

PRODUCCION Y SECRECION DE MIEMBROS DE LA FAMILIA DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN *Pichia pastoris*.

Gerardo R. Padilla Rivas, Celia N. Sánchez Domínguez, Antonio A. Pérez Maya, Iram P. Rodríguez Sánchez, Jorge A. Ascacio Martínez, Hugo A. Barrera Saldaña. Facultad de Medicina, Departamento de Bioquímica, Madero y Dr. Aguirre Pequeño, Monterrey N.L. México. C.P. 64460. Fax 81 83337747, hbarrera@fm.uanl.mx

Palabras clave: GH, proteínas recombinantes, *Pichia pastoris*

Introducción. El mayor interés de la industria biotecnológica han sido las proteínas terapéuticas y de éstas las la mayoría relacionadas con la salud humana, como es el caso de la HGH recombinante (1). También, las relacionadas con la producción y salud animal, destacando nuevamente las GHs. Estas son proteínas de aproximadamente 190 residuos aminoacídicos, sintetizadas en los somatotropos de la hipófisis anterior de los mamíferos. Participan en el crecimiento muscular, lactopoyesis y regeneración de tejidos, entre otras propiedades (2). Los sistemas actuales de producción de GHs son en bacterias, presentando las característica de ser producidas desnaturalizadas en cuerpos de inclusión y biológicamente inactivas, contrastando con la levadura *Pichia pastoris* que sobreproduce y secreta al medio de cultivo proteínas recombinantes reteniendo su actividad biológica (3).

El objetivo de este trabajo fue construir cepas de levaduras *Pichia pastoris* capaces de sobreproducir y secretar las GHs recombinantes.

Metodología. Utilizando plásmidos previamente construidos en nuestro laboratorio, por RCP se amplificó el ADNc de cada una de las GHs. Posteriormente se inserto en el vector de expresión pPIC9, originando a pPIC9K para HGH22K y HGH20K y pPIC9 para HGHV, hPL, BGH, CHGH, CFGH, ECGH y FCGH. Luego cada plásmido se linearizó y transformó a *P. pastoris*, integrándose en su genoma por recombinación homóloga (4). Las clonas resultantes que integraron el casete expresor de las respectivas GH se fermentaron en matraz con 25 ml de medio con extracto de levadura, peptona, base nitrogenada para levadura y glicerol, por 120 h a temperatura de 30 C a 250 r.p.m., induciendo con metanol al 0.75%. De casa caso, se recuperó el medio de cultivo por centrifugación y se analizó por SDS-EGPA al 15% y fue teñido con azul de Coomassie. Las proteínas se determinaron por la técnica de Bradford.

Resultados y discusión.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Proteínas totales secretadas al medio de cultivo.

CEPA	Prot. totales (µg/ml)	CEPA	Prot. totales (µg/ml)
HGH22Kuni.	33.3	BGH	33.7
HGH22Kmulti.	36.9	CHGH	27.3
HGH20K	38.8	FCGH	37.4
HGHV	36.3	ECGH	37.6
HPL	39.8	CFGH	41.2

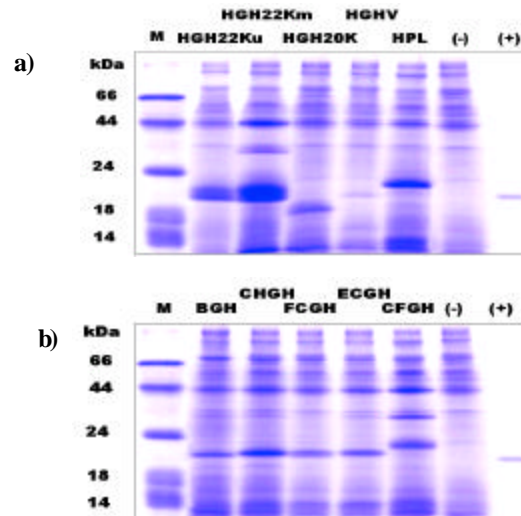


Fig. 1. Expresión en *Pichia pastoris* de las GHs. Proteínas en medio de cultivo resueltas en EGPA-SDS al 15%. M, marcador de peso molecular; (+), HGH22K comercial; (-) clona no inducida; a) GHs humanas y lactogeno placentario y b) GHs animales según se indica.

Conclusiones. Este es el primer reporte de la producción simultanea de múltiples hormonas de la familia de la GH lograda en *Pichia pastoris*. Las GHs fueron eficientemente producidas, procesadas, secretadas y correctamente plegadas por *Pichia pastoris*.

Agradecimiento. Este trabajo fue apoyado por el proyecto Z-037 del CONACYT.

Bibliografía.

- Escamilla-Treviño, L.L., Viader Salgado, J.M., Barrera Saldaña, H. y Guerrero Olzarán, M. (2000). Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letter*. 22:109-114.
- Etherton, T.D. y Bauman, D.E. (1998). Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.* 78:745-761.
- Cregg, J.M., Cereghino, J.L., Shi, J. y Higgins, D.R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* 16:23-52.
- Invitrogen (2000). Products for Gene Expression and Analysis. Instructuion manual. *Pichia Expression Kit. Protein Expression. A Manual of Method for Expression of Recombinant Proteins in Pichia pastoris. Version L.*