puede observar el retraso en la migración de los plásmidos recombinantes, indicando la presencia de un inserto en el vector pPIC9

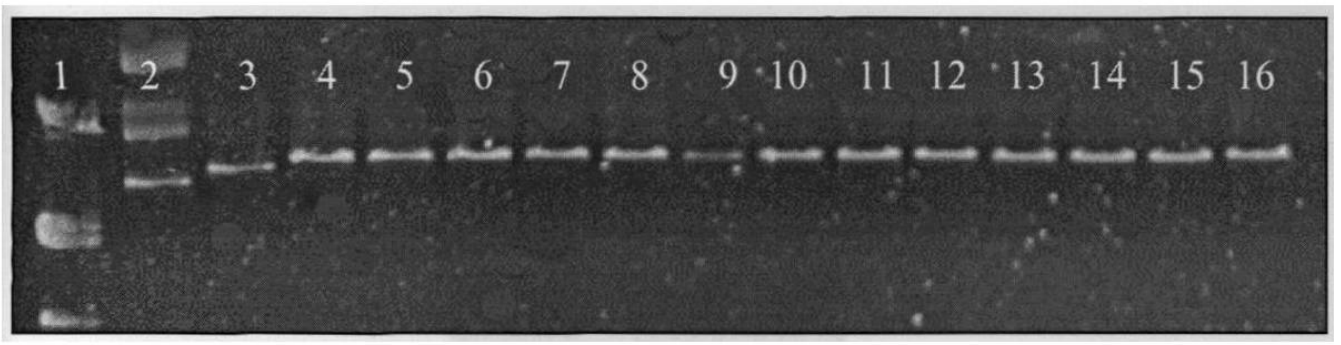


Figura 18. Selección de recombinantes pPIC9hGH-V por electroforesis en gel de agarosa 0.7%. En los carriles 4 al 16 se muestran los plásmidos recombinantes linearizados con *Sal* I. Se observa la migración retrasada respecto a pPIC9 linearizado con la misma enzima (carril 3). Adicionalmente, en el carril 2 a la derecha del MPM λ+*Pst* I, se muestra DNA de pPIC9 sin digerir.

4.5.2 Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes.

a) Estimación del tamaño del inserto en los recombinantes.

Aproximadamente 1μg de cada plásmido recombinante seleccionado de acuerdo al criterio anterior fue digerido con las enzimas *Xho* I y *Not* I, y los fragmentos liberados fueron comparados en tamaño frente al DNAc de hGH-V, resolviéndolos por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, y como puede verse en la Figura 19, dichos fragmentos resultaron del tamaño esperado.

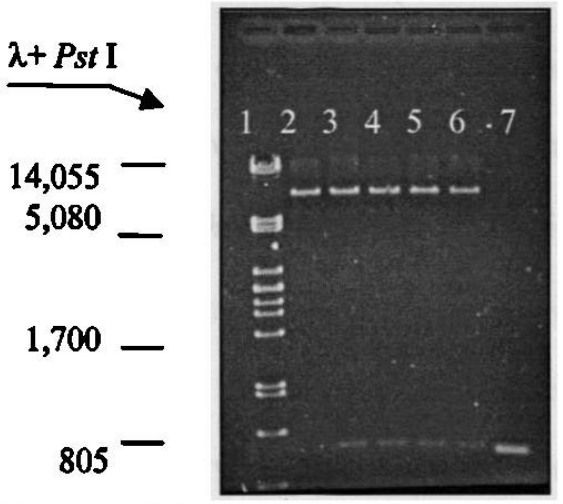


Figura 19. Estimación del tamaño de inserto en los recombinantes pPIC9hGH-V. Se muestran 5 plásmidos recombinantes (cariles 2 al 6) liberando un fragmento de igual tamaño al DNAc de hGH-V (carril 7) al digerir con las enzimas *Xho* I y *Eco* RI.

b) Demostración de la existencia de un sitio adicional *Bgl* II en los plásmidos recombinantes.

La ganancia de un sitio adicional *Bgl* II en los plásmidos recombinantes pPIC9hGH-V, se evidenció por digestión con dicha enzima. La electroforesis de los fragmentos (Figura 20) indicó la presencia de una banda adicional de 1612 pb en los vectores recombinantes. Este resultado confirmó la presencia del sitio *Bgl* II en el inserto.

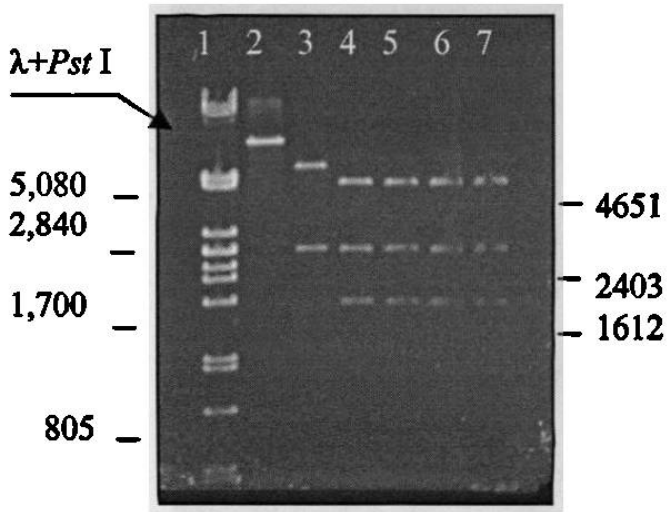


Figura 20. Demostración de la ganancia de un sitio *Bgl* II en los recombinantes pPIC9hGH-V. En el carril 3 se muestran las bandas de 5620 y 2403 pb generadas al digerir el plásmido pPIC9 con la enzima *Bgl* II, mientras que en los carriles 4 al 7 se muestran las bandas generadas por la digestión de los recombinantes pPIC9hGH-V con la misma enzima (4651, 2403 y 1612 pb). En el carril 2 se muestra el plásmido pPIC9 linearizado con la enzima *Sal* I. Los números a ambos lados del gel indican el tamaño en pares de bases (pb).

c) Caracterización de los vectores pPIC9hGH-V y pPIC9hGH22K con *Xba* I.

El vector recombinante pPIC9hGH-V es muy silimar a otro denominado pPIC9hGH-22K, elaborado por Escamilla en 1996, el cual se ha empleádo desde entonces en el laboratorio, de manera que se tomo la precaución de verificar que no contaminara la preparación de pPIC9hGH-V, previo a la transformación de *Pichia pastoris*. La diferencia entre ellos radica en los DNAc que portan. En el primer caso se trata de hGH-V y en el segundo de hGH-N, aunque ambos codifican para isoformas de 22kDa. A pesar de que también son muy similares en tamaño (pPIC9hGH-V tiene 8666 pb y pPIC9hGH22K, 8587 pb), éstos pudieron diferenciarse por su

patrón de digestión con la enzima *Xba* I, generando fragmentos de 7862 y 804 pb en el caso de pPIC9hGH-V y de 7212 y 1377 pb en el caso de pPIC9hGH22K (ver Figura 21).

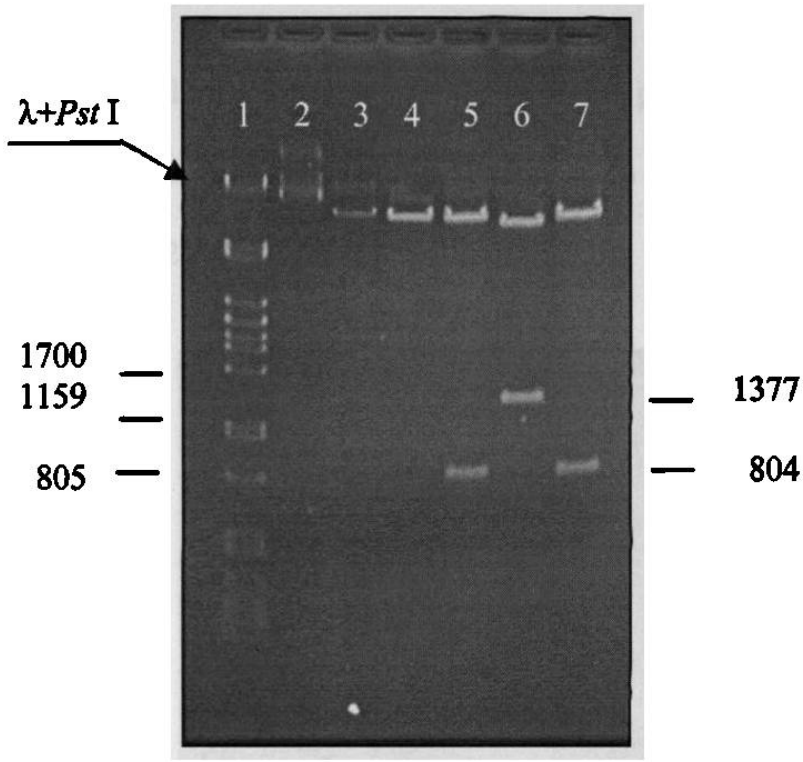


Figura 21. Diferenciación entre pPIC9hGH-V y pPIC9hGH22K con *Xba* I. En los carriles 5 y 7 se muestran los fragmentos de 7862 y 804 pb generados al digerir el vector pPIC9hGH-V con la enzima *Xba* I, y en el carril 6, los fragmentos de 7212 y 1377 generados por la digestión de pPIC9hGH22K con la misma enzima. La diferencia más clara se da entre los fragmentos liberados de 804 y 1377 pb, respectivamente. En los carriles 3 y 4 se muestra pPIC9 linearizado con *Sal* I, y en el carril 2 pPIC9 sin digerir.

4.5.3 Secuenciación del vector pPIC9hGH-V para verificar su integridad y la fase de lectura.

Se generó una secuencia de aproximadamente 1140 pb, la cual fue comparada contra el contenido no redundante de la base de datos del GenBank, dándo como resultado 189 secuencias, todas ellas correspondientes a secuencias codificadoras para hormonas del crecimiento de diversas especies. Posteriormente, un alineamiento local entre la secuencia reportada de hGH-V y la derivada del inserto contenido en el vector pPIC9hGH-V, demostró la integridad de la secuencia codificadora para HGH-V y su correcto marco de lectura.

4.6 Integración del vector pPIC9hGH-V al genoma de *Pichia pastoris* por recombinación homóloga y verificación de su integración por PCR.

4.6.1 Preparación del DNA para transfección.

Para transfectar las levaduras, el vector pPIC9hGH-V fue previamente linearizado con la enzima *Sac* I. Dicha linearización se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, como se puede apreciar en la Figura 22.

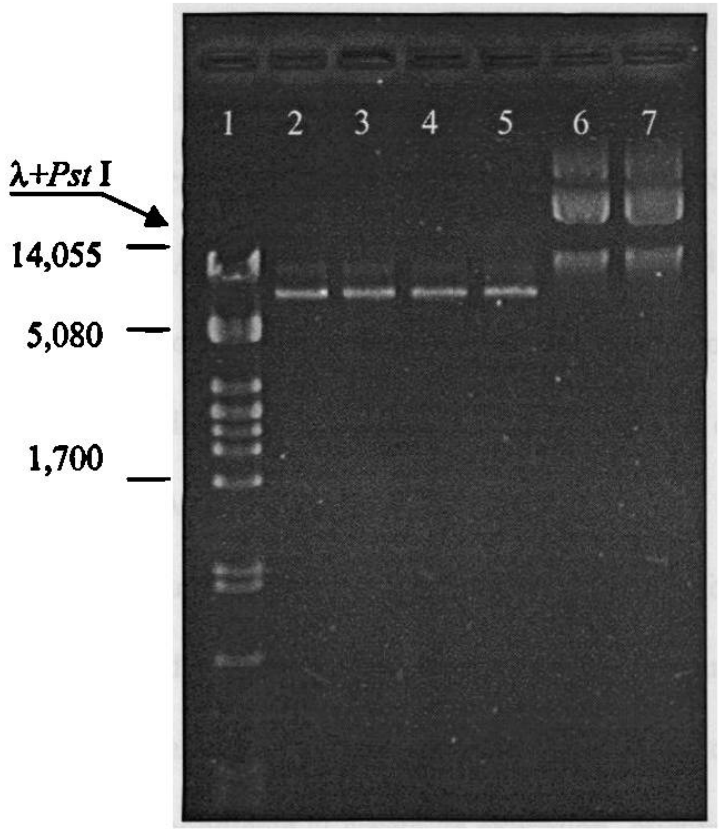


Figura 22. Linearización del vector pPIC9hGH-V con *Sac* I. En los carriles 2 al 5 se muestran alícuotas de la reacción de digestión del vector con *Sac* I (~100 ng). En los carriles 6 y 7 se observa la migración del mismo vector sin digerir.

4.6.2 Transfección y selección de recombinantes.

Se prepararon levaduras Li^+-competentes, y después se llevó a cabo la transfección de las mismas con 10 μg de DNA del vector, como se describió en las secciones 3.2.6.2 y 3.2.6.3. Se utilizó agar RDB para plaquear y seleccionar a las levaduras transfectadas por su capacidad para

sintetizar histidina (propiedad conferida por el vector de expresión que les permite crecer en un medio carente de este aminoácido, como el RDB). Se obtuvieron de 3-5 colonias por placa de agar RDB y fue necesario realizar tres procesos de transfección para reunir un grupo de 12 colonias que posteriormente fueron sometidas a tamizaje por PCR para determinar la presencia del casette de expresión.

4.6.3 Análisis por PCR de las levaduras transfectadas.

Se extrajo DNA genómico de 12 clonas transfectadas con el vector pPIC9hGH-V, asi como de la cepa sin transfectar, por la técnica denominada TSNT (Sección 3.2.6.4). Se obtuvieron hasta 2.5 mg de DNA genómico a partir de un cultivo de 24 horas de 2 mL de YPD.

Para evaluar la calidad del DNA se llevó a cabo una electroforesis en agarosa al 0.8% (Figura 23) y se determinó la relación de absorbancia a 260/280 nm, la cual fue de 2.044. Ambos resultados indicaron que el DNA era de buena calidad.

Se demostró la presencia del casete de expresión en 9 de 12 clonas seleccionadas por su capacidad para crecer en el medio selectivo RD, mediante PCR utilizándo los primers *AOX1* Al amplificar los DNAs genómicos con los primers *AOX1* se observó una banda de aproximadamente 1 kpb correspondiente al casete de expresión, mientras que la banda de 2 kpb correspondiente a la amplificación del gen nativo se observó claramente en la cepa sin transfectar y muy sutilmente en las cepas transfectadas (Figura 24).

Como controles durante la PCR, se utilizó DNA genómico de *Pichia pastoris* sin transfectar (negativo) y DNA plasmídico de pPIC9hGH-V (positivo).

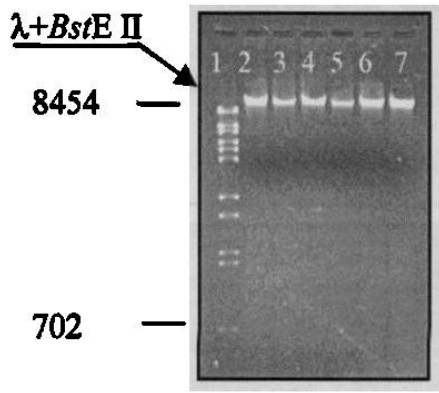


Figura 23. DNA genómico de *Pichia pastoris*. Electroforésis en gel de agarosa al 0.8% de DNA genómico de cepas GS115 de *Pichia pastoris* transfectada con el vector pPIC9hGH-V.

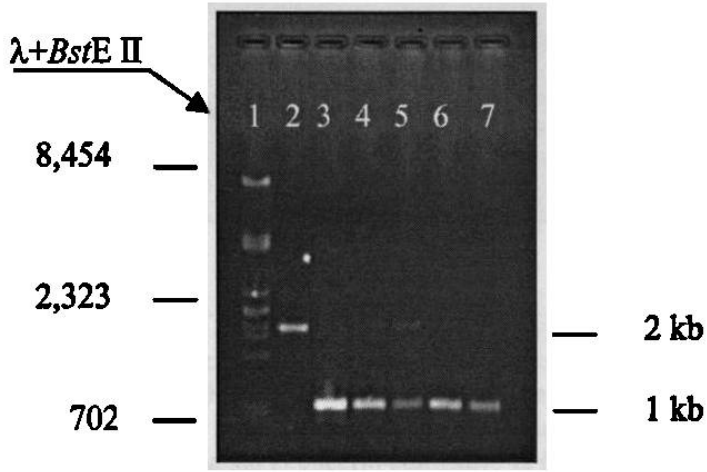


Figura 24. Análisis por PCR de las cepas transfectadas. En el carril 2 se muestra un fragmento de ~ 2 kpb correspondiente al gen nativo *AOX1* de la levadura, y en el carril 3 el fragmento de ~1 kpb correspondiente al cassette de expresión derivado del plásmido pPIC9hGH-V. Los carriles del 4 al 7 corresponden a los productos amplificados derivados de 4 cepas recombinantes transfectadas con el vector en donde se demuestra la presencia del cassette de expresión.

4.7 Producción de la HGH-V recombinante en cultivo de levaduras.

4.7.1 Cinéticas de crecimiento con glicerol y metanol como única fuente de carbono.

Dos clonas de *Pichia pastoris* portadoras del DNAc de hGH-V (GS115HGH-V22K), seleccionadas al azar, fueron crecidas con glicerol (1%) como única fuente de carbono, y con metanol (1%). No se observaron diferencias en la proliferación celular entre las dos cepas (medida en términos del incremento de la D.O. $_{600\ nm}$), ni entre éstas y la GS115HGH-22K

(productora de HGH-N) empleada como control. Sin embargo, como ya se ha descrito, la proliferación celular es favorecida cuando el glicerol constituye la fuente de carbono (Figura 25).

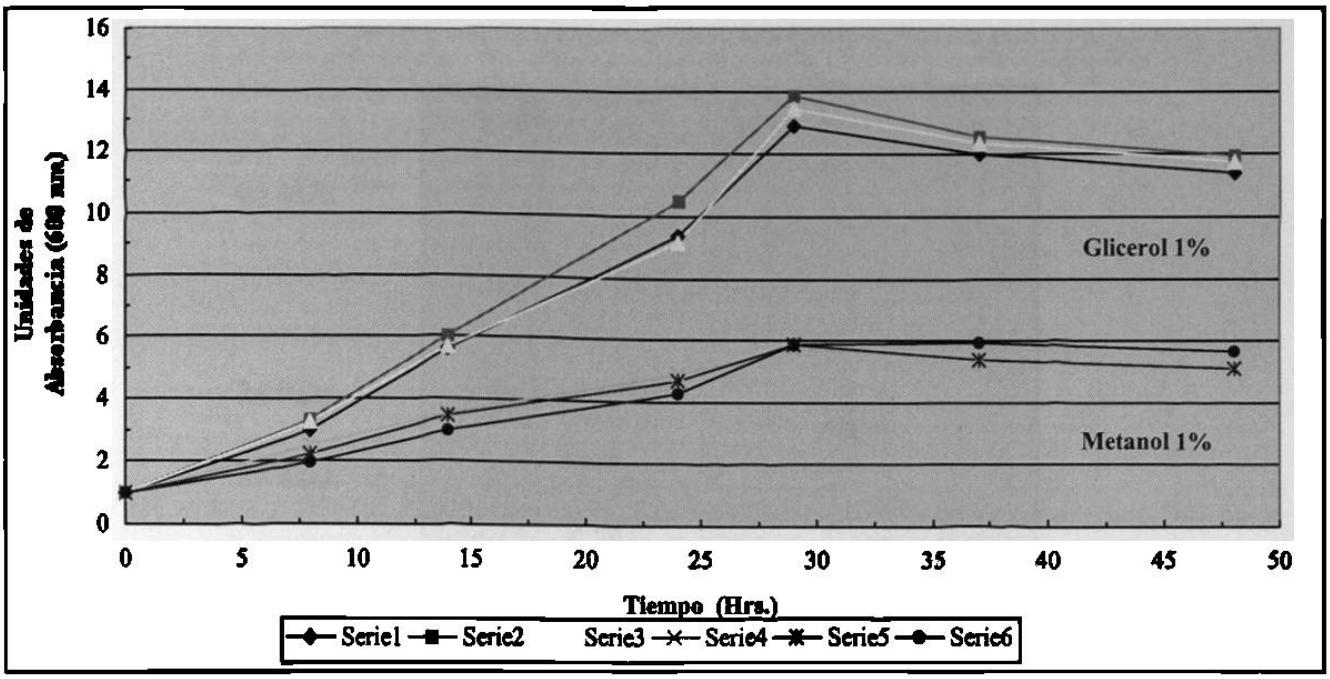


Figura 25. Cinéticas de crecimiento con glicerol o metanol como fuente de carbono. Las cepas de *Pichia pastoris* productoras de HGH-N y HGH-V muestran cinéticas de crecimiento similares en ambos casos. Sin embargo, la proliferacion celular es más alta cuando el glicerol constituye la fuente única de carbono.

Serie 1 Control	**Serie 3** Cepa V-3	**Serie 5**Cepa V-2
Serie 2 Cepa V-2	**Serie 4** Control	**Serie 6** Cepa V-3

La cepa control utilizada es la GS115HGH-22K, productora de la isoforma de 22kDa de HGH-N.

4.7.2 Inducción de la expresión con 1% de metanol.

Las 9 cepas de *Pichia pastoris* portadoras del DNAc de HGH-V fueron sometidas a ensayos de expresión, como se describe en la sección 3.2.7.2. En la Figura 26 se muestra la producción de HGH-V por parte de dos de las cepas construídas (carriles 2 y 3). Se puede observar una banda de aproximadamente 22 kDa que no está presente en el carril correspondiente

a la cepa sin inducir. Las dos cepas ensayadas bajo las mismas condiciones de cultivo (BMMY, pH 7.0, metanol 1% por 96 horas) tuvieron niveles de expresión diferentes, pero ninguna de las cepas productoras de HGH-V alcanzaron los niveles de producción de HGH-N.

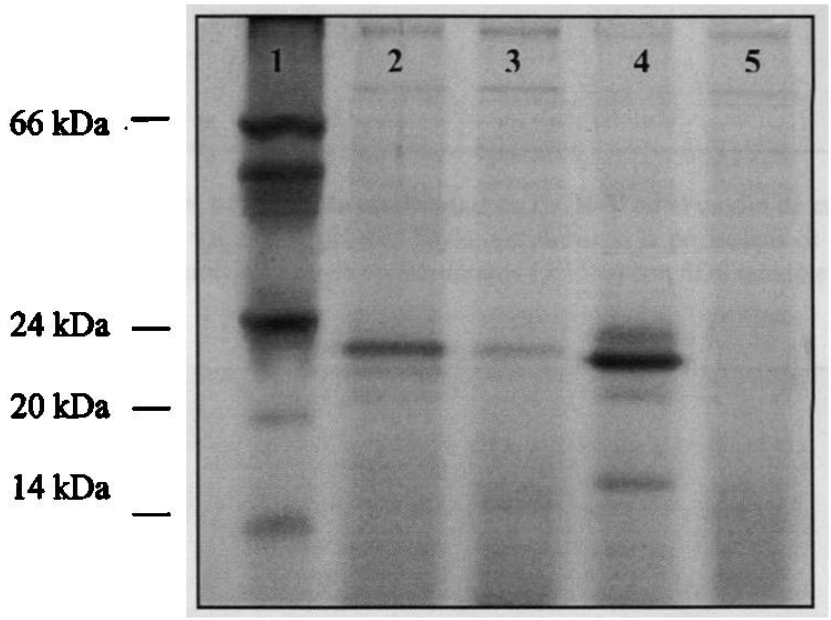


Figura 26. Producción de HGH-Vr en *Pichia pastoris*. Se muestra la producción por parte de dos de las cepas construídas, en los carriles 2 y 3, y la producción de HGH-N bajo las mismas condiciones de cultivo en el carril 4. El carril 5 corresponde al control negativo (inducción con glicerol 1% v/v).SDS-PAGE (5/15 %) teñido con Azúl de Coomasie.

Adicionalmente se realizaron ensayos de expresión a pH 4, 5, 6, 7 y 8, y como puede observarse en la Figura 27, los mejores resultados se obtuvieron a pH 8. Sin embargo, la proteólisis de la hormona es muy acentuada, por lo cual en adelante se trabajó a pH 7. Un ensayo similar se llevó a cabo con la cepa productora de HGH-N, y como puede observarse en la Figura 28, ésta última es aún más susceptible a degradación que la HGH-V, a pH 8.

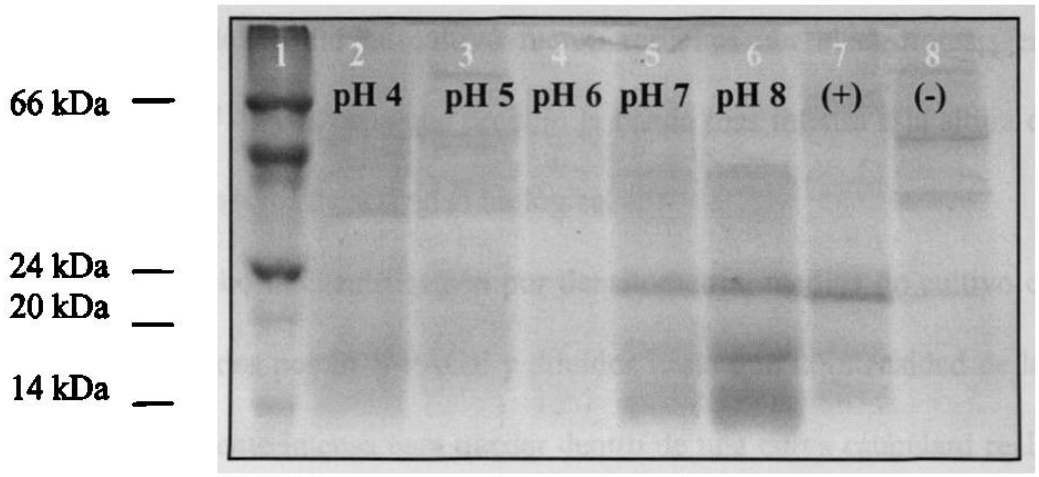


Figura 27. Evaluación del efecto del pH sobre la estabilidad de HGH-V en el medio de cultivo. Se observa que a pH 8 la producción es mayor que a valores de pH más bajos, sin embargo la proteólisis es evidente. El control (+) corresponde a HGH-N. El gel corresponde a uno de poliacrilamida (5/15%) con SDS teñido con Azúl de Coomasie.

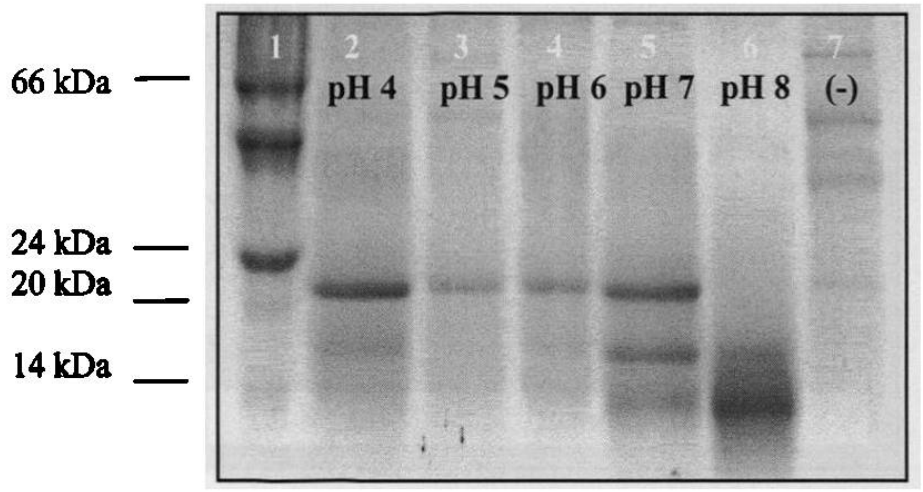


Figura 28. Evaluación del efecto del pH sobre la estabilidad de HGH-N en el medio de cultivo. Se observa que a valores de pH 6 la proteólisis es evidente, especialmente a pH 8. El gel corresponde a uno de poliacrilamida (5/15%) con SDS teñido con Azúl de Coomasie.

4.7.3 Cuantificación de la HGH-V producida en *Pichia pastoris*.

Se indujo la expresión de HGH-V por parte de las cepas construídas en BMMY, a pH 7, durante 96 horas por adición de metanol (1%, v/v). Los medios de cultivo libres de células fueron dializados como se describe en la sección 3.2.7.3 y las proteínas totales se cuantificaron por el método de Bradford. El valor de las proteínas totales en el medio de cultivo varió de 35 – 40 mg/L entre las 8 cepas productoras de HGH-V.

Las proteínas del medio de cultivo fueron resueltas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (3.2.7.4) y la cepa que produjo la banda más intensa a la altura de 22 kDa fue seleccionada para los ensayos de actividad biológica.

Para llevar a cabo la cuantificación por densitometría, medios de cultivo con HGH-N ó HGH-V fueron analizados por SDS-PAGE y diluídos hasta que la intensidad de la banda de 22 kDa fue lo suficientemente intensa para quedar dentro de una curva estándard realizada con una formulación comercial de HGH-N ($R^2 = 0.9872$, ver Figura 29).

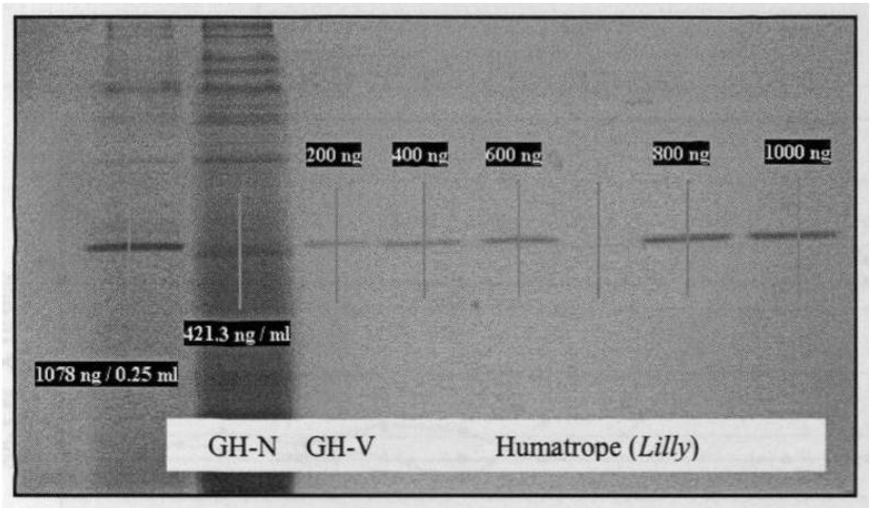


Figura 29. Cuantificación por densitometría. Se muestran los resultados de la cuantificación por densitometría de las hormonas HGH-N y V producidas en *Pichia pastoris*. La curva estándar se preparó con HGH-N comercial (Humatrope, *Lilly*), y el análisis de la imagen se llevó a cabo con el programa *Molecular Analist* (Biorad).

Bajo las condiciones anteriormente descritas, se obtuvo una producción máxima de 4.3 mg/l para HGH-N y de 0.42 mg/l para HGH-V, es decir, aproximadamente 10 veces menos para esta última empleándo el mismo sistema de expresión. En cuanto a la pureza, expresada en términos del porcentaje correspondiente a la banda de 22 kDa, respecto del total de las proteínas resueltas por SDS-PAGE, fue del 35 % para HGH-N (pH=7) y de 16.8 al 23.5 % para HGH-V (pH= 7) .

4.8 Evaluación de la actividad lactogénica de HGHVr en cultivo de células Nb2.

4.8.1 Determinación de la curva de proliferación de células Nb2 con HGH (*Humatrope, Eli Lilly & Co.*).

Se ensayaron diluciones logarítmicas seriadas desde 10^{3} hasta 10^{-8} ng/ml de HGH (*Humatrope)* en PBS (0.01M) pH 7.4, y en la Figura 30 se puede apreciar que bajo las condiciones del ensayo, la respuesta de proliferación de las células Nb2 a la inducción con HGH se aprecia desde 10^{-1} ng/ml. Este último valor se estableció como el mínimo requerido para obtener una respuesta medible de proliferación celular.

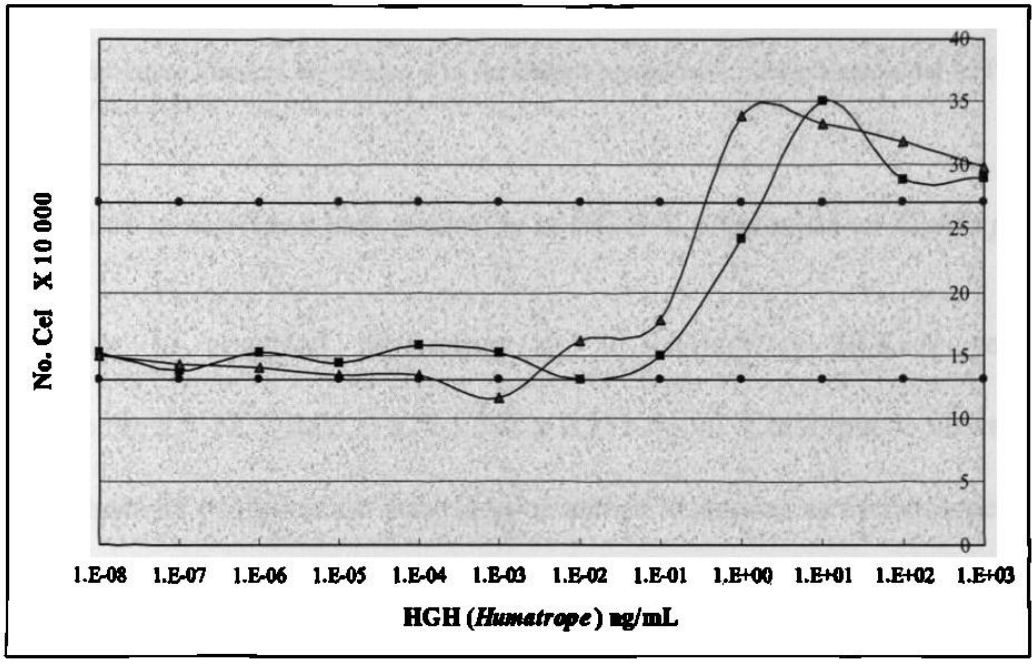


Figura 30. Curva de proliferación celular por inducción con HGH (*Humatrope*). Se muestran los resultados de dos determinaciones independientes. La escala de la derecha representa el número de células/ml X 10^{4}. Las líneas rectas superior e inferior corresponden a los controles positivo y negativo, respectivamente.

4.8.2 Medición de la proliferación de células Nb2 por reducción del MTT.

Se estandarizó el ensayo de reducción del MTT para medir la proliferación, diluyendo 1:2 de forma seriada una población celular de densidad conocida (600, 000 células/ml). La absorbancia del formazán, medida a 570 nm, se graficó contra el número de células (Figura 31).

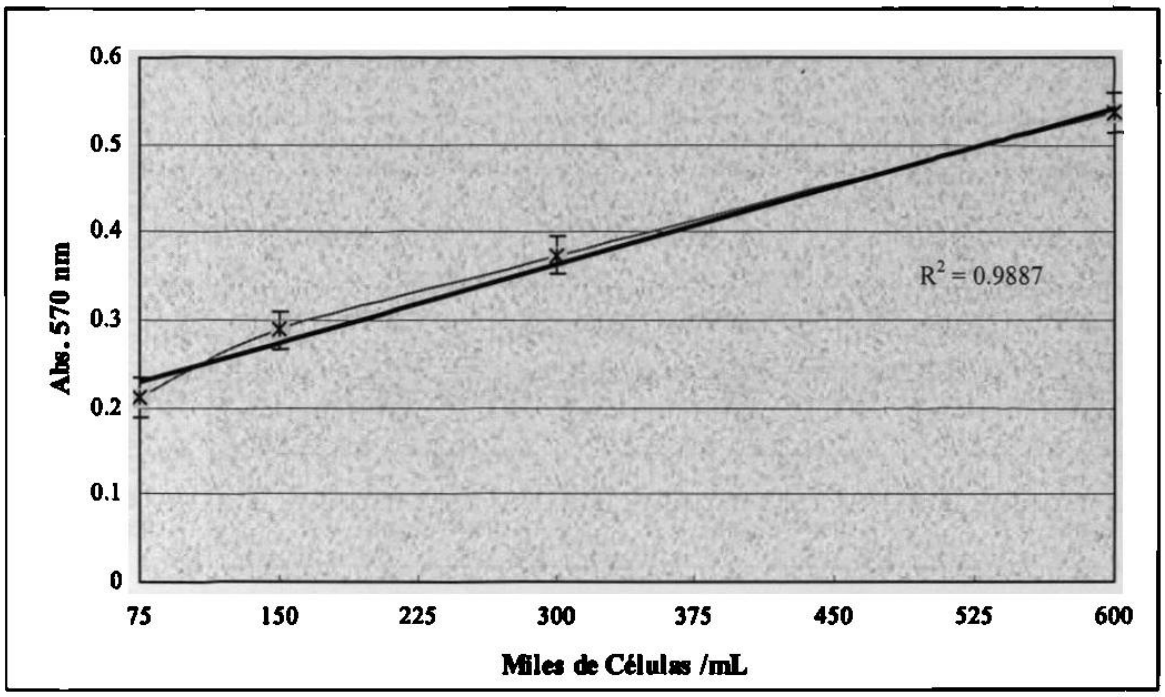


Figura 31. Correlación entre número de células y el formazán producido por reducción del MTT. Se muestra el promedio de 2 ensayos ± 3 DS.

4.8.3 Evaluación de la actividad lactogénica de la HGH-V producida en *Pichia pastoris.*

Para evaluar la actividad lactogénica de la HGH-V y HGH-N se utilizaron concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125,1.562 y 0.781 ng/ml. Como puede observarse en la Figura 32, la respuesta de proliferación inducida por ambas hormonas es evidentemente mayor a la del control negativo, lo cual indica que éstas son biológicamente activas en el presente modelo. En ambos casos, la proliferación celular inducida por las hormonas recombinantes producidas en *Pichia pastoris* es inferior a la inducida por la HGH estándar (*Humatrope*) a las mismas concentraciones.

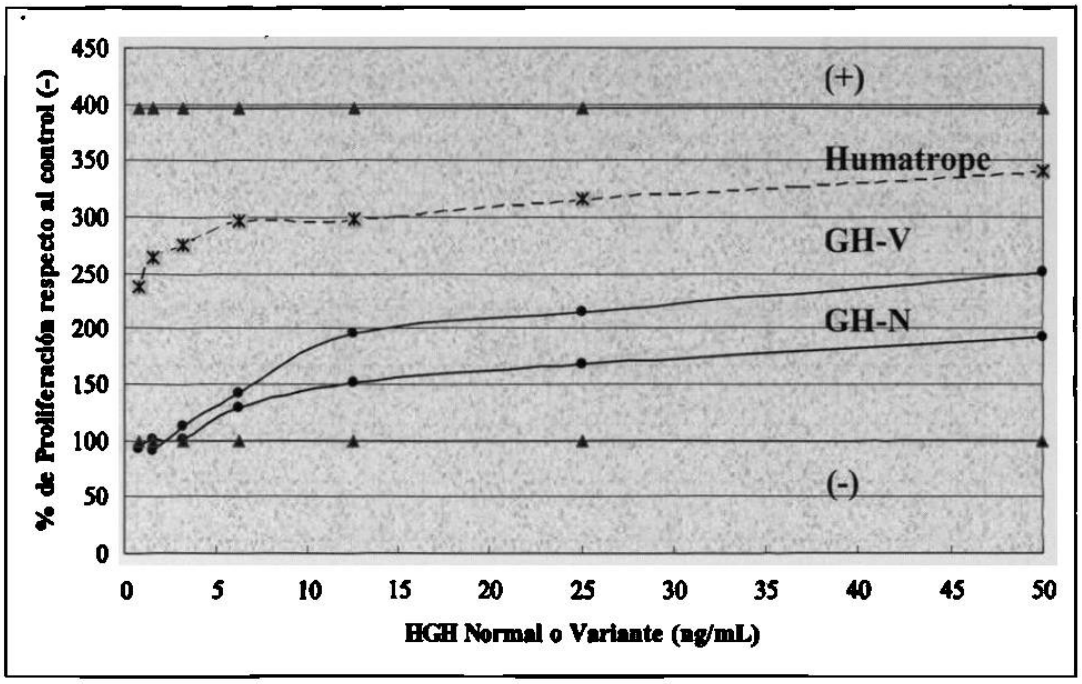


Figura 32. Evaluación de la actividad lactogénica de hGH-V. Se muestra la proliferación inducida a 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125,1.562 y 0.781 ng/mL de HGH-N, V y *Humatrope*.

En la Figura 32 también puede observarse que la proliferación inducida por HGH-V es mayor a la inducida por HGH-N. Para verificar dicha observación, se realizó una curva de proliferación celular con 100, 10, 1 y 0.1 ng/ml de HGH-N, HGH-V y *Humatrope*. Como puede observarse en la Figura 33, a las concentraciones anteriormente ensayadas (50 ng/ml), la HGH-V induce una proliferación más alta que HGH-N. La curva obtenida con HGH-N muestra una pendiente similar a la de *Humatrope*, mientras que la pendiente de la curva obtenida con HGH-V es claramente inferior. Estas diferencias, previamente reportadas, se han atribuído a la diferente afinidad de ambas hormonas por el receptor de la prolactina (*Mac Leon y cols.*,1990).

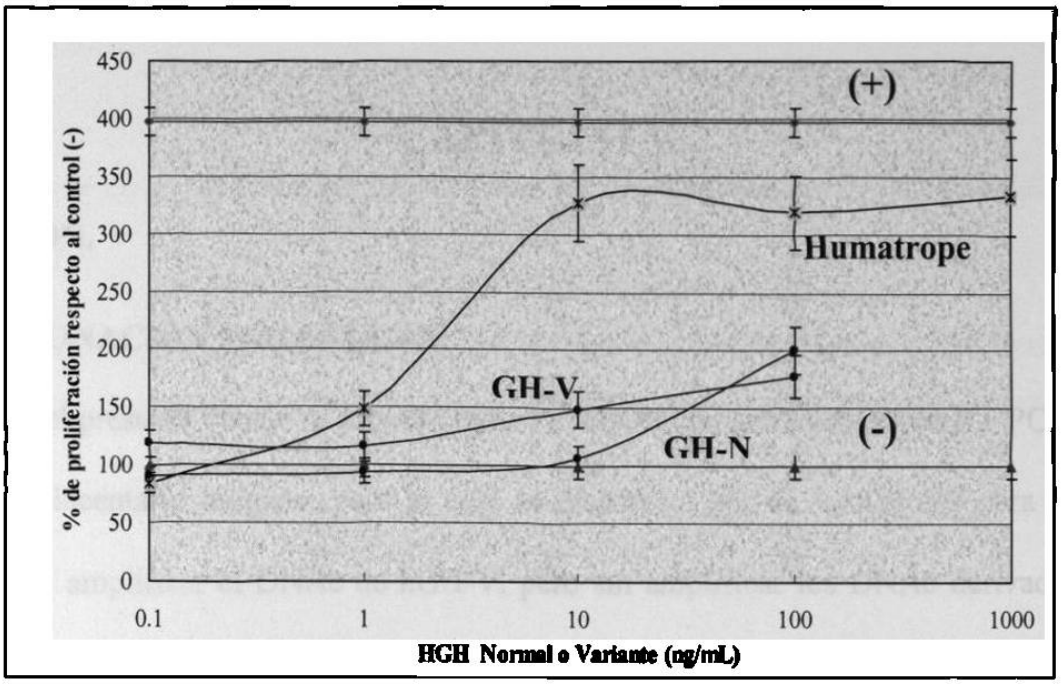


Figura 33. Curva de proliferación de HGH-N, HGH-V y *Humatrope*. Se muestra la media de dos determinaciones simultáneas ± DS.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN.

5.1 CLONACIÓN MOLECULAR.

En el presente trabajo se propuso clonar el DNAc del gen hGH-V por RT-PCR a partir de tejido placentario humano, para lo cual se diseñó un par de iniciadores para PCR que permitieran amplificar el DNAc de hGH-V, pero sin amplificar los DNAc derivados de los genes que codifican para lactógenos placentarios (hPLs), cuyos niveles de expresión en la placenta a término llegan a ser de diez a mil veces más altos que los de hGH-V (Chen *y cols.*, 1988).

Para lograrlo, se realizó un alineamiento de los DNAc de hGH-V y los hPLs y se eligió una zona de mínima similitud hacia la región 3' no traducible. La elección de la zona para situar el primer sentido, hacia la región 5', estuvo limitada a la región del codón que codifica para el primer aminoácido en la proteína madura, y como puede verse en la sección de resultados, los inciadores diseñados presentaron la especificidad requerida para amplificar únicamente el DNAc de hGH-V, como fue confirmado al digerir el producto amplificado con la enzima *Bgl* II (presente en todos los transcritos de hGH-V y ausente en los hPL).

Sin embargo, los primers v3 y v5 no discriminan entre los cuatro transcritos derivados de hGH-V y, teóricamente (*Amplify* 2.53β) se amplificarían fragmentos de 649 pb (hGH-V1), 905 pb (hGH-V2), 648 pb (hGH-V3) y 604 pb (hGH-V4), y considerando que partimos de RNA total de placenta humana, cabría esperar que estuvieran representados todos los transcritos de hGH-V.

El DNAc de la clona # 24 subclonado en pPIC9 fue identificado, por secuenciación en ambas cadenas, como el correspondiente al transcrito 1 de hGH-V.

La presencia de los transcritos V2 y V4 fue descartada debido a que no se liberaron productos de 905 ó 604 pb respectivamente, de las clonas obtenidas por digestión con *Xho* I y *Eco* RI. Como la diferencia de 4 pb entre el los transcritos V1 y V3 no puede ser apreciada durante la migración electroforética, ni evidenciada por digestión enzimática, y dado que solo se secuenció una de las 14 clonas obtenidas, existe la posibilidad de encontrar clonado en alguna de ellas el transcrito V3.

Durante el diseño de los primers, se introdujeron los sitios de restricción *Xho* I y *Eco* RI con la intención de clonar directamente el producto amplificado en el vector pPIC9, sin embargo se presentaron algunas inconsistencias en el corte de dicho vector con la enzima *Eco* RI, de manera que se optó por clonar el producto amplificado en el vector pBS II KS (+) y posteriormente llevar a cabo una subclonación en pPIC9, aprovechando la compatibilidad entre los sitios de restricción de ambos vectores.

5.2 PRODUCCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE.

En el presente trabajo se reportan niveles de producción de hasta 0.42 mg/l para HGH-V y 4.3 mg/l para HGH-N, una diferencia de 10 veces, empleándo el mismo sistema de expresión y bajo las mismas condiciones de cultivo. La variación de los niveles de producción de HGH-V entre las ocho cepas analizadas fue de 0.33 – 0.42 mg/l, mientras que la pureza varió de 16.8 - 23.5 %. Esta diferencia entre clonas que expresan la misma proteína (variación clonal), parece ser inherente al proceso de recombinación que se lleva a cabo en cada una de

ellas, que aunque es un evento dirigido al locus *AOX* 1, el sitio preciso donde se lleva a cabo no puede ser controlado.

Por otra parte, reportes previos estiman que la producción de HGH-N llega a ser de hasta 12 mg/l; sin embargo en el presente trabajo se alcanzaron niveles máximos de 4.3 mg/l. Una de las posibles explicaciones a dicha variación reside en la metodología empleada para cuantificar la proteína. En el presente trabajo, las proteínas totales del medio de cultivo dializado se resolvieron por SDS-PAGE y la proteína de 22 kDa fue cuantificada por densitometría empleándo HGH estándard (*Humatrope*) y BSA para trazar una curva de calibración (R^2 = 0.9872). De esta manera se elimina la interferencia de la peptona del medio de cultivo que provoca una sobreestimación de la producción cuando el valor de las proteínas totales se emplea para estimar la producción de HGH en términos de la pureza.

La diferente susceptibilidad a degradación que parecen presentar ambas hormonas en el medio de cultivo puede deberse a las diferencias fisico-químicas de ambas estructuras y de como ésta es afectada por el pH del medio. La HGH-N tiene un punto isoeléctrico teórico estimado de 5.1 y la HGH-V de 8.2 (*Mac Vector* 6.5.3).

5.3 ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA HGH-Vr.

Actualmente se dispone de diversas metodologías útiles para evaluar la actividad biológica de hormonas del crecimiento y péptidos estructuralmente relacionados. En primer lugar, la actividad puede medirse frente al receptor de la GH (actividad somatogénica) o frente al receptor de la prolactina (actividad lactogénica). Así mismo, la fuente del receptor

puede ser de la misma especie o bien de especies que se encuentran mas abajo en la escala evolutiva.

En los ensayos de unión al receptor, se mide la cantidad de la GH de interés necesaria para desplazar de los receptores el 50% de GH estandard generalmente marcada con I^{125}. Este tipo de ensayos tiene la ventaja de poder emplear homogenados de tejido de la misma especie como fuente de receptores, pero su limitante radica en el hecho de que la unión al receptor, aunque es un evento determinante de la actividad biológica, no siempre es una condición suficiente; por ejemplo, la HGH debe inducir la dimerización de receptores en las células blanco para iniciar la señalización intracelular a través de la activación de una tirocinacinasa por los dominios intracelulares.

Una variante de estos ensayos emplea células completas que expresan los receptores en la membrana, teniéndo la ventaja de medir una respuesta fisiológica que garantiza no solo la unión al receptor, sino la activación de la cascada de señalización intracelular mediada por la hormona de interés. Sin embargo, la disponibilidad de líneas celulares que expresen el receptor deseado es limitada.

En el presente estudio se utilizó la línea celular Nb2, derivada de linfoma de rata, para demostrar la actividad lactogénica de la HGH-V producida en *Pichia pastoris*. Estudios previos que documentan la actividad lactogénica de la HGH-V en este mismo modelo se han llevado a cabo transfectando el gen hGH-V en células GC (*Nickel y cols.*,1989) ó en C127 (*MacLeod y cols.*, 1990), y evaluando la actividad lactogénica de la hormona secretada al medio de cultivo. Cabe mencionar que en los ensayos de transfección se producen todas las isoformas fisiológicamente posibles derivadas del transcrito primario, y la respuesta medida es el resultado del sinergismo de todas las variantes frente al receptor en cuestión. En nuestro caso, demostramos la actividad lactogénica de solo la isoforma de 22 kDa de HGH-V.

En la Figura 33 puede observarse que la proliferación de las células Nb2 es dosis dependiente de 1 – 100 ng/ml de HGH-V. Dosis más altas que permitieran calcular la cantidad de hormona necesaria para alcanzar la mitad de la respuesta máxima (EC_{50}), no pudieron ser ensayadas debido a limitaciones propias del sistema de expresión (420 ng/ml). Sin embargo, una vez que se ha demostrado que ésta es biologicamente activa, su producción en volúmenes de fermentación mayores al aquí utilizado (10 ml), y su purificación a partir del medio de cultivo, permitirán disponer de mayor cantidad de la hormona para determinar dicho parámetro.

También en la Figura 33 pude apreciarse que las pendientes de proliferación inducidas por HGH-N y HGH-V son evidentemente diferentes. HGH-V induce una respuesta de proliferación más plana que HGH-N. Esto último puede explicarse por la menor afinidad de la HGH-V por el receptor de la prolactina.

Otros modelos celulares para medir la actividad somatogénica, como la línea celular Ba/F3-hGHR, que expresa en la membrana el receptor de la GH humana (*Ishikawa y cols.*, 2000) o el modelo de adipogénesis de fibroblastos 3T3F442A, no se encuentran disponibles o se encuentran en proceso de estandarización en nuestro laboratorio.

CAPÍTULO VI

6.1 CONCLUSIONES.

6.1.1 Las diferencias de expresión entre las cepas construídas productoras de HGH-V pueden deberse a la variación clonal, previamente descrita.

6.1.2 La producción 10 veces menor de HGH-V por parte de las cepas construídas respecto a la cepa productora de HGH-N, puede explicarse en parte por el hecho de que esta última es multicopia para el cassette de expresión.

6.1.3 Las isoformas de 22 kDa de HGH-N y HGH-V producidas en *Pichia pastoris* muestran diferente grado de susceptibilidad a proteólisis en el medio de cultivo. Uno de los factores asociados a dicho evento es el pH.

6.1.4 Tanto la HGH-V producida en *Pichia pastoris* como la HGH-N son biológicamente activas frente al receptor de la prolactina de rata.

6.2 APORTACIONES.

6.2.1 Se diseñó un par de iniciadores (v3 y v5) que permitieron amplificar selectivamente la secuencia codificante de hGH-V correspondiente a la proteína madura.

6.2.2 Se construyó el vector pBSIIKS(+)hGH-V que contiene la secuencia codificante para HGH-V clonada por vector T, en ambas orientaciones.

6.2.3 Se construyó el vector de expresión pPIC9hGH-V22kDa portador de la secuencia codificante para HGH-V (verificada por secuenciación en ambas cadenas).

6.2.4 Se construyó la cepa de GS115 *Pichia pastoris* productora de HGH-V: GS115HGH-V22kDa.

6.2.5 Se estandarizó la metodología para evaluar la actividad lactogénica de hormonas del crecimiento en células Nb2.

CAPITULO VII

7. ANEXOS.

ANEXO 1 Ejemplos que documentan la expresión exitosa de proteínas en *Pichia pastoris.*

ANEXO 2. Mapa gráfico de pPIC9.

ANEXO 3. Mapa de sitios de restricción de pBShGH-V1.

ANEXO 4. Mapa de sitios de restricción de pPIC9hGH-V1.

ANEXO 5. Caracterización enzimática de pPIC9hGH-V1.

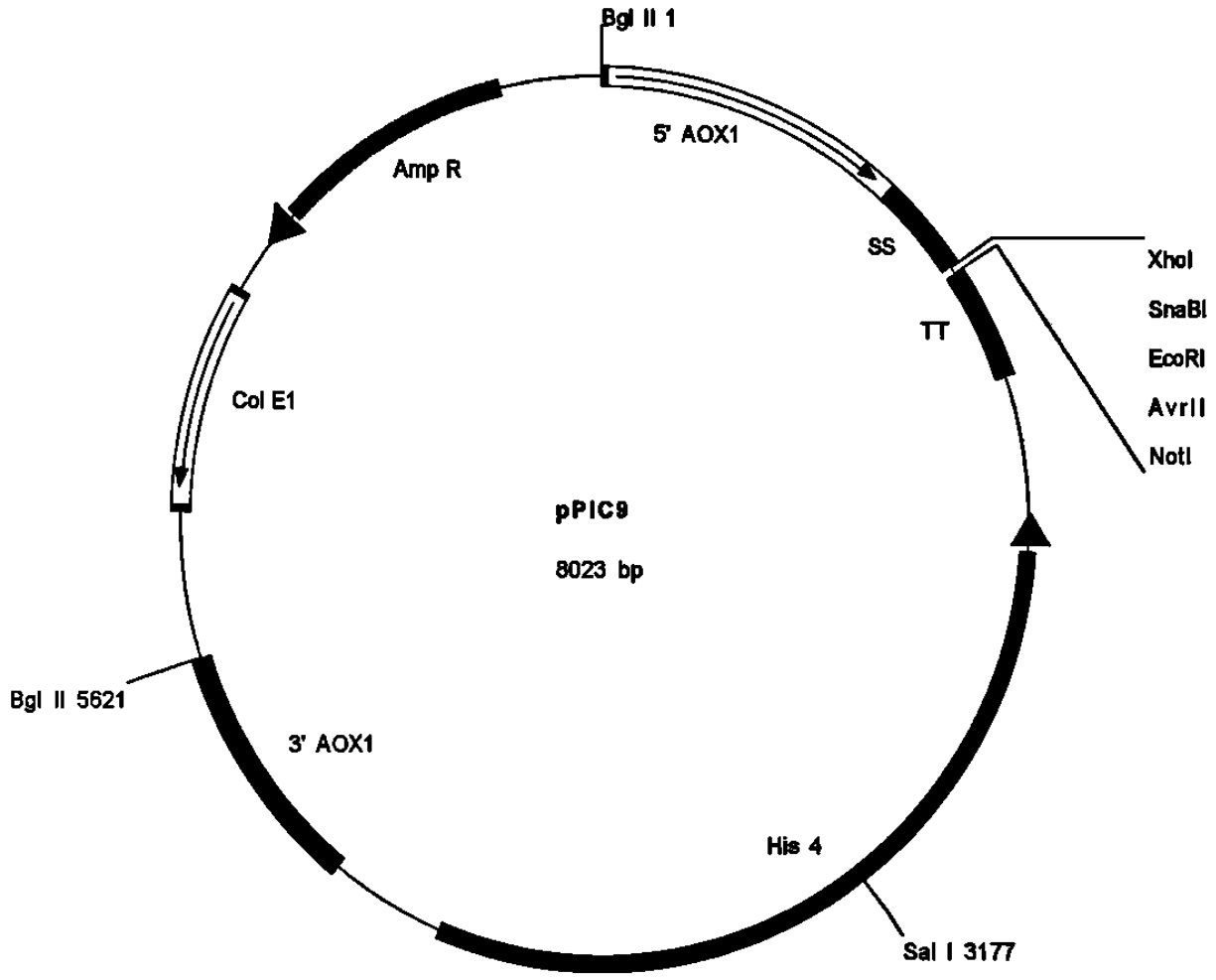
ANEXO 1

Ejemplos que documentan la expresión exitosa de proteínas en *Pichia pastoris.*

PROTEÍNA	Niveles de Expresión (g/l)	Forma de Expresión en el sistema	Referencia
ENZIMAS			
Invertasa	2.3	Secretada	Tschopp *y cols.*, 1987
Lisozima bovina c2	0.55	Secretada	Digan *y cols.*, 1989
Streptocinasa activa	0.08	Intracelular	Hagenson *y cols.*,1989
α-amilasa	2.5	Secretada	Paifer *y cols.*, 1994
Pectatoliasa	0.004	Secretada	Guo *y cols.*, 1995
Fosforibulocinasa	0.1	Intracelular	Brandes *y cols.*, 1996
ANTÍGENOS			
Ag Pertussis P69	3.0	Intracelular	Romanos *y cols.*, 1991
Toxina tetánica FC	12.0	Intracelular	Clare *y cols.*, 1991
HIV-1 gp120	1.25	Intracelular	Scorer *y cols.*, 1993
PROTEÍNAS REGULADORAS			
TNF	10.0	Intracelular	Sreekrishna *y cols*,1989
EGF de ratón	0.45	Secretada	Clare *y cols.*, 1991
IFN α2b humano	0.4	Intracelular	Garcia *y cols.*, 1995
PROTEÍNAS DE MEMBRANA			
CD38 humana soluble	0.05	Secretada	Fryxell *y cols.*, 1995
Receptor de serotonina de ratón	0.001	Secretada	Weiss *y cols.*, 1995

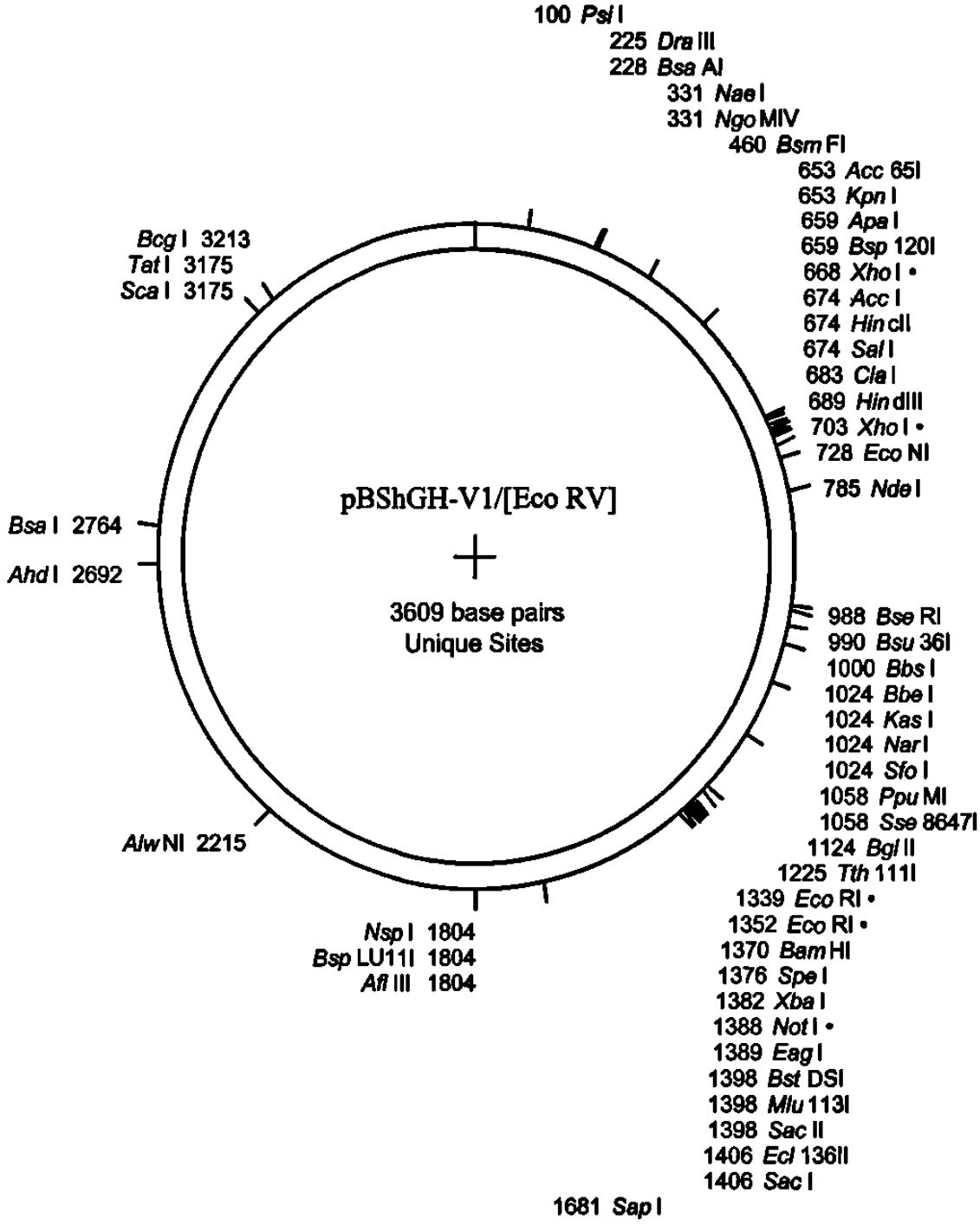
ANEXO 2

Mapa gráfico de pPIC9



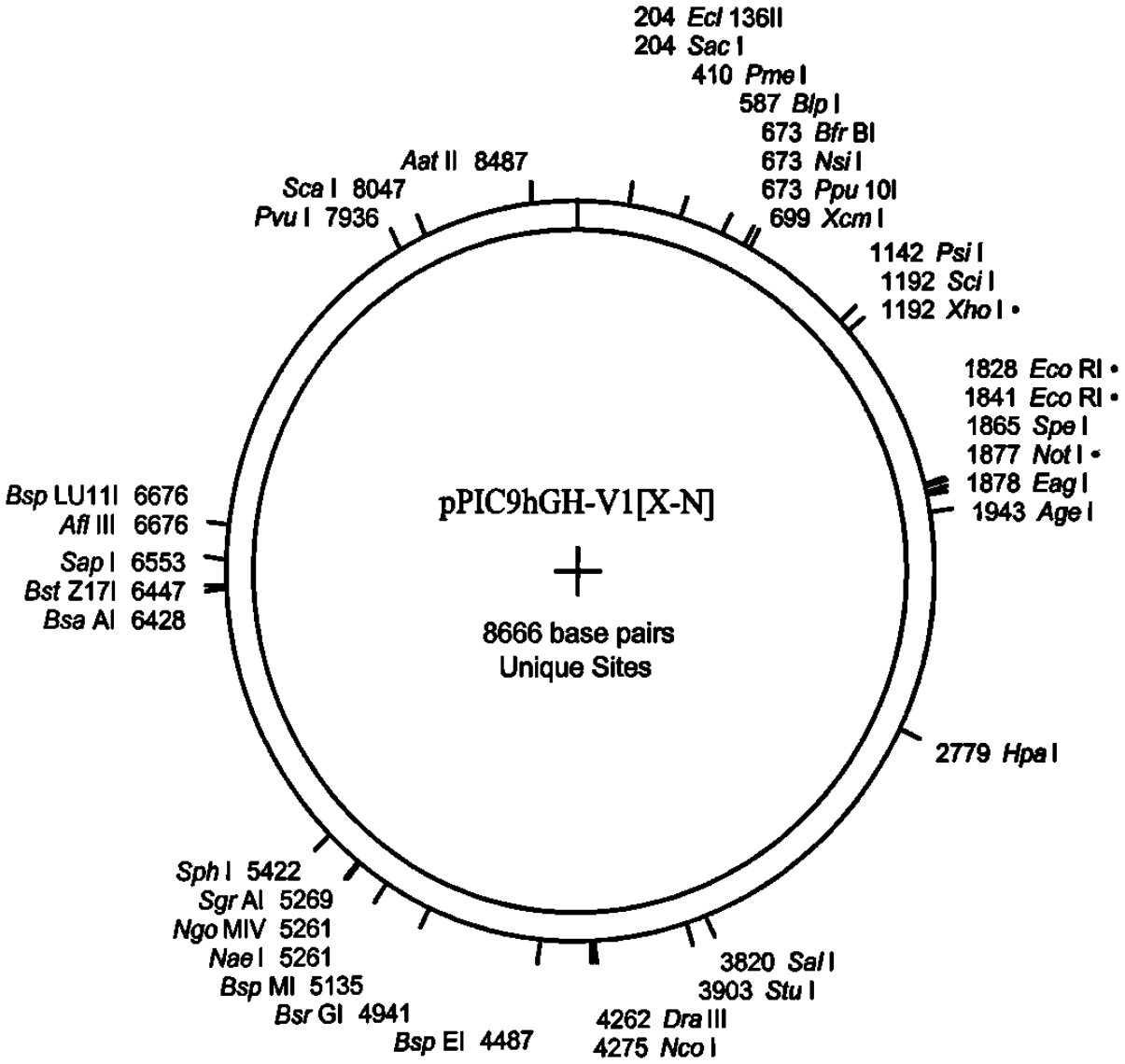
ANEXO 3

Mapa de sitios de restricción de pBShGH-V1

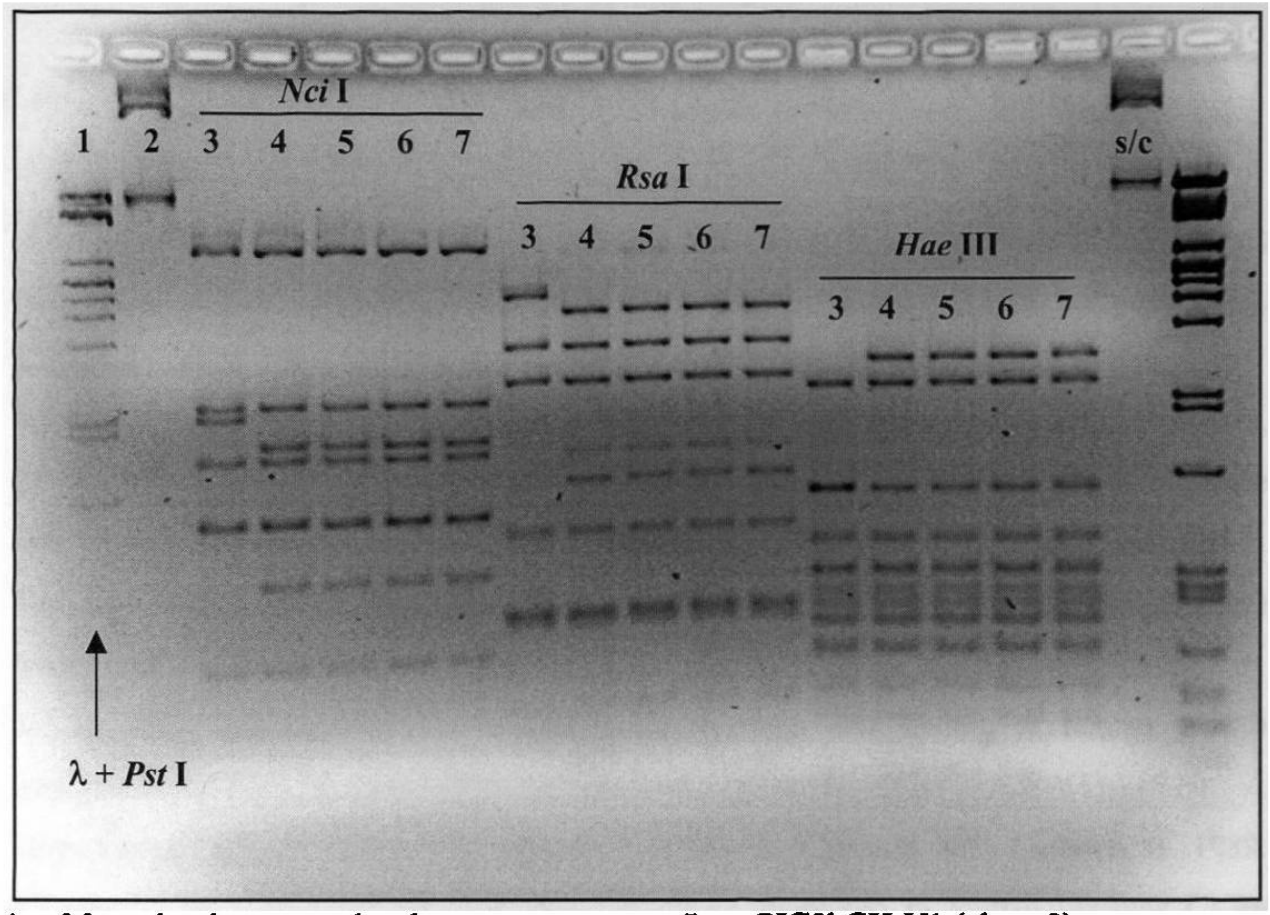


ANEXO 4

Mapa de sitios de restricción de pPIC9hGH-V1



ANEXO 5
Caracterización enzimática de pPIC9hGH-V1



1. Marcador de peso molecular
2. pPIC9 sin digerir
3. pPIC9 digerido
4. pPIC9hGH-V1 (clona 1)
5. pPIC9hGH-V1 (clona 2)
6. pPIC9hGH-V1 (clona 3)
7. pPIC9hGH-V1 (clona4)

pPIC9hGH-V1/*Nci* I	pPIC9hGH-V1/*Rsa* I	pPIC9hGH-V1/*Hae* III
3017	1881,1565	1385,1234
1182	1290,813	742,587
983	638,438	512,501
927	432,429	458,434
699	413	395,392
696	251	343,337
523	180	267,219
351	115	209,
179	74	124 (2)
72	67	123,99
35	58	80,64
1 (2)	22	18

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFÍA.

1. Adelman, JP, Hayflick, JS, Vasser, M, Seeburg, PH. 1983. *In vitro* deletional mutagenesis for bacterial production of the 20,000 dalton form of human pituitary growth hormone. *DNA*, 2 (3):183-193.
2. Aprikian PG, Karpychev IV, Mikhailover VM, Gracheva VD, Shchedrin AM, Beburov Mlu, El'darov MA, Skriabin KG. 1991. Expression and secretion of human growth hormone (hGH) in methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha. Dokl Akad Nauk SSSR*;321(2):390-4.
3. Barrera-Saldaña, HA.1998. Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. *Gene* 28;211(1):11-8.
4. Becker GW, Hsiung HM. 1986. Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. Purification and characterization. *FEBS Lett*.204(1):145-50.
5. Boguszewski CL, Svensson PA, Jansson T, Clark R, Carlsson MS, Carlsson B. 1988. Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta.*J Clin Endocrinol Metab*.83(8)2878-2885.
6. Bradford MM.1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
7. Brandes HK, Hartman FC, Lu TYS and Larimer FW.1996. Efficient Expression of the Gene for Spinach Phosphoribulokinase in *Pichia pastoris* and Utilization of the Recombinant Enzyme to Explore the Role of Regulatory Cysteinyl Residues by Site-directed Mutagenesis. *J. Biol. Chem. 27*1, 6490-6496.
8. Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K and Romanos MA.1991. High-level Expression of Tetanus Toxin Fragment C in *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Tandem Integrations of theGene. *Bio/Technology* 9: 455-460.
9. Clare JJ, Romanos MA, Rayment FB, Rowedder JE, Smith MA, Payne MM, Sreekrishna K, and Henwood CA. 1991. Production of Epidermal Growth Factor in Yeast: High-Level

Secretion Using *Pichia pastoris* Strains Containing Multiple Gene Copies. *Gene 105*:205-212.

10. Cooke NE, Ray J, Emery JG, Liebhaber SA.1988. Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins.*J Biol Chem* 263:9001-9006.
11. Cooke NE, Ray J, Watson MA, Estes PA, Kuo BA, Liebhaber SA.1988. Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns.*J Clin Invest* 82:270-275.
12. Cooke NE.1989. Prolactin:normal synthesis and regulation.In *De Groot LJ (ed) Endocrinology.Saunders, Philadelphia*.1:384-407.
13. Cregg, JM., Vedvick, TS., and Raschke, WC. 1993. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris. Bio/Technology; 11*, 905-910.
14. Chang JY, Pai RC, Bennett WF, Bocher BR. 1989. Periplasmic secretion of growth hormone by *Escherichia coli. Biochem Soc Trans;* 17(2):335-7.
15. Chen EY, Liao YC, Smith DH *et al.*1989. The human growth hormone locus: nucleotide secuence, biology and evolution.*Genomics*; 4:479-97.
16. Chomczynski P, Sacchi N.1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*; 162:156-159.
17. Chowen JA, Evain-Brion D, Pozo J, Alsat E, García-Segura LM, Argente J. 1996. Decreased expression of placental growth hormone in intrauterine growth retardation. *Pedriatr Res*.39(4 Pt 1):736-9.
18. Digan ME, Lair SV, Brierley RA, Siegel RS, Williams ME, Ellis SB, Kellaris PA, Provow SA, Craig WS, Velicelebi G, Harpold MM and Thill GP. 1989. Continuous production of a novel lysozyme via secretion from the yeast *Pichia pastoris. Bio/Technology*;7:160-164.
19. Ellis, S. B., Brust, P. F., Koutz, P. J., Waters, A. F., Harpold, M. M., and Gingeras, T. R. 1985. Isolation of Alcohol Oxidase and Two other Methanol Regulatable Genes from the Yeast, *Pichia pastoris. Mol. Cell. Biol. 5*, 1111-1121.
20. Escamilla-Treviño LL.1996.Biosíntesis de la hormona de crecimiento humano recombinante (hGHr) en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. TESIS DE MAESTRIA. Facultad de Medicina, UANL.Monterrey N.L.,Méx.

21. Evain-Brion D, Alsat E, Igout A, Frankenne F, Hennen G. 1994. Placental growht hormone variant:assay and clinical aspects. *Acta Pediatr Suppl* 399:49-51.

22. Franchi E, Maisano F, Testori SA, Galli G, Toma S, Parente L, Ferra FD y Grandi G. 1991. A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnol*;18:41-54.

23. Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo ML, Smal J, Hennen G.1988. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant.*J Clin Endocrinol Metab*. 66(6):1171-1180.

24. Frankenne F, Scippo M, Van Beeumen J, Igout A, Hennen G. 1990. Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J Clin Endocrinol Metab*.71:15-18.

25. Freud A, *y cols.* 1995. Short protocols in molecular biology.Third Edition. Ed.Wiley.

26. Fryxell KB, O'Donoghue K, Graeff RM, Lee HC, and Branton WD. Functional Expression of Soluble Forms of Human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 6:329-336.

27. Gallardo-Blanco HL.1999. Construccion de cepas de *Pichia pastoris* portadoras del DNAc de la hormona del crecimiento bovino.TESIS DE MAESTRIA. Facultad de Medicina, UANL.Monterrey N.L.,Méx.

28. Garcia JN, Aguiar JA, Gill M, Alvarez A, Morales J, Ferrero J, Gonzalez B, Padron G, and Menendez A. 1995. High Level Expression of Human IFN-a2b in *Pichia pastoris*. *Biotecnologia Aplicada 12*: 152-155.

29. George DL, Phillips JA III, Francke U, Seeburg PH.1981. The genes for growth hormone and chorionic somatomammotropin are on the long arm of human chromosome 17 in region q21-qter. *Hum.Genet.* 57:138-141.

30. Goeddel DV, Heyneker HL, Hozumi T, Arentzen R, Itakura K, Yansura DG, Ross MJ, Miozzari G, Crea R, Seeburg PH. 1979. Direct expression in Escherichia coli of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 18;28(5732):544-8.

31. Gray GL, Baldridge JS, McKeown KS, Heyneker HL, Chang CN.1985. Periplasmic production of correctly processed human growth hormone in *Escherichia coli*:natural and bacterial signal sequences are interchangeable. *Gene*.39(2-3):247-54.

32. Guo W, Gonzalez-Candelas L,Kolattukudy PE. Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f sp. Pisi (*Nectria haematococca,* Mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris.Arch Biochem Biophys*;323:352-360.

33. Hagenson MJ, Holden KA, Parker KA, Wood PJ, Cruze JA, Fuke M, Hopkins TR and Stroman DW.1989. Expresion of streptokinase in *Pichia pastoris* yeast. *Enzyme Microbiol Technol* 11:650-656.

34. Haro LS, Lewis UJ, García M, Bustamante J, Martínez AO, y Ling NC. 1996. Glycosylated human growth hormone (hGH): a novel 24 kDa hGH-N variant.*Biochem Biophys Res Commun.*228(2):549-56.

35. Hirt H, Kimelman J, Birnbaum MJ *et al.*1987. The human growth hormone gene locus: structure, evolution and allelic variations.*DNA*;6:59-70.

36. Igout A, Scippo ML, Frankenne F, Hennen G.1988. Cloning and nucleotide sequence of placental hGH-V cDNA.*Arch Int Physiol Biochem.*;96:63-7.

37. Igout A, Scippo ML, Frankenne F, Hennen G.1989. Expression and secretion of the human placental growth hormone in *Escherichia coli. Nucleic Acids Res*;17(10):3998.

38. Igout A, Van Beeumen J, Frankenne F, Scippo ML, Devreese B, Hennen G.1993. Purification and biochemical characterization of recombinant human placental growth hormone produced in Escherichia coli. *Biochem J* .295 (Pt 3):719-24.

39. Invitrogen.*Pichia* Expression. 2000. A manual of methods for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris.*Invitrogen Corporation, Carlsbad CA.

40. Invitrogen.*Pichia* Fermentation process guidelines.2000. Invitrogen Corporation, San Diego CA.

41. Ishikawa M, Nimura A, Horikawa R, Katsumata N, Arisaka O, Wada M, Honjo M, Tanaka T.2000. A Novel Specific Bioassay for Serum Human Growth Hormone. *J Clin Endocrinol Metab*;85(11): 4274 - 4279.

42. Kato C, Kobayashi T, Kudo T, Furusato T, Murakami Y, Tanaka T, Baba H, Oishi T, Ohtsuka E, Ikehara M .1987. Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli. Gene*;45(2-3):197-202.

43. Koutz, PJ., Davis, GR., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, JM., and Thill, G.1989. Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. *Yeast 5*, 167-177.

44. Liebhaber SA, Urbanek M, Ray J, Tuan RS, Cooke NE.1989. Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta.*J Clin Invest* 83:1985-1991.1987.

45. Lecomte CM, Renard A, Martial JA. A new natural hGH variant-17.5 kDa-produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection.*Nucleic Acids Res*;15(16):6331-48.

46. MacLEOD JM, Worsley I, Ray J, Friesen HG, Liebhaber SA, Cooke NE.1991. Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen.*Endocrinol.*128(3):1298-1302.

47. Mc Intyre HD, Serek R, Crane DI, Veveris-Lowe T,Parry A, Johnson S, Leung KC, Ho K, Bougoussa M, Hennen G, Igout A,Chan FY, Cowley D, Cotterill A, Barnard R.2000. Placental Growth Hormone (GH), GH-Binding Protein, and Insulin-Like Growth Factor Axis in Normal, Growth-Retarded, and Diabetic Pregnancies: Correlations with Fetal Growth. *J Clin Endocrinol Metab*;85(9):1143-50.

48. Miller WL, Eberhardt NL, 1983. Structure and evolution of the growth hormone gen family.*Endocr Rev* 4:97.

49. Mirlesse V, Frankenne F, Alsat E, Poncelet M, Hennen G, Evain-Brion D.1993. Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growht retardation.*Pediatr Res.*;34:439-42.

50. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for celluar growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63.

51. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwel VW.2001.Bioquímica de Harper.Ed. El manual modeno.

52. Nickel BE, Kardami E, Cattini PA.1990. The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells.*Endocrinology*; 126:971-976.

53. Paifer E, Margolles E, Cremata J, Montesino R, Herrera L and Delgado JM. 1994. Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. *Yeast*;10:1415-1419.

54. Pardi G, Marcini AM, Cetin I.1997. Pathophysiology of intrauterine growth retardation:rol of the placenta. *Acta Pediatr Suppl.* 423:170-2.

55. Pmfarma Digital.http://*www.pmfarma.com.*

56. Ray J, Jones BK, Liebhaber SA, Cooke NE.1989. Glycosylated human growth hormone variant.*Endocrinology*.125:566-568.

57. Reznikov MV, Fidler R, Rubtsov PM, Skriabin KG, Chumakov PM, Prasolov VS, Baev AA.1989. Expression of human growth hormone in culture mouse fibroblast. *Mol Biol (Mosk)*;23(6):1692-9

58. Rincon-Limas DE, Resendez-Perez D, Ortiz-Lopez R, Alvidrez-Quihui LE, Castro-MuñozLedo F, Kuri-Harcuch W, Martinez-Rodriguez HG, Barrera-Saldaña HA. 1993. hGH isoforms: cDNA expression, adipogenic activity and production in cell culture. *Biochim Biophys Acta*;1172(1-2):4954.

59. Romanos MA, Clare JJ, Beesley KM, Rayment FB, Ballantine SP, Makoff A. J, Dougan G, Fairweather NF, and Charles IG. 1991. Recombinant *Bordetella pertussis* Pertactin p69 from the Yeast *Pichia pastoris* High Level Production and Immunological Properties. *Vaccine* 9:901-906.

60. Rygaard K, Revol A, Esquivel-Escobedo D, Beck BL, Barrera-Saldana HA.1998. Absence of human placental lactogen and placental growth hormone (HGH-V) during pregnancy: PCR analysis of the deletion. *Hum Genet.* 1998 Jan;102(1):87-92.

61. Sambrook, J., Fristsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cols. Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor. 2nd. Edition.

62. Sanchez-Dominguez CN.Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de hormona del crecimiento humana recombinante y evaluacion de esquemas de purificacion.1998. TESIS DE MAESTRIA. Facultad de Medicina, UANL.Monterrey N.L.,Méx.

63. Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ, and Romanos MA.1993. The Intracellular Production and Secretion of HIV-1 Envelope Protein in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Gene 136*:111-119.

64. Seeburg PH.1982. The human growth hormone gene family:nucleotide secuence show recent divergence and predict a new polypeptide hormone.*DNA* 1:239-249.

65. Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, Cruse J, Mazzaferro P, Fish W, Fuke,M, Holden K., Phelps D, Wood P, and Parker K.1989. High Level Expression, Purification, and Characterization of RecombinantHuman Tumor Necrosis Factor Synthesized in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry 28*:4117-4125.

66. Tanaka T, Shiu RP, Gout PW, Beer CT, Noble RL, Friesen HG. 1980. A new sensitive and specific bioassay for lactogenic hormones: measurement of prolactin and growth hormone in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*;51(5):1058-63.
67. 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.
68. Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig W and Grina L.1987. High level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*;5:1305-1308.
69. Uchida H, Naito N, Asada N, Wada M, Ikeda M, Kobayashi H, Asanagi M, Mori K, Fujita Y, Konda K, Kusuhara N, Kamioka T, Nakashima K, Honjo M.1997. Secretion of authentic 20-KDa human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *J Biotechnol.*55(2):101-12.
70. Weiss HM, Haase W, Michel H, and Reilander H.1995. Expression of Functional Mouse 5-HT5A SerotoninReceptor in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*: Pharmacological Characterization and Localization. *FEBS 377*:451-456.
71. Wessel, D. and UI Flugge.1984. A Method for the Quantitative Recovery of Protein in Dilute Solution in the Presence of Detergents and Lipids. *Analytical Biochemistry*; 138 (141-143).