



CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS MUT^S DE *PICHIA PASTORIS* PRODUCTORAS DE LAS HORMONAS DEL CRECIMIENTO HUMANO DE 20 Y 22 KDa

Alejandra Arciniega-De Los Santos, Eneida J. Hernández-Vásquez, Eddy L. Cab-Barrera, José M. Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán. Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Av. Pedro de Alba s/n, Col. Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México, 66450.
(81) 83294000 ext. 6439, mguerrer@fcb.uanl.mx

Palabras clave: *Pichia pastoris*, hormonas de crecimiento humano.

Introducción. *Pichia pastoris* es un hospedero actualmente muy usado para la producción de proteínas heterólogas, las cuales con frecuencia se producen como glicoproteínas con residuos de manosa. Esta característica frecuentemente es limitante en proteínas con fines terapéuticos en humanos. En este trabajo se construyeron y caracterizaron cepas Mut^S portadoras de los DNAC que codifican para las secuencias de las proteínas maduras de las isoformas de 22 (HGH-22K) y 20 kDa (HGH-20K) de la hormona del crecimiento humano.

Metodología. Los vectores pPIC9-HGH22 y pPIC9K-HGH20 portadores de los DNAC que codifican para las secuencias de las proteínas maduras de las isoformas de 22 y 20 kDa de la hormona del crecimiento humano fueron linerizados con la enzima *Sall* para transformar la cepa KM71 (Mut^S) de *P. pastoris*, mediante el método de competencia química. Las colonias transformadas y portadoras de los genes heterólogos fueron crecidas en YPD a 30°C y 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 9-10. Con este cultivo se inocularon en 100 mL de BMG (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6], 4x10⁻⁵% biotina, 1% de glicerol) se incubó a 30°C, 250 rpm por 12 h hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 6-7. Todas las células del cultivo en BMG se cosecharon y se cultivaron en 20 mL de medio BMM (1.34% YNB, 100 mM de fosfato de potasio [pH 6], 4x10⁻⁵% biotina y 0.75 % de metanol) a 30°C, 250 rpm por 72 h y adición de metanol cada 24 h. El paquete celular producto del cultivo fue lisado por tratamiento enzimático y las proteínas intracelulares solubles fueron recuperadas. El sobrenadante de cada cultivo fue desalado utilizando columnas Sephadex™ G-25 Medium y concentrado de 8X veces en unidades de ultrafiltración (Ultrafree-0.5, Millipore). Tanto el sobrenadante directo, como su preparación concentrada y las proteínas solubles intracelulares fueron analizados por ELISA (IMMULITE immunoassay system), SDS-PAGE, dot blot y Western blot. Para el Western y el dot blot se emplearon anticuerpos monoclonales específicos para cada isoforma (1). Como segundo anticuerpo se usó un anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa y TMB como sustrato. Proteínas totales fueron determinadas por Bradford. Tratamientos con Endo Hf (New England, BioLabs) fueron llevados a cabo en ambas proteínas para determinar la presencia de N-glicosilaciones.

Resultados y discusión. La biomasa en BMM al inicio de la inducción fue de 37 en DO₆₀₀ y de 47 a las 72 h de inducción, indicando un crecimiento de biomasa durante esta etapa. Las proteínas totales extracelulares alcanzaron niveles de 35 mg/L. Los niveles de producción de HGH determinados por ELISA (con anticuerpo específicos para HGH-22K) fueron de 2.4 mg/L de HGH-22K, de los cuales el 60% fue extracelular y el 40% de proteína no secretada en la cepa KM71-HGH22K. Para el caso de la cepa productora de la isoforma de 20 kDa (KM71-HGH20K), los niveles fueron de 1.4 mg/L, de los cuales el 69% fue secretado. Mediante el análisis por Western blot de las proteínas extracelulares del cultivo de la cepa KM71-HGH22K se detectaron dos proteínas con un Mrf ≈ 45 kDa y 22 kDa. La proteína de 45 kDa probablemente corresponde a una forma dimérica covalente resistente a la reducción previamente ya documentada, y la de 22 kDa a la forma monomérica de esta hormona. Mientras que para la cepa KM71-HGH20K, sólo se detectó una proteína un Mrf ≈ 20 kDa inmunoreactiva al anticuerpo específico hacia HGH-20K. Las tres proteínas inmuno reactivas no presentaron evidencia de glicosilación.

Conclusiones.

En el presente trabajo se han caracterizado cepas Mut^S productoras de las isoformas de 22 y 20 KDa de la hormona del crecimiento humano y se determinó que las proteínas producidas no fueron glicosiladas por este hospedero.

Agradecimientos. Agradecemos el apoyo técnico brindado por los Q.B.P. José A. Fuentes-Garibay, Miguel Castillo-Galván y Juan A Gallegos-López.

Bibliografía.

1. Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Kremer L, Martínez-Alonso C. (1996). Characterization of monoclonal antibodies specific for the human growth hormone 22K and 20K isoforms. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 81(4): 1613-1618.