador 3' a 0.5 mM, agua ultrapura estéril y 0.5 unidades de Taq polimerasa en una reacción de 25 μL. El programa llevado a cabo en el termociclador fue el siguiente: una etapa inicial de desnaturalización del ciclo a 94°C (2 min), una etapa de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), alineación a 60°C (1 min) y extensión a 72°C (2 min) y una última etapa de

extensión a 72°C (7 min). Una vez finalizada la amplificación se realizó el análisis de 5 µL del producto de reacción de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.6% en TBE 1X (0.089 M de Tris-boratos, 0.089 M de ácido bórico y 0.002 M de EDTA).

3.3.3.4 Inducción de la expresión del DNAc de HGH 20K

Para realizar la inducción del DNAc de hGH de 20K se realizaron fermentaciones en dos fases: En la primera fase se busca el aumento de masa celular empleando un medio de cultivo mínimo amortiguado, siendo la fuente de carbono glicerol o glucosa. En esta etapa se encuentra reprimida la producción de la proteína recombinante debido a que el promotor que dirige la síntesis se encuentra apagado. En la segunda fase, se activa el promotor de *AOX1* al agregar metanol al medio de cultivo, convirtiéndose en la única fuente de carbono disponible. En esta etapa se produce la proteína recombinante.

Las clonas fueron analizadas mediante fermentaciones a nivel matraz, para verificar de esta manera la expresión del producto recombinante (HGH 20K). Colonias aisladas de cada una de las colonias fueron inoculadas en 25 mL de medio BMG en matraces de 250 mL y se crecieron a 30°C en agitación a 250 rpm hasta que el cultivo alcanzó una D.O.₆₀₀ nm entre 2 y 6. Posteriormente el paquete celular se obtuvo por centrifugación a 10000 rpm (centrifuga ICE Centra, rotor 954) durante 5 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 25 mL de medio BMM (medio inductor). En seguida, se incubó a 30°C durante 96 h para inducir la expresión del gen heterólogo (hGH). Para mantener la inducción se agregó metanol al 100% cada 24 h a una concentración final de 0.75%. Una vez terminado el tiempo de fermentación, las células fueron separadas del medio de cultivo mediante

centrifugación a 10000 rpm (centrifuga ICE Centra, rotor 954) durante 5 min. El sobrenadante obtenido de estas fermentaciones fue utilizado para realizar análisis en geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE); determinación de proteínas totales; y para establecer la cinética de crecimiento, para así determinar si existía alguna variación en su crecimiento con respecto a la producción de HGH 20K

3.3.4 Selección de clonas conteniendo copias múltiples del cassette de expresión

El procedimiento para generar clonas resistentes a G418 (geneticina) requiere de una selección inicial de transformantes His⁺, seguido de un tamizaje variando los niveles de resistencia a G418. La resistencia a G418 es conferida por el gen kanamicina presente en pPIC9K.

Se realizó un tamizaje preliminar que permitió analizar un gran número de clonas de forma rápida y simplificada, éste se llevó a cabo determinando el nivel de resistencia a G418 de las diferentes clonas, el cual se relaciona con el número de copias del cassette de expresión integrado al genoma de la levadura.

De las clonas recombinantes obtenidas mediante la técnica de formación de esferoplastos, se tomaron 103 colonias y se replicaron en placas con RDB (sin histidina), además se utilizaron 5 controles (GS115, GS115pPIC9K-Sal I, GS115pPIC9K-Dra I, GS115pPIC9hGH22K, pPIC9KhGH22K). La Tabla III muestra las características de dichos controles.

Tabla III.- Descripción de los controles

GS115 (C3-6.3)*	Cepa original de <i>Pichia pastoris</i> .
GS115pPIC9K-Sal I (C3-6.6)*	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> transformada con el vector pPIC9K, digerido con <i>Sal I</i> .
GS115pPIC9K-Dra I (C3-6.5)*	Cepa de <i>Pichia pastoris</i> transformada con el vector pPIC9K, digerido con <i>Dra I</i> .
GS115pPIC9hGH22K (C3-6.4)*	Cepa unicopia de <i>Pichia pastoris</i> transformada con el vector pPIC9hGH22K, portadora de una copia del DNAc de HGH 22K
GS115pPIC9KhGH22K (C3-6.3)*	Cepa multicopia de <i>Pichia pastoris</i> transformada con el vector pPIC9hGH22K, portadora de múltiples copias del DNAc de HGH 22K

* Ver Anexo 2.

Cada una de las colonias se crecieron en placas de microtitulación conteniendo cada pozo 200 μ L de YPD. La inoculación se llevó a cabo mediante la punción de la colonia con un palillo de dientes estéril y la posterior resuspensión de las células en los 200 μ L del medio YPD. Las placas de microtitulación se incubaron a 30°C durante dos días (no requiere de agitación). Transcurridos los dos días de incubación, se tomaron placas nuevas de microtitulación y se les añadió 190 μ L de YPD a cada pozo. Este segundo juego de placas de microtitulación fue inoculado con 10 μ L de cada uno de los pozos de la primera placa de microtitulación, utilizando una pipeta multicanales. Nuevamente las placas de microtitulación se incubaron a 30°C durante dos días. Transcurridos los dos días de incubación, se inoculó un tercer juego de placas de microtitulación, de la misma manera que el segundo juego, esto con el fin de obtener densidades celulares semejantes en cada una de las clonas analizadas y evitar de esta manera falsos positivos. Después de la incubación se tomó el tercer juego de placas de microtitulación y se resuspendieron las células de cada pozo con una pipeta multicanales. Se tomaron 5 μ L de cada pozo y se inocularon en placas con YPD que contenían G418 a concentraciones finales de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0, y

4.0 mg/mL. Para este ensayo se utilizaron placas con 36 divisiones, lo que permitió separar cada una de las clonas analizadas.

Las placas se incubaron a 30°C y se revisaron después de 2, 3, 4, y 5 días para identificar las clonas resistentes a G418. Finalmente, se analizaron de los resultados obtenidos.

3.3.5 Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K

Para la selección de la clona sobreproductora de HGH 20K, se tomaron en cuenta dos consideraciones: por un lado se llevó a cabo la selección de clonas que crecieron a dosis altas de G418 y por otro lado se evaluaron los niveles de producción de estas clonas. Para determinar los niveles de producción se realizaron: a) Fermentaciones a nivel matraz, con un tiempo final de inducción de 140 h; b) Determinación de proteínas totales del medio de cultivo libre de células por el método de Bradford (Bradford, 1976); c) Estimación del porcentaje (%) relativo de hGH 20K mediante análisis densitométrico de geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (Sambrook, 1989); d) Cálculo de la concentración de HGH 20K relacionando el % relativo de ésta con respecto a las proteínas totales. Además, se realizó una correlación entre la resistencia al antibiótico G418 y los niveles de producción de HGH de 20K obtenidos.

3.3.5.1 Análisis de proteínas

En este sistema de expresión el producto es secretado al medio de cultivo, por lo cual fué necesario separarlo de las células al final de las fermentaciones. El medio de cultivo obtenido fue dializado contra agua ultrapura y se utilizó para realizar el análisis de proteínas. Las bolsas de diálisis con 10 mL de medio de cultivo permanecieron sumergidas en 4 L de agua fría (4°C) durante 2 h con agitación moderada. Se realizaron dos cambios mas de agua cada 12 h. El medio dializado en todos los casos se llevó a un volumen final de 13 mL con agua ultrapura. Posteriormente, 500 μ L del medio dializado de cada una de las muestras se secaron al vacío. La pastilla de proteínas se resuspendió en 15 μ L de buffer SDS-PAGE, se calentaron durante 5 min a 100°C, y se centrifugaron por 5 segundos para bajar el líquido condensado y se aplicaron los 15 μ L para la electroforesis en gel de poliacrilamida.

La determinación de las proteínas totales se realizó por el métodos de Bradford (Bradford, 1976). Este método cuantifica la unión del azul brillante de Coomassie a una proteína desconocida y compara esta unión a las cantidades diferentes de una proteína estándar. Se determinó la absorbancia a 595 nm y se realizaron curvas de calibración con estándares de albúmina de suero bovino en un intervalo de concentración de 0.25 a 8 μ g/mL. Tanto las muestras como los estándares fueron preparados por triplicado. Los cálculos se realizaron utilizando una recta de calibración determinada por el método de mínimos cuadrados con el apoyo del programa computacional *Microsoft Excel*.

Para el análisis de las proteínas se utilizó un gel de poliacrilamida discontinuo al 15% (como gel separador). Una vez colocadas las muestras en el gel, se aplicó un voltaje inicial de 80 mV hasta que el colorante penetró en el

gel concentrador aproximadamente 1 cm, luego se aumentó el voltaje a 120 mV hasta que el colorante salió totalmente del gel separador (8.3 cm x 10.2 cm x 0.1 cm). El gel fue desensamblado y colocado en un recipiente de plástico que contenía solución fijadora (metanol 50% v/v, ácido acético 10 % v/v en agua ultrapura) y permaneció en éste durante 1 hora con agitación a 40 rpm. Se retiró la solución fijadora y el gel fue teñido con la solución colorante de Coomassie (Azul brillante de Coomassie 0.5 % p/v, metanol 50 % v/v, ácido acético 10 % v/v, en agua ultrapura) durante 25 minutos con agitación a 40 rpm. Transcurrido este tiempo se retiró la solución colorante de Coomassie y se añadió la solución decolorante (metanol 5 % v/v, ácido acético 7 % v/v, en agua ultrapura); en este caso se realizaron cambios periódicos de la solución decolorante con agitación a 40 rpm y permaneció en esta solución hasta que se observaron bandas azules de proteínas en un fondo claro del gel.

El porcentaje relativo de HGH 20K se determinó por densitometría en gel. Este se basa en la medición de la intensidad de la coloración de las bandas de proteínas obtenidas en el gel provenientes del medio de cultivo, y el % se calculo con respecto a la sumatoria de las intensidades de todas las bandas presentes en el carril. La concentración de HGH en el medio de cultivo fue calculada con este porcentaje en relación a las proteínas totales presentes en el mismo medio y determinada por Bradford. El equipo empleado fue un sistema de fotodocumentación Gel Doc 1000 (BIO-RAD).

CAPITULO 4

4. RESULTADOS

4.1 Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGh22K en *E. coli* XL1-Blue

Se logró la transformación de células calcio-competentes de *E. coli* XL1-Blue con los plásmidos: pBS , pJV, pPIC9K y pPIC9hGh22K. En todos los casos las preparaciones de DNA plasmídico a gran escala mostraron valores de A_{260}/A_{280} de 1.8 a 2.0, los cuales fueron considerados aceptables en las preparaciones de DNA plasmídicos tal y como se muestra en la Tabla IV. El rendimiento obtenido en cada una de las preparaciones mostró estar dentro de los límites reportados en la bibliografía (500 a 2000 μg por litro de cultivo). Por lo tanto, la cantidad de DNA plasmídico obtenida fue suficiente para realizar todas las manipulaciones subsecuentes.

Tabla IV.- Rendimiento y calidad de las preparaciones plasmídicas

Plásmido	A 260/A 280	Rendimiento $\mu\text{g}/\text{L}$
pBS	2.03	1798
pJV	1.94	1930
pPIC9K	2.07	3485
pPIC9hGH22K	2.01	2739

4.2 Construcción del plásmido pBS20K

Las digestiones preparativas con *Xho* I y *Hind* III de pBS y pJV se llevaron de manera eficiente a juzgar por su análisis en el gel de agarosa. Los fragmentos requeridos para la ligación fueron recuperados mediante la técnica de fibra de vidrio siliconizada de manera adecuada.

Los resultados de la transformación de *E. coli* XL1-Blue con el plásmido recombinante construido (pBS20K) empleando diferentes estrategias se muestran en la Tabla V.

Tabla V.- Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBS20K

Tratamiento	Colonias blancas	Colonias azules	No. Total de Colonias
TE (Control negativo)	0	0	0
pUC18 (Control positivo)	0	290	290
pBS + Fragmento* + Ligasa	157	51	208
pBS + Fragmento* - Ligasa	0	0	0
pBS + <i>Hind</i> III + Ligasa	41	441	482
pBS + <i>Hind</i> II - Ligasa	0	0	0
pBS + <i>Xho</i> I + <i>Hind</i> III+Ligasa	0	81	81
pBS + <i>Xho</i> I + <i>Hind</i> III- Ligasa	0	0	0

*Fragmento *Xho* I-*Hind* III de 609 pb correspondiente a la secuencia completa del DNAc de hGH 20K.

Se obtuvieron un total de 208 colonias, de las cuales 51 colonias eran de color azul y 157 fueron de color blancas (transformadas con plásmido recombinante). Se analizaron 18 colonias (donde 16 de ellas provenían de colonias blancas y 2 de colonias azules, utilizadas como control), por electroforesis en gel de su DNA, mostrando que 15 colonias presentaron un DNA con un tamaño aproximado a 3549 pb, lo que era de esperarse ya que

poseían la inserción de un fragmento de 609 pb (DNAC hGH 20K). Las 3 colonias restantes presentaron el patrón de pBS (plásmido receptor). Se eligieron solamente 4 colonias para su caracterización con las endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Hind* III, *Sac* I, *Xho* I, *Pst* I, *Xho* I-*Hind* III, *Pvu* II, *Xba* I, *Xba* I-*Sma* I. La caracterización exhaustiva mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron a los tamaños esperados (Fig. 15), según el mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido pBS20K construido conteniendo la secuencia completa del DNAC de hGH 20K.

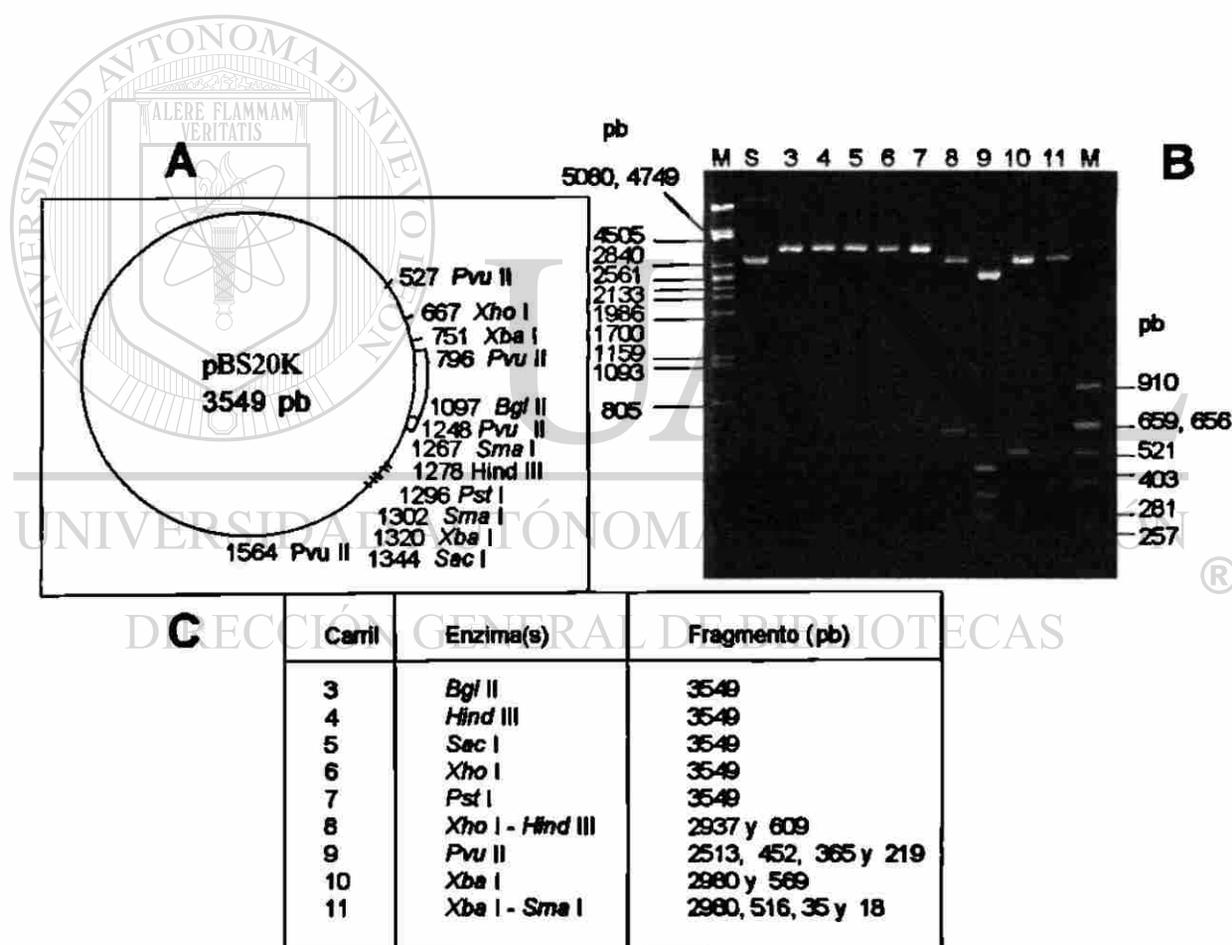


Figura 15. - Caracterización enzimática del plásmido pBS20K. El panel A muestra una representación gráfica del mapa de restricción de este plásmido. El panel B muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% de las digestiones de pBS20K con diferentes enzimas de restricción (carriles del 3 al 11). M, marcadores de peso molecular (λ -*Pst* I y pBR322-*Alu* I respectivamente); S, pBS20K circular. El panel C muestra los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos de las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. El patrón de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

4.3 Construcción del plásmido pBSPIC9

Las digestiones preparativas con *Sac I* y *Xba I* de pBS y pPIC9hGH22K se llevaron de manera eficiente a juzgar por su análisis en el gel de agarosa. Los fragmentos se recuperaron de forma adecuada mediante la técnica de fibra de vidrio siliconizada.

Los resultados de la transformación de *E. coli* XL1-Blue con el plásmido recombinante construido (pBSPIC9) se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI.- Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBSPIC9

Tratamiento	Colonias blancas	Colonias azules	Número total de colonias
TE (Control negativo)	0	0	0
pUC18 (Control positivo)	0	Incontables	Incontables
pBS + Fragmento* - Ligasa	0	0	0
pBS + Fragmento*+ Ligasa	6	60	66

*Fragmento de 1018 pb desde *Sac I* hasta *Xba I* del plásmido pPIC9hGH22K.

Se obtuvo un total de 66 colonias, de las cuales 60 colonias eran de color azul y solamente 6 resultaron blancas (transformadas con plásmido recombinante). El análisis inicial del DNA de 8 colonias (6 de ellas provenían de colonias blancas y 2 de colonias azules utilizadas como control), mostró que solo el DNA de 3 colonias poseían la inserción de un fragmento de 1018 pb, teniendo como resultado un plásmido recombinante de un tamaño aproximado de 3955 pb. Las 3 colonias restantes presentaron el patrón de pBS. Se eligieron 3 colonias para su caracterización con las endonucleasas de restricción: *Bgl II*, *Sac I*, *Sma I*, *Xba I*, *Sac I-Sma I*, *Pvu II*, *Pst I*, *Xho I*, *Xba I-Sma I*. La caracterización exhaustiva mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron a los tamaños esperados (Fig. 16), según el

mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido construido pBSPIC9, el cual contiene 739 pb del extremo 5' AOX1 de pPIC9 desde la posición 209 hasta la posición 948; la secuencia señal del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y por último posee 19 pb del extremo 5' del DNAC de hGH 22K, correspondientes a la proteína madura. Estas regiones fueron clonadas con el fin de facilitar la siguiente construcción.

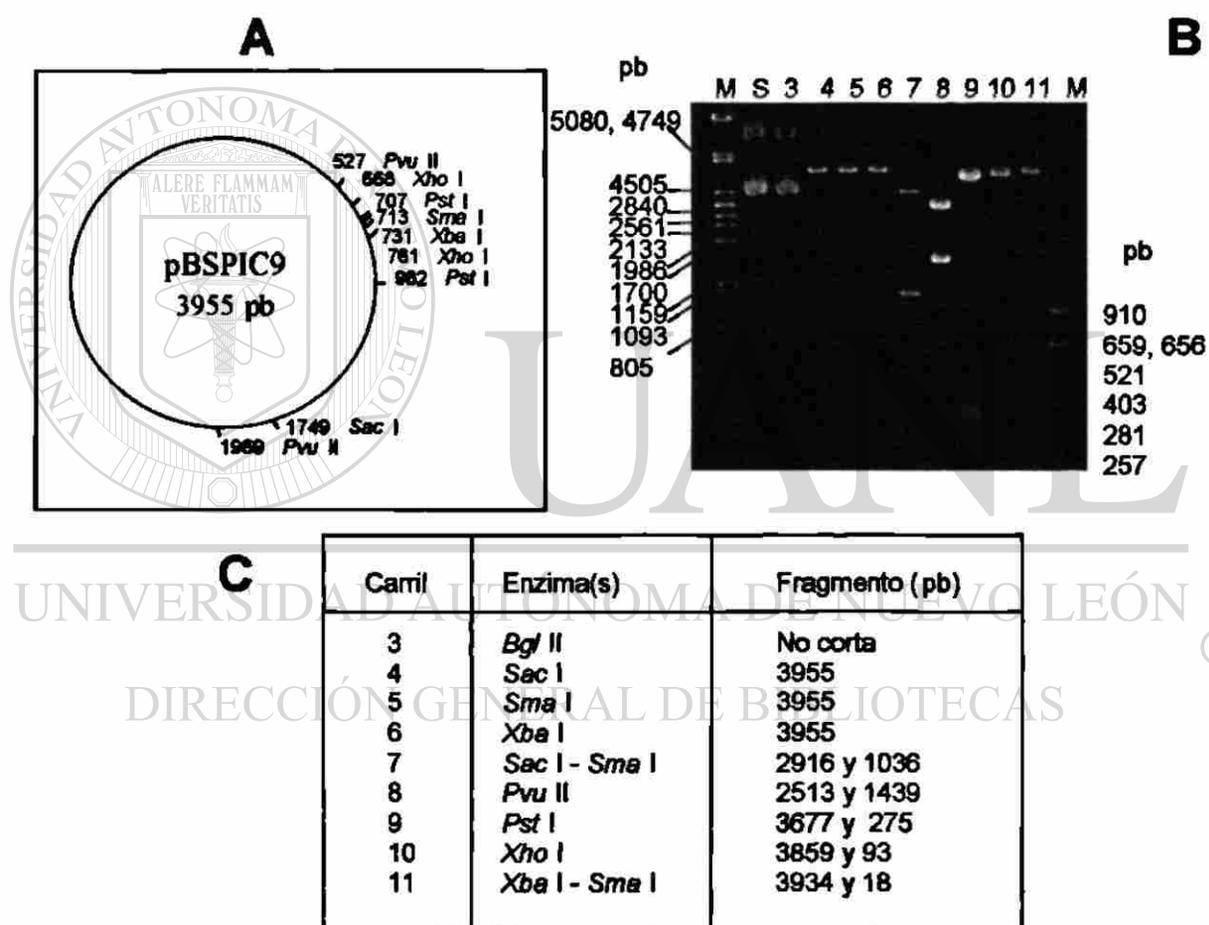


Figura 16.- Caracterización enzimática del plásmido pBSPIC9. El panel A muestra una representación gráfica del mapa de restricción de este plásmido. El panel B muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% de las digestiones de pBSPIC9 con diferentes enzimas de restricción (carriles del 3 al 11). M, marcadores de peso molecular (λ -*Pst* I y pBR322-*Alu* I respectivamente); S, pBSPIC9 circular. El panel C muestra los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos de las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. El patrón de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

4.4 Construcción del plásmido pBSPIC20

Para la construcción de pBSPIC20 se llevó a cabo primero la digestión de pBS20K con la enzima *Xba* I liberándose los fragmentos de 569 pb 2980 pb. Posteriormente, al digerir este DNA con la enzima *Sma* I, el fragmento de 569 pb sufrió un doble corte, generándose los fragmentos de 516, 35 y 18 pb. La verificación de la liberación del fragmento de 516 pb (producto de la doble digestión de pBS20K con *Xba* I y *Sma* I) se llevó a cabo mediante su comparación con el fragmento de 569 pb (producto de la digestión de pBS20K solo con *Xba* I) ya que los fragmentos de 18 y 35 pb tienen poca resolución en este tipo de gel, tal como se muestra en la Figura 17.

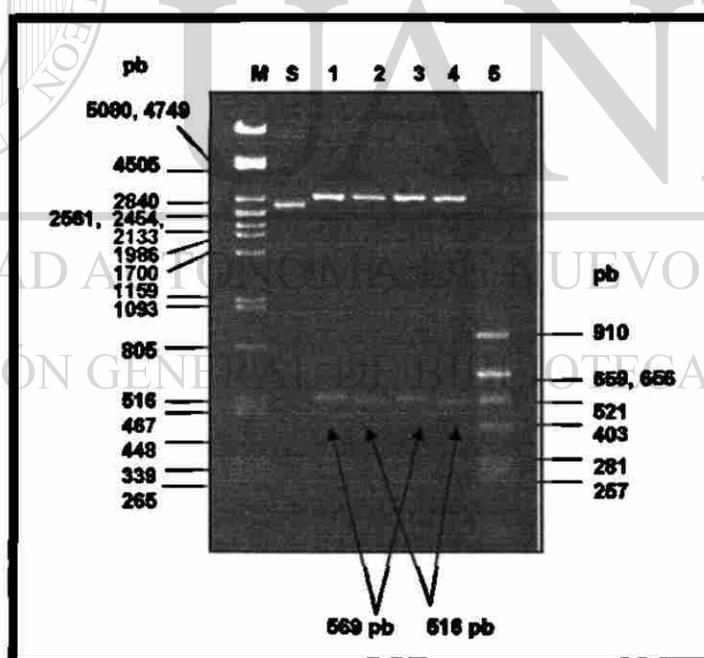


Figura 17.- Verificación de la liberación del fragmento de 516 pb producto de la doble digestión de pBS20K con *Xba* I y *Sma* I. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los fragmentos obtenidos de las digestiones de pBS20K con las enzimas de restricción *Xba* I y *Sma* I. M marcadores de peso molecular (*Lambda-Pst* I y pBR322-*Alu* I, respectivamente). S Plásmido pBS20K superenrollado. Carriles 1 y 3, digestión de pBS20K con la enzima *Xba* I (liberando el fragmento de 569 pb); carriles 2 y 4, digestión de pBS20K con *Xba* I-*Sma* I (liberando el fragmento de 516 pb).

Las digestiones preparativas con *Xba* I y *Sma* I de pBSPIC9 y pBS20K se llevaron de manera eficiente a juzgar por su análisis en el gel de agarosa. La recuperación de los fragmentos de ligación se llevó de manera adecuada mediante la técnica de fibra de vidrio siliconizada.

Los resultados de la transformación de *E. coli* XL1-Blue con el plásmido recombinante construido (pBSPIC20) se muestran en la Tabla VII.

Tabla VII.- Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBSPIC20

Tratamiento	Colonias Azules	Colonias Blancas
TE	0	0
pPUC18)	0	600
pBSPIC9 + *Fragmento + Ligasa	29	5
pBSPIC9 + *Fragmento - Ligasa	0	0

*Fragmento de 516 pb de *Xba* I a *Sma* I de pBS20K.

Se levantaron 6 colonias (5 de ellas provenían de colonias blancas y 1 de colonias azules, utilizada como control), para un análisis inicial de su DNA. Se observó que solamente 1 colonia mostró un tamaño de DNA de aproximadamente 4453 pb. Las colonias restantes presentaron el patrón de pBSPIC9 (3955 pb). La caracterización exhaustiva con las endonucleasas de restricción: *Bgl* II, *Sac* I, *Sma* I, *Xba* I, *Sac* I-*Sma* I, *Pvu* II, *Pst* I, *Xho* I, *Xba* I-*Sma* I mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, correspondieron a los tamaños esperados (Figura 18), según el mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido pBSPIC20, el cual contiene el fragmento del DNAC de hGH 20K a partir de codón 7.

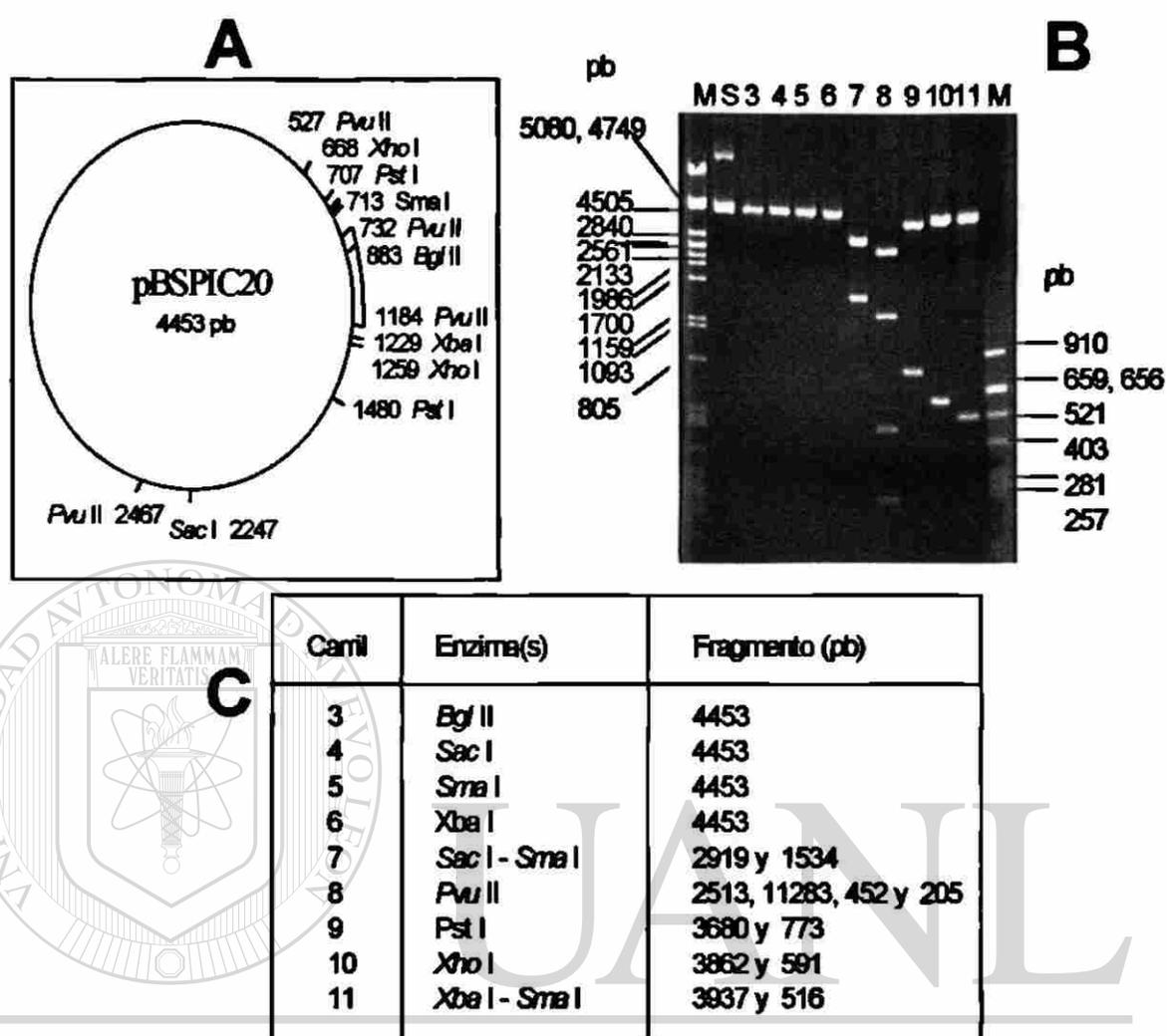


Figura 18 - Caracterización enzimática del plásmido pBSPIC20. El panel A muestra una representación gráfica del mapa de restricción de este plásmido. El panel B muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% de las digestiones de pBSPIC20 con diferentes enzimas de restricción (carriles del 3 al 11). M, marcadores de peso molecular (λ -*Pst* I y pBR322-*Alu* I respectivamente); S, pBSPIC20 superenrollado. El panel C muestra los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos de las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. El patrón de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

4.5 Construcción del vector pPIC9KhGH20K

Las digestiones preparativas con *Sac* I y *Eco* RI de pPIC9K y pBSPIC20, se llevaron de manera eficiente a juzgar por su análisis en el gel de agarosa.

El análisis electroforético de la reacción de ligación mostró que dicha reacción se llevó a cabo de forma aceptable y suficiente. La figura 19 muestra la presencia de las bandas correspondientes a los fragmentos de 1546 y 8258 pb en el caso del control negativo (sin ligasa) y la desaparición de dichas bandas cuando estos fragmentos fueron sometidos a la acción de la enzima ligasa. Las digestiones adicionales de *Apa* I y *Sna* B1 (para eliminar los plásmidos de partida pBSPIC20 y pPIC9K) antes y después de la ligación, no fueron verificadas electroforéticamente, debido a la cantidad tan pequeña de DNA a ligar. Sin embargo, se obtuvieron resultados satisfactorios al momento de transformar, lo que nos confirmó la eficiencia de corte de cada una de estas enzimas.

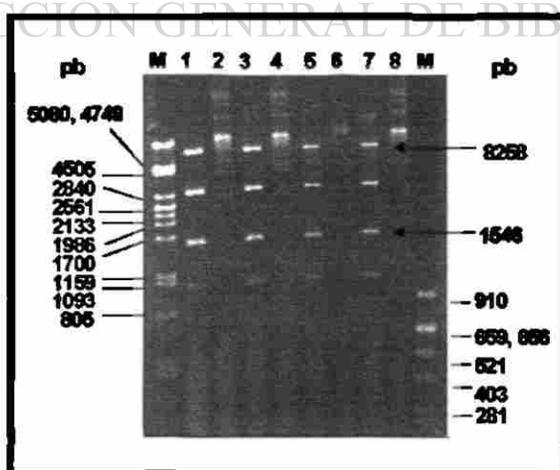


Figura 19.- Reacción de ligación para generar a pPIC9KhGH20K. Gel de agarosa al 0.8%. M marcador de peso molecular (λ + *Pst* I y pBR322 + *Alu* I respectivamente). Los carriles del 1 al 4 representan las ligaciones A, incubadas 16°C (carriles 1 y 2) y 37°C (carriles 3 y 4), sin ligasa y con ligasa respectivamente. Los carriles del 5 al 8 representan los mismos tratamientos mencionados anteriormente pero con la ligación B.

De la transformación de *E. coli* XL1-Blue se obtuvieron un total de 544 colonias. En la Tabla VIII se muestran los resultados de la transformación, incluyendo los controles que se emplearon, así como el número de colonias analizadas y número de colonias que resultaron positivas.

Tabla VIII.- Resultados obtenidos con la transformación del plásmido pPIC9KhGH20K

Tratamiento	Número de colonias obtenidas	Número de colonias analizadas	Número de colonias positivas
TE	0		
pBR322	1283		
pPIC9K	15		
pPIC9K + <i>Sac</i> I + <i>Eco</i> R I	0		
*Ligación A, ***incubación a 16°C - Ligasa	0		
*Ligación A, ***incubación a 16°C + Ligasa	139	10	5
*Ligación A, ***incubación a 37°C - Ligasa	0		
*Ligación A, ***incubación a 37°C + Ligasa	212	10	8
Ligación B, *incubación a 16°C - Ligasa	0		
Ligación B, *incubación a 16°C + Ligasa	42	10	9
Ligación B, *incubación a 37°C - Ligasa	0		
Ligación B, *incubación a 37°C + Ligasa	151	10	9

*Sin corte adicional *Apa* I, *Sna* B1 de los fragmentos de ligación.

**Con corte adicional *Apa* I, *Sna* B1 de los fragmentos de ligación.

***Temperatura de incubación de la ligación.

Se eligieron 40 colonias (10 de cada uno de los tratamientos: Ligación A y B, a 16° y 37° C, respectivamente) para un análisis inicial de su DNA en forma superenrollada (circular), tal como se muestra en la Figura 20. Se observó que todas las colonias mostraron un tamaño de DNA mas grande que pPIC9K (9276 pb), lo que era de esperarse, ya que la inserción del fragmento de 1546 pb generaría como resultado un plásmido de 9804 pb (pPIC9KhGH20K).

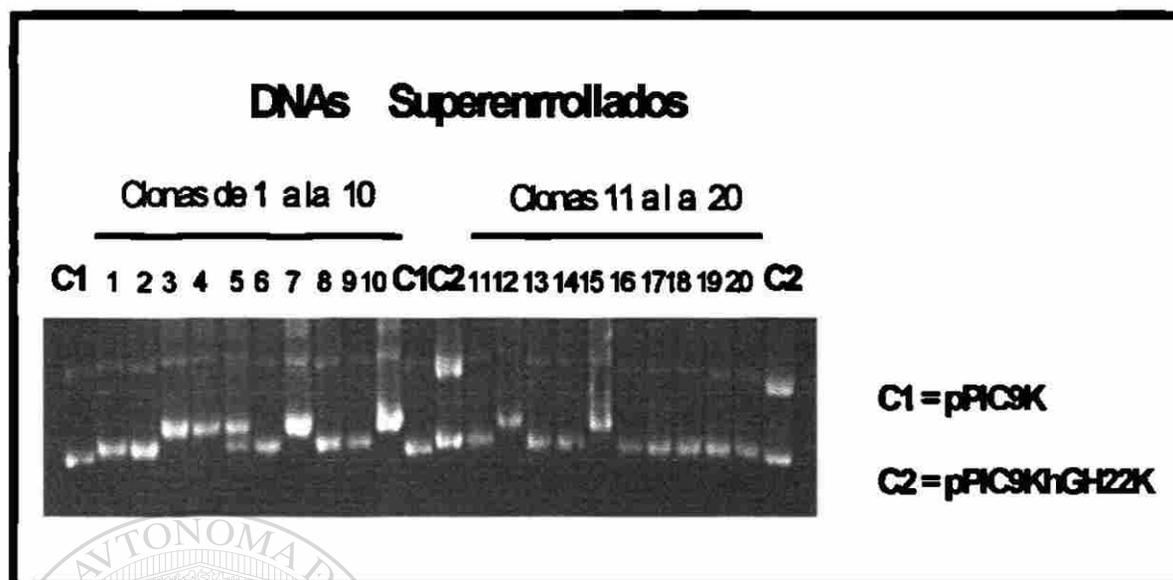


Figura 20.- DNAs Superenrollados de las clonas de pPIC9KhGH20K. Muestra la electroforesis en gel de agarosa al 0.6% del DNA superenrollado de 20 de las 40 clonas analizadas, utilizando como controles de corrimiento a pPIC9K y pPIC9khGH22K. Se observa que el tamaño obtenido de dichas clonas esta por arriba del tamaño de pPIC9K (9276 pb).

Posteriormente, las 40 clonas fueron sometidas a un análisis preliminar con la enzima *Pvu* II, donde se observó que solo 31 de ellas presentaban el patrón esperado, es decir la liberación de los fragmentos de: 6131, 2949, 452 y 267 pb. Las 9 clonas restantes presentaban un patrón de restricción entre pPIC9K y pBSPIC20, La Figura 21 muestra solo 20 de las 40 clonas analizadas con la enzima *Pvu* II.

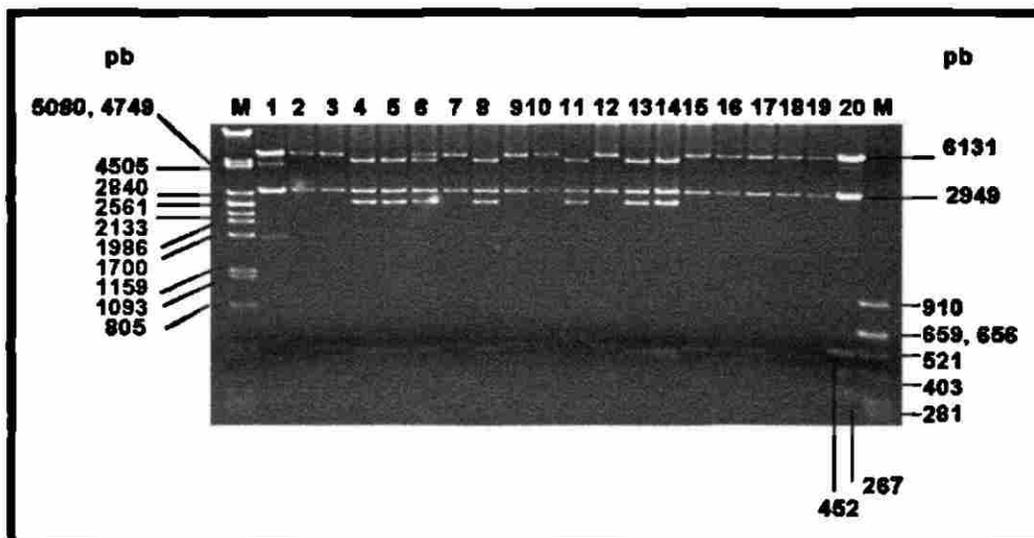


Figura 21.- Clonas de pPIC9KhGH20K caracterizadas con *Pvu* II. Gel de agarosa al 1.0%. M marcador de peso molecular (λ + *Pst* I y pBR 322 + *Alu* I respectivamente). Los carriles del 1 al 20 muestran 20 de las 40 clonas sometidas a un análisis con la enzima *Pvu* II. Los carriles del 15 al 20 muestran un ejemplo del patrón adecuado de corte (liberación de los fragmentos de 6131, 2949, 452 y 267 pb). Los carriles del 4 al 6 muestran el patrón diferente de corte que se encontró.

Finalmente, se eligieron 8 clonas diferentes para su análisis exhaustivo con las enzimas de restricción: *Sal* I, *Dra* I, *Sac* I-*Eco* RI, *Sac* I-*Avr* II, *Pst* I, *Xba* I, *Xho* I, *Bgl* II y *Pvu* II. La caracterización exhaustiva mostró que el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada digestión, evidenciados en el análisis electroforético en gel de agarosa, corresponde a los tamaños esperados, según el mapa de restricción obtenido con el programa *DNA Strider*. De esta manera se aseguró la identidad del plásmido construido pPIC9KhGH20K. La Figura 22 muestra la caracterización exhaustiva de pPIC9KhGH20K.

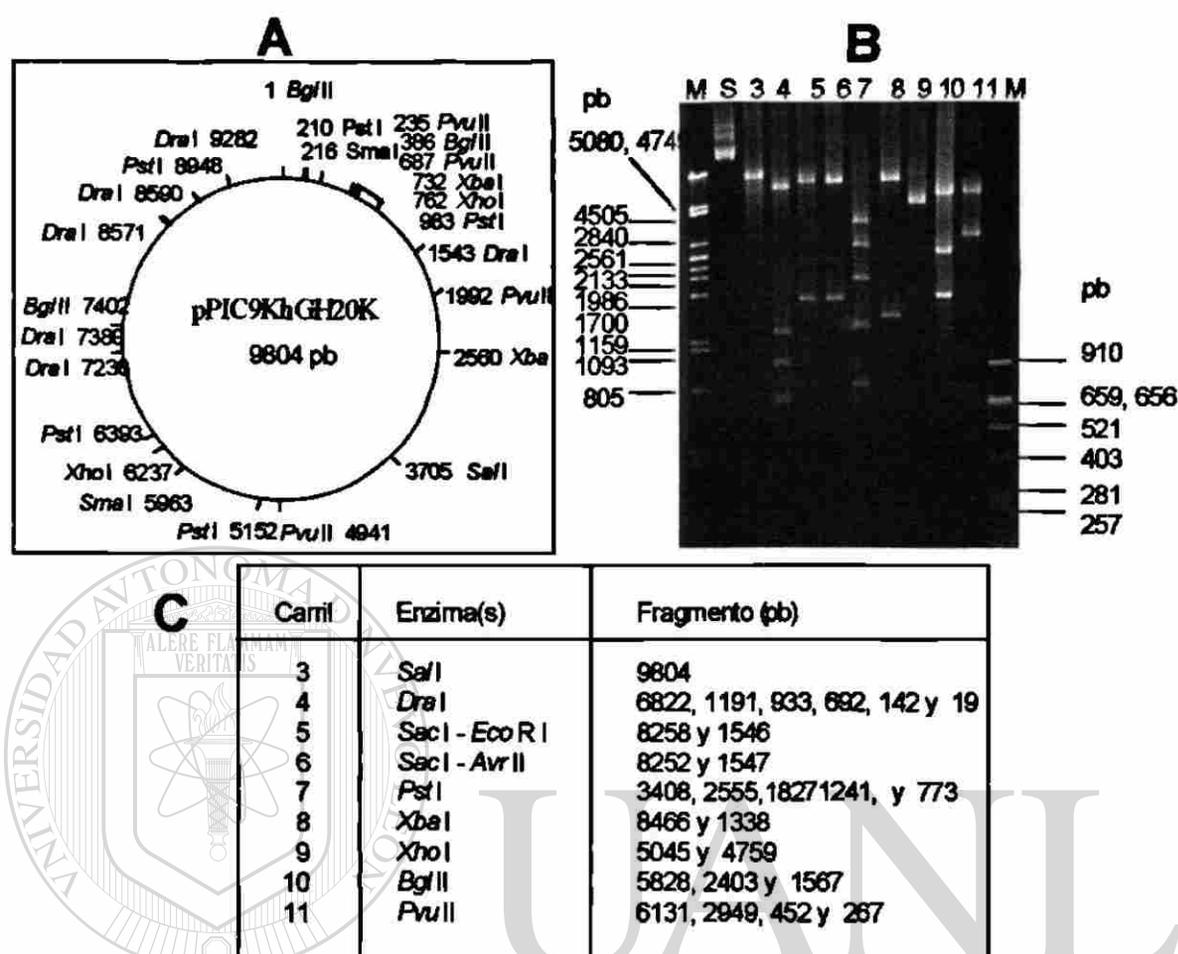


Figura 22.- Caracterización enzimática del plásmido pPIC9KhGH20K. El panel A muestra una representación gráfica del mapa de restricción de este plásmido. El panel B muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% de las digestiones de pPIC9KhGH20K con diferentes enzimas de restricción (carriles del 3 al 11). M, marcadores de peso molecular (λ -*PstI* y pBR322-*AluI* respectivamente); S, pPIC9KhGH20K superenrollado. El panel C muestra los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos de las digestiones con las diferentes enzimas de restricción. El patrón de los fragmentos obtenidos corresponde a los esperados.

4.5.1. Secuenciación

Se logró realizar la secuenciación de un fragmento de 724 pb del plásmido pPIC9KhGH20K, tal como se muestra en la Figura 23. De este fragmento secuenciado, 171 pb corresponden a la secuencia señal de levadura: factor α de *Saccharomyces cerevisiae*. Además posee 19 pb del extremo 5' del DNAC de hGH 22K e incluye a partir del codón 7 hasta el codón de terminación del DNAC de hGH 20K de la proteína madura; 13 pb (desde *Sma* I a *Eco* RI) que corresponden a un fragmento de la región de policonación del vector pPIC9K. Una vez obtenida la secuencia se envió a comparar al *Blast*, indicando que ésta correspondía al tipo de GH (hormona del crecimiento). De esta manera se aseguró la integración del DNAC de hGH 20K al plásmido pPIC9K

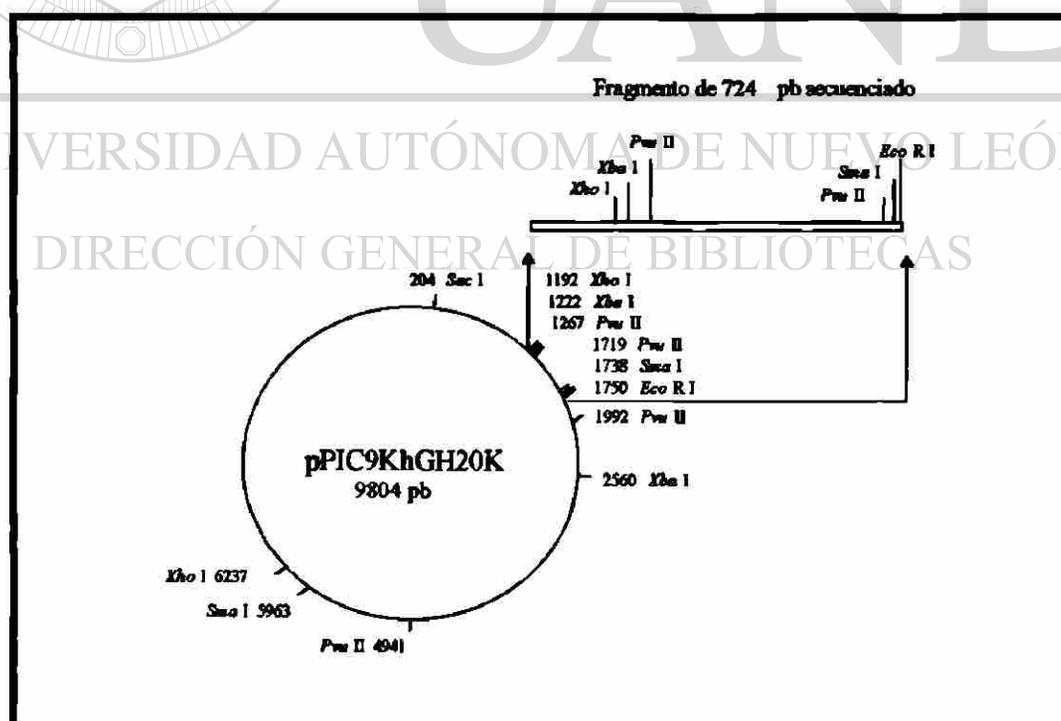


Figura 23. Secuencia de pPIC9KhGH20K de 724 pb. Se muestra la localización del fragmento secuenciado de 724 pb en el plásmido pPIC9KhGH20K, donde se resaltan los sitios mas importantes.

4.5.2 Aislamiento a mediana escala del DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K

Las clonas 39 y 40 fueron empleadas para preparar DNA plasmídico a mediana escala. En la Tabla IX se presentan los valores de rendimiento y calidad de las preparaciones de DNA. La cantidad obtenida también fue suficiente para realizar los ensayos posteriores.

Tabla IX.- Rendimiento y calidad de las preparaciones plasmídicas a mediana escala

Plásmido (pPIC9KhGH20K)	A260/A280	Rendimiento $\mu\text{g/mL}$
Clona 39	1.88	430
Clona 40	2.23	256

4.6 Transformación de *P. pastoris* GS115

Se obtuvieron colonias aisladas de *Pichia pastoris* cepa GS115 mediante su inoculación por estría en las placas que contenían YPD.

De las preparaciones plasmídicas de las clonas 39 y 40 obtenidas por mediana escala, se eligió solamente la clona 39 para su digestión preparativa con las enzimas *Sal* I y *Dra* I. Observamos en el caso de *Sal* I una digestión total mediante la linearización del plásmido. En cambio con *Dra* I fue evidenciada por la liberación de 6 fragmentos (6822, 1191, 933, 692, 142, y 19 pb). Ambos DNAs fueron utilizados para la transformación de *Pichia pastoris* GS115.

En la preparación de esferoplastos, los inóculos con 10 μ L fueron los que alcanzaron una D.O.₆₀₀ nm de 0.3 al día siguiente de su inoculación (18 h).

En ensayos independientes, se encontró un 70% de formación de esferoplastos de las células de *Pichia pastoris* GS115 tanto a 25 como a 40 min de incubación con la enzima zimolasa. Los resultados de la transformación obtenidos con ambos tratamientos fueron muy similares, ya que no existe diferencia en el número de colonias obtenidas, tal como se muestra en la Tabla X.

Tabla X.-Transformación por la técnica de formación de esferoplastos

Tiempo de incubación	Tratamiento	No. de colonias
25 min	TE	0
	GS115pPIC9K-Sal I	0
	GS115pPIC9K-Dra I	1
	GS115HGH20K-Sal I	34
	GS115HGH20K-Dra I	113
40 min	TE	0
	GS115pPIC9K-Sal I	1
	GS115pPIC9K-Dra I	0
	GS115HGH20K-Sal I	35
	GS115HGH20K-Dra I	116
Número total de colonias		300

La aparición de colonias fue monitoreada durante 4 a 6 días. Este método proporcionó una selección inicial de transformantes HIS⁴⁺, ya que solamente las células que integraron en su genoma el vector pPIC9KhGH20K (conteniendo el cassette de expresión), pudieron crecer en medio carente de histidina. Se obtuvo un total de 300 colonias por la técnica de transformación por formación de esferoplastos. En la prueba de viabilidad no fue posible determinar el número exacto de células debido a la gran cantidad de estas.

4.7 Selección de clonas multicopias del cassette de expresión, mediante su crecimiento a dosis crecientes del antibiótico G418 (geneticina)

De un total de 300 colonias obtenidas mediante la técnica de formación de esferoplastos, se escogieron 103 colonias para realizar el tamizaje de clonas multicopias mediante su crecimiento a dosis crecientes del antibiótico G418. De éstas, 78 correspondían a las cepas de *P. pastoris* transformadas con el vector pPIC9khGH20K digerido con *Sal* I y las 25 restantes a las cepas de *P. pastoris* transformadas con el vector pPIC9khGH20K digerido con *Dra* I (ver Anexo 2, a partir de C3-2.1 hasta C3-6.1). Además se utilizaron 5 controles, los cuales incluían a: GS115 (cepa de *P. pastoris* sin transformar), GS115pPIC9K-*Sal* I (cepa transformada sólo con el vector: pPIC9K) I, GS115pPIC9K-*Dra* I (cepa transformada sólo con el vector: pPIC9K), GS115pPIC9hGH22K (cepa unicopia: portadora de una copia del DNAc de HGH 22K), GS115pPIC9KhGH22K (cepa multicopia: portadora de múltiples copias del DNAc de HGH 22K). Las 108 clonas fueron crecidas en placas con RDB sin histidina para corroborar la selección de transformantes HIS4⁺. Dichas clonas se distribuyeron en 3 placas (ver Anexo 2), cada una con 36 divisiones, lo que permitió separar cada una de las clonas analizadas, tal como se muestra en la Figura 24.

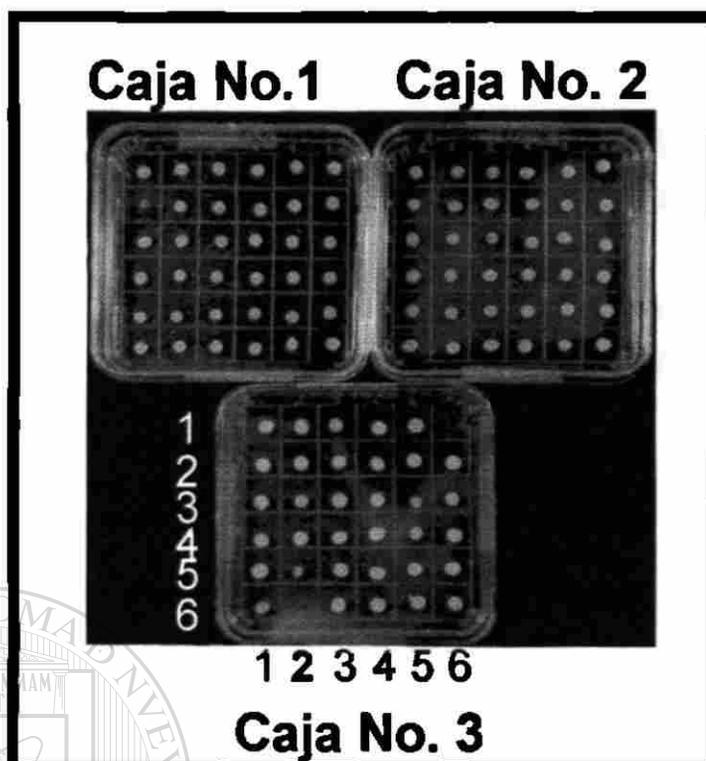


Figura 24.- Crecimiento en RDB agar sin histidina para corroborar la selección de transformantes $HIS4^+$. Muestra el total de las clonas analizadas crecidas en cajas con RDB agar sin histidina (primera selección), así también como los controles utilizados. En la caja No. 3 posición 6.2 (C3-6.2) muestra la ausencia de crecimiento, en este caso se refiere a la cepa de GS115 utilizada como control (esta cepa no puede crecer sin histidina).

Una vez corroborada la selección de transformantes $HIS4^+$, las clonas fueron pasadas a placas de YPD agar con G418 a diferentes dosis, generando así un nuevo juego de placas. Cada juego de placas incluyó placas con YPD que contenían G418 a concentraciones finales de 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0, y 4.0 mg/mL. El crecimiento de las colonias se observó a partir del tercer día de incubación. Finalmente al sexto día se determinó la concentración máxima de crecimiento alcanzada en cada una de las clonas, en las diferentes concentraciones del antibiótico G418. La Figura 25 muestra solo un ejemplo de los resultados obtenidos en el tamizaje de la selección a G418, de forma particular los obtenidos para la caja No. 1, donde se observa tanto el crecimiento total de las clonas analizadas (caja sólo con YPD sin antibiótico), como la restricción del crecimiento de algunas de estas clonas (caja con G418

a una concentración de 0.25 hasta 1.5 mg/mL). En el Anexo 3 se muestra la concentración máxima de antibiótico alcanzada por cada una de las clonas.

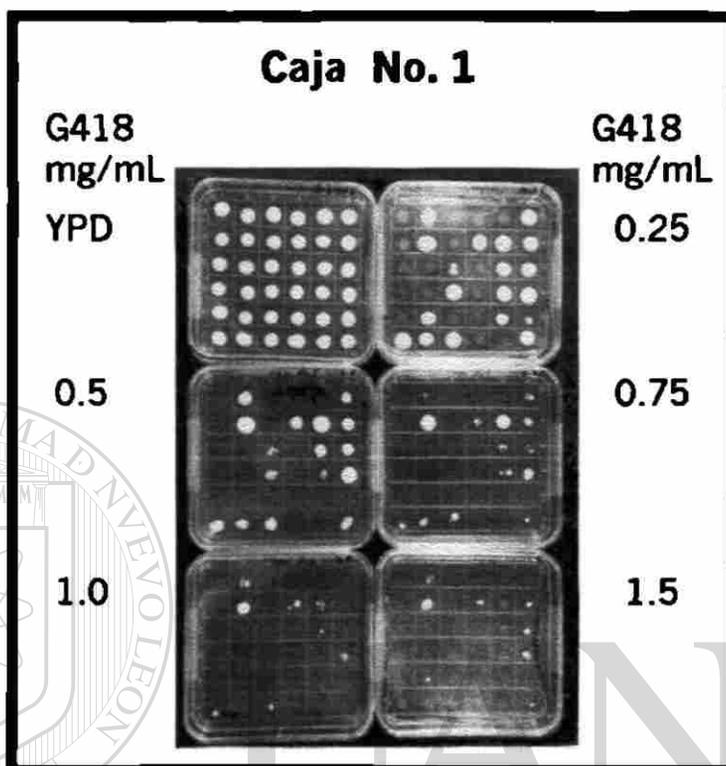


Figura No. 25.- Selección por G418 de las clonas obtenidas. Muestra un ejemplo de selección, en este caso se refiere a cada una de las clonas utilizadas en la Caja No. 1 crecidas a diferentes dosis del antibiótico. Nótese la ausencia de crecimiento de algunas clonas al aumentar la dosis del antibiótico, así como la permanencia del crecimiento.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se obtuvieron un total de 51 clonas que crecieron en las diferentes concentraciones de G418, lo cual corresponde a un 49.51% del total de clonas analizadas (103 clonas), tal como se muestra en la Tabla XI.

Tabla XI.- Porcentaje de clonas que crecieron a concentraciones crecientes de G418

Concentración de G418 (mg/mL.)	Caja No. 1 (Número de clonas)	Caja No. 2 (Número de clonas)	Caja No. 3 (Número de clonas)	Porcentaje obtenido
0.0 (Solo YPD)	todas	todas	todas	100.0%
0.25	5	4	7	15.5%
0.5	2	2	2	5.8%
0.75	5	3		7.8%
1.0	2	2	1	4.9%
1.5	1	2	2	4.9%
1.75		2		1.9%
2.0	2			1.9%
3.0	2			1.9%
4.0	2	2		3.9%
Porcentaje total de clonas que crecieron a concentraciones crecientes de G418				49.51%

4.8 Caracterización genotípica y fenotípica de las cepas obtenidas

4.8.1 Extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De las 51 clonas que crecieron en las diferentes concentraciones de G418 se eligieron al azar 8, a las que se les realizó extracción de DNA genómico y se les comprobó mediante PCR la integración del gen heterólogo al genoma de *P. pastoris*. De las 8 clonas elegidas al azar, 4 de ellas provenían de la transformación de *P. pastoris* GS115 con el plásmido pPIC9KhGH20K digerido con *Sal* I (clonas denominadas como: GS115HGH20K-*Sal* I-1 a la 4). Las 4 clonas restantes provenían de la transformación con el mismo plásmido pero digerido con *Dra* I (clonas denominadas como: GS115HGH20K-*Dra* I -1 a la 4). Como controles para la amplificación se realizó tanto la extracción de DNA genómico de las cepa GS115 (cepa nativa de *P. pastoris*), GS115pPIC9K (cepa transformada con el

vector pPIC9K y digerido con *Sal* I), y GS115HGH22K (cepa transformada con el vector pPIC9hGH22K); como la extracción de DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K y pPIC9hGH22K. Los resultados obtenidos en la extracción del DNA se muestran en la Tabla XII.

Tabla XII.- Rendimiento y calidad de las preparaciones de DNA genómico y plasmídico

DNA genómico	A260/A280	Rendimiento µg/mL
GS115pPIC9K- <i>Sal</i> I	2.0	377
GS115HGH20K- <i>Sal</i> I-1	1.7	621
GS115HGH20K- <i>Sal</i> I-2	1.8	889
GS115HGH20K- <i>Sal</i> I-3	1.9	647
GS115HGH20K- <i>Sal</i> I-4	1.8	512
GS115HGH20K- <i>Dra</i> I-1	1.7	290
GS115HGH20K- <i>Dra</i> I-2	1.6	389
GS115HGH20K- <i>Dra</i> I-3	1.9	640
GS115HGH20K- <i>Dra</i> I-4	1.6	209
GS115HGH22K	1.9	977
GS115	1.7	952
DNA plasmídico	A260/A280	Rendimiento µg/mL
pPIC9K	2.07	4150
pPIC9K hGH20K	1.88	430

La Figura 26 muestra los resultados obtenidos tanto en la extracción de DNA genómico como el análisis por PCR. Las muestras fueron separadas en geles de agarosa al 0.6%. Los DNAs genómicos y plasmídicos obtenidos en su mayoría fueron de buena calidad, a juzgar por su corrimiento en el gel y los resultados obtenidos en la relación de A_{260}/A_{280} . Los resultados encontrados en el análisis de PCR demuestran la integración del gen heterólogo (cassette de expresión para HGH 20K) al genoma de *P. pastoris* en las 8 clonas analizadas; mediante la amplificación de una banda de 1016 pb. Además indican que la integración se llevó a cabo en HIS4, dando como resultado transformantes Mut⁺, las cuales poseen el gen *AOX1* intacto; esto, evidenciado por la amplificación de una banda de 2200 pb (carriles del 2 al 9). Se puede observar además que existe variación en la dosis génica a juzgar por las diferencias en intensidades en la banda de 1016 pb amplificada (carril

3), lo cual indica una probable integración de múltiples copias del gen heterólogo (HGH 20K). Se encontró en la clona GS115HGH20K-*Dra* I-4 (carril 9) el reemplazamiento del gen AOX1, evidenciado por la ausencia de la banda de 2200 pb. En el caso del control GS115 (carril 11) se obtuvo la amplificación de la banda de 2200 pb, ya que posee solo el gen de AOX1 y no el gen heterólogo. También se pudo observar en el carril 10, que la banda inferior de amplificación es ligeramente mayor (1060 pb) al resto de las bandas amplificadas. Esto debido a que el gen heterólogo proviene de hGH 22K. La amplificación de los plásmidos pPIC9KhGH20K y pPIC9K (utilizados como controles) se muestran en los carriles A y B respectivamente, mediante la aparición de las bandas de 1016 pb y 449 pb.

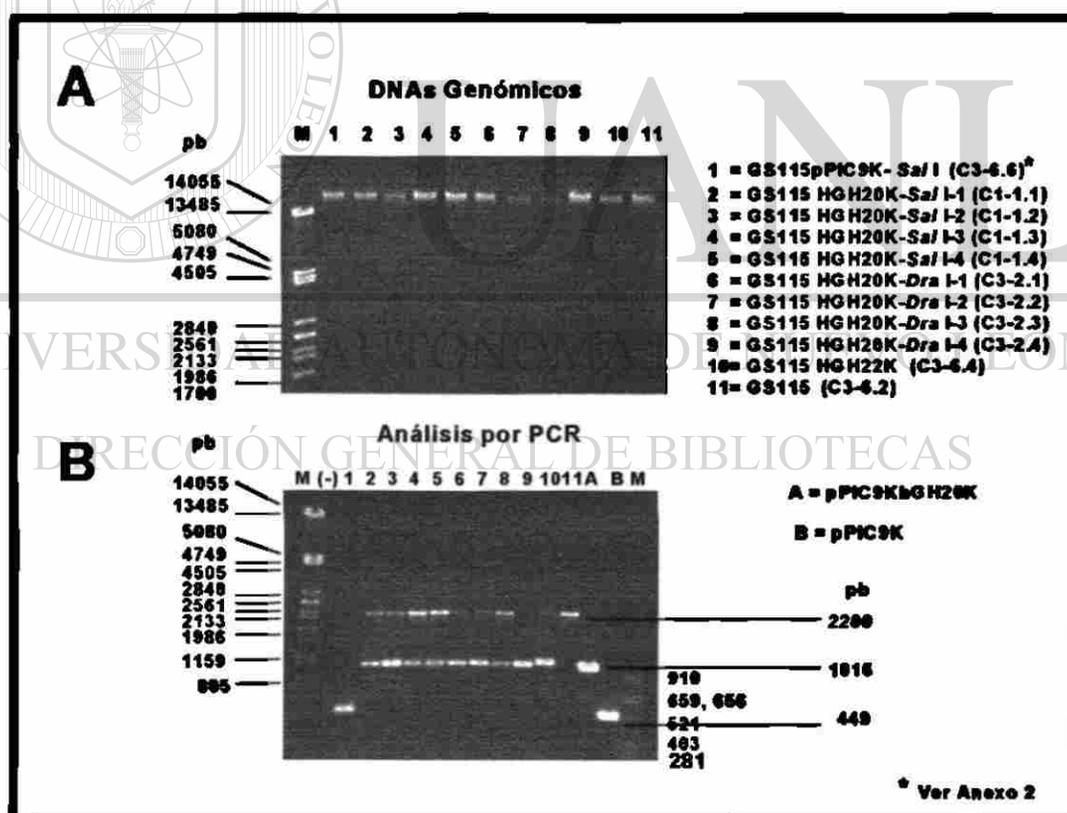


Figura 26.- Extracción de DNA genómico y PCR de ocho clonas elegidas al azar. Geles de agarosa al 0.6%. M marcador de peso molecular (λ +*Pst* I y pBR322 + *Alu* I respectivamente). El panel A muestra los DNAs genómicos extraídos por la técnica de TSNT. El panel B muestra un análisis de PCR realizado a los DNAs genómicos y plasmídicos extraídos. Se puede observar en este caso en el carril 3 la intensidad mayor de la banda de 1016 pb, lo que indica que probablemente el cassette de expresión se integró en más de una copia.

4.8.2 Fermentación

Para caracterizar el producto de la expresión del gen heterólogo integrado (HGH 20K), se realizó un ensayo de fermentación e inducción del gen heterólogo durante 96 h. Dicho ensayo incluyó cuatro de las clonas en las cuales se comprobó la integración del gen heterólogo (Figura 26). La Figura 27 muestra un gel de SDS-PAGE al 12 % de los medios de cultivo analizados resultantes de dichas fermentaciones. Se observó la presencia de una banda de aproximadamente 20K de acuerdo al estándar de peso molecular, lo que indicó la producción y secreción de HGH 20K. En el carril 1 se muestra como control de expresión el medio de cultivo de células inducidas que no poseen el gen heterólogo. En el carril 6 se muestra como control de inducción y expresión, el medio de cultivo de células de *P. pastoris* productoras de HGH 22K (Escamilla-Treviño, 1996), donde se observa que la expresión de HGH 22K es en este caso, menos evidente que HGH 20K.

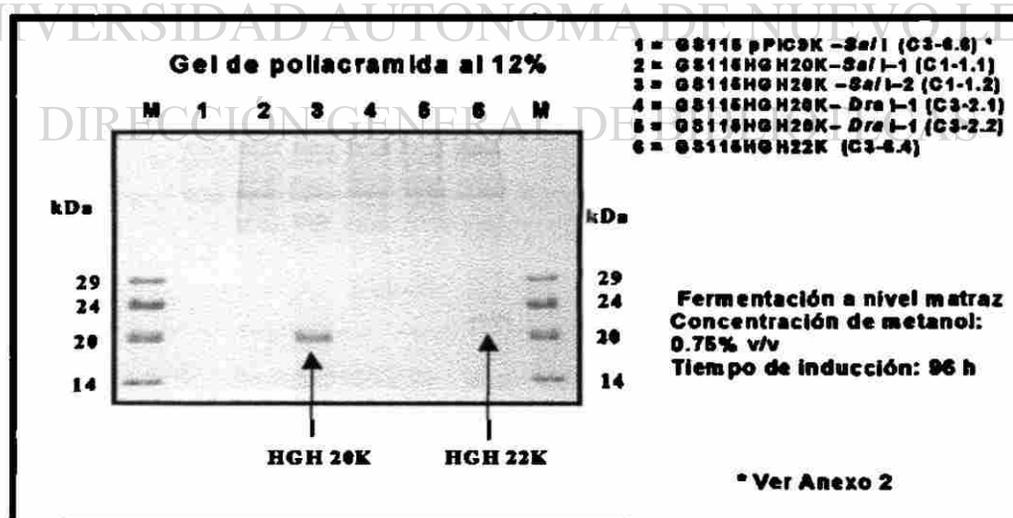


Figura 27.- Fermentación e inducción de cuatro clonas en las cuales se comprobó la integración del gen heterólogo. Gel de SDS-PAGE al 12% de los medios de cultivo analizados, donde se muestra la expresión de HGH 20K de una de las clonas analizadas (carril 3). El carril 6 muestra la expresión de HGH 22K como control de expresión. M marcador de peso molecular.

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 *SaI* I, ya que fueron las que presentaron las colonias mas 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.

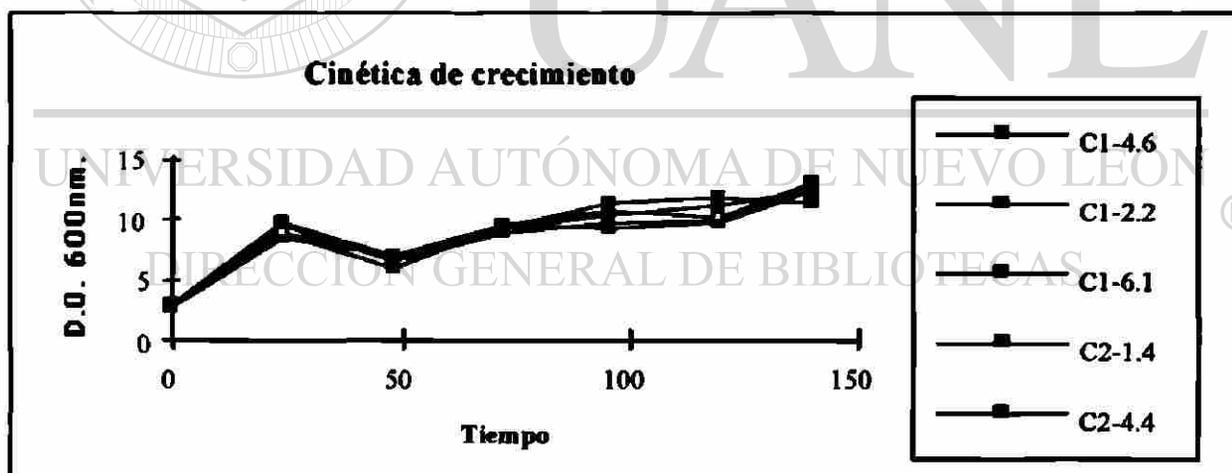
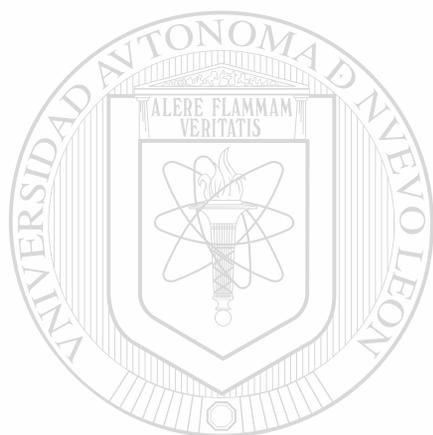


Figura No 28.- Cinética de crecimiento. Muestra un ejemplo de las cinéticas de crecimiento encontradas en 5 de las clonas analizadas.

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-Sal 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

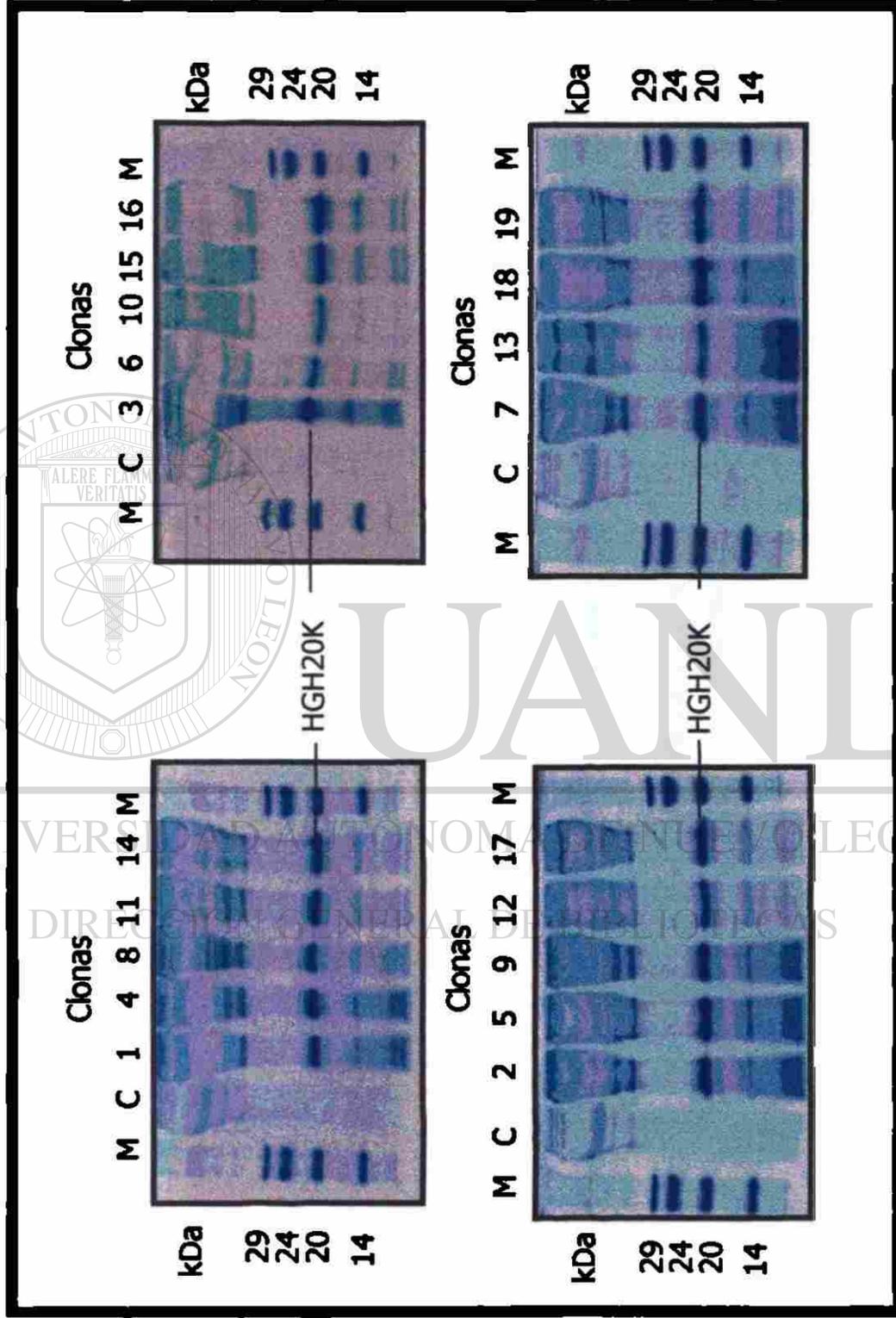


Figura 29.-Análisis electroforético en gel de poliacrilamida de proteínas presentes en los medio de cultivo. M, marcador de peso molecular de proteínas; C, Medio de cultivo de células transformadas solo con el vector (pPIC9K) e inducidas con metanol; los números representan las 19 clonas diferentes analizadas.

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.

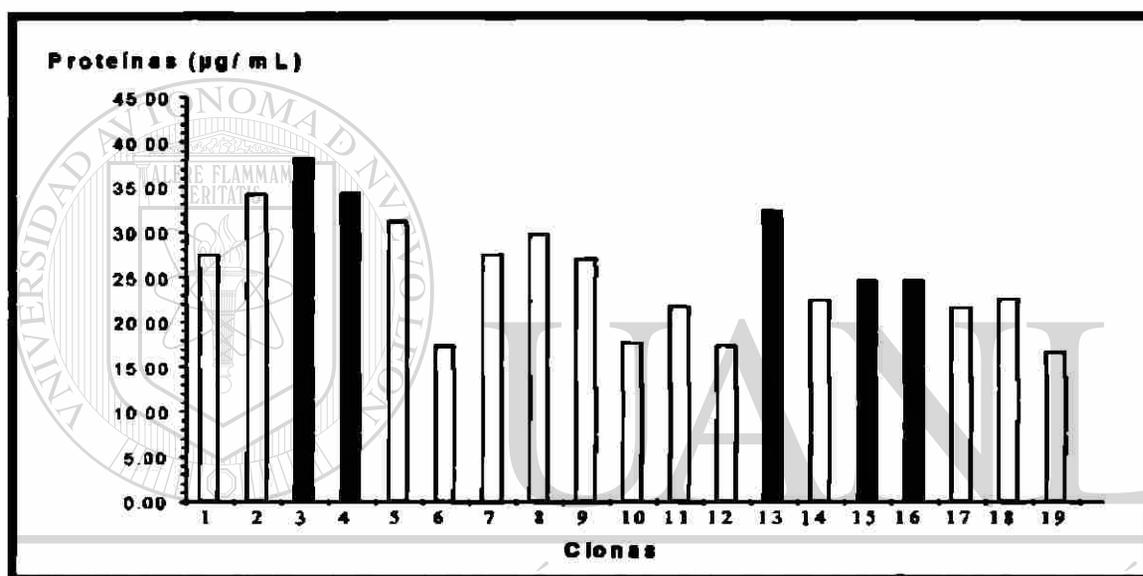


Figura No 30.- Determinación de proteínas totales de las 19 clonas analizadas. La determinación de proteínas totales se efectuó mediante el método de Bradford. Las barras oscuras corresponden a las 5 clonas que resultaron ser mejores productoras de HGH 20K, además se puede observar que estas clonas no 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).

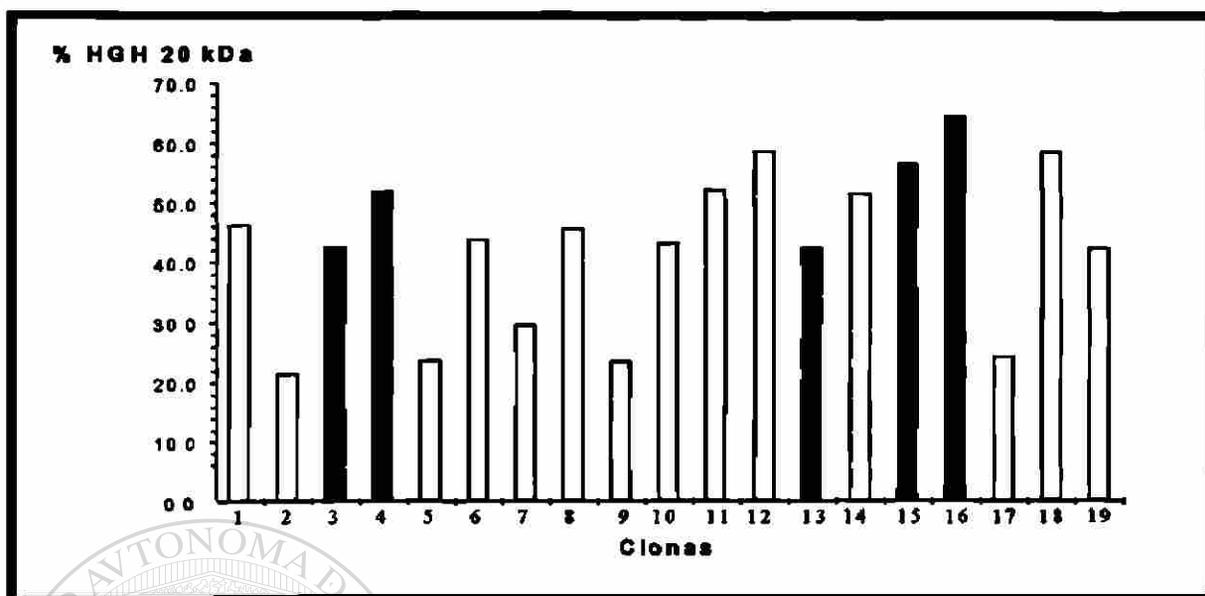
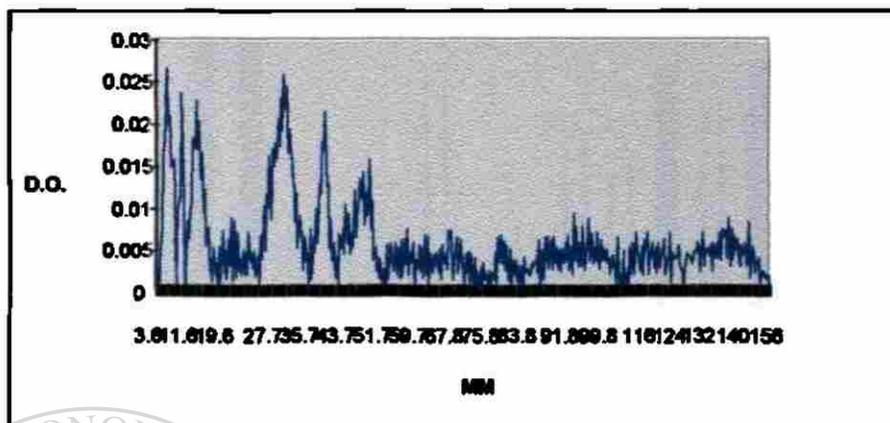


Figura No 31.- Porcentaje de HGH 20K respecto a las proteínas totales en el medio de cultivo. La determinación del porcentaje de HGH 20K con respecto a las proteínas totales se realizó mediante el sistema de fotodocumentación Gel DOC 1000 de Bio Rad. Estos porcentajes de HGH 20K variaron entre 21.1 y 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-Sal 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

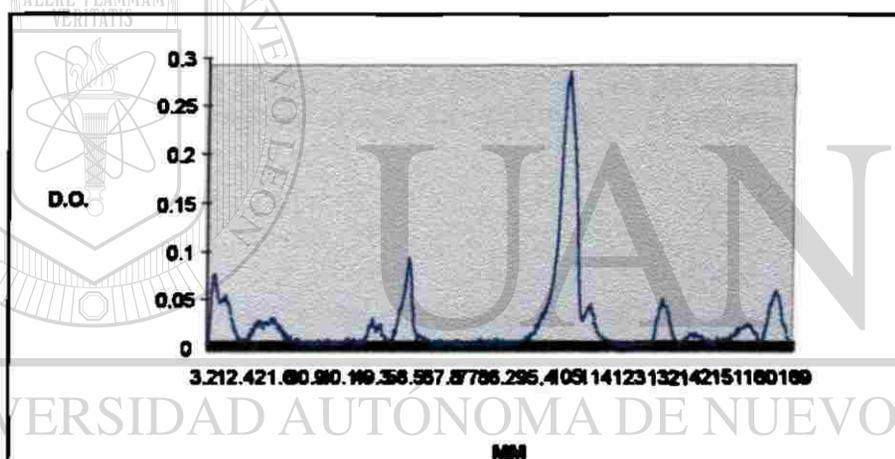


Figura No 32.- Análisis densitométrico de las proteínas de los medios de cultivo fermentados . El densitograma superior muestra el patrón de picos obtenido a partir de medio de cultivo de células inducidas transformadas con el vector pPIC9K, sin el cassette de expresión (clona GS115pPIC9K-Sa/ I). El 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.

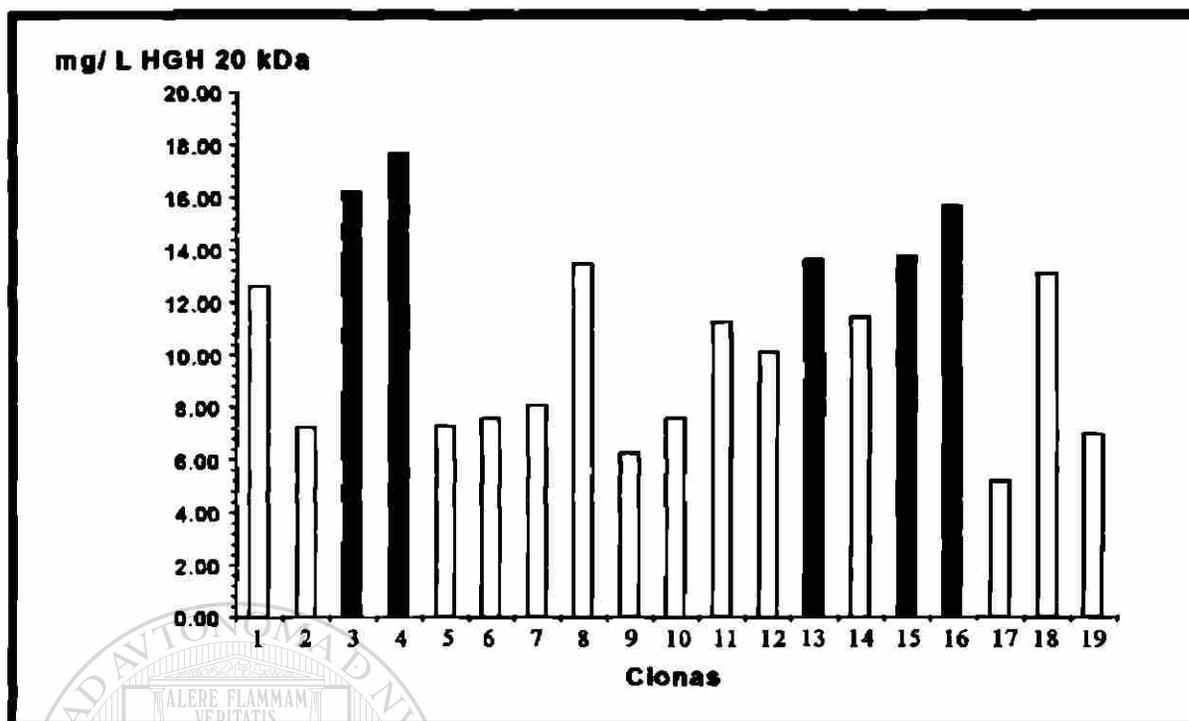


Figura No 33.- Niveles de producción de HGH 20K. Las barras oscuras corresponden a las 5 clonas que produjeron mayores niveles de HGH 20K. Los valores de producción variaron entre 5.13 a 17.63 mg/mL.

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)

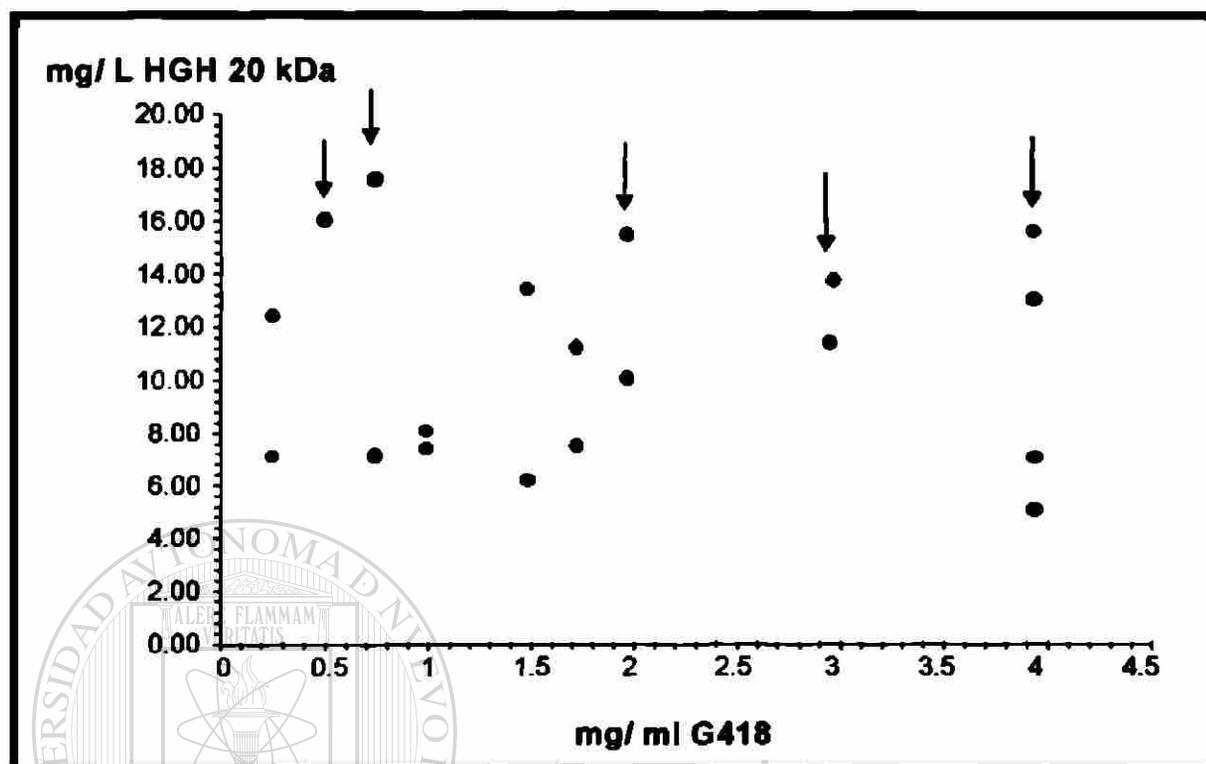


Figura No 34.- Correlación de la concentración inhibitoria de G418 y la producción de HGH 20K. Los resultados muestran que no existe correlación alguna entre el nivel de producción de HGH 20K con respecto a la concentración de G418, ya que las cepas de mayor producción de HGH 20K se encuentran distribuidas 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.	% Linea 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.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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 *Sal* 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 comercial production of heterologus protei. *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 carboximethylated derivaated, and human placental lactogen an 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 deferenciación adiocítica. *Ciencia UANL*. Vol. II, No. 1, 70-78. DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
- 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 weigth 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., Sreerishna, 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 Expression. 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., Ohtsukaa, 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 disorders. *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). Methylophilic 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 biosynthetic 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

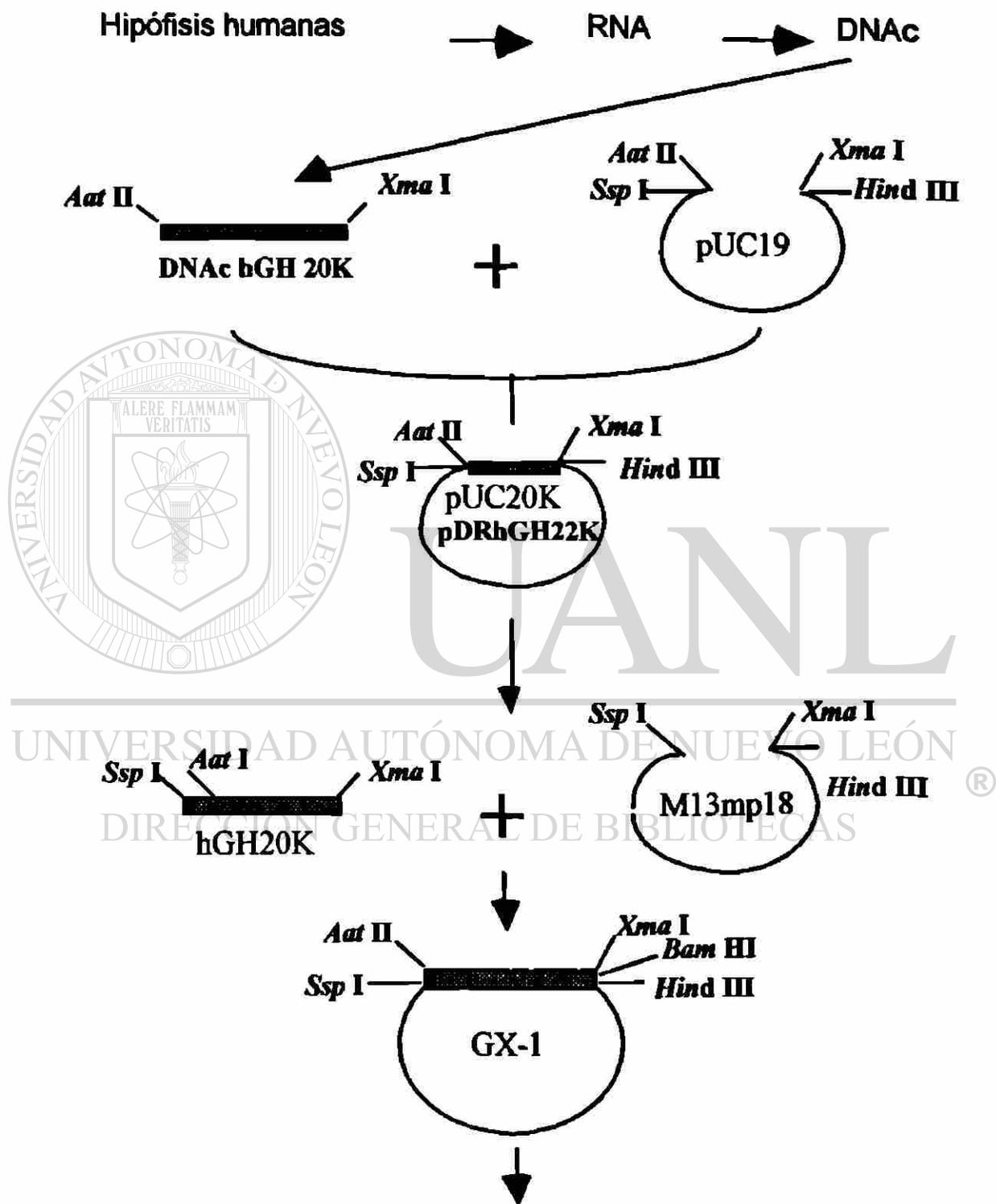
Concentración máxima de antibiótico inhibitoria para cada una de las clonas analizadas

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

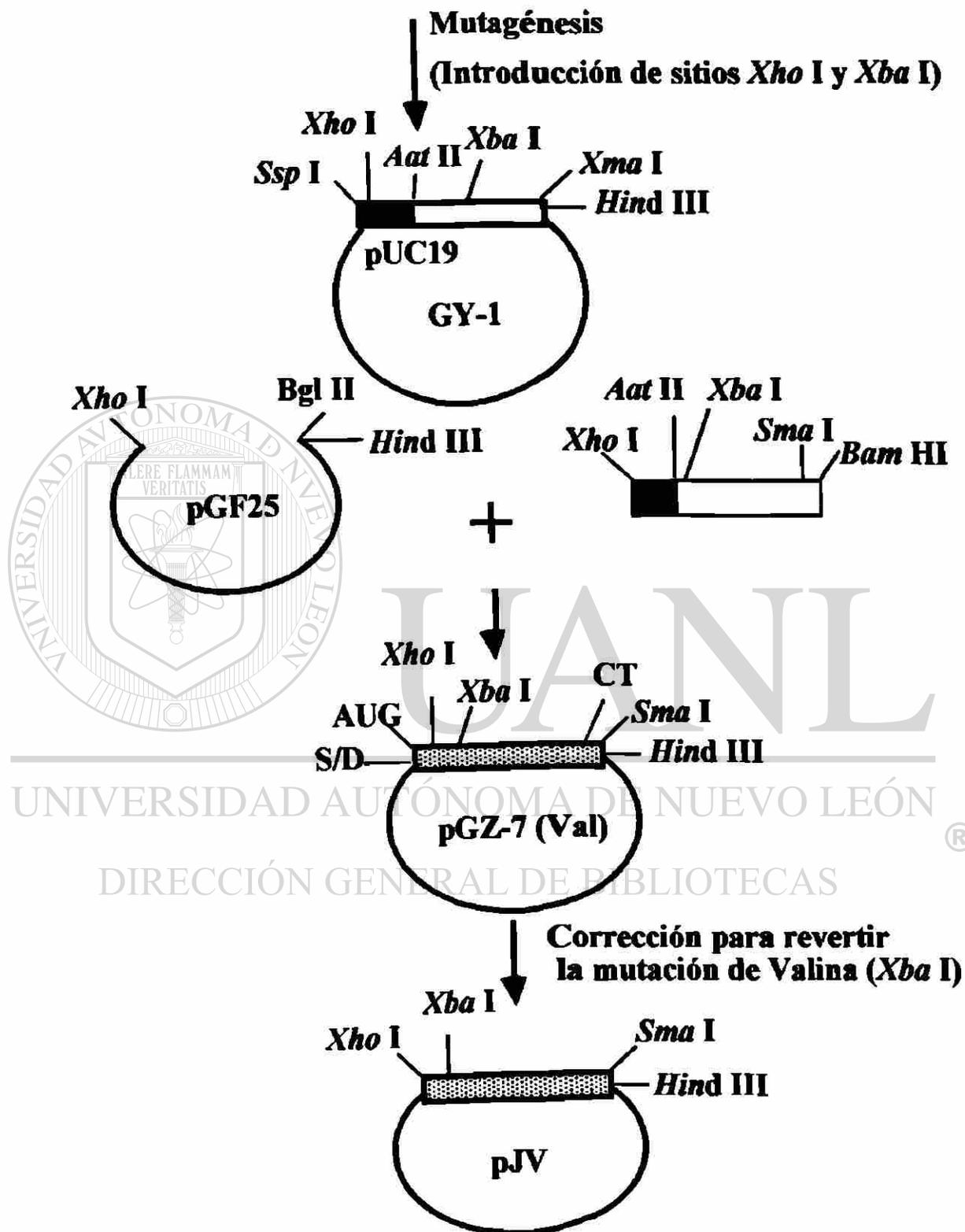
En negritas se resaltan las 19 clonas que fueron utilizadas en los ensayos de fermentación e inducción.

ANEXO 4

"Ontogenia" de pJV



Continuación ANEXO 4



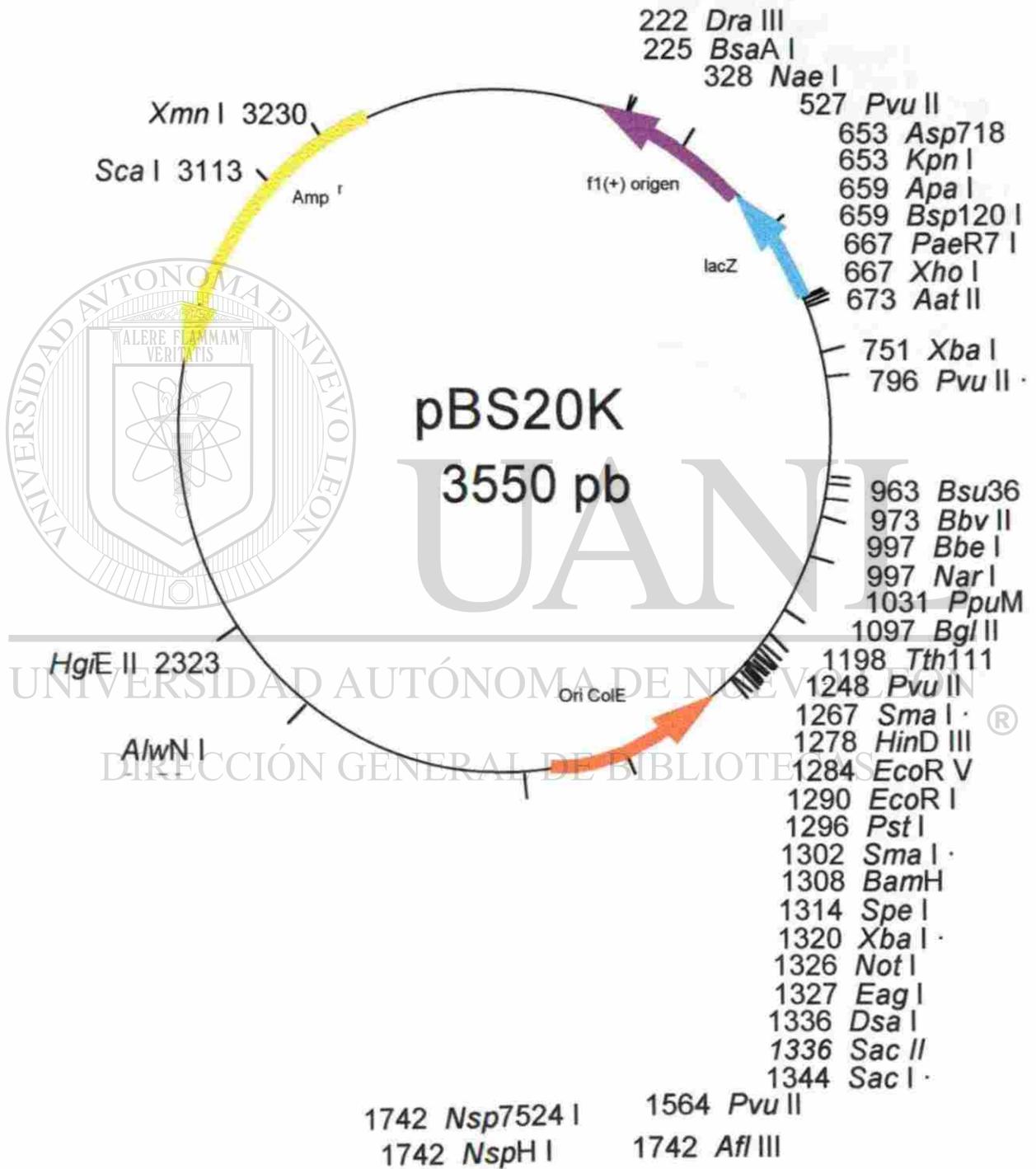
ANEXO 5

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 645, 5320 pb	pBS Xho I y Hind III 21, 2940 pb	545 y 2940 pb	645 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, 616, y 2980 pb	pBSPIC9 Xba I y Sma I 18, 3937 pb	516 y 3937 pb	616 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 7

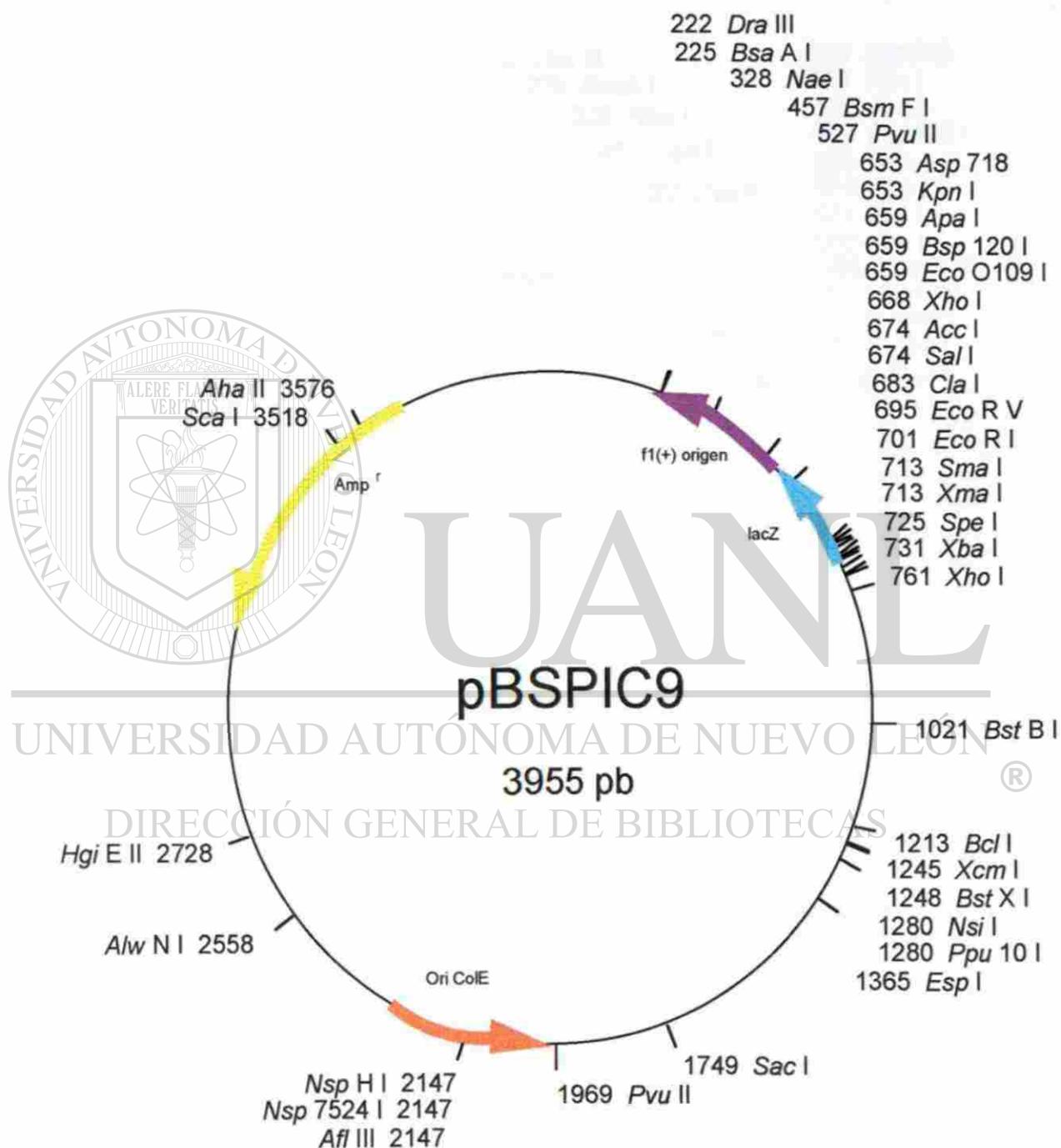
Mapa de restricción del plásmido pBS20K



Muestra los sitios únicos de corte.

ANEXO 8

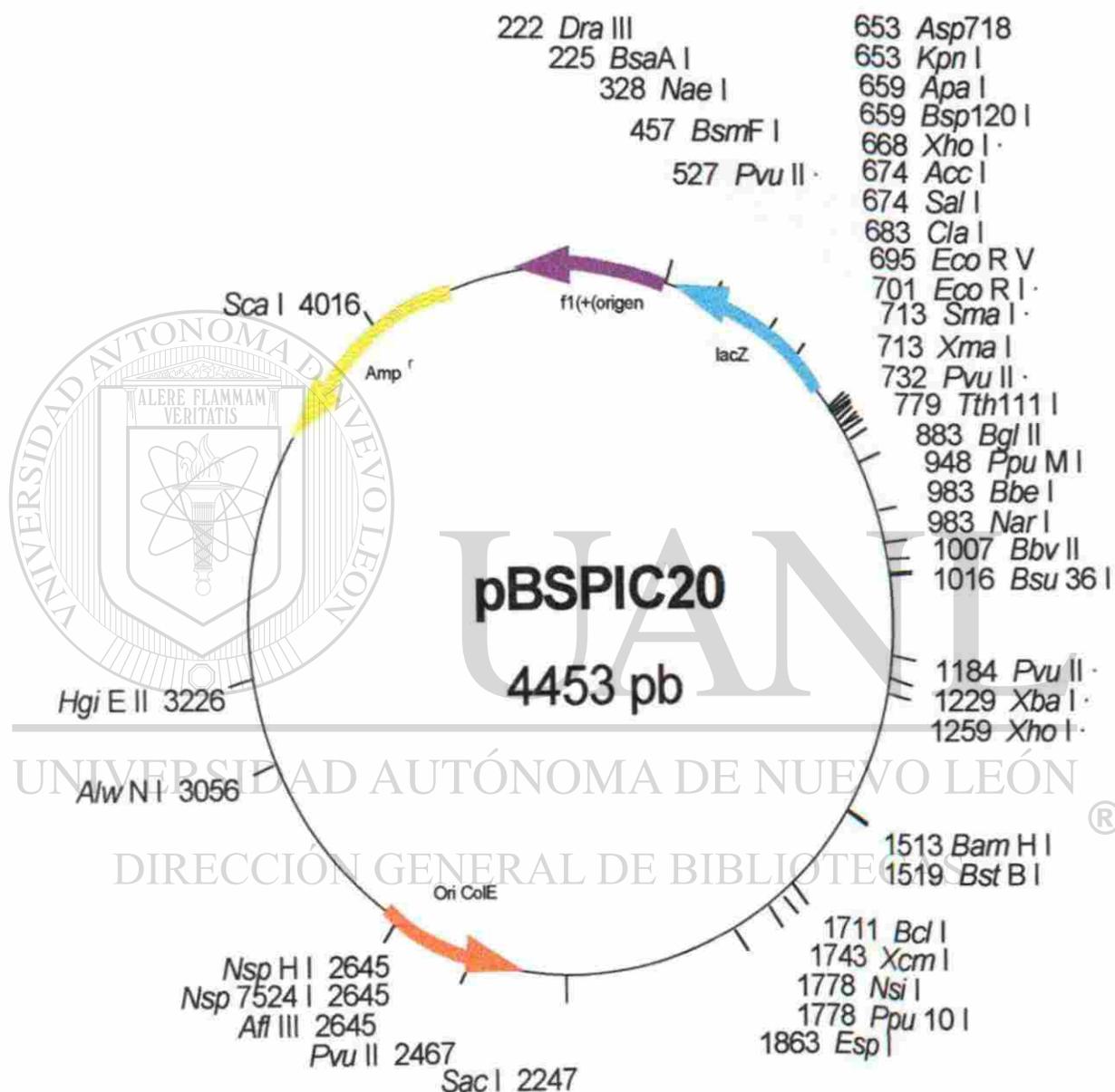
Mapa de restricción del plásmido pBSPIC9



Muestra los sitios únicos de corte.

ANEXO 9

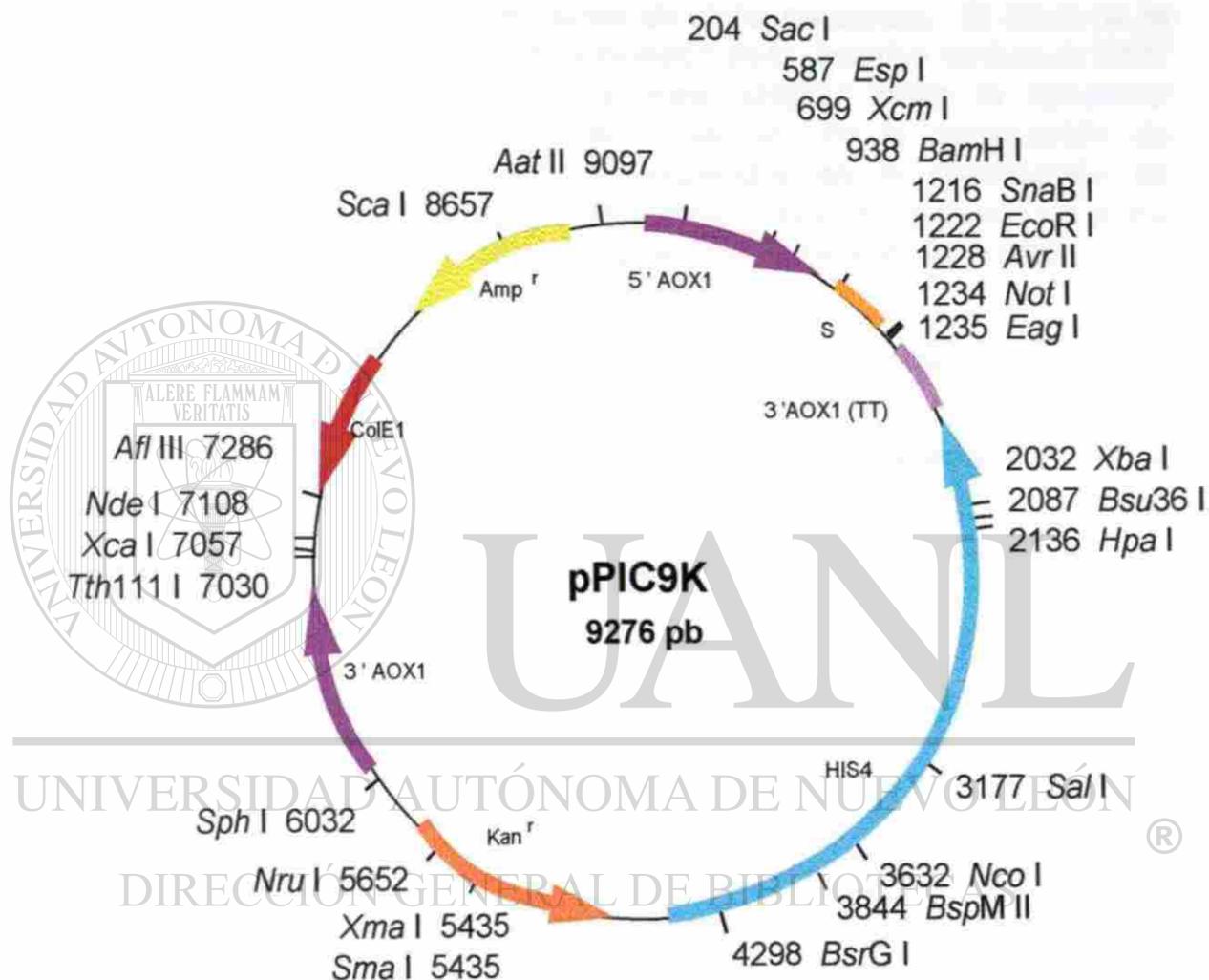
Mapa de restricción del plasmido pBSPIC20



Muestra los sitios únicos de corte.

ANEXO 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'

GAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTC

GATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACT

Primer codón de la hormona madura

ACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGATTCCCAAC

Xho I

CATTCCCTTATCTAGACTTTTGGACAACGCTATGCTCCGCGCCCATCGTCTGCACCAGC

Xba I

Pvu II

TGGCCTTTGACACCTACCAGGAGTTTAACCCCCAGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAGTCTA

TTCCGACACCCTCCAACAGGGAGGAAACACAACAGAAATCCAACCTAGAGCTGCTCCGCA

TCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGCAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCG

CCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTCTGACAGCAACGCTATGACCTCCTAAAGGACCTAG

AGGAAGGCATCCAAACGCTGATGGGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCGGACTGGGCAGA

TCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACACAACGATGACGCACTACTCA

AGAACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCTGC

GCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGctgcccgggctgca

Pvu II

Sma I

ggaattcc

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

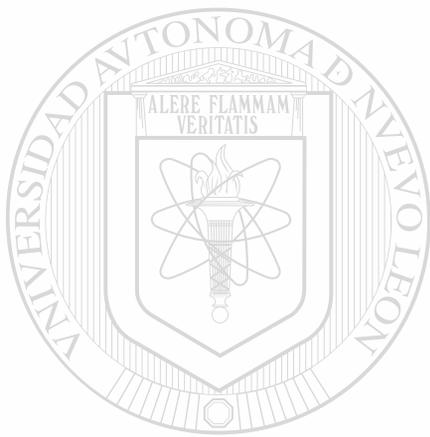
Biografía:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



