

PRODUCCIÓN Y SECRECIÓN DE HORMONA DEL CRECIMIENTO CANINA BIOLÓGICAMENTE ACTIVA POR *Pichia pastoris*.

Jorge A. Ascacio Martínez, Gerardo R. Padilla Rivas y Hugo A. Barrera Saldaña. Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Madero y Aguirre, Monterrey, N.L. México. C.P. 64460. Fax: 83337747, hbarraera@fm.uanl.mx.

Palabras claves: GH, *Canis familiaris*, *Pichia pastoris*

Introducción. Las hormonas del crecimiento (GH) son proteínas de aproximadamente 190 residuos aminoácidos, sintetizadas en los somatotropos de la hipófisis anterior de los mamíferos. Para el perro (*Canis familiaris*) hay evidencia del papel benéfico que juega su GH (CFGH) en el tratamiento de obesidad y fracturas de huesos. Interesantemente, esta hormona es idéntica a la del cerdo (1), especie en la que induce carne más magra. Las GHs se han venido produciendo en bacterias, aunque dificultando su proceso por producir las desnaturalizadas en cuerpos de inclusión y biológicamente inactivas, contrastando con la levadura *Pichia pastoris* que sobreproduce y secreta al medio de cultivo proteínas recombinantes con actividad biológica (2).

Buscando explotar las ventajas de *Pichia pastoris*, nos propusimos construir cepas de esta levadura capaces de sobreproducir y secretar la CFGH biológicamente activa.

Metodología. Por Reacción en cadena de la polimerasa (RCP) a partir de plásmidos previamente construidos en nuestro laboratorio (1), se amplificó el ADNc de la CFGH y se insertó en el vector de expresión pPIC9 en los sitios *Xho I* y *Avr II*, originando a pPIC9-cfGH. Luego éste se linearizó con *Sac I* y se transformó en *P. pastoris*, integrándose en su genoma por recombinación homóloga (3). La clonación resultante que integraron el "casete" expresor de la CFGH se fermentaron en matraz con 25 ml de medio de medio con extracto de levadura, peptona, base nitrogenada para levadura y glicerol, por 120 horas a temperatura de 30 °C a 250 r.p.m., induciendo con metanol al 1 %. Se recuperó el medio de cultivo por centrifugación y se analizó por SDS-EGPA al 15%, teñido con azul de Coomassie. El medio que contiene la CFGH se dializó y con éste se ensayo la actividad biológica en la línea celular Nb2 (4).

Resultados y discusión. La RCP produjo una banda de 597 pb correspondiente al ADNc de CFGH, que se clonó en pPIC9 originando a pPIC9-cfGH. La integración del "casete" expresor de CFGH al genoma de *P. Pastoris* se demostró por RCP, con la presencia de una banda de 1050 pb. Además, se encontró que algunas clonas presentaban la banda de 2105 pb correspondiente al gen de *aox1* (mut^+), mientras que otras no (mut^s). Las fermentaciones produjeron CFGH de alrededor de 23 kDa que sobresale en abundancia del resto de las proteínas del medio. El nivel de proteínas totales secretadas al medio de cultivo alcanzado en matraz fue de aproximadamente 40 µg/ml y 15 µg/ml para las construcciones mut^s y mut^+ , respectivamente. Según el análisis en EGPA-SDS, la hormona producida por la

fermentación de la mut^s representa alrededor del 60% del total de las proteínas secretadas, casi tres veces más que su contraparte mut^+ (fig. 1). La CFGH mostró actividad biológica en el ensayo de proliferación celular de la línea Nb2.

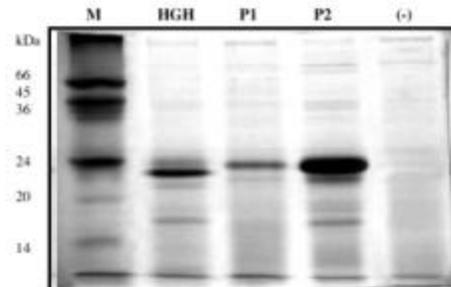


Fig. 1. Expresión en *Pichia pastoris* de la CFGH. Proteínas en el medio de cultivo resueltas en EGPA-SDS al 15%. M, marcador de peso molecular; HGH, hormona del crecimiento humana; P1, rCFGH (mut^+) y P2, rCFGH (mut^s); y (-), clona no inducida.

Conclusiones. Este es el primer reporte de la producción de la CFGHr madura lograda en un microorganismo modificado por ingeniería genética. La GH canina fue eficientemente producida, procesada, secretada y correctamente plegada por *Pichia pastoris*. El análisis por EGPA-SDS, muestra que la CFGHr constituye la banda principal entre las proteínas secretadas. La actividad biológica de la hormona se comprobó en el ensayo de la línea celular Nb2.

Agradecimiento. Al Dr. Carlos Arámburo y Dra. Carmen Clapp (CNB, UNAM, Querétaro, México) por su apoyo en el ensayo biológico. JAAM agradece al CONACYT y a la UANL por la beca otorgada. Este trabajo fue parcialmente apoyado por el proyecto Z-037 del CONACYT.

Bibliografía.

1. Ascacio-Martínez J.A. y Barrera-Saldaña H.A. (1994). A dog growth hormone cDNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone. *Gene*. 10;143(2):277-280.
2. Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. y Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16(1):23-52.
3. Invitrogen (2000). Products for Gene Expression and Analysis. Instruction manual. *Pichia* Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Version L.
4. Lawson, D.M., Sensui, N., Haisenleder, D.H. y Gala, R.R. (1982). Rat lymphoma cell bioassay for prolactin: observations on its use and comparison with radioimmunoassay. *Life Sci.* 31(26):3063-3070.