

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

**Expresión en *Escherichia coli* de las hormonas del crecimiento humano y
bovino en fusión con la proteína de unión a la maltosa**

Tesis

Que con opción al grado de

Maestro en Ciencias

Con especialidad en **Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Presenta

Ataúlfo Martínez Torres
Biólogo



FONDO TESIS

Monterrey, N.L. Julio de 1994

Expresión en *Escherichia coli* de las hormonas del crecimiento humano y
bovino en fusión con la proteína de unión a la maltosa

Por
Ataúlfo Martínez Torres
Biólogo

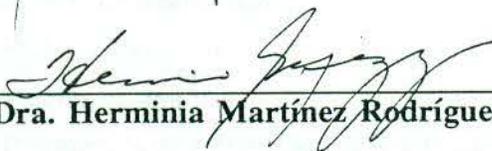
El comité de tesis:



Dr Hugo A Barrera Saldaña
Director de Tesis



Dra. Martha Guerrero



Dra. Herminia Martínez Rodríguez

Dra. Diana Reséndez Pérez



QFB MC María Alicia Suárez Semour

TABLAS DE CONTENIDO

1. AGRADECIMIENTOS	i
2. LISTA DE ABREVIATURAS.	ii
3. RESUMEN	iii
4. INTRODUCCION	1
4.1 Las hormonas del crecimiento	2
4.2 Relevancia biotecnológica de las GHs de mamífero	3
4.3 Función y estructura	4
4.4 Clonación	6
4.5 Producción de formas recombinantes	7
4.6 Sistemas de expresión en <i>E. coli</i>	13
4.7 Expresión de proteínas de fusión	13
4.8 El modelo: proteína de fusión con MBP	14
4.9 El problema: baja expresión de bGH y hGH en <i>E. coli</i>	17
5. HIPOTESIS	19
6. OBJETIVOS	20
7. MATERIAL Y METODOS	21
7.1 Estrategias de clonación	22
7.2 Apareamiento de oligonucleótidos sintéticos	28
7.3 Digestión con enzimas de restricción	28
7.4 Ensayo con la DNA ligasa de T4	29
7.5 Electroforesis en geles de agarosa	29
7.6 Purificación de fragmentos de DNA mediante adsorción a sílica (Gene clean)	31
7.7 Preparación de bacterias competentes para transformación	32
7.8 Transformación de bacterias calcio competentes	33
7.9 Obtención de DNA mediante minipreparación de plásmidos	33
7.10 Obtención de DNA de plásmidos en gradiente de CsCl	34
7.11 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	37
7.12 Purificación de cuerpos de inclusión	38
7.13 Reacción proteolítica con el factor Xa	38
7.14 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e inmunodetección de las proteínas recombinantes expresadas en <i>E. coli</i>	39

7.15 Mutagénesis sitio dirigida usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	42
7.16 Subclonación del fragmento amplificado	44
7.17 Determinación de la secuencia nucleotídica por el método enzimático	45
8. RESULTADOS	51
8.1 Clonación	51
8.2 Expresión	60
8.3 Mutagénesis dirigida y análisis de la expresión con el plásmido pMAL(SS)hGH	64
9. DISCUSION Y CONCLUSIONES	68
10. LITERATURA CONSULTADA	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Remoción diferencial de intrones en el pre-RNAm de hGH	5
Figura 2. Plásmido típico de expresión procariótica	14
Figura 3. Mapa de restricción del plásmido pMAL	16
Figura 4. Estrategia para la construcción del plásmido pMALbGH	26
Figura 5. Estrategia para la construcción de pMALhGH	27
Figura 6. Análisis electroforéticos de los productos de "Gene clean" y de ligación	52
Figura 7. Mapa de restricción y caracterización de pMALcbGH	53
Figura 8. Mapa de restricción y caracterización del plásmido pMALpbGH	54
Figura 9. Determinación de la secuencia del fragmento de DNA sintético en pMAcbGH	54
Figura 10. Mapa de restricción y caracterización de pMALphGH20kDa	56
Figura 11. Mapa de restricción y caracterización de pMALchGH20kDa	57
Figura 12. Mapa de restricción y caracterización del plásmido pMALphGH22kDa	58
Figura 13. Mapa de restricción y caracterización del plásmido pMALchG22kDa	59
Figura 14. Análisis de la expresión de las bacterias recombinantes	61
Figura 15. Análisis tipo "Western blot" de las proteínas recombinantes	62
Figura 16. Electroforesis en gel de los cuerpos de inclusión purificados	63
Figura 17. Análisis tipo "Western blot" de los productos de la digestión proteolítica con el factor Xa	64
Figura 18. Análisis de la amplificación por PCR	65
Figura 19. Análisis de los RNAm bacterianos extraídos y del producto de RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa	66
Figura 20. Secuencia de la región del péptido señal de MBP y del promotor TAC	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Algunos genes y DNAs de GHs purificados	8
Tabla 2. Valores obtenidos en la purificación de plásmidos en gradiente de cloruro de cesio	52

1. AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo, así como una buena parte de mi formación como estudiante y como persona se deben principalmente al apoyo y entusiasmo que el Dr. Hugo A. Barrera me ha sabido imprimir. Queda pues aquí mi testimonio de gratitud por todos este tiempo que me soportó en su laboratorio.

Agradezco a la comisión de tesis por el analisis critico del manuscrito. A la Dra. Herminia Martínez en la Secretaria Académica del Area Basica por el apoyo brindado y sus valiosas sugerencias.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología me otorgó una beca durante los ultimos dos años, extendiendo mi agradecimiento a esta institución.

Algunas valiosas sugerencias para la realización de este trabajo fueron hechas por algunos de los compañeros y amigos en la ULIEG. A Rocío Ortíz, Augusto Rojas, Diana Reséndez, Victor Ramírez y Luis E. Alvidrez (Kiwi) quienes estuvieron siempre discutiendo y criticando este trabajo y otras cosas mas interesantes.

Durante la realización del trabajo experimental Carmen Villalobos tuvo siempre una excelente disposición para sacar adelante los pedidos de material y reactivos para que nuestro trabajo nunca quedara detenido, a ella, a Raúl y a las secretarias que permitieron esta eficiencia mi reconocimiento y agradecimiento.

A la Nueva Generación de ULIEGenses: Ana M. y Ana C., Déctor, Hugo, Zavála, Mario, Everardo y Jorge. A Norma, Dolores, Eddy y Tomas. Y por supuesto a Feli. .

2. LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosin trifosfato
bGH	Hormona del crecimiento bovino
°C	Grado centígrado
CHO	Ovario de hámster chino
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
g	gramos
g	gravidades
hGH	Hormona del crecimiento humano
h	horas
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
l	litros
M	Concentración molar
MBP	Proteína de unión a maltosa
mg	Miligramos
min	Minutos
µg	Microgramos
µl	Microlitros
mM	Concentración milimolar
MT	Metalotioneina
N	Concentración normal
Nt	Nucleótidos
OmpA	Proteína de membrana externa A
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
Poli-A	Acido poliadenílico
(P/V)	Relación peso volúmen
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _r	RNA ribosomal
RNA _t	RNA de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Lauril sulfato de sodio
Seg	segundos
SV40	Virus del simio tipo 40
UO	Unidades ópticas
UV	Ultravioleta
V	Voltios
Vol	Volumen

3. RESUMEN

Las hormonas del crecimiento de mamíferos son polipéptidos de alrededor de 22 Kilodaltones sintetizados en la hipófisis. Tienen la capacidad de promover el crecimiento postnatal ejerciendo su acción en una gran cantidad de tejidos e interviniendo en toda una serie de procesos metabólicos. Con la tecnología del DNA recombinante, se han logrado clonar los genes y DNAs complementarios a los RNA mensajeros que codifican para varias hormonas del crecimiento. Gracias a ello se han sobreproducido éstas en microorganismos reprogramados genéticamente y algunos de dichos productos recombinantes se ofrecen ya en el mercado. La gran cantidad de aplicaciones de estas hormonas en el campo biomédico y pecuario han hecho de éstas uno de los principales productos derivados del desarrollo de la ingeniería genética.

En este trabajo se expresó en *Escherichia coli* los DNAs que codifican para las hormonas del crecimiento bovino y las hormonas del crecimiento humano de 20 y 22 kDa, en fusión con una proteína de origen bacteriano: la proteína de unión a maltosa (MBP) de *Escherichia coli*. Se derivaron seis plásmidos a partir de la serie de vectores pMAL (los cuales llevan la información codificante para MBP); todos ellos expresaron una proteína de fusión que fué reconocida por anticuerpos anti-hormona del crecimiento, así como por anticuerpos anti-MBP. Además, se liberaron las hormonas del crecimiento del péptido de fusión, empleando la enzima conocida como factor Xa, cuya secuencia de reconocimiento se encuentra justo entre el final de MBP y el inicio de las hormonas del crecimiento en las proteínas de fusión generadas. Finalmente, se introdujo por mutagénesis dirigida, empleando la reacción de la polimerasa (PCR), un nuevo sitio de restricción en el plásmido pMALp con el cual se facilitó la subclonación en éste del DNAc de hGH de 22kDa y se trató de expresar la proteína hGH en fusión ya no con la proteína MBP completa, sino solo con su péptido señal ó líder. Aunque no se obtuvo una proteína según el análisis por "Western blot", si se logró localizar el RNAm en ensayos de transcripción reversa con subsecuente amplificación por PCR.

4. INTRODUCCION

En los últimos años y gracias a la aplicación de la tecnología del DNA recombinante, se ha logrado producir en bacterias, particularmente en *E. coli*, una gran variedad de proteínas de importancia biomédica. Los plásmidos de *E. coli* son utilizados en esta tecnología para la sobreproducción de dichas proteínas, ya que éstos, al ser modificados por ingeniería genética, portan la información necesaria para la codificación de una proteína y con las señales reguladoras óptimas para la expresión génica, facilitan la producción en cantidades abundantes de la proteína deseada (1). A la fecha se ofrecen en el mercado internacional toda una variedad de proteínas de origen recombinante, desde factores de crecimiento hasta anticoagulantes. La lista de estos productos se alarga 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 (2).

Por su baja disponibilidad, y alto consumo potencial, las hormonas del crecimiento (GHs) estuvieron entre las proteínas de mayor interés para clonar los DNAs complementarios (DNACs) a los RNA mensajeros (RNAm) que les codifican, para así lograr su sobreproducción en bacterias.

Aunque las técnicas de clonación estándar son hoy en día rutinarias y algunos sistemas de expresión están disponibles comercialmente, al momento de llevar la producción a la práctica el investigador se encuentra con dificultades no previstas (3,4).

Reconociendo el interés que reviste la aplicación de las hormonas del crecimiento de mamíferos, en nuestra Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina se ha logrado la clonación del DNAC de la hormona del crecimiento

bovino (bGH) (5) y los DNAc's de la hormona del crecimiento humano (hGH) para la isoforma de 22 Kilodaltones (kDa) así como para la de 20 kDa (6). Además se ha alcanzado ya la expresión de éstas en células eucarióticas en cultivo, tanto en sistemas de expresión transitoria (7,8) como estables (9). Sin embargo, la expresión en *E. coli* no se había alcanzado eficientemente, pues en el mejor de los casos se consiguió únicamente detectar la expresión a nivel de RNAm (3).

En este trabajo se logró la expresión en *E. coli* de BGH y HGH 20 y 22 kDa como proteínas de fusión con la proteína de unión a maltosa (MPB). Además, se purificaron éstas como cuerpos de inclusión y se demostró su inmunorreacción con anticuerpos específicos para hormonas del crecimiento; también se logró liberar la hormona del crecimiento de la proteína fusión, mediante el corte con el factor proteolítico Xa. Finalmente realizamos mutaciones sitio-dirigidas mediadas por la reacción encadena de la polimerasa (PCR) para lograr construir un gen quimera entre el péptido señal de MBP y HGH y producir ésta como proteína madura en el periplasma, sin embargo no logramos detectar el producto proteico, aunque otros ensayos mostraron la presencia de un RNAm codificante para GH.

4.1 Las hormonas del crecimiento

A continuación se presenta la importancia que las hormonas del crecimiento tienen en el mercado biofarmacéutico, su Biología Molecular, así como los trabajos de Ingeniería Genética y Biotecnología animal que en ellas se han desarrollado.

4.2 Relevancia biotecnológica de las GHs de mamífero

El empleo de HGH en pacientes con enanismo hipofisiario, se ha estado popularizando recientemente gracias a la disponibilidad de la hormona recombinante producida en microorganismos reprogramados por ingeniería genética. Esta ha sustituido a la hormona recuperada a partir de cadáveres que se venía utilizando hasta antes de la implementación de la producción de la forma recombinante, y que incluso estaba por prohibirse debido al fallecimiento de varios pacientes tratados, a causa de contaminación con virus lentos que afectan el sistema nervioso central (10,11). La importancia de HGH y su aplicación práctica en el área biofarmacéutica se refleja en los usos que ha tenido esta hormona: remueve ácidos grasos y es empleada en el tratamiento de obesos, también mejora la vascularización en los ancianos y promueve la ganancia de masa muscular en éstos. Es usada en el tratamiento de úlceras y fracturas óseas, acelera la regeneración de tejidos dañados y en el tratamiento de insuficiencia renal (12).

Por otra parte, BGH incrementa la producción de leche en el ganado vacuno hasta en un 25% , también la cantidad de grasa en ésta en un 22.7% mayor al promedio (13). Estos resultados indican que la distribución de nutrientes en el animal puede ser alterado de tal modo que la síntesis de leche es estimulada y la ganancia de peso muscular es mejorada (14). El uso de BGH recombinante en ganado lechero no representa ningún riesgo para los consumidores, lo que ha sido demostrado por algunos estudios desarrollados por compañías biofarmacéuticas y por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, los cuales concluyeron que BGH no es

biológicamente activa en el humano y por tanto su aplicación al ganado no sería restringida (15).

4.3 Función y estructura

Las hormonas del crecimiento representan una familia de proteínas, sintetizadas en la hipófisis anterior de los vertebrados, cuya función principal consiste en estimular el crecimiento longitudinal de los huesos. Estas son las hormonas más abundantes en dicha glándula. Consisten de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de alrededor de 22 kDa, compuesta de 191 aminoácidos, aunque en algunas especies presenta algunas formas alternativas, como es el caso de la isoforma de 20 kDa de HGH (Figura 1) (8,16). Tienen dos puentes disulfuro y no presentan residuos de carbohidratos. Portan un péptido señal ó líder de alrededor de 26 aminoácidos, el cual es utilizado para dirigir el transporte de la pre-hormona a través de la membrana del retículo endoplásmico hacia la cisterna, donde se remueve el péptido señal y la proteína madura funcional es secretada al torrente sanguíneo (17,18).

Entre los efectos que promueven las GHs están algunos cambios metabólicos como el incremento de la síntesis de DNA y RNA, efectos diabetogénicos y acciones lactogénicas y mamotróficas. También están involucradas en la regulación de lípidos, carbohidratos, proteínas, minerales y nitrógeno. A la vez, actúan sinérgicamente para reforzar los efectos de otras hormonas. La función principal de las GHs es promover el crecimiento postnatal. Esto está asociado a una gran variedad de fenómenos fisiológicos, anatómicos y metabólicos. Las GHs pueden incrementar el uso de la glucosa en músculo y tejido adiposo, aumentar el transporte de aminoácidos a través

de las membranas de las células musculares, promover la oxidación del piruvato y la leucina y estimular la glucogénesis en el tejido adiposo (18). Los efectos de estas hormonas se llevan a cabo por acción directa mediante receptores de membrana para GH (19) e indirecta sobre varios tejidos. Los efectos indirectos son mediados por una serie de proteínas, como en el caso del factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-I) (20,21).

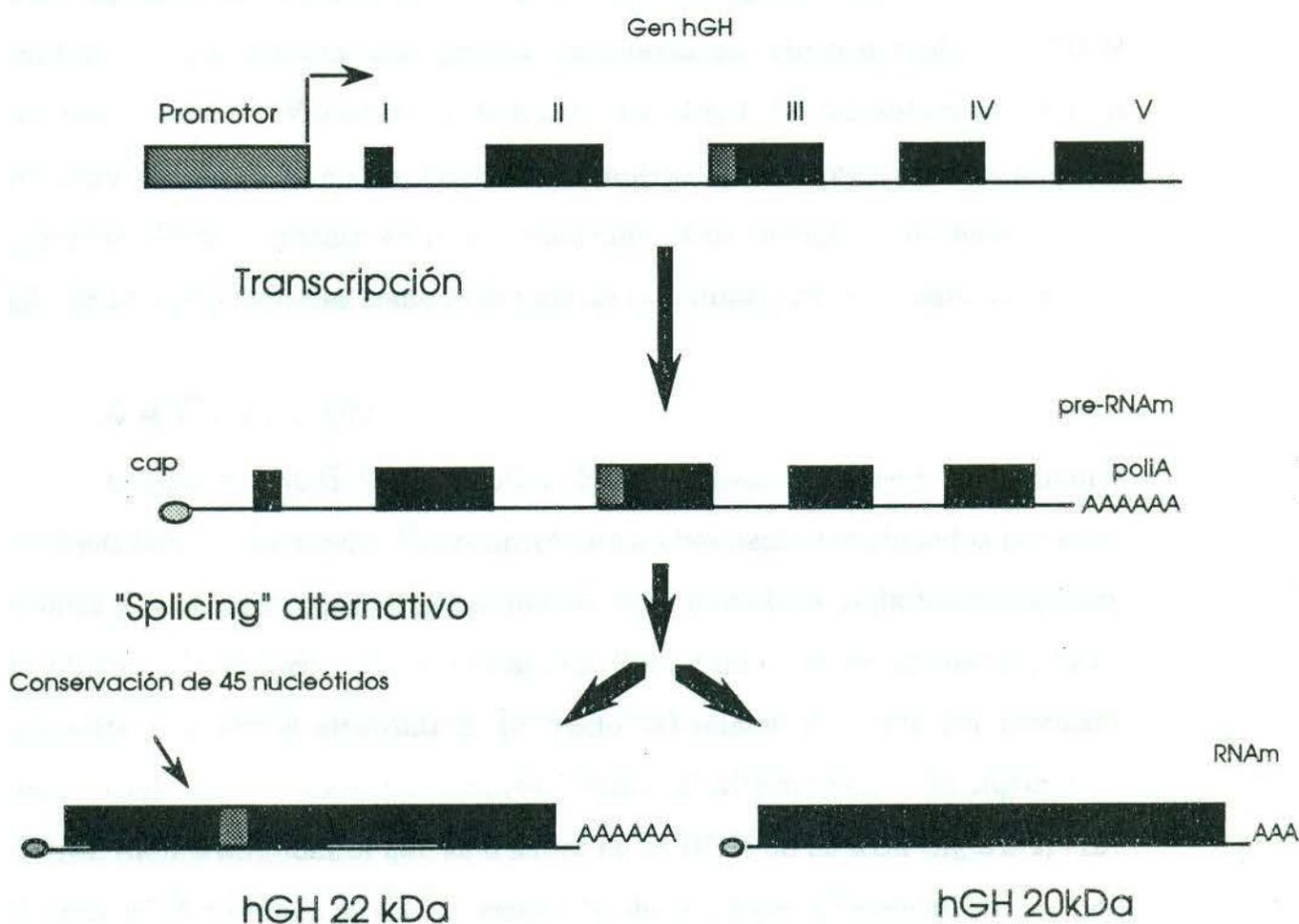


Figura 1. Remoción diferencial de intrones en el pre-RNA de hGH. Los genes que codifican para algunas GHs incrementan su potencial codificador mediante el mecanismo de "splicing" alternativo. Al remover diferencialmente del transcrito primario 45 nucleótidos del tercer exón, además del RNA para la hGH de 22 kDa, también se genera un más pequeño, el cual al ser traducido genera una proteína de 20 kDa. Este RNA representa el 10% mientras que el que codifica para la proteína de 22 kDa comprende el 90% .

Por su parte, la actividad biológica de la isoforma de 20 kDa de HGH conserva la actividad promotora del crecimiento, aunque ligeramente disminuída, no acelera la utilización de la glucosa y su actividad lipogénica e hiperglicemante es notablemente inferior a la de la isoforma de 22 kDa (9,22).

Las GH's estan filogenéticamente relacionadas con otras hormonas como la lactogénica placentaria (PL) y la prolactina (Pr1) (23). En el humano conforman una familia multigénica compuesta por cinco miembros: hGH-N (Normal), hGH-V (Variable), hPL-3, hPL-4 y hPL-1. De los anteriores, solo el primero se expresa en la hipófisis; mientras que el resto lo hace en la placenta. Recientemente se han encontrado otros miembros de esta familia génica en otras especies como es el caso de la somatolactina de salmón (24).

4.4 Clonación

Los genes hGH-N (25) y bGH (26,27) fueron clonados y su secuencia nucleotídica determinada. Se encontró que ambos están constituidos por cinco exones y cuatro intrones, al igual que los otros miembros de la familia génica: lactógeno placentario (25) y Prolactina (28). Como ya se mencionó, HGH presenta una forma alternativa producto del mismo gen, que por remoción diferencial de uno de sus intrones ("splicing" alternativo) da lugar a un RNAm menos abundante que se traduce en la HGH de 20 kDa (figura 1) (16). El gen bGH también presenta remoción de intrones diferencial de su pre-RNAm, aunque no se ha encontrado el producto proteico esperado (29). Los DNACs codificantes para las GHs humanas, incluyendo la hGH-V, fueron clonados (16,30,31) al igual que el DNAC de bGH. Su secuencia nucleotídica también fue determinada (32,33).

Se reportó la clonación del DNAC de bGH siguiendo diferentes

estrategias, las cuales requirieron algunas manipulaciones con DNA sintético (33,34). Por una parte se utilizó como rastreador molecular el DNAc de la hormona del crecimiento de rata (rGH) con lo que se logró identificar, después de tamizar un banco de DNAc de hipófisis bovinas, la secuencia codificante completa y las regiones no-traducibles hacia ambos extremos del DNAc. Se identificaron los 26 codones que cifran para el péptido señal y los restantes 190 residuos aminoacídicos concordaron casi completamente con la secuencia aminoacídica establecida previamente por Santome y Cols. (1973) (35). Siguiendo una estrategia alternativa por otra parte, se clonó el DNAc de bGH en el plásmido pBR322, aprovechando de éste el gen de la β -lactamasa para integrar en la fase de lectura correcta el DNAc de bGH, de tal manera que se logró la expresión de una proteína fusión entre bGH y la β -lactamasa (33,34). Algunos otros genes y DNacs de GHs de cordados fueron clonados por diferentes grupos de investigadores. La tabla 1 muestra algunas de éstas.

4.5 Producción de formas recombinantes

El DNAc de bGH se empleó para alcanzar altos niveles (de hasta el 15% de la proteína total) de expresión en *E. coli* siguiendo diversas estrategias. Se utilizó en fusión con la región codificante del gen de la β -lactamasa y se encontró la proteína fusión únicamente en citoplasma (33). También se modificó con la ayuda de DNA sintético la región que codifica para la proteína madura, incrementando la tasa transcripcional del gen y la eficiencia de la traducción, encontrándose que hasta el 15% de la proteína total correspondía a bGH (34). Cuando se reemplazó la región 5' que codifica para la proteína madura (a partir del codón 27), por codones ricos en A y T, se mejoró sustancialmente los niveles de expresión, y se encontró un papel

especialmente importante del codón posterior al sitio de iniciación para la traducción eficiente del transcrito (35).

Tabla 1. Algunos genes y DNACs de GHs clonados

Peces:

<i>Cyprinus carpio</i>	(36)
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	(GenBank X60419)
Carpa plateada (<i>Hipophthalmichthys molitrix</i>)	(37)
Carpa cabezona (<i>Hipophthalmichthys nobilis</i>)	(38)
<i>Onchorhynchus kisutch</i>	(39)
<i>Onchorhynchus keta</i>	(40)
Brema (<i>Pagrus major</i>)	(41)
Trucha arcoiris (<i>Salmo gairdneri</i>)	(42)
<i>Seriola quinqueradiata</i>	(43)
<i>Salmo salar</i>	(44)
Atún (<i>Thunnus thynnus</i>)	(45)

Anfibios:

Rana toro (<i>Rana catesbeiana</i>)	(46)
---------------------------------------	------

Aves:

Pato (<i>Anas platyrhynchos</i>)	(47)
Pollo (<i>Gallus domesticus</i>)	(48)
Pavo (<i>M. gallapavo</i>)	(49)

Mamíferos:

Bovina (<i>Bos taurus</i>)	(33,34)
Caballo (<i>Equus equus</i>)	(50,51)
Caprina (<i>Capra hircus</i>)	(52)
Mink (<i>Mustela vison</i>)	(53)
Porcina (<i>Sus scrofa</i>)	(54)
Ovina (<i>Ovis ovis</i>)	(55)
Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	(56)
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	(57)

En otra serie de experimentos se utilizó un pequeño "marco de lectura abierto" corriente arriba del DNAC de bGH, lo que le confirió a éste una configuración de gen bicistrónico, lo cual facilitó la traducción de la hormona al impedir la formación de estructuras secundarias en el extremo 5' del RNAm que pudieran interferir con la eficiencia de la traducción eficiente (58).

BGH activa se obtuvo al expresar el DNAC de ésta en tándem con el péptido señal del gen *lamB* con lo que BGH se secretó al periplasma y se encontró correctamente plegada. Su función biológica se analizó por su capacidad de unión a su receptor. Los niveles de producción de BGH fueron de 1 a 2 μg por ml de medio (59). Por otra parte se comprobó que plásmidos basados en el origen de replicación de pBR322 son poco útiles para la sobreexpresión de BGH y que ciertas mutaciones en las regiones que controlan la replicación del este plásmido en conjunción con cambios en la secuencia nucleotídica del DNAC de bGH incrementaron la tasa de expresión (60).

El DNAC de hGH se clonó y utilizó para expresarlo en *E. coli* como proteína de fusión con el producto del gen *trpD*, del operón triptófano de *E. coli*, lo que resultó en un 3% de producción de proteína de fusión en relación a la proteína total (61). A la vez se reportó la modificación del extremo 5' del DNAC de hGH mediante el uso de DNA sintético, de tal manera que codificaba únicamente para la proteína madura bajo el control del promotor **Lac**, con lo que se produjo por vez primera en *E. coli* un polipéptido humano en su forma madura (62).

Para obtener una proteína recombinante correctamente plegada y funcional, se recurrió a la producción de ésta de tal manera que la proteína madura se secretara hacia el espacio periplásmico de la bacteria, en donde el ambiente reductor de este compartimento celular permite la el plegamiento preciso de la proteína. La secreción de HGH al periplasma se logró siguiendo varias estrategias. Una de ellas consistió en utilizar el DNAC de hGH en fusión con la región que codifica para el péptido señal del gen de la fosfatasa alcalina de *E. coli*, con lo cual se logró la secreción de la proteína madura (63) y la producción se incrementó cuando se alteraron los codones que codifican

para el péptido señal (64). También se usó el péptido señal de la proteína de membrana externa (**OMP**) de *E. coli* para lograr producir una forma madura en periplasma, la proteína era correctamente procesada en el espacio periplásmico produciendo hasta 15 μg de HGH por ml de medio(65).

En otra estrategia, el DNAc de hGH se fusionó a la región que cifra para el péptido señal de la enterotoxina II termoestable de *E. coli* y, utilizando la inducción del promotor del gen de la fosfatasa alcalina de esta misma bacteria, el cual se encontraba regulando a la fusión enterotoxina-GH, las células sintetizaron de 15 a 25 μg de HGH por ml de medio, lo que representó de un 6 a 10% de la proteína total; de ésta el 90% era procesada y secretada al espacio periplásmico (66).

Una alternativa potencial para la producción de proteínas recombinantes, es la excreción de éstas hacia el medio de cultivo durante la fermentación, ya que esto permite que los procesos de purificación sean más rápidos y eficientes. El uso de la proteína liberadora de la bactericina permitió que HGH, la cual era secretada al periplasma gracias a la presencia del péptido señal de **OMP**; fuera excretada hacia el medio de cultivo, con un rendimiento de hasta 69.6 μg de HGH por ml de medio de cultivo (67). Otra estrategia ingeniosa para excretar HGH involucró el uso del promotor y péptido señal del gen de la penicilinasa (*kil*) de *Bacillus*; el gen *kil* era poco activo en *E. coli*, cuando se introdujo un híbrido *kil*-hGH a *E. coli* produjo HGH madura correctamente en el medio de cultivo (68).

Las GHs también fueron expresadas en células de mamífero en cultivo, bajo el control de las señales reguladoras propias de la maquinaria de expresión génica eucariote. Un gen quimera entre el DNAc de hGH y su propio gen se produjo en células murinas en cultivo. Se aprovechó la capacidad de transformación del virus del Papiloma Bovino y la potencia del

promotor transcripcional del gen de la Metalotioneina (MT) para producir HGH en líneas estables (69, 70). Utilizando los sistemas del promotor-potenciador del citomegalovirus (CMV) y del virus del sarcoma de Rous (RSV), aunado a la selección de sistemas de expresión estable, se obtuvieron líneas celulares de ratón que expresaban BGH (71,72). Los promotores del gen de MT murina y humana, se usaron para expresar transitoriamente BGH y HGH en células L murinas (73,74,75).

Un vector basado en el modelo del virus del herpes modificado, el cual portaba el gen de bGH bajo la regulación transcripcional del promotor de los genes tardíos de SV40, produjo hasta 750 ng de hormona por ml de cultivo de células de riñón de mono aullador (76). También, se expresaron formas truncadas de BGH en células murinas en cultivo bajo la regulación del promotor MT-I (77). El promotor MT en tandem con el potenciador del virus del simio tipo 40 (SV40) se utilizó para expresar HGH en células CHO (9,78). El DNAc de bGH y el de hGH bajo el control del potenciador del CMV expresaron su respectivo producto peptídico en células COS-7 (7,79).

La producción de GHs principalmente se desarrolló en sistemas basados en *E. coli*, aunque otros han sido explotados. Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* se logró la expresión de HGH en forma soluble integrando en el extremo 5' del DNAc de hGH una región que codificaba para algunos residuos aminoacídicos que permitieron la purificación fácil de la proteína a partir del extracto total, además portaban la señal de corte (Ile-Glu-Gly-Arg) para el factor proteolítico Xa, con lo que se liberó GH de la proteína madura. El rendimiento de GH fué del 5% de la proteína total (80). En *Streptomyces lividans* el promotor del gen *aph*, que codifica para la enzima aminoglicosido 3' fosfotransferasa, fue empleado para regular la transcripción del DNAc de bGH. Con éste se produjo BGH en forma constitutiva alcanzando niveles de

0.17% del total de la proteína de *S. lividans* (81). HGH fue expresada en *Saccharomyces cerevisiae* empleando el promotor del gen de la fosfatasa ácida y con la adición de DNA sintético en la secuencia codificante de HGH, se logró la expresión de la forma inmadura de esta proteína incrementando los niveles de expresión (82).

Otras GHs de diversas especies han sido expresadas en *E. coli*. Saito y Cols. (1988) clonaron y expresaron el DNAC de la hormona del crecimiento de anguila (*Anguilla japonica*), esto último bajo el control transcripcional del promotor **pL** del bacteriófago lambda. En este sistema se tuvo que eliminar la secuencia que codifica para los tres primeros aminoácidos para alcanzar niveles de producción de hasta el 5% de la proteína total (83). Por otra parte los DNACs de las GHs de la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) fueron expresadas primero como proteínas híbridas con la β -galactosidasa, empleando el plásmido pUC8 (84) y posteriormente, empleando el péptido señal de **OmpA**, se logró la producción de la forma madura de la proteína, expresándola en el periplasma de *E. coli* (42). La hormona del crecimiento del salmón también fue expresada en *E. coli* empleando el promotor del operón **Trp** y DNA sintético, lo que permitió la producción de la forma madura, llegando a obtenerse hasta el 15% de la proteína total (40). La hormona del crecimiento ovino (oGH) fue expresada a muy bajos niveles con 9-12 residuos aminoacídicos en el extremo amino terminal correspondientes a la β -galactosidasa (cuando se empleaba el promotor **Lac**) o donados por el operón del triptófano (al emplear el promotor **Trp**) (85). Los niveles de expresión se incrementaron cuando se introdujeron mutaciones al azar en el extremo 5' del DNAC de oGH y además empleando el gen de la β -galactosidasa del plásmido pUC 8 como fusión, se obtuvieron niveles de hasta el 20% de la proteína total (86). La hormona del crecimiento humano

variable (hGH-V), fue expresado en *E. coli* empleando el péptido señal **OmpA**; con éste se logró secretar hacia el periplasma la hormona madura (87).

4.6 Sistemas de expresión en *E. coli*

Los elementos que constituyen un plásmido de expresión procariótica y que son necesarios para alcanzar un buen nivel de expresión de una proteína heteróloga son entre otros: un origen de replicación para mantener la propagación y replicación del plásmido, un marcador de selección para asegurar su mantenimiento en la bacteria y las regiones reguladoras de la expresión; a saber: un promotor de la transcripción fuerte (como los promotores **Tac**, **Trc** o **pL**), un sitio de unión al ribosoma o región **Shine-Dalgarno** (complementaria a la subunidad 16S del RNA ribosomal). En ocasiones, algunos plásmidos portan además su propio codón de iniciación para asegurar la traducción, e incluso sitios únicos de restricción que facilitan la inserción del DNAC en la fase de lectura apropiada. Otros plásmidos llevan la información que codifica para el extremo amino o carboxilo de un péptido, lo que produciría una proteína híbrida o de fusión, la cual deberá ser modificada para liberar la proteína de interés (88).

4.7 Expresión de proteínas de fusión

Las proteínas de fusión fueron los primeros recursos usados para producir proteínas de mamífero en *E. coli*. Las razones para emplear proteínas de fusión van desde el evitar la degradación proteolítica por la bacteria hasta facilitar estrategias de purificación sencillas, e incluso dirigir la proteína a diversos compartimentos celulares (89).

Algunos de los sistemas de fusión génica permiten diferentes ventajas.

Entre éstos tenemos a la proteína de unión a fosfato (PhoS) (90), la glutatión S transferasa (91,92) y múltiples residuos de cisteína (93). A éstas se añade la proteína de unión a maltosa (MPB), la cual fue utilizada para este trabajo.

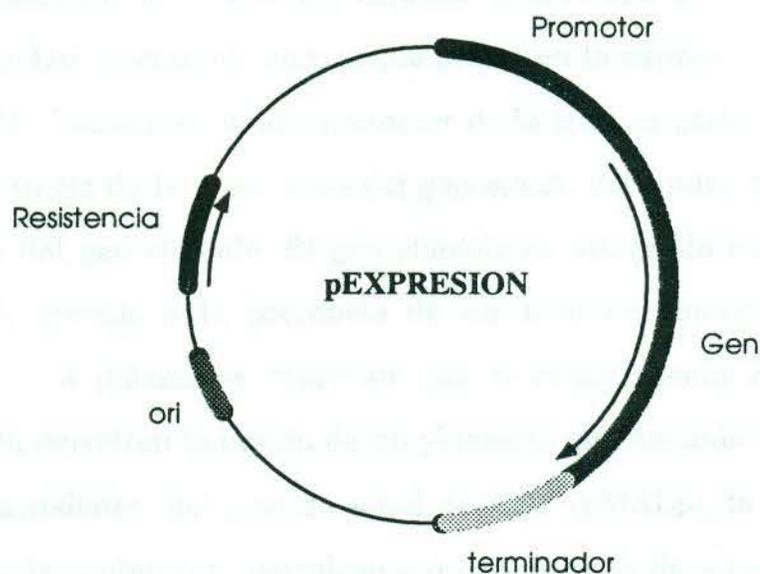


Figura 2. Plásmido típico de expresión procariótica. Estos plásmidos portan algunos elementos necesarios para su replicación (ori), genes de resistencia ó selección (como la B-lactamasa), promotor de la transcripción (Tac, Trc etc.), terminador de la transcripción y el gen que se desea expresar.

4.8 El modelo: proteína de fusión con MPB

La proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli* es una proteína periplásmica que facilita la difusión de la maltosa y maltodextrinas a través de la membrana externa, induce la respuesta quimiotáctica y permite la translocación del sustrato a través de la membrana citoplásmica. Tiene un péptido señal que permite la exportación de la proteína madura, el cual es cortado en el proceso de secreción (94).

Se ha aprovechado la MBP para construir vectores de expresión que poseen algunas ventajas para la sobreproducción de proteínas difíciles de expresar en *E. coli*, tales como el uso de regiones reguladoras de la expresión bastante potentes y propias del vector, señales para el corte proteolítico y subsecuente liberación de la proteína expresada en fusión (95,96,97). La serie de plásmidos pMAL portan elementos que permiten la expresión de genes en fusión con MBP. Tienen un fuerte promotor de la transcripción : **Tac** (98), y las señales de inicio de la traducción del gen *malE*, las cuales permiten una alta expresión del gen clonado. El gen clonado es integrado corriente abajo del gen *malE*, gracias a la presencia de un sitio de clonación múltiple. Originalmente, los plásmidos expresan una proteína fusión entre MBP y *LacZ*. También permiten la opción de un plásmido que además del gen *malE* que incluye los codones del péptido señal de MBP (pMALp), lo cual permite la secreción de la proteína al periplasma ó uno carente de aquel (pMALc) y cuya expresión es citoplásmica. Los vectores portan el gen *lacI^q* que codifica para el represor **Lac**, el cual mantiene apagada la expresión del promotor **Tac**, debiéndose utilizar Isopropil β -tiogalactosido (IPTG), un análogo de la alolactosa, para desreprimir el promotor e iniciar la expresión. Estos vectores llevan la señal de reconocimiento para la proteasa factor Xa (fXa), localizada en la región 5' del sitio de clonación múltiple, lo que permite que MBP sea separada de la proteína de interés (figura 3).

El rendimiento observado de expresión es bastante alto y los niveles de sobre-expresión pueden ser utilizados para purificar la proteína por métodos convencionales, como la purificación de cuerpos de inclusión (99).

4.9 El problema: baja expresión de bGH y hGH en *E. coli*

Los DNAC's de bGH y hGH de 20 y 22 kDa se expresaron eficientemente en células de mamífero en cultivo en nuestro laboratorio (Alvídrez-Quihui 1990, Rincón-Limas, 1993). Sin embargo, estos resultados no fueron logrados al tratar de expresar éstos en un sistema bacteriano.

Se han seguido diferentes estrategias para lograr la expresión en *E. coli* de las GHs con el promotor **Trc** utilizando el plásmido pKK233-2 (100). En este sentido el trabajo desarrollado por Ramírez-Angulo (3) involucró: 1) expresión del DNAC nativo de bGH, 2) expresión del DNAC de bGH con modificaciones en el extremo 5' introducidas mediante la inserción de DNA sintético, 3) expresión de bGH en fusión con el extremo 5' del DNAC de hPL, incluyendo el péptido señal, cuya expresión había sido probada en células de riñón de mono COS-7 en cultivo, 4) expresión de hGH en fusión con el extremo 5' del DNAC de hPL, incluyendo el péptido señal, y cuya expresión también había sido probada en células COS-7. Se trató de detectar la proteína mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y por "Western blot", sin embargo no se logró visualizar ésta.

Por otra parte, se analizó la presencia de RNA transcrito a partir de estos DNACs, mediante la técnica de "Northern blot" y en este caso sí se encontró la presencia del mismo en todas las bacterias inducidas, demostrándose que el problema es postranscripcional (3).

Además, en diferentes experimentos realizados por diversos grupos de investigación se demostró que la región que rodea al codón de inicio de la traducción juega un papel vital para la expresión de GHs en *E. coli*. La modificación de ésta, es necesaria para una eficiente traducción. Este problema se resolvió principalmente de dos maneras: 1) al modificar el

extremo 5' de la región codificante de las GHs, así como la secuencia y distancia entre el codón de iniciación de la traducción y la secuencia **Shine-Dalgarno** (58,60,101,102,103,104,105) y 2) al fusionar la GH con otro gen expresado eficientemente en *E. coli* o bien con el péptido señal de éste (40,42,59,62,64,65,67,83).

5. HIPOTESIS

Los resultados mostrados por Ramírez-Angulo (3) sugieren que los niveles de transcripción alcanzados por los DNAs bajo el control del promotor **Trc** son aceptables, por lo que el problema debe radicar más adelante en la vía de expresión del gen hacia la proteína. Postulamos que radica a nivel de la eficiencia de la traducción de los mensajeros de las GHs y para probarlo hemos planteado la siguiente hipótesis :

“ La expresión de una proteína de fusión que proporcione un extremo 5' de acceso fácil a los complejos de traducción permitirá la expresión de las GH's.”

6. OBJETIVOS

Para lograr la expresión de nuestras GHs en *E. coli* se propusieron los siguientes objetivos:

1. Derivar a partir de los plásmidos pMALc y pMALp aquellos recombinantes que porten el DNAc de bGH y de hGH de 20 y 22 kDa.
2. Inducir la expresión de las proteínas recombinantes en las bacterias transformadas con los plásmidos portadores de los DNAs de GHs.
3. Determinar la identidad de las proteínas expresadas mediante inmunorreacción con anticuerpos policlonales anti-bGH y anti-MBP.
4. Liberar mediante el corte proteolítico con el factor Xa a la hormona del crecimiento de la proteína de fusión.

7. MATERIAL Y METODOS.

Las enzimas de restricción utilizadas, así como la enzima DNA Ligasa de T4 fueron obtenidas de New England Biolabs (NEB, Beverly MA, EUA) y Bethesda Research Laboratories (BRL, Gaithersburg MD, EUA). Los amortiguadores fueron utilizados en las reacciones para cada enzima siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Los reactivos para las diferentes soluciones fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St Louis MO, EUA), Merck de México (Monterrey, N.L.) y Reactivos Monterrey (Monterrey, N.L.). El estuche de "Gene clean" fue adquirido de Bio-101 (La Jolla CA, EUA). El sistema de expresión en plásmidos pMAL, incluyendo el f(Xa), la cepa para expresión TB1 de *E. coli* y los DNAs sintéticos adaptadores, fueron adquiridos de New England Biolabs (Beverly MA, EUA). El estuche para determinación de la secuencia nucleotídica se compró a United States Biochemical (Cleveland Ohio, EUA). El azufre $\alpha^{35}\text{S}$ dATP se obtuvo de Amersham Ltd de México (México, D.F.). Los "primers" para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se adquirieron de Biosynthesis Inc. (Lewisville TX, EUA).

Las cepas de *E. coli* JM101 (para propagación de los bacteriófagos M13mp18 y 19) y RRI (para transformación con productos de reacciones de ligación) se obtuvieron del cepario de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG). El plásmido pBHX empleado como control positivo en los experimentos de expresión fue amablemente donado por el Dr. Daniel Baty del CNRS en Marsella. Las técnicas empleadas provienen de Sambrook y Cols. (107) a menos que se haga referencia a otra fuente.

7.1 Estrategias de clonación

El DNAC de bGH y los de hGH de 20 y 22kDa fueron clonados previamente en la ULIEG. A partir del plásmido p63, el cual porta el DNAC de bGH (5), se subclonó esta última región y se introdujo por mutagénesis sitio dirigida un sitio AflII entre el quinto y el séptimo codón que codifica para la proteína madura (Barrera-Saldaña, resultados no publicados). De este modo se obtuvo un nuevo sitio de restricción óptimo para la manipulación del DNAC de bGH.

Secuencia nativa del extremo 5' del DNAC de bGH

Proteína madura >

5' ATG.....TTC CCA GCC ATG TCC TTG GTC CGG3'

Secuencia modificada del extremo 5' del DNAC de bGH

Proteína madura >

5' ATG.....TTC CCA GCC ATG TCC TTA AGC CGG.....3'

AflII

Por otra parte los DNACs de hGH de 20 y 22 kDa se modificaron en los codones 7 y 8 que llevan la información para la proteína madura de tal manera que se introdujo un nuevo sitio XbaI.

Secuencia nativa del extremo 5' del DNAc de hGH

Proteína madura >

5' ATG.....TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCG AGT CTT.....3'

Secuencia modificada del extremo 5' del DNAc de hGH

Proteína madura >

5' ATG..... TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCT AGA CTT.....3'

XbaI

Cabe aclarar, que con la creación de estos nuevos sitios de restricción no se alteró la fase de lectura, ni se cambió el aminoácido codificado por los nuevos codones. Los plásmidos portadores de estos DNacs modificados (pSSbGH y pSShGH de 20 y 22 kDa) comprenden una fusión de éstos con los primeros cinco codones del DNAc de interleucina 2, lo cual es irrelevante para nuestro trabajo. Esta fusión IL-2-hGH está bajo el control transcripcional del promotor TAC en estos plásmidos, sin embargo en diferentes experimentos de inducción no se logró la expresión de la proteína.

Se partió de estos plásmidos recombinantes, los cuales donaron la región que corresponde a la región codificante para la proteína madura de las GHs desde el sitio AflII (en lo que respecta a bGH) y desde el sitio XbaI (para la hGHs) hasta el sitio HindIII, el cual flanquea el extremo 3' de ambos DNacs. Aún quedando por reconstituir los primeros codones de la proteína madura, es decir desde el primer aminoácido de ésta (Phe=TTC) hasta la señal de corte de las enzimas de restricción (AflII ó XbaI).

Para reconstituir los codones faltantes de las GHs, se diseñó una estrategia que involucró la participación de un fragmento de DNA sintético que se empleó como adaptador para ligar los DNAs de cada GH con el plásmido pMAL. Esta secuencia está diseñada de tal manera que los codones incluídos en ella son aquellos preferidos por *E. coli*, además se complementan de modo que dejan en un extremo la secuencia que reconoce la enzima de restricción, con la que se ha cortado cada uno de los DNAs de las GHs (AflII ó XbaI), y en otro extremo permite la ligación con una enzima de corte romo (p. ej. StuI).

Adaptadores de DNA sintético:

Para hGH:

5' TTC CCG ACC ATC CCG CTG T 3'
 3' AAG GGC TGG TAG GGC GAC AGA TC 5'
XbaI

Para bGH:

5' TTC CCG GCT ATG TCC 3'
 3' AAG GGC CGA TAC AGG AAT T 5'
AflII

De este modo se logró la clonación de los diferentes DNAs en fase de lectura correcta en los plásmidos pMAL. En resumen los elementos en las reacciones de ligación fueron:

- El plásmido pMAL cortado con las enzimas StuI y Hind III

- El DNA sintético adaptador

- El DNAC de las GHs desde el sitio introducido por mutagénesis sitio dirigida (AflII ó XbaI en su caso) hasta el sitio HindIII.



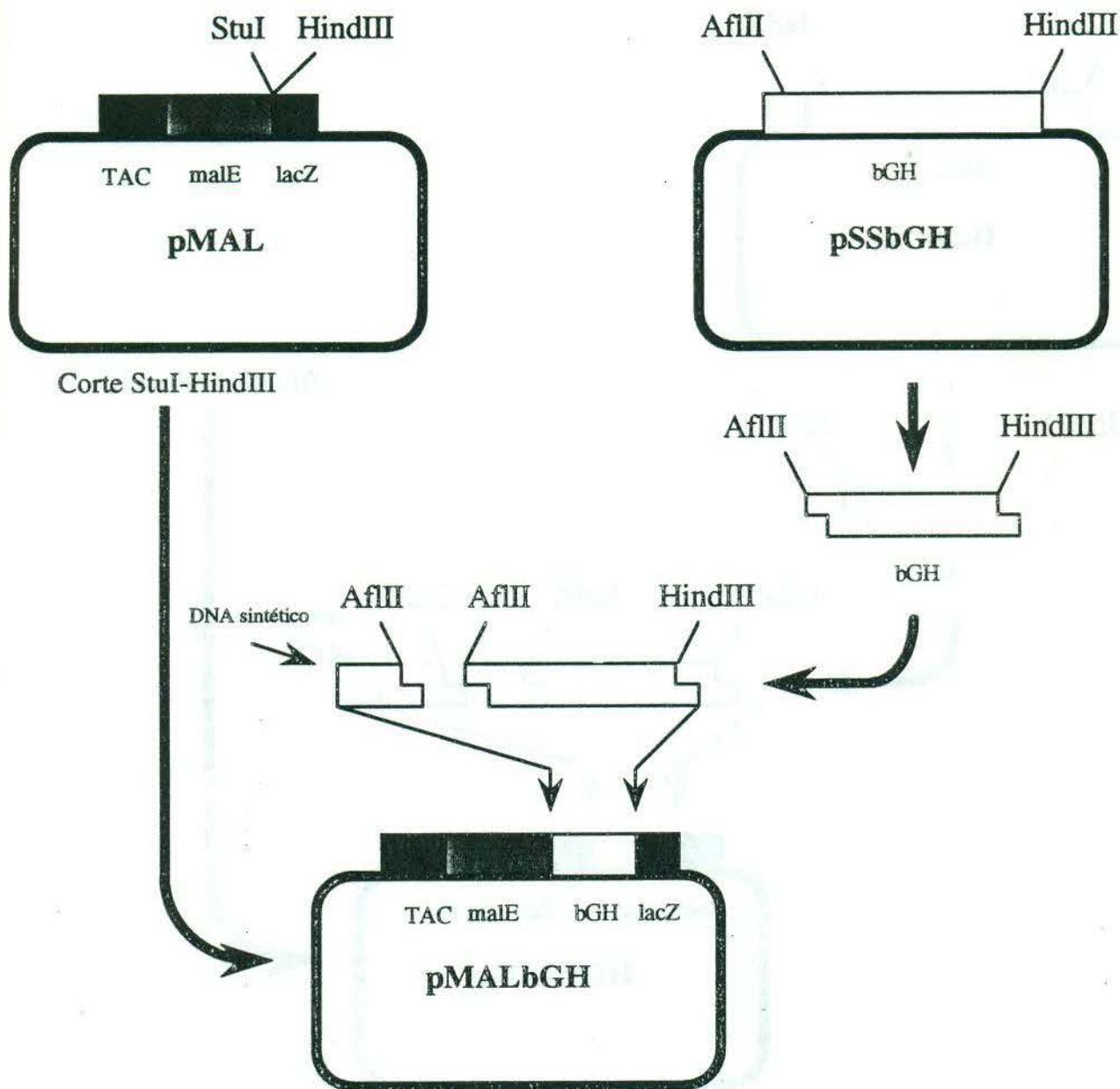


Figura 4. Estrategia para la construcción del plásmido pMALbGH. Para la construcción de este plásmido se partió de pMALp ó pMALc cortando en los sitios *StuI* y *HindIII* de la región del sitio múltiple de clonación. El fragmento portador del DNAc de *bGH* (668 pb) fue obtenido del plásmido pSSbGH cortando en los sitios *AflIII* y *HindIII*. Finalmente el DNA sintético adaptador eslabonó la región del plásmido pMAL con el DNAc de *bGH*.

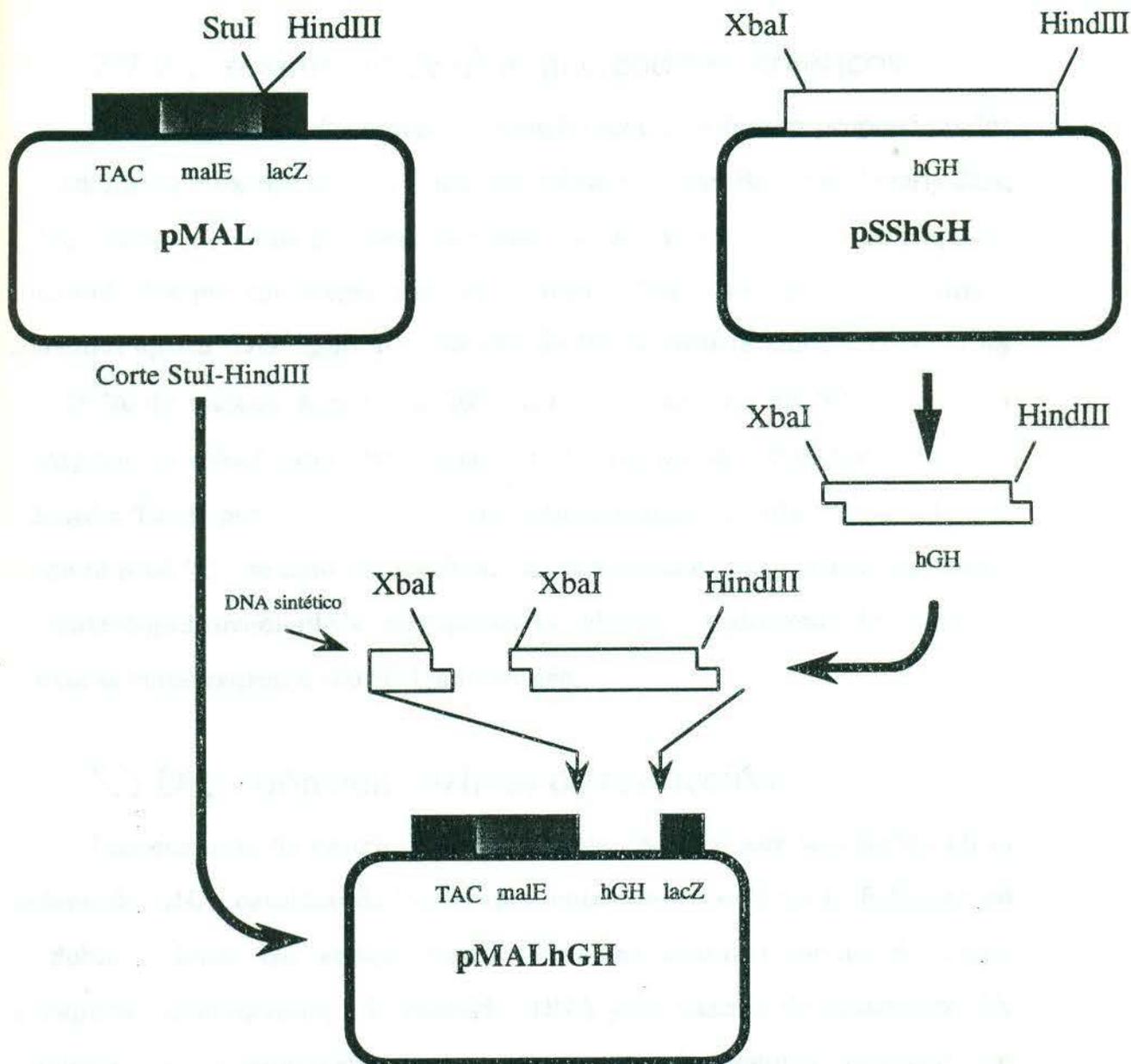


Figura 5 Estrategia para la construcción de pMALhGH. De manera similar a la construcción de pMALbGH, la serie de plásmidos portadores del DNAc de hGH se construyó partiendo de pMALp o pMALc (*StuI*-*HindIII*), los DNAs de hGH de 20 y 22kDa fueron liberados de los plásmidos pSShGH20K y pSShGH22K, respectivamente (*XbaI*-*HindIII*). El DNA sintético (18 pb) permitió la unión de hGH y pMAL donando el sitio *XbaI* y un extremo romo.

7.2 Apareamiento de oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos sintéticos complementarios fueron proporcionados en cadena sencilla por la casa comercial (New England Biolabs, Beverly MA, EUA). Para que éstos pudieran ser empleados en la clonación, se requirió ensamblarlos por complementaridad de bases (108). Con este fin se tomó 1 densidad óptica (DO A₂₆₀) de cada uno de los oligonucleótidos (1DO=33 µg de DNA de cadena sencilla a 260 nm) y se disolvió en 33 µl de agua ultrapura, se colocó cada alícuota con la alícuota de su complementario y se calentó a 70 °C por 5 min. Después de esto se transfirió cada tubo a un baño de agua a 65 °C , se dejó éste enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente, se centrifugó brevemente y se repartió la solución en alícuotas de 10 µl, las cuales se conservaron a -20 °C hasta su uso.

7.3 Digestión con enzimas de restricción.

Las enzimas de restricción son capaces de reconocer secuencias en la cadena de DNA, catalizando los rompimientos de los enlaces fosfodiéster en la doble cadena. Un ensayo típico con estas enzimas consta de: Agua ultrapura, amortiguador de reacción, DNA y la enzima de restricción. Se emplearon estas endonucleasas para obtener los fragmentos requeridos en las clonaciones (preparativas) así como para corroborar la identidad de los plásmidos (analíticas). Se usó mas de una enzima a la vez si ambas eran compatibles con el amortiguador de reacción. Por ejemplo:

Corte analítico de pMALc :

Agua.....	8.1µl
Buffer 3 (10X).....	1.0µl
DNA (1mg/ml).....	0.5 µl
<u>XbaI</u> (20 U/ml).....	0.2 µl
<u>HindIII</u> (20 U/ml).....	0.2 µl
Total.....	10.0 µl

Corte preparativo de pMALc :

Agua.....	6.0 µl
Buffer 3.....	2.0 µl
DNA (1 mg/ml).....	10.0 µl
<u>XbaI</u> (20 U/ml).....	2.0 µl
Total.....	10.0 µl

Se Incubó durante 2 h o más a 37°C ó a la temperatura óptima para la enzima. Cuando se realizaron cortes con enzimas que no comparten el mismo amortiguador, primero se cortó con una enzima y una vez obtenida una digestión total se precipitó con etanol, se resuspendió en amortiguador TE (Tris-HCl 100 mM pH 7.4, EDTA 1 mM) y el amortiguador de corte para la segunda enzima.

7.4 Ensayo con la DNA ligasa de T4.

Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre un extremo 5' monofosfato y el extremo 3' oxhidrilo de los fragmentos de DNA. Gracias a ésta, se pueden realizar recombinaciones entre fragmentos de DNA de diverso origen. El ensayo típico constó de los fragmentos de DNA a ligar (vector + inserto), la enzima DNA ligasa de T4, amortiguador de ligación con ATP y agua ultrapura. La reacción se incubó por 8 h o más a 16 °C.

7.5 Electroforesis en geles de agarosa.

Para lograr visualizar plásmidos, fragmentos de DNA derivados de

digestiones con enzimas de restricción, y los productos de ligaciones se realizaron electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. La agarosa al igual que la poliacrilamida proporciona un material de soporte por donde el DNA migra en respuesta a un campo eléctrico y su movilidad depende de su longitud. Esto nos permite diferenciar las moléculas de plásmido y sus fragmentos de acuerdo a su tamaño cuando teñimos el gel con bromuro de etidio, colorante que se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA y fluoresce al ser irradiado con luz ultravioleta (UV).

Se preparó una solución 50X de amortiguador de corrida (TAE 50X: 2.0 M Tris-acetato y 0.1 M EDTA pH 8.0). La solución de trabajo se diluyó a 1X. La solución de agarosa se preparó con TAE 1X a una concentración (P/V) acorde con el tamaño de los fragmentos que se esperaban, ordinariamente entre el 0.8 a 1.0 %. Para disolver la agarosa se calentó a ebullición y posteriormente se enfrió a 50-40°C. Se formó el gel montando un molde de acrílico y con su "peine" se formamaron los orificios para aplicar las muestras. Una vez montado el molde se vertió la agarosa. La agarosa tardó en solidificar aproximadamente 10 min. Una vez solidificada se pasó el gel a la cámara de electroforesis. Se Prepararon las muestras agregándoles una novena parte de su volúmen de solución 10X de "amortiguador de muestra" (50% v/v de glicerol, 0.1M EDTA pH7.5, 1.0% (P/V) SDS y 0.1% (P/V) azul de bromofenol). Esto con el fin de que el glicerol diera densidad e impidiera que la muestra se dispersara mientras que el azul de bromofenol sirvió como colorante de referencia. Los orificios para las muestras del gel se colocaron hacia el polo negativo, se conectó la cámara y se comenzó la electroforesis, primero a 40 V y una vez que las muestras entraron al gel se incrementó a 100 V. De acuerdo con los tamaños de los fragmentos que se esperaban fue el tiempo de corrida, se utilizó como referencia el colorante azul de bromofenol

del "amortiguador de muestra". Una vez terminada la corrida, se apagó la corriente, se recuperó y se tiñó el gel con bromuro de etidio (2.0 µg/ml) por 10 min. Para observar el gel, primero se lavó con agua desionizada los restos de bromuro de etidio del mismo y luego se llevó al transiluminador de luz UV.

7.6 Purificación de fragmentos de DNA mediante adsorción a sílica ("Gene clean").

Los fragmentos que se necesitaron para clonaciones fueron extraídos después de realizar cortes con las enzimas correspondientes y de haber resuelto en un gel de poliacrilamida o agarosa la banda correspondiente al fragmento de interés. El método de "Gene clean" permite purificar fragmentos de DNA mayores de 400 pb a partir de geles de agarosa. La agarosa es fundida después de separar la banda deseada y el DNA se une a una matriz de sílica.

Se aisló, cortando con un bisturí, la banda de interés de un gel preparativo de agarosa y se colocó en un tubo eppendorf. Se fundió el fragmento de agarosa en el tubo en un baño de agua entre 50 y 70 °C con 2.5 vol de una solución saturada de yoduro de sodio y se esperó a que la agarosa se disolviera completamente. Se agregaron 5.0 µl de sílica en suspensión en la solución de agarosa fundida, se mezcló bien y colocamos el tubo durante 5 min en hielo. Se centrifugó por 5 seg en una microcentrífuga y se eliminó el sobrenadante con una micropipeta. Agregamos 300 µl de la "solución nueva" (50% etanol y 50% Tris-HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 0.2 M y EDTA 2mM). Se resuspendió la pastilla y se centrifugó por 5 seg. Se repitió este paso dos veces mas. La última pastilla se resuspendió en 5 µl de TE. Se incubó a 50 °C por 3 min y se centrifugó 30 seg. Se transfirió el TE a otro tubo y se repitió la elución. El DNA permanece en solución con el TE. La recuperación se verificó

corriendo en una electroforesis una alícuota de la elución final y comparando el porcentaje de recuperación con una parte de la digestión preparativa que previamente había sido reservada.

7.7 Preparación de bacterias competentes para transformación

Escherichia coli ha sido el principal organismo utilizado para la propagación de plásmidos recombinantes. Para que la bacteria sea capaz de ser transformada por los plásmidos, es necesario someterla a un tratamiento con iones divalentes para permeabilizar la membrana, además para que los complejos DNA-Calcio interaccionen con ésta y al ser sometidas a un choque térmico se introduzcan al interior de la bacteria. Las bacterias transformadas son seleccionadas por su resistencia a algún antibiótico, dicha resistencia es conferida por el mismo plásmido que se introdujo. Las bacterias son esparcidas en cajas petri con medio de cultivo sólido conteniendo el antibiótico; los plásmidos utilizados contienen el gen de resistencia a ampicilina. Las colonias obtenidas fueron tamizadas para buscar el plásmido deseado.

Se inoculó una colonia de la bacteria en un tubo con 4 ml de LB (10 g de Bacto-Triptona, 10 g de NaCl y 5 g de Extracto de levadura para un litro, ajustando el pH a 7.4) y se dejó crecer toda la noche a 37 °C con agitación. Se pasó un ml del cultivo de toda la noche a un matríz con 100 ml de LB. Se siguió la cinética de crecimiento en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, hasta que se obtuvo una absorbancia de 0.4 a 0.5. Esto tomó poco más de 2 h. Se detuvo el crecimiento al poner las bacterias en hielo por 10 min. Se centrifugó por 5 min a 5000 rpm en refrigeración y se resuspendió en 5 ml de CaCl₂ 0.1 M frío y se mantuvo 30 min en hielo. Se centrifugó de

igual manera pero ahora se resuspendió en 1 ml de CaCl_2 0.1 M . Asi las bacterias están competentes y listas para transformación.

7.8 Transformación de bacterias calcio competentes.

Se agregaron 100 μl de bacterias *E. coli* RR1 competentes en un tubo eppendorf estéril y frío. Se pusieron en contacto con el plásmido por 30 min con agitación suave ocasional. Se realizó un choque de calor a 37 °C por 30 seg. Se incubó en hielo por 10 min mas. Se añadieron 100 μl de LB y se incubó a 37 °C por 20 min. Esto para que las bacterias se recuperaran y comenzaran a expresar el gen de resistencia. Se inocularon las bacterias en cajas Petri con antibiótico (ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) las células y se incubaron a 37 °C. Las colonias aparecieron después de 12 h. Ordinariamente se usó un testigo positivo de transformación (1.0 ng de pUC18) para estimar la eficiencia del experimento y un testigo negativo: TE estéril.

7.9 Obtención de DNA mediante minipreparación de plásmidos.

La obtención de plásmidos de las bacterias transformadas es requisito para analizar las clonas, producto de ligaciones ó cuando se necesitan cantidades de DNA pequeñas pero suficientes para realizar cortes con enzimas de restricción e incluso para aislar fragmentos para posteriores clonaciones. Los plásmidos, a diferencia del DNA cromosómico, son resistentes a desnaturalización al exponerse a pH alcalino, por lo que después del tratamiento con NaOH y de neutralizar el pH las proteínas y DNA cromosómico se desnaturalizan y por centrifugación forman una pastilla, el plásmido permanece en solución. En seguida se realizan extracciones de proteínas remanentes del sobrenadante con fenol-sevag y por

último se precipitan con isopropanol el DNA plasmídico y algo de RNA bacteriano.

Se eligieron algunas de las colonias producto de la transformación con DNAs sometidos a ligaciones y las colocamos en tubos con 4 ml de medio LB. Se dejaron crecer con agitación por 16 a 18 h a 37 °C. Se pasó el cultivo a tubos eppendorf y se cosechó mediante un par de centrifugaciones sucesivas a 772 g por 2 min. Se resuspendió en 100 µl de solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 24 mM Tris-HCl pH 8). Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de solución II (0.2 M NaOH y 1% SDS). Se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Se añadieron 150 µl de solución III (Acetato de potasio 3 M y ácido acético 2 M). Se colocó en hielo por 10 min. Se centrifugó por 5 min a 772 g. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se realizaron extracciones de proteínas con un volumen de fenol-sevag. Se mezcló al vortex y se centrifugó por 5 min a 772 g. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo. Se precipitó el plásmido y RNA con medio volumen de isopropanol y por centrifugación por 10 min a 13 000 rpm. Se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó por un min. Se secó la pastilla en un desecador centrífugo al vacío (Savant). La pastilla se resuspendió en TE con RNAsa (20 µg/ml). Se observaron los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa.

7.10 Obtención del DNA de plásmidos en gradiente de CsCl.

Con el fin de obtener plásmidos con alta pureza y en gran cantidad, realizamos esta técnica. Para realizarla es necesaria una ultracentrífuga y cloruro de cesio (CsCl). Se basa en que el DNA plasmídico y el cromosómico se comportan diferente cuando ambos son centrifugados en un gradiente de

CsCl saturado con bromuro de etidio; el DNA plasmídico por estar superenrollado intercala menos bromuro de etidio y mantiene su densidad, migrando más rápido en el gradiente. El DNA bacteriano por el contrario intercala más el colorante y su baja su densidad, migrando menos. Mediante esta técnica es posible obtener hasta unos cuantos mg de plásmido por litro de cultivo, con alta pureza y capaz de ser utilizado en ensayos de transfección de células en cultivo. Las soluciones de lisis y alcalinas son iguales a las usadas en la minipreparación, pero aumentando los volúmenes.

Se inoculó un tubo con 4 ml de medio LB mas antibiótico (Ampicilina 100 µg/ml) con la clona bacteriana que contenían los plásmidos: pMALc y pMALp así como cada uno de sus derivados que portaban los DNAs de bGH y hGH de 20 y 22 kDa. Se dejó crecer 16 a 18 h. Al siguiente día se inoculó un matraz con 500 ml de LB mas antibiótico con los 4 ml del cultivo de toda la noche. Se dejó crecer por 20 h con agitación a 37 °C. Se cosecharon las bacterias en una centrifuga DAMON/IEC refrigerada en botellas de plástico con el rotor 872 a 1003 g a 4 °C. Se añadió 18 ml de solución I y se resuspendió la pastilla de bacterias con una pipeta Pasteur. Una vez resuspendida, se puso 2 ml más de solución I con 10 mg/ml de lisozima A. Se incubó por 10 min. Se agregó 40 ml de solución II y se agitó en vortex. Se incubó 10 min en hielo. Se agregaron 20 ml de solución II mientras se agitaba al vortex. Se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó por 10 min a 1003 g. Se filtró el sobrenadante en una tela con poro fino, colocándolo en una probeta y se agregaron 0.5 volúmenes de isopropanol. Se centrifugó 1003 g por 10 min. Al terminar la centrifugación se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 3 ml de TE evitando la formación de grumos. Se pasó a un tubo Falcon de 15 ml nuevo y estéril. Se tomó 1.0 µl de esta solución se corrió en una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % para

estimar la abundancia del plásmido. Se utilizó un control de concentración conocida. Si este reflejaba una producción de al menos 1.0 mg del plásmido se continuó con la preparación. Se disolvieron 3.85 g de CsCl agregándolos a esta solución. Se mezcló bien evitando la formación de cualquier grumo. Se pasó esta solución a un tubo "Quick Seal" para rotor Ti65 de ultracentrífuga, ayudándose con una pipeta Pasteur, se añadió 0.5 ml de bromuro de etidio (10mg/ml) y se completó el llenado del tubo con aceite mineral. Se sellaron los tubos con calor y se colocaron en el rotor. Una vez adentro, se mezcló la solución invirtiendo varias ocasiones el rotor. Se colocó el rotor en la ultracentrífuga y se corrió a 18 144 g por 24 h. Se sacaron los tubos del rotor, manteniendo el cuarto con luz tenue, y se visualizaron las bandas, con luz UV de onda larga. Para extraer la banda que contiene el plásmido, primero se rompió el vacío con una aguja en la parte superior del tubo. Después con una jeringa con aguja delgada introducida justo abajo de la banda plasmídica y con el bicel orientado hacia arriba se comenzó a extraer ésta lentamente (aproximadamente 0.7 a 1.0 ml) y se colocó en un tubo eppendorf. Se eliminó el bromuro de etidio agregando 1 vol de n-butanol saturado con TE. Se centrifugó a 140 g por 3 min y se retiró la parte orgánica. Se repitió el paso hasta que desapareció completamente el color rojo de la solución. Se dializaron las muestras contra 2.0 l de TE por 5h en un tubo eppendorf cuya tapa se agujeró con calor y fué sellado con membranas de diálisis. Se trató con una concentración final de 10 µg/ml de RNasa por 30 min a 65 °C. Se agregaron SDS a una concentración final de 0.5 % y Proteinasa K a 50 µg/ml. Se incubó 1 h a 65 °C. Se extrajeron las proteínas con un volumen de fenol y se centrifugó a 1003 g por 5 min. Se transfirió la fase acuosa y se realizó otra extracción con un volumen fenol-sevag (1:1). Se repitió la centrifugación recuperando nuevamente la fase acuosa. Se realizó una extracción final con

un volumen de sevag, se centrifugó de igual manera y se transfirió a otro tubo la fase acuosa. A la última fase acuosa recuperada se añadió acetato de sodio a una concentración final de 0.3 M y 2.5 vol de etanol absoluto. Se guardó a -20°C por lo menos 2h y se centrifugó a 772 g por 30 min. Se disolvió el precipitado en 0.4 ml de TE y se agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto. Se centrifugó a 772 g por 15 min. Se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 772 g por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se secó la pastilla en el evaporador centrífugo al vacío (Savant). Se resuspendió en 500 µl de TE. Para estimar la concentración y pureza del DNA, se leyó la absorbancia a 260 y 280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro con una alícuota de 10 µl diluida en 1 ml de TE. Para obtener la concentración, se multiplicó la absorbancia por el factor de dilución (100) y por el factor de equivalencia (50 µg/ml). Los resultados se muestran en la tabla 2.

7.11 Inducción de la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*.

Se procuró cada vez que se llevó a cabo un experimento de expresión, partir de bacterias TB1 recién transformadas con la serie de plásmidos pMAL. Se tomó una colonia y se colocó en un tubo con medio LB (con 100µg/ml de ampicilina), se dejó crecer incubando por 16 a 18 h en agitación a 37 °C. Posteriormente, se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro (Sequoia-Turner) a una longitud de onda de 600 nm. Se midió la densidad óptica (DO) del cultivo y se tomó el volumen necesario de éste para que al hacer una dilución en medio LB nuevo, se tuviera una absorbancia de 0.5 DO a 600 nm. Se incubaron los tubos a 37 °C en agitación durante 15 min y se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM; se continuó la incubación por 3 h. Se analizó la expresión mediante

electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y por "Western blot" (electrotransferencia e inmunodetección).

7.12 Purificación de cuerpos de inclusión

El siguiente protocolo (109) fue utilizado para purificar cuerpos de inclusión a partir de un cultivo de 1 l de medio LB inducido por 3 h.

Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 280 g por 10 min, Éstas se resuspendieron en 10 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7.8 y EDTA 0.1 mM; se congelaron en nitrógeno líquido y se esperó a que se descongelara a temperatura ambiente. Se resuspendió en 100 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM y sacarosa 25%, después de resuspender se añadió lisozima a una concentración final de 1 mg/ml, se incubó en hielo por 90 min. Se agregó MgCl₂ (20 mM final) y DNAasa (50 µg/µl) y se incubó en hielo por 90 min. Se agregó 120 ml de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7.8, NaCl 0.2 M, desoxicolato 1 %, NP40 1.6 %, EDTA 2 mM y DTT 0.5 mM); se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó 10 min a 280 g y se eliminó el sobrenadante; la pastilla se resuspendió en 120 ml de: tritón X-100 0.5%, EDTA 1 mM y DTT 1 mM. Se centrifugó 3 min a 280 g y se repitieron los últimos dos pasos tres veces más. La última pastilla se disolvió toda la noche a 4°C en 50 ml de urea 9M, Tris-HCl 20 mM pH7.8 y DTT 20 mM. Se dializó contra 2 l de Tris-HCl 0.1 mM pH 7.8 y la concentración final se determinó leyendo la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

7.13 Reacción proteolítica con el Factor Xa

Una vez recuperadas las proteínas de fusión a manera de cuerpos de

inclusión, se procedió al corte enzimático con el factor Xa. Esta enzima, que forma parte de la cascada de reacciones en el mecanismo de coagulación sanguínea reconoce la secuencia de cuatro aminoácidos: Isoleucina, Glutamina, Glicina y Arginina, cortando hacia el carboxilo terminal de esta última, las proteínas de fusión creadas tienen esta secuencia justo entre el final de **MBP** y el inicio de las GHs, lo que permitió separar éstas. 5 µg de la proteína de fusión se disolvieron en amortiguador de corte del factor Xa: 20mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 2 mM CaCl₂. Se agregaron 200 µg del factor Xa y se incubó la reacción a temperatura ambiente y se obtuvieron muestras a diferentes tiempos de 4 a 72 h. Finalmente analizamos la reacción mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y por "Western blot".

7.14 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS e inmunodetección de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*

Para detectar las proteínas expresadas, se determinó la absorbancia final a 600 nm del cultivo después de 3 h de inducción, se cosechó 1 ml de bacterias y se resuspendió en amortiguador de muestra (Tris-HCl 50mM, pH 6.8, B-mercaptoetanol 5%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.1%, y glicerol 10%), de tal manera que se tenía 0.1 DO del cultivo inducido por ml de amortiguador de muestra. Se colocaron 30 µl de muestra por carril en el gel de poliacrilamida-SDS. Algunos geles se analizaron para determinar el porcentaje de proteína recombinante comprendida en el extracto total empleándose para ello un densitómetro Ultra Scann XL modelo 2222-020 (Pharmacia-LKB, Piscataway NJ). La inmunodetección se realizó después de

correr un gel de poliacrilamida-SDS y electrotransferirlo a membranas de nitrocelulosa, donde se lleva a cabo la reacción con el anticuerpo específico.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Se preparó el gel de resolución al 12.5% mezclando los siguientes reactivos:

Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8 %)	12.0	ml
Tris 3 M pH 8.8	7.5	ml
H ₂ O	9.9	ml
SDS 10%	0.3	ml
Persulfato de amonio (PSA 10%)	0.3	ml
TEMED	0.012	ml

Al mezclar los reactivos se añadió al final el TEMED , pues al estar en contacto con el persulfato se desencadena una reacción que libera los radicales libres que inducen la polimerización de la acrilamida y bisacrilamida en poliacrilamida. Una vez añadido el último reactivo (TEMED) se agitó suavemente y se vertió inmediatamente la mezcla entre las placas de vidrio desengrasadas previamente y con separadores. Se procuró llenar el 80% de la capacidad del espacio para formar el gel. Al final de vertir la solución de poliacrilamida, se agregó una capa de isopropanol absoluto para evitar que la mezcla tuviera contacto directo con el aire y así facilitar su polimerización. Se esperó a que el gel polimerizara (15 min) y se preparó el gel concentrador:

Acrilamida-bisacrilamida (30:0.8)	1.0	ml
Tris 3 M pH 6.8	0.75	ml
H ₂ O	4.1	ml
SDS10%	0.06	ml
Persulfato de Amonio (PSA 10%)	0.06	ml
TEMED	0.006	ml

Se mezcló y vació la solución entre las placas de vidrio y se introdujo el peine que sirve de molde para formar los pozos de aplicación de la muestra evitando las burbujas. Una vez completa la polimerización se retiró el peine y el separador inferior. Se montó el gel en la cámara de electroforesis con amortiguador de corrida (Tris-base 125 mM, glicina 250mM, SDS 0.5%, pH 8.3) procurando que no existieran burbujas de aire debajo del gel.

Para la aplicación de las muestras al gel, se colocaron en baño de agua en ebullición durante 5 min en amortiguador de muestra. Se pusieron las muestras en el gel con una jeringa Hamilton de 50 μ l y se inició la electroforesis a 80 V. Cuando la muestra penetró totalmente en el gel concentrador, se incrementó a 200 V. Se detuvo la corrida cuando el colorante de referencia salió del gel, se tiñió el gel por inmersión y agitación lenta en la solución colorante (Metanol 45%, ácido acético al 10% azul de Coomassie R250 al 0.25%) durante 2 h. se decoloró con agitación y varios cambios de solución decolorante (Metanol 45% y ácido acético 10%) hasta retirar el colorante de fondo no unido a proteína.

Inmuno-electrotransferencia o "Western blotting".

Después de la electroforesis de las muestras en gel de poliacrilamida-SDS, se montó el sistema de electrotransferencia. Se sujetaron las partes perfectamente con ligas de goma procurando que las rejillas ejercieran presión sobre las piezas del interior y posteriormente se colocaron en la cámara de electrotransferencia cubriéndolas totalmente con amortiguador de transferencia (Glicina 39mM, Tris-base 48mM, SDS 0.037%, metanol al 20% ajustando a pH 8.3). Se aplicó corriente y se dejó transferir por 2 h a 40 V. Se desmontó el sistema de transferencia, se retiró el filtro de nitrocelulosa y se secó a temperatura ambiente.

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, se incubó durante 2 h en solución de bloqueo (5% leche descremada en TBS 1X) (TBS es: Tris 50mM pH 7.4, NaCl 150 mM). Se incubó con el primer anticuerpo (antisuero de conejo anti-bGH) durante 1 h y se realizaron tres lavados de 10 min en TBST (TBS 1X + Tween 20 al 0.05%). Se incubó con el segundo anticuerpo (antisuero caprino anti-IgG de conejo) durante 1 h y se lavó tres veces durante 10 min con TBST. Se lavó dos veces en amortiguador PA (Tris HCl 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1M) y se incubó en la solución reveladora (66 µl de NBT 5% en dimetilformamida 70 %, 33 µl de BCIP 5% en dimetilformamida 100% y 5 mM MgCl₂).

7.15 Mutagénesis sitio dirigida usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Diseño del experimento: Una vez que se comprobó que los plásmidos derivados de pMALc y pMALp fueron capaces de producir una proteína de fusión se aprovecharon las señales reguladoras de la expresión y traducción optimizadas de éstos, particularmente de pMALp, para producir hormonas del crecimiento, sin tener que expresarlas en fusión con MBP completa.

La primera parte consistió en analizar la secuencia nucleotídica que codifica para el péptido señal de MBP. En ésta se encontró que el codón que cifra para el último aminoácido del péptido señal (GCC) podía ser utilizado al sustituir el primer codón de la proteína madura (AAA) por GGC, formando así el hexanucleótido GCCGGC, el cual es sitio de reconocimiento para la enzima *NaeI*, la cual deja extremos romos. De esta manera se aprovechó la introducción de este sitio de restricción para integrar los DNAs de las GHs en la fase de lectura correcta con el péptido señal de MBP.

Con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica que permite amplificar fragmentos de DNA *in vitro*, mediante una serie de duplicaciones, se procedió a realizar la mutagénesis sitio dirigida. Por una parte se diseñaron los "primers" o iniciadores, el primero de los cuales fué perfectamente complementario a la región 613-623 del plásmido pMALp, esta parte proporcionó un sitio de reconocimiento para la enzima ApaI. El segundo iniciador incluyó 36 bases que llevaban una serie de nucleótidos complementarios a la región del péptido señal y otra serie que creó un sitio EcoRI (GAACCC->GAATTC) además del nuevo sitio NaeI. Se diseñó el programa de amplificación en base a las temperaturas medias de fusión de los cebadores.

Se montó la reacción de amplificación en un tubo eppendorf de 0.5 ml.

DNA (blanco) pMALp (10ng/ μ l)	1.0 μ l
Amortiguador 10X	5.0 μ l
Cebador 5' (3.4 μ M)	1.0 μ l
Cebador 3' (1.7 μ M)	2.0 μ l
dNTPs (8mM)	1.2 μ l
MgCl ₂ (35 mM)	3.0 μ l
DNA pol Taq	1.0 μ l
Agua ultrapura	36.8 μ l

Se mezcló bien y se agregaron 50 μ l de aceite mineral. Se montaron los tubos en el aparato termociclador (MJ Research, Inc. PT-100) con el siguiente programa de 30 ciclos: Desnaturalización 95 °C por 30 seg, alineamiento 55 °C por 90 seg y extensión 72 °C por 45 seg

Se corrió en paralelo un testigo negativo de amplificación (10 ng de pMALc). Los resultados de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

7.16 Subclonación del fragmento amplificado.

Después de realizar la reacción de PCR al fragmento amplificado, se le hicieron extracciones con 1 vol de Sevag y se precipitó con un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M y 0.6 vol de isopropanol. Se centrifugó por 10 min y se descartó el sobrenadante, se lavó con etanol al 70% y se centrifugó a 772 *g* por 3 min. Por último se secó al evaporador centrífugo al vacío. Se resuspendió la muestra en 10 μ l de agua ultrapura y se realizó un corte con las enzimas ApaI y EcoRI. Por otra parte se preparó el vector pMALp cortado con ApaI y EcoRI y purificado por "gene clean". Ambos fragmentos se ligaron utilizando una relación molar vector:inserto de 1:5. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias competentes RR1 y las bacterias transformadas se analizaron para recuperar aquellas que portaban el plásmido de interés. El plásmido construido se le llamó pMAL(SS).

El plásmido pMAL(SS) se cortó con las enzimas NaeI y HindIII y se ligó al DNA sintético adaptador Romo-XbaI descrito anteriormente y con el DNAC de hGH 22 kDa (XbaI-HindIII). Se transformó con los productos de ligación y se analizaron varias colonias en busca del producto esperado (pMAL(SS)22kDa). Aquellas clonas que portaban el plásmido con el patrón de restricción adecuado se usaron para los experimentos de expresión. Después de la inducción de la expresión se analizaron las proteínas en geles de poliacrilamida-SDS y se procesó también para "Western blot". Además, se purificó su RNA con el fin de identificar el transcrito para GHs mediante PCR, previa síntesis de su DNA complementario.

7.17 Determinación de la secuencia nucleotídica por el método enzimático.

Para corroborar la introducción de la mutación creada y para corroborar la identidad de los adaptadores de DNA sintético, se recurrió al análisis fino determinando la secuencia nucleotídica por el método de Sanger. Para llegar a este fin, recurrimos a tres etapas: subclonación del fragmento en el bacteriofago M13mp18, reacción enzimática de polimerización y electroforesis en gel de poliacrilamida-urea.

Subclonación en el bacteriofago M13mp18: Los fragmentos EcoRI-EcoRV del plásmido pMAL(SS)hGH 22kDa, así como el fragmento BamHI-HindIII del plásmido pMALcbGH se ligaron al vector fágico M13mp18 mediante una reacción de ligación estándar.

Se prepararon bacterias *E. coli* JM101 competentes para transformación de la siguiente manera. Se sembró en un tubo con 4 ml de medio 2YT la bacteria, se incubó a 37 °C con agitación por 12 h. Se hizo una dilución 1:100 en 50 ml de medio 2YT y se tomó una muestra para leer la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, ésta se consideró como la absorbancia al tiempo cero, además se realizó una dilución 1:100 de las bacterias del cultivo de toda la noche en 4 ml de 2YT, el cual se mantuvo en agitación a 37 °C y se utilizó posteriormente al momento de la transformación. Se incubó a 37 °C en agitación y se esperó a que la absorbancia alcanzara 0.3 UO a una longitud de onda de 600 nm, lo que tomó alrededor de 1.5 h. Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 280 g por 5 min y se resuspendieron en 20 ml de CaCl₂ 0.1 M, frío y estéril, se incubó en hielo por 30 min. Se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ 0.1 M frío y estéril, se conservaron las bacterias en hielo. De esta manera las bacterias estaban listas para ser transformadas.

Transformación: Se colocaron en tubos eppendorf estériles una parte de la ligación previamente diluída con TE y se utilizaron en tubos separados un testigo positivo (1 ng de M13mp18) y otro negativo (TE estéril) de transformación. Se agregaron 100µl de bacterias competentes y se incubó por 30 min en hielo. 15 min antes de terminar la incubación, se fundieron 4 ml de medio suave (LB con 0.6 gr de agar por 100 ml), el cual se mantuvo a 47 °C. Se realizó un choque térmico a 42 °C por 2 min a las bacterias y se colocaron a temperatura ambiente. Se agregaron las bacterias competentes a los tubos con agar suave fundido, además de 50 µl de X-Gal (20 mg/ml), 10 µl de IPTG (0.1 M) y 100 µl de bacterias no competentes, se mezcló y se vertió el contenido en cajas petri con medio LB mantenidas a 37°. Se dejó solidificar y se incubó a 37 °C por 10 h. Las colonias portadoras de fagos con insertos aparecieron blancas, las no recombinantes fueron azules. Se inocularon las colonias blancas en tubos con 4 ml de 2YT a los cuales se había incubado previamente a 37°C en agitación con 40 µl de la cepa JM101 de *E. coli*. Se siguió incubando por 8 h más. Transcurrido este tiempo se cosecharon por centrifugación las bacterias en tubos eppendorf de 1.5 ml y se separó el sobrenadante en otros tubos estériles, los cuales se almacenaron a 4°C. La pastilla con las bacterias se procesó para la purificación de la forma replicativa del fago, del mismo modo en que se describió la minipreparación de plásmidos.

Purificación de la cadena sencilla. Se inocularon 11 ml de medio 2YT con 300 µl de *E. coli* JM101 en fase estacionaria y se incubó por 30 min a 37 °C con agitación. Se agregaron 10 µl del sobrenadante previamente cosechado y se continuó la incubación por 8 h. Se cosecharon las bacterias por centrifugación y se separaron 7.2 ml de sobrenadante distribuidos en

alícuotas de 1.2 ml en tubos eppendorf. Se agregaron 200 μ l de polietilenglicol (disuelto en una solución de NaCl 1.8 M), se mezcló y se centrifugó por 5 min a 13 000 rpm. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se reasuspendió en 100 μ l de TE, después de lo cual se agregaron 100 μ l de fenol, se mezcló al agitador tipo vórtex y se centrifugó a 772 g por 2 min. Se recuperó la fase superior y se juntó el contenido en tres tubos de 1.5 ml (180 μ l en cada tubo). Se agregó 1 ml de éter etílico y se mezcló, se centrifugó por 5 min a 772 g y se retiró el éter, se repitió este paso una vez más. Finalmente el contenido se reunió en tres tubos donde se añadieron 90 μ l de acetato de sodio 3 M y 800 μ l de etanol al 100%, se mezcló y se colocó a -20 °C por 1 h. Se centrifugó a 772 g por 10 min y se tiró el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se secó al evaporador centrífugo con vacío. Se resuspendió en 20 μ l de TE. Se determinó la concentración del DNA por espectrofotometría a 260 nm, y su pureza relativa leyendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 y 280 nm. Se corrieron las muestras en una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar el resultado.

Apareamiento del templado y del cebador. Se realizó la siguiente reacción en un tubo de 1.5 ml :

Cebador (0.5 pmol/ μ l).....	1 μ l
Amortiguador de enzima.....	2 μ l
DNA (150 μ g/ μ l).....	7 μ l

Se calentó el tubo a 65 °C a baño maría por 2 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que alcanzó 25-30 °C.

Reacción enzimática. Se diluyó la mezcla de nucleótidos (dGTP, dCTP, dTTP, dATP 7.5 μ M), seis veces con agua ultra pura. Lo mismo que la enzima Secuenasa pero 1:8 con TE frío y mezclamos en un tubo en el siguiente orden:

DNA + cebador.....	10.0 μ l
DTT 0.1 M.....	1.0 μ l
dNTP's diluídos.....	2.0 μ l
³⁵ S dATP (10 μ Ci/ μ l).....	0.5 μ l
Secuenasa diluída.....	2.0 μ l

Se incubó a temperatura ambiente por 5 min

Reacción de terminación. Se etiquetaron cuatro tubos con las letras G, A, T y C y se agregó 2.5 μ l de la mezcla de terminación correspondiente, se calentaron estos tubos a 37 °C por 1 min. Se tomaron 3.5 μ l de la mezcla de reacción y se colocaron en los tubos que contenían los didesoxinucleótidos. Se incubó por 5 min más a 37 °C. Finalmente se añadieron 4 μ l de la solución inactivadora ("stop solution"), se mezcló y se colocó en hielo hasta realizar la electroforesis.

Preparación de geles de acrilamida-urea para secuenciamiento. Se utilizaron dos placas de vidrio, una de 33x38 cm y otra de 33x40 cm, también separadores en gradiente de 0.4 a 1.2 mm y un peine tipo "dientes de tiburón". Las placas de vidrio se lavaron intensamente con detergente y se enjuagaron con agua desionizada cuidando de no dejar manchas de grasa en éstas. Se ensamblaron las placas colocando sobre la placa mayor los separadores y sobre éstos la placa más pequeña. Se

colocó una tira de cinta adhesiva en los laterales y al fondo del molde. Se aseguró este ensamblaje con pinzas especiales .

Se preparó un gel a una concentración del 8% con la siguiente mezcla:

Solución de acrilamida-bisacrilamida (30.0-0.8%) ¹	...56.23 ml
Solución de urea 7.7M ²	84.0 ml
Persulfato de amonio al 10%.....	0.665 ml
TEMED.....	0.035 ml

¹Esta solución se conservó a 4°C y en la oscuridad.

²La solución de urea 7.7 M se preparó en TBE 1X.

Se colocó el molde en un ángulo de 45° y se vertió la mezcla de poliacrilamida-urea. Se puso el peine con los dientes de éste hacia afuera del gel y se dejó polimerizar por espacio de 40 min.

Se retiró la cinta que estaba al rededor del molde y éste se ensambló en una cámara de electroforesis vertical. Se retiró cuidadosamente el peine y se lavaron los restos de urea. Se reintrodujo el peine con los dientes indicando hacia abajo e introduciendolo ligeramente en el gel para formar los carriles. Los tanques de la cámara de electroforesis se llenaron con TBE 1X.

Se recorrió el gel a 1200 V por 1 h. Finalmente se prepararon las muestras calentandolas a 75°C por 2 min y se colocaron inmediatamente en el gel 2.5 µl de la muestra en el orden G A T C, cada reacción en un carril. Se corrió la muestra a 1200 V por espacio de 6 h. Finalmente se apagó la corriente y se desmontó el molde, se desprendió una de las placas y aquélla en donde se quedó adherido el gel se sumergió en una solución de metanol-ácido acético (12-10%) por 40 min. Utilizando papel filtro Wattman 3MM, el cual se colocó sobre la superficie del gel, se adhirió éste al papel. Se cubrió el gel con "saram wrap" y luego se secó en un secador de geles con vacío y a

80°C por 4 h. Finalmente, se colocó el gel seco en un chasis cargado con película sensible a rayos X, donde se dejó exponer por 48 h.

8.RESULTADOS

8.1 Clonación

Los vectores plasmídicos de expresión pMALc y pMALp, se utilizaron para transformar bacterias competentes, las cuales se propagaron a gran escala y a partir de las cuales se purificaron los plásmidos en gradiente de CsCl. Los plásmidos recombinantes derivados de pMALc y pMALp que portaban los DNAs de las diferentes GHs (bGH y hGH de 20 y 22kDa) también fueron purificados en gradiente de CsCl. La tabla 2 muestra los valores obtenidos después de leer la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 y 280 nm, la relación 260/280 se calculó para evaluar la calidad del DNA obtenido (una relación igual ó mayor a 1.8 es el valor óptimo), la concentración y el rendimiento también se muestra en esta tabla para cada plásmido. Los fragmentos purificados por "Gene clean" fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6A) al igual que los productos derivados de las reacciones de ligación (Figura 6B). Se corroboró la identidad de los plásmidos recombinantes por cortes con enzimas de restricción. Las figuras 7, 8, 10,11, 12 y 13 muestran los mapas de restricción y los análisis electroforeticos de los cortes con enzimas de restricción de los plásmidos derivados de pMALc y pMALp. La figura 9 muestra la autorradiografía obtenida después de exponer el gel de secuenciación donde se analizó la región de pMALcbGH que abarca la unión del gen *malE*, el DNA adaptador y el inicio del DNAc de bGH.

Tabla 2

Valores obtenidos en la purificación de plásmidos en gradiente de cloruro de cesio

Plásmido	A260	A280	260/280	Concentración
pMALc	0.014	0.07	2.0	0.7 µg/µl
pMALchGH20	0.021	0.011	1.9	1.0 µg/µl
pMALchGH22	0.025	0.012	2.0	1.2 µg/µl
pMALcbGH	0.005	0.002	2.0	0.2 µg/µl
pMALp	0.008	0.003	2.6	0.4 µg/µl
pMALphGH20	0.005	0.002	2.0	0.2 µg/µl
pMALphGH22	0.008	0.004	2.0	0.4 µg/µl
MALpbGH	0.005	0.002	2.0	0.2 µg/µl

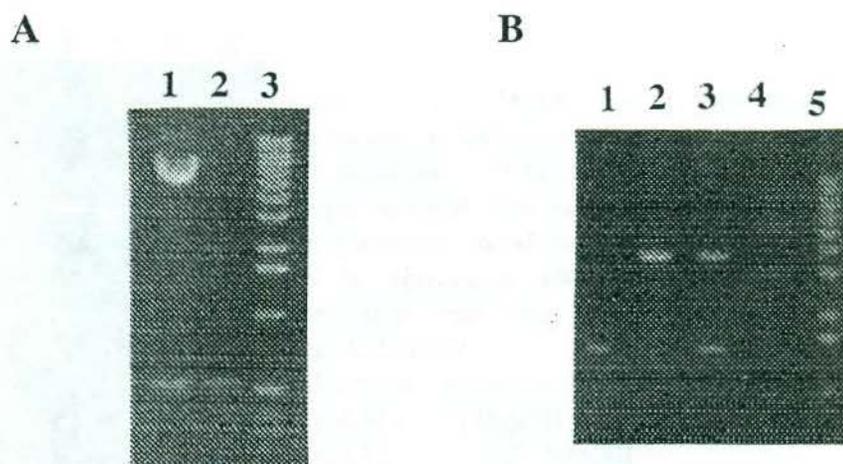
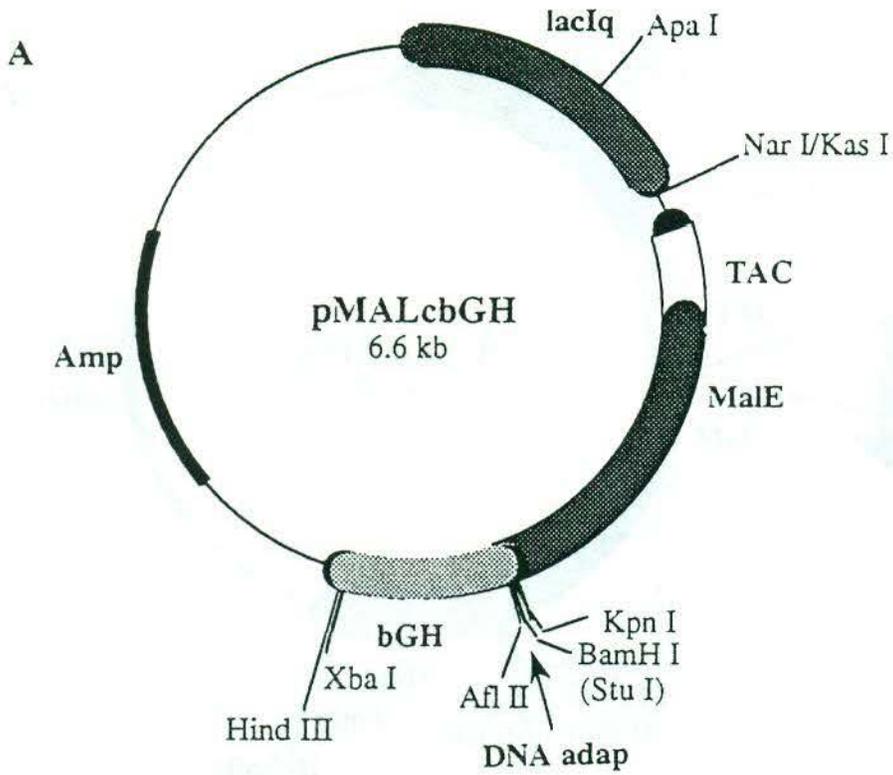


Figura 6. Análisis electroforéticos de los productos de "Gene clean" y de ligación. A) Después de realizar la técnica de "Gene clean" los productos fueron analizados en electroforesis de agarosa 1%. 1) pSSHGH cortado con *Xba*I y *Hind*II; 2) fragmento correspondiente al DNAC de hGH desde el sitio *Xba*I hasta *Hind*III. B) Análisis del producto de ligación. 1) Fragmento purificado 2) vector purificado; 3) control no ligado; 4) producto de ligación y 5) Marcador de peso molecular (Lambda cortado con *Eco*RI y *Hind*III)



B

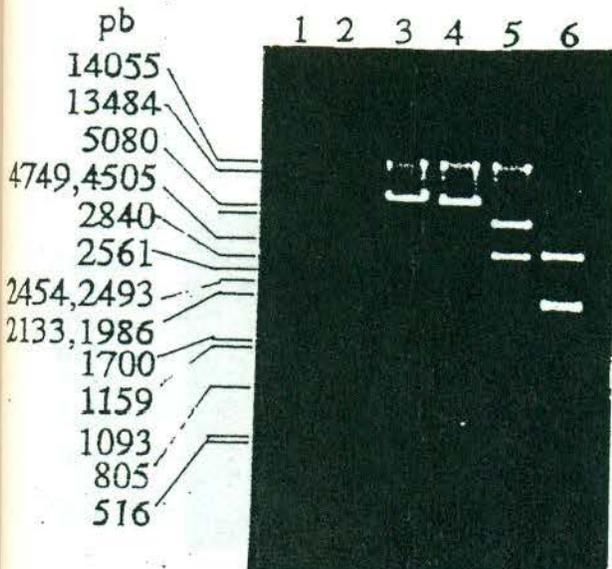


Figura 7. Mapa de restricción y Caracterización con enzimas de restricción de los plásmidos pMALcbGH y pMALpbGH. A) Mapa de restricción mostrando los sitios únicos del plásmido pMALcbGH. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones con enzimas de restricción. Orden en el gel:

- 1: pMALcbGH
- 2: Lambda cortado con PstI
- 3: pMALcbGH HindIII
- 4: pMALcbGH AflII-HindIII
- 5: pMALcbGH ApaI-HindIII
- 6: pMALcbGH PvuII

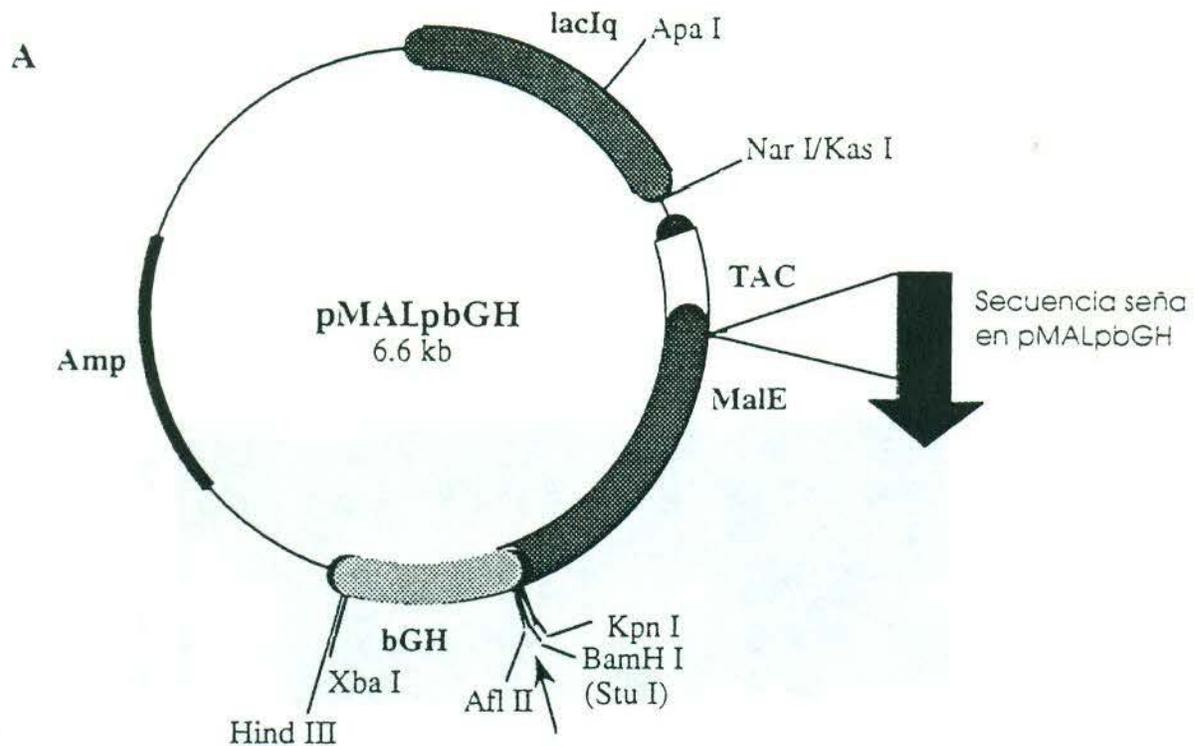
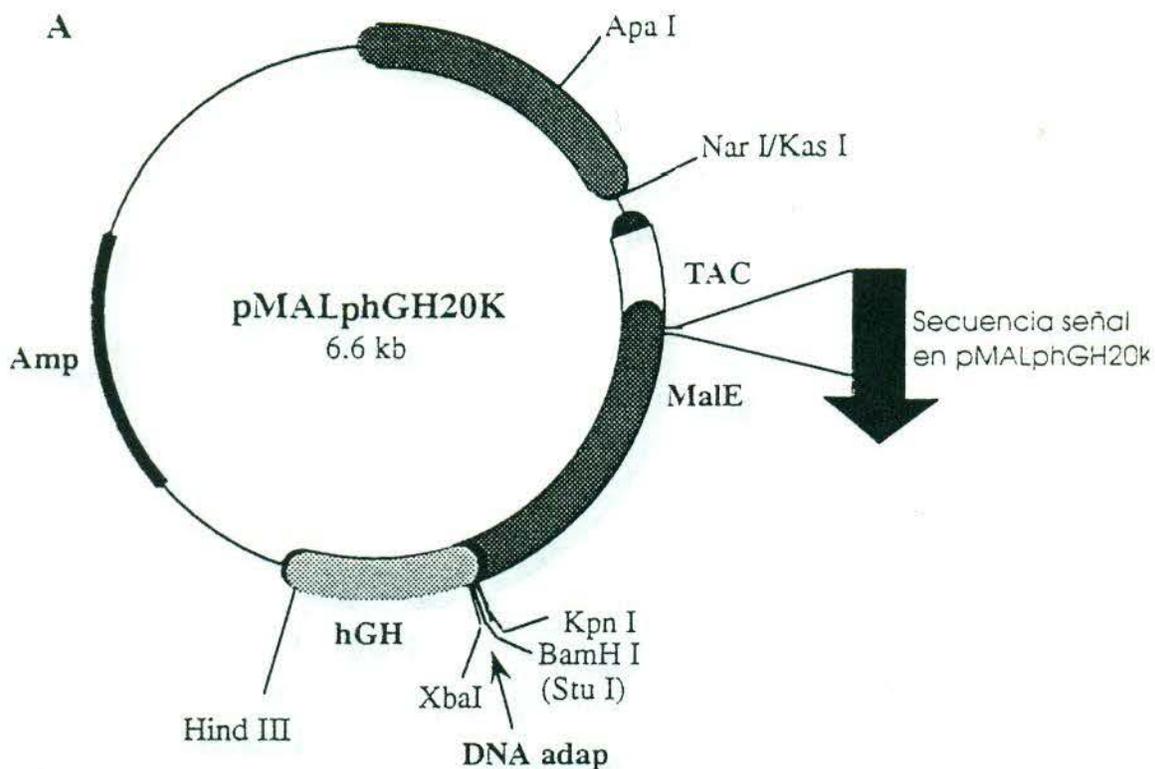


Figura 8. Mapa de restricción y Caracterización del plásmido pMALpbGH. **A)** Mapa de restricción mostrando los sitios únicos del plásmido pMALpbGH. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones con enzimas de restricción. Orden en el gel:
 pMALpbGH
 Lambda cortado con BstEII
 pMALpbGH HindIII
 pMALpbGH AflII-HindIII
 pMALpbGH ApaI-HindIII
 pMALpbGH PvuII



B

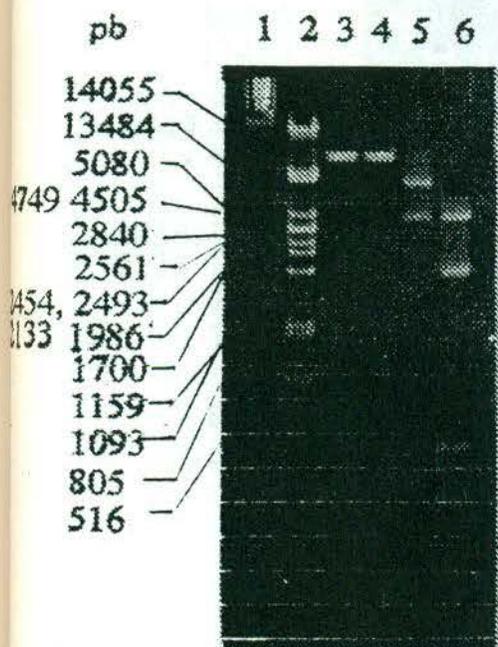


Figura 10. Mapa de restricción y caracterización de pMALphGH20k. A) Mapa de restricción mostrando los sitios únicos del plásmido pMALp20k. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones con enzimas de restricción. Orden en el gel:
 pMALphGH20k
 Fago Lambda cortado con PstI
 3:pMALphGH20k HindIII,
 4:pMALphGH20k HindIII-XbaI,
 5:pMALphGH20k HindIII-ApaI,
 6:pMALphGH20k PvuII

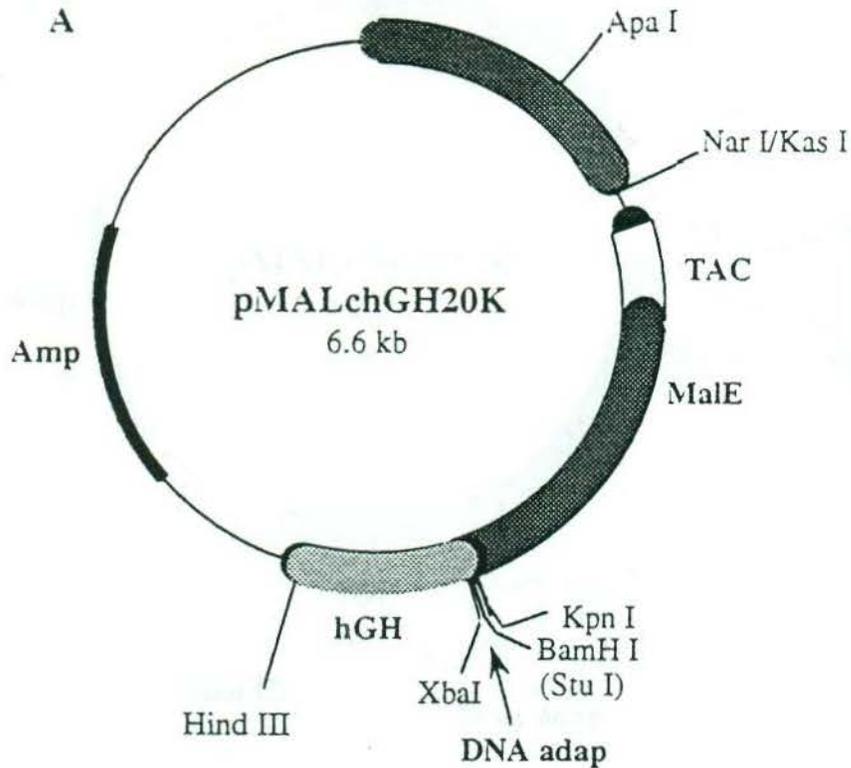
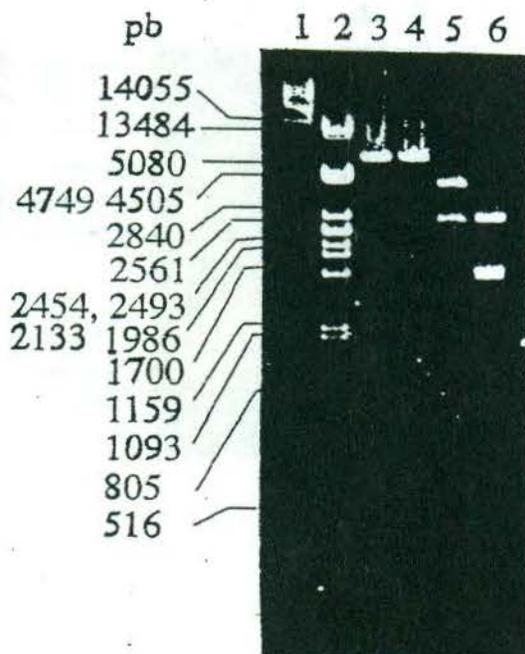
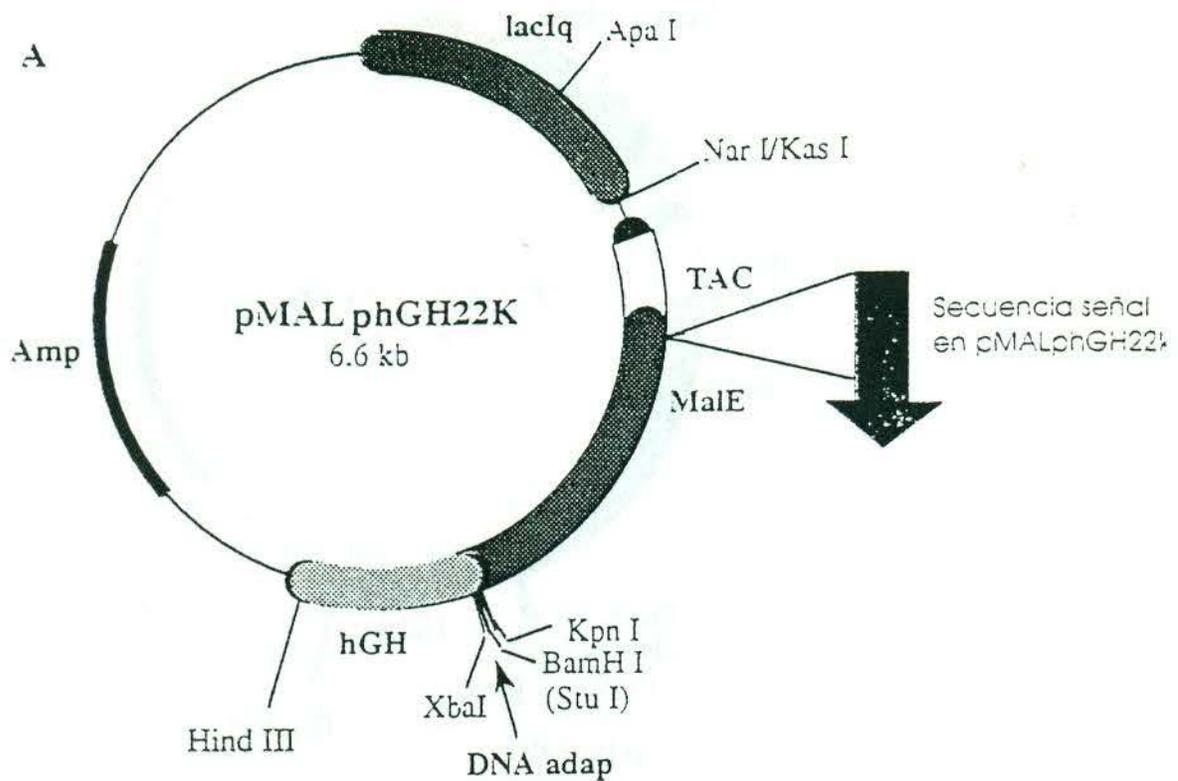
**B**

Figura 11. Mapa de restricción y caracterización de pMALc20k. A) Mapa de restricción mostrando los sitios únicos del plásmido pMAL20k. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones con enzimas de restricción. Orden en el gel:

- 1: pMALchGH20k
- 2: Fago Lambda cortado con *Pst*I
- 3: pMALchGH20k *Hind*III,
- 4: pMALchGH20k *Hind*III-*Xba*I,
- 5: pMALchGH20k *Hind*III-*Apa*I,
- 6: pMALchGH20k *Pvu*II



B

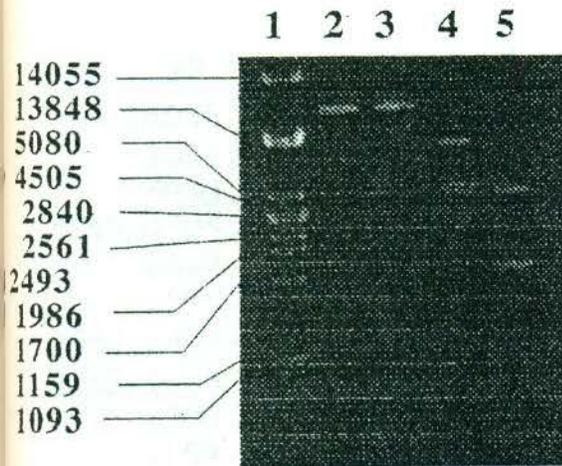


Figura 12. Mapa de restricción (A) y caracterización de los plásmidos pMALphGH22K (B). A) Mapa de restricción mostrando los sitios únicos del plásmido pMALphGH. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones con enzimas de restricción. Orden en el gel: Lambda PstI
pMALpbGH HindIII
pMALpbGH XbaI-HindIII
pMALpbGH ApaI-HindIII
pMALpbGH PvuII

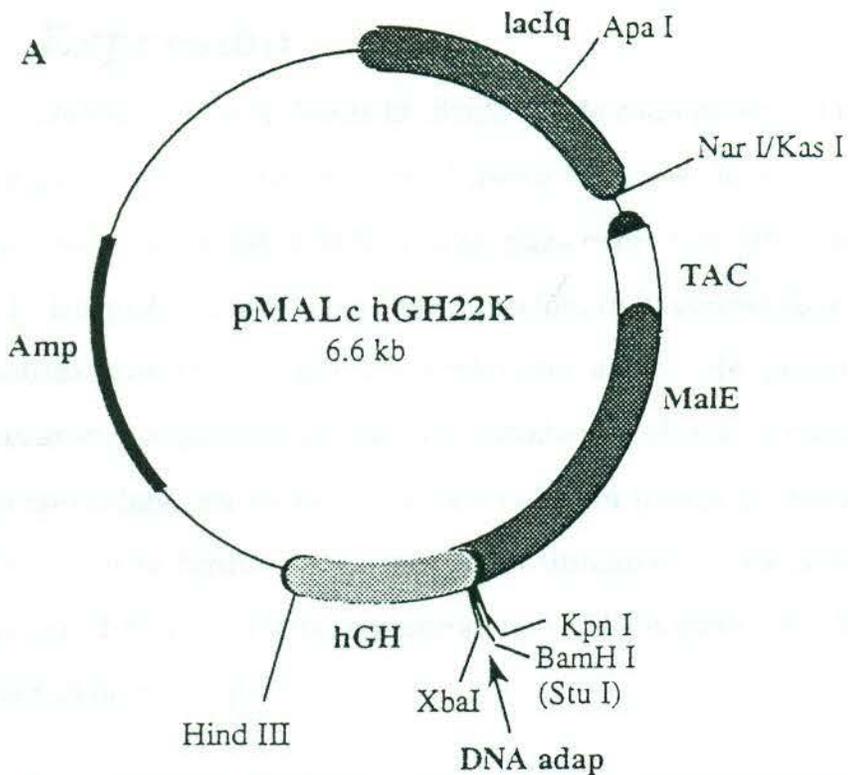
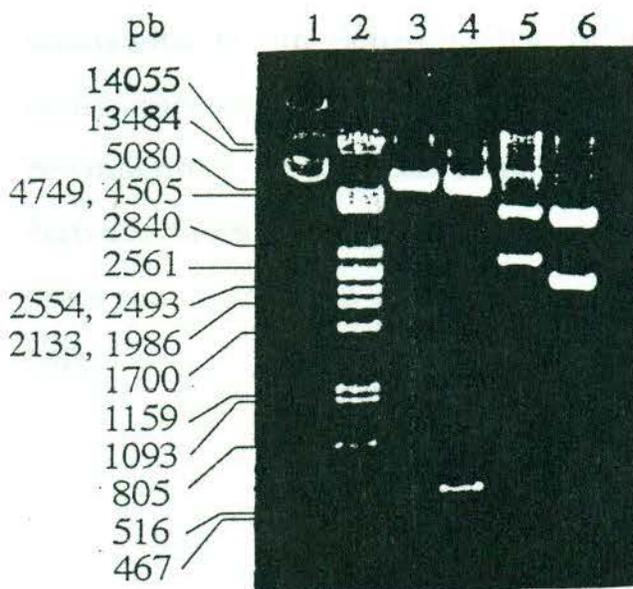
**B**

Figura 3. Mapa de restricción (A) caracterización de los plásmidos pMALchGH2. (B). A) Mapa de restricción mostrando los sitios únicos del plasmido pMALcbGH. B) Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las digestiones con enzimas de restricción. Orden en el gel:

- 1: pMALcbGH
- 2: Lambda *Pst*I
- 3: pMALcbGH *Hind*III
- 4: pMALcbGH *Afl*II-*Hind*III
- 5: pMALcbGH *Apa*I-*Hind*III
- 6: pMALcbGH *Pvu*II

Expresión

Después de corroborar la identidad de cada plásmido mediante cortes con enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa, a las bacterias transformadas con éstos se les indujo para expresión con el análogo de la lactosa IPTG. Después de tres horas de inducción, las bacterias fueron cosechadas y las proteínas analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Se observaron que algunas clonas que portaban el plásmido recombinante adecuado no presentaban en su perfil proteico alguna banda prominente, mientras que otras sí. En la figura 14 se muestran únicamente las clonas que si lograron expresar dicha proteína adicional (tres derivadas de pMALc y otras tres derivadas de pMALp).

La proteína de fusión correspondió aproximadamente al 30% de la proteína total de *E. coli* como lo demostraron algunos geles de poliacrilamida donde se corrieron extractos totales de bacterias inducidas y que fueron analizados en un densitómetro. Además los ensayos tipo "Western blot" corroboraron que la proteína adicional era un híbrido entre hormonas del crecimiento y la proteína de unión a maltosa, ya que la banda prominente derivada de los extractos de proteínas totales de bacterias inducidas reaccionaba tanto con anticuerpos anti-GH, como con anticuerpos anti-MBP (figura 15A y 15B).

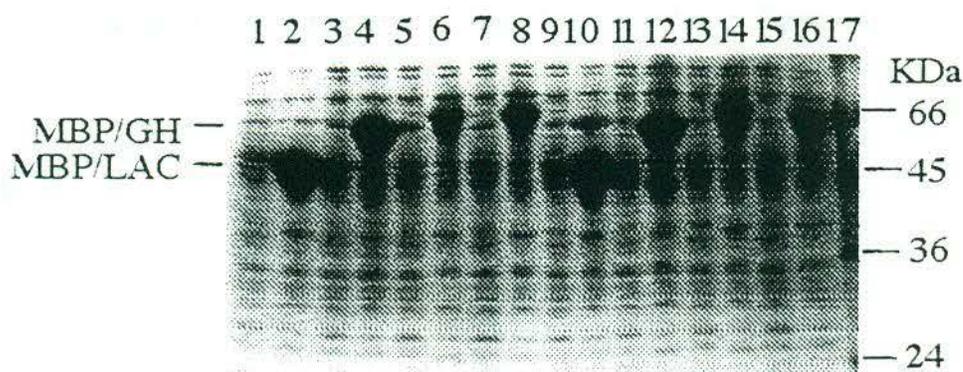


Figura 14. Análisis de la expresión de las bacterias recombinantes. Electroforesis en gel de SDSópoliacrilamida al 12% de extractos totales de proteínas de *E.coli* inducidas (+) o no (-) para expresión. Estas portaban los plásmidos derivados de pMALc o pMALp: 1: pMALc (-), 2:pMALc (+), 3: pMALc20kDa (-), 4: pMALc20kDa (+), 5: pMALc22kDa (-), 6: pMALc22kDa (+), 7:pMALcbGH (-), 8: pMALcbGH (+), 9: pMALp (-), 10: pMALp (+), 11:pMALp20kDa (-), 12: pMALp20kDa (+), 13:pMALp22kDa (-), 14:pMALp22kDa (+), 15: pMALpbGH (-), 16: pMALpbGH(+), 17: Marcador de peso molecular. Se logran distinguir claramente las bandas prominentes correspondientes al péptido de fusión (MBP-GH) en aquellas clonas que fueron inducidas con IPTG (+).

La proteína de fusión purificada como cuerpo de inclusión fué en primera instancia purificada por cromatografía de afinidad, uitlizando amilosa como soporte, sin embargo el rendimiento obtenido era demasiado bajo: entre 100 y 160 μg por cada 100 ml de medio. La alternativa de la purificación de cuerpos de inclusión permitió rendimientos de 13 a 15 mg de proteína por cada 100 ml de medio. La pureza de los cuerpos de inclusión fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS tal y como se muestra en la figura 16A. Los cuerpos de inclusión purificados resultaron también inmunoreactivos a los anticuerpos anti-GH y anti-MBP (figura 16B). El factor Xa fue utilizado para cortar las proteínas purificadas como cuerpos de inclusión, productos de la expresión de pMALchGH22K y pMALcbGH. Este resultó ser bastante ineficiente, aunque si se logró liberar una proteína de 22 kDa e inmunoreactiva

con anticuerpos contra bGH, ésta no se logró visualizar por electroforesis en gel de poliacrilamida, sino únicamente por "Western blot" (figura 17).

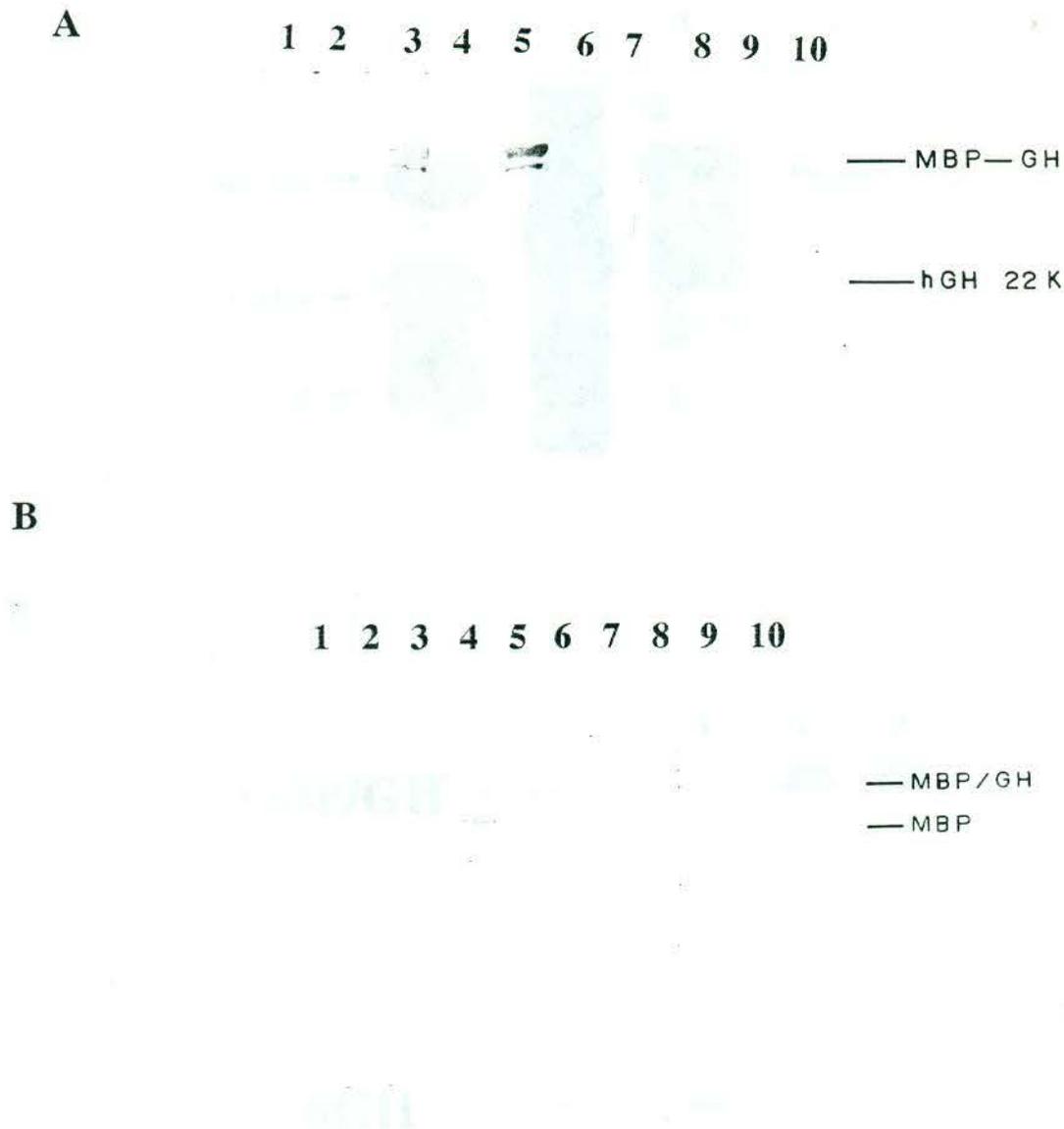
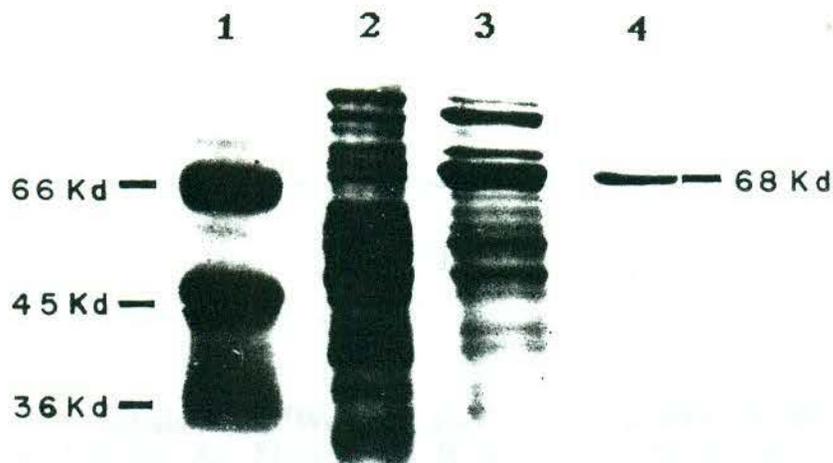


Figura 15. Análisis tipo "Western blot" de las proteínas recombinates. Los extractos de proteínas totales de *E. coli* fueron analizados mediante electroforesis en gel y electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa donde se realizó la inmunodetección con anticuerpos anti bGH (A) o anti MBP (B). **A:** 1: pBHX (+), 2: pBHX (ó), 3: pMALc20kDa (+), 4: pMALc20kDa (-), 5: pMALc22kDa (+), 6: pMALc22kDa (-), 7: pMALcbGH (+), 8: pMALcbGH (-), pMALc (+) y pMALc (-). **B:** 1: pBHX (-); 2: pBHX (+), 3: pMALc (-), 4: pMALc (+), 5: pMALc20kDa (-), 6: pMALc20kDa (+), 7: pMALc22kDa (-), 8: pMALc22kDa (+), 9: pMALcbGH (-), 10: pMALc bGH (+).

A



B

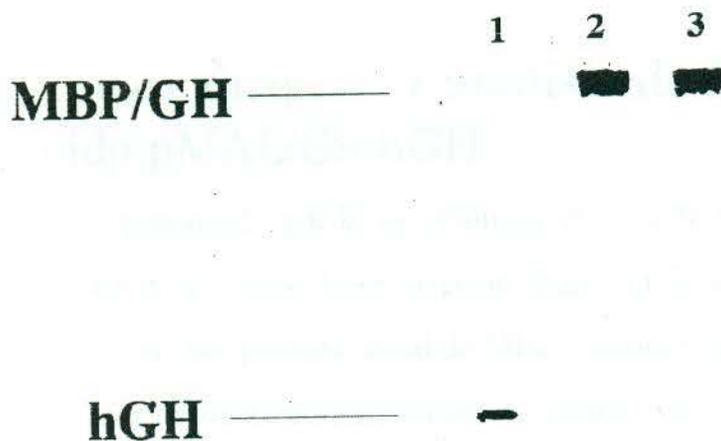


Figura 16. Electroforesis en gel de los cuerpos de inclusión purificados. Después de resuspender los cuerpos de inclusión se analizaron éstos mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (A) y "Western blot" emplando anticuerpos anti-GH (B). **A)** 1: Marcador de peso molecular, 2: pMALcbGH (-), 3: pMALcbGH (+), 4: cuerpo de inclusión (MBP/GH). **B)** 1: hGH, 2:MBP/BGH 3: MBP/HGH.

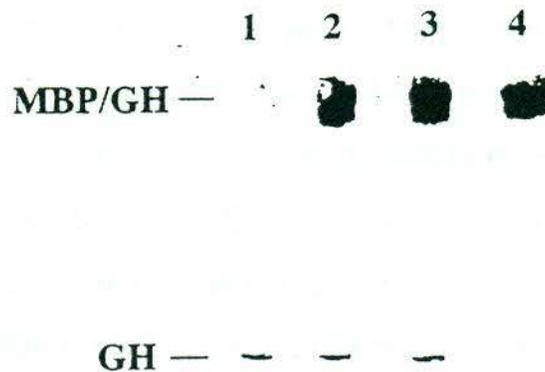


Figura 17: Análisis tipo “Western blot” de los productos de la digestión proteolítica con el factor Xa. El producto de la digestión enzimática fue analizado primero por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS 12% durante varios períodos de tiempo. Después de encontrar una reducida actividad en el corte, analizamos los productos por “Western blot”, utilizando anticuerpos anti-bGH. 1) HGH producto de la expresión del plásmido pBHX, 2) Producto proteolítico de MBP/BGH, 3) Producto proteolítico de MBP/HGH 22 kDa y 4) MBP/BGH.

Mutagénesis dirigida y análisis de la expresión con el plásmido pMAL(SS)hGH.

La mutagénesis mediada por la reacción en cadena de la polimerasa, nos permitió introducir un sitio nuevo de restricción (NaeI) en la región que codifica para el último aminoácido del péptido señal de MBP. La reacción de amplificación fue corroborada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 18). En ésta se presentó una banda a la altura esperada (970 pb). Esta banda fue purificada y subclonada en el plásmido pMALp (Cortado en ApaI y EcoRI). Posteriormente al plásmido resultante (Cortado NaeI-HindIII) se le introdujo el DNAC de hGH de 22 kDa (XbaI-HindIII) con la ayuda del DNA sintético adaptador romo-XbaI, empleado en la construcción de pMALchGH22kDa.

Posteriormente se indujo la expresión mediante la adición de IPTG y se analizaron las proteínas totales después de tres horas de inducción mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. No se alcanzó a notar alguna banda nueva en los carriles del gel en los que se incluía la muestra inducida, mientras que el testigo de inducción (pBHX), presentaba la bandas predichas (22 kDa) (figura 19A). Con el fin de demostrar que después de la inducción se estaba produciendo un RNAm específico para hGH realizamos un análisis por RT-PCR de las clonas inducidas, el cual indicó que el RNAm está siendo producido, como lo muestra la banda amplificada a la altura del tamaño del transcrito esperado (figura 19B). Finalmente la secuencia de la región amplificada fue determinada, encontrándose en ésta, mutaciones que alteraban completamente la región codificante para la proteína , particularmente el codón de iniciación de la traducción (Figura 20).

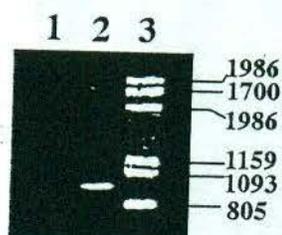
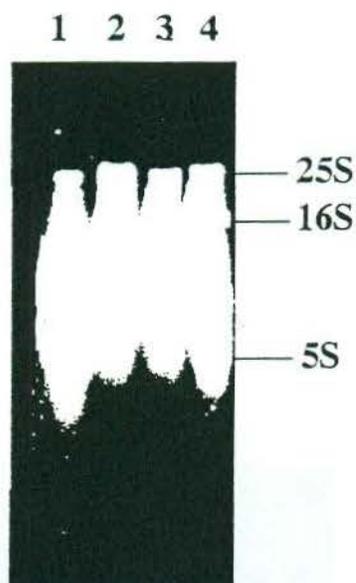


Figura 18. Análisis de la amplificación por PCR. El fragmento de 960 pb del plásmido pMALp desde el sitio ApaI hasta el final del péptido señal de MBP fué amplificado por PCR, el oligonucleótido de corriente arriba permitió la inserción de sitios NaeI y EcoRI justo donde termina la región codificante de MBP lo que permitió posteriores manipulaciones. 1) Control negativo empleando el plásmido pMALc, 2) Producto de la amplificación con el plásmido pMALp y 3) Lambda cortado con PstI

A



B

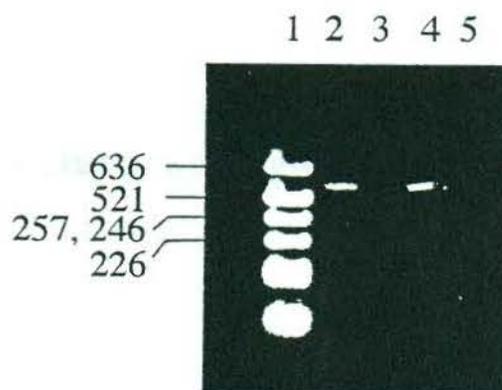


Figura 19. Análisis de los RNAm bacterianos extraídos y del producto de RT-PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Después de 3 h de la inducción con IPTG de la expresión en las bacterias portadoras del plásmido recombinante pSShGH22K y pBHx(hGH), se extrajo el RNA total de éstas, el cual se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (A). Posteriormente se sintetizó el DNac y se amplificó por PCR la región que codifica para hGH, desde el inicio de la región que codifica para la proteína madura hasta el extremo 3', los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (B). **A)** Extractos de RNA total de: 1: pBHx (+), 2: pBHx (-), 3: pSShGH22kDa (+) y 4: pSShGH22kDa (-). **B)** 1: marcador de peso molecular, 2: pBHx (+), 3: pBHx (-), 4 pSShGH22kDa (+), 5: pSShGH 22 kDa (-).

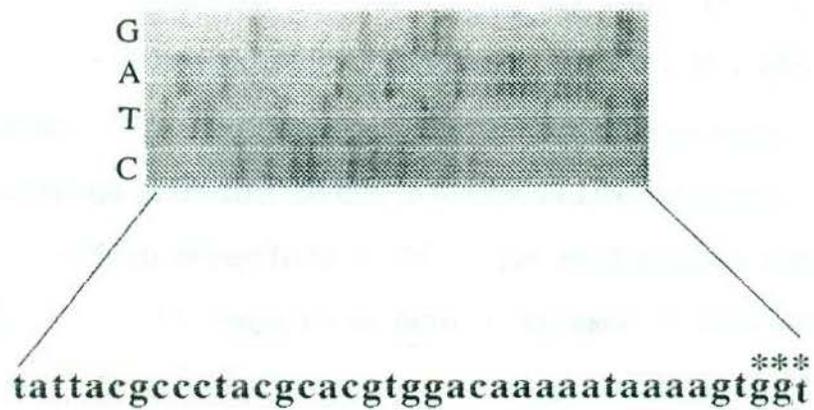


Figura 20. Secuencia de la región del péptido señal de MBP y del promotor TAC. La región que abarca el promotor TAC y la secuencia señal de MBP del plásmido pSShGH fue determinada, en ella se encontraron mutaciones que alteran el marco de lectura abierto del gen de fusión MBP-GH. Con * se indican los cambios con respecto a la secuencia original.

9. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Previamente se reportó que los DNACs que codifican para hormonas del crecimiento de mamífero, presentan algunos problemas al momento de tratar de expresarlos en *E. coli*. (3, 32, 34, 58, 61). Estos problemas se superaron siguiendo diversas estrategias. A saber: 1) alterando la secuencia nucleotídica de tal manera que los codones empleados preferentemente por la bacteria, reemplacen a aquellos naturales del DNAC, 2) modificando la secuencia y la distancia que hay entre la región de reconocimiento del ribosoma (Shine-Dalgarno) y 3) empleando proteínas de fusión (*B*-galactosidasa, *B*-lactamasa). A partir del conocimiento previamente acumulado por diferentes grupos de investigación, en un trabajo anterior que se realizó en la ULIEG (3), se optó por modificar las secuencias alrededor del sitio de inicio de la traducción con la ayuda de DNA sintético. Pese a los altos niveles de RNAm específicos de bGH que se demostró tenían las clonas derivadas en aquel trabajo, no se logró la expresión de una proteína madura, aún y con dichas modificaciones. En el presente trabajo, se probó la alternativa de expresar las GHs como fusión con una proteína propia de *E. coli* y que es eficientemente reconocida por la maquinaria traduccional de la bacteria: la proteína de unión a maltosa.

Los DNACs de las HGH de 20 y 22 kDa, al igual que el DNAC de BGH se subclonaron en los plásmidos de expresión de la serie pMALc y pMALp. Después de la inducción de la expresión, el análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS mostró las bandas correspondientes a las proteínas de fusión MBP-GH, mientras que en los testigos no inducidos no se encontró ninguna banda nueva. Esto indicó que la banda que se observada era un producto de la inducción con IPTG, es decir éste se encontraba "desreprimiendo" la unidad promotora (TAC) de los plásmidos recombinantes. La identidad de la proteína fusión se corroboró cuando extractos totales de

bacterias inducidas y no inducidas se analizaron por "Western blot" con antisuero anti-GH y anti-MBP. Con ambos sueros, las proteínas producto de la expresión de los nuevos plásmidos recombinantes fueron inmunoreactivas, mientras que la fusión MBP-LacZ solo reaccionó con los anticuerpos anti-MBP, y el producto de la expresión del plásmido pBHX (hGH) reaccionó sólo con el antisuero anti-bGH. Esto demostró que la proteína que resultaba de la expresión con los nuevos recombinantes era en efecto una fusión entre MBP y GHs. Al mismo tiempo, aquellas proteínas que se purificaron como cuerpo de inclusión, también resultaron inmunoreactivas con los mismos anticuerpos. Los anteriores experimentos nos permitieron concluir que la proteína recombinante producida era, al menos por lo que a su identidad inmunológica respecta, una fusión entre GH y MBP. Por otra parte, la determinación nucleotídica parcial de la región que abarca la fusión entre el gen *malE* y bGH permitió reforzar que la fusión génica estaba en la fase de lectura correcta. Otros trabajos han descrito la expresión eficiente de proteínas de fusión empleando MBP; proteínas como la fibronectina, actinmiosina, peptidasa mitocondrial hepática, activador beta del ácido retinóico y una proteína de unión a GTP fueron producidas en fusión empleando el sistema de los plásmidos pMAL. En todos estos trabajos los niveles de expresión ó cuantificación no fueron reportados, unicamente se citaron como abundantes, de este modo no se pudo establecer una relación con los niveles obtenidos en esos casos (110, 111,112,113,114,115). El método de purificación mediante columna de afinidad de amilosa también fue reportado como muy poco eficiente, a excepción de los casos en que el péptido de fusión era pequeño (112).

La expresión de las GHs en fusión permitió corroborar que las secuencias clonadas y reportadas en trabajos anteriores (5, 6) si pueden ser expresadas en bacterias, siempre y cuando la maquinaria traduccional de *E. coli* pueda ser "engañada" para reconocer a los DNAs de GHs como propios.

Debido a los problemas encontrados anteriormente (3 y otros trabajos realizados en la ULIEG no reportados) se pensaba que estos DNACs podrían tener secuencias "venenosas" que impedían su expresión en *E.coli*. Esto quedó descartado al lograr finalmente su expresión en esta bacteria. Tratando de aprovechar el sistema que brinda pMALp, se diseñó una estrategia que permitió mutagenizar el área donde termina el péptido señal de MBP para así poder clonar en la fase de lectura adecuada los DNACs de las GHs. Se construyó un plásmido que incluyó al DNAC de hGH 22kDa en fusión ahora solo con el péptido señal de MBP. Este nuevo plásmido recombinante no logró expresar la proteína esperada. Para tratar de identificar si el problema residía en la falta de transcripción ó era un proceso que implicaba la falta de una traducción eficiente, se analizó por RT-PCR la posible presencia de un transcrito específico de hGH después de 3 h de inducción con IPTG. Este ensayo permitió ver que el sistema estaba produciendo RNAm de hGH, pero que éste posiblemente no era traducido eficientemente. Después de esto se analizó la secuencia nucleotídica del fragmento mutagenizado; en ésta se encontró que existe una mutación justo en el codón de iniciación de la traducción, esto explica la falta de traducción del transcrito detectado por RT-PCR, además se encontraron otras mutaciones a lo largo del promotor, las cuales pudieron alterar significativamente la eficiencia de la transcripción, aunque la producción de RNAm de hGH no era nula por completo. Será necesario realizar nuevamente la amplificación por PCR, subclonar el fragmento amplificado en el bacteriófago M13mp18 ó 19 para determinar la secuencia y encontrar una clona sin mutaciones perjudiciales para partir de ésta para posteriores subclonaciones en pMAL. En experimentos simultáneos desarrollados en la ULIEG, el DNAC de bGH se fusionó con la región que codifica para el péptido señal de la proteína de membrana externa (OmpA) de *E. coli*, esta fusión se encontraba bajo el control del promotor del bacteriófago T7, con el fin de aprovechar que se tenía una secuencia nativa

de *E. coli* corriente arriba de la región codificante para bGH; sin embargo este sistema no permitió la expresión de la proteína en la bacteria.

Los obstáculos para producir eficientemente BGH en *E. coli* encontrados por Ramírez-Angulo (1991), indicaron que existe un problema para llevar a cabo la traducción del RNAm de bGH, el cual logró generar en altas cantidades. Como se mencionó en la hipótesis de este trabajo, pensamos que en el extremo 5' del RNAm de las GHs y en la secuencia nucleotídica que se encuentra entre el sitio de unión al ribosoma y el codón de iniciación de la traducción, se forman estructuras que impiden el acceso eficiente a los complejos de traducción y que la alternativa de probar una fusión proteica entre las GHs y una proteína fácilmente reconocida por la bacteria (MBP), podría facilitar la traducción de la proteína. Al emplear este sistema, donde la región que codifica para MBP es traducida primero, puesto que se encuentra frente a los DNAs de GHs en los plásmidos pMAL, la maquinaria traduccional de la bacteria reconoce primero esta secuencia y posteriormente continua con la traducción de la región codificante para las GHs. Es decir, las regiones críticas arriba mencionadas no afectan directamente el inicio de la traducción de las GHs, lo que permitió que éstas se expresaran eficientemente en *E. coli*. Con esto se corroboró que al prevenir que el inicio de la traducción dependa del codón de iniciación de las GHs y de las regiones adyacentes a éste, se logran expresar estas hormonas en esta misma bacteria. Se piensa que introduciendo cambios más finos en la región crítica para la traducción, se logrará finalmente encontrar la secuencia óptima para expresar las GHs en *E. coli*.

En resumen, aunque las GHs se produjeron con alta eficiencia como productos de fusión con la proteína de unión a la maltosa, purificadas como cuerpos de inclusión y cortadas proteolíticamente con el factor Xa, éstas no pudieron ser expresadas en fusión únicamente con el péptido se-al de MBP, debido a mutaciones encontradas en la región del promotor e inicio de la

traducción. Se necesitará probar diferentes sistemas de expresión que permitan producir las hormonas del crecimiento nativas en *E. coli*.

10. LITERATURA CONSULTADA

1. **Singer**, M. y **Berg**, P. 1991. Genes and genomes. Primera edición. University Science Books. Mill Valley, Ca. EUA. 929 pp.
2. **Gilbert**, D. (1993). The future remains bright for biotech stocks. *Biotechnology*. 11, 654-655.
3. **Ramírez-Angulo**, V. (1991). expresión en *Escherichia coli* del DNAc de la hormona del crecimiento bovino. Tesis. Facultad de Medicina. UANL.
4. **Hodgson**, J. 1993. Expression systems: a user's guide. *Biotechnology*. 11,887-893.
5. **Amaya-Manzanares**, F. (1988). Clonación del DNAc complementario al RNAm de la hormona del crecimiento bovina. Tesis. Facultad de Medicina. UANL.
6. **Rincón-Limas**, D. E. (1990). Clonación molecular de los DNAs complementarios que codifican para las hormonas de crecimiento de origen hipofisiario humano en *Escherichia coli*. Tesis. Facultad de Medicina. UANL.
7. **Alvidrez-Quihui**, L. E. (1990). Subclonación y Expresión transitoria de los DNAs complementarios de las hormonas del crecimiento humana y bovina. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL.
8. **Rincón-Limas**, D.E., **Reséndez-Pérez**, D., **Ortíz-López**, R., **Alvidrez-Quihui**, L.E., **Castro-Muñoz Ledo**, F., **Kuri-Haruch**, W., **Martínez-Rodríguez**, H.G., **Barrera-Saldaña**, H.A..(1993). HGH isoforms: cDNA expression, adipogenic activity and production in cell culture. *Biochimica et Biophysica Acta*.1172,48-54.
9. **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. UANL.
10. **Underwood**, L.E., **Fisher**, D.A., **Frasier**, D.A., **Gertner**, J.M., **Kaplan**, S.L., **Kirkland**, R.T., **Lipne**, B.M. y **Raiti**, S. (1985). Degenerative neurologic disease in patients formerly treated with human growth hormone. *J. Pediatr.* 107,10-12.

11. **Norman, C.** (1985) Virus scare halts hormone research. *Science*. 228:1176-1177.
12. **Watson, A. R.** (1991). Safety of growth hormone. *Science*, 337, 108.
13. **Peel, J.C., Bauman, D.E., Gorewit, R.C. y Sniffen, C.J.** (1981). Effects of exogenous growth hormone on lactational performance in high yielding dairy cows. *J. Nutr. Sci.* 3,1662-1671.
14. **Etherton, T.D. y Kensinger, R.S.** (1984). Endocrine regulation of fetal and postnatal meat animal growth. *J. Animal Sci.* 59, 511-527.
15. **Juskevich, J. C., y Guyer, C. G.** (1990). Bovine growth hormone: Human food safety evaluation. , 249, 875-884.
16. **Masuda, N., Watahiki, M., Tanaka, M., Yamakawa, M., Shimizu, K., y Nakashima, K.** (1988). Molecular cloning of cDNA encoding 20kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 949, 125-131.
17. **Paladini, A., Pe-a, C. y Poskus E.** (1982). *Molecular Biology of growth hormone*. Editado por J,G,R, Hurrel. 15, 25-56.
19. **Leung, D.W., Spencer, S.A., Cachianes, G., Hammonds, R.G., Collins, C., Henzel, W.J., Barnard, R., Waters, M.J. y Wood, W.I.** 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression.. 330,537-543.
20. **Phillips, J.A. y Vnenacak-Jones, C.L.** (1989). Genetics of the growth hormone and its disorders. *Advances in Human Genetics*, 18,305-306.
21. **Rudd, B.T.** (1991). Growth, growth hormone and the somatomedins: a historical perspective and current concepts. 28, 542-555.
22. **Culler, F.L., Kaufmann, S., Frigeri, L.G. y Jones, K.L.** (1988). Comparison of the acute metabolic effects of 22,000-Dalton and 20,000-Dalton growth hormone in human subjects. *Horm. Metabol. Res.* 20,107-109.
23. **Hirtman, H., Kielman, J., Birnbaum, M. J., Chen, E. Y., Seeburg, P. H., Eberhardt, N. L., y Barta, A.** (1987). The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations. , 6, 59-70.

24. **Ono, M., Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Sakata, S., Yasunaga, T., Noso, T., y Kawauchi., H.** (1990.). cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87., 4330-4334.
25. **Seeburg, P.H.** (1982). The human growth hormone gene family: nucleotide sequence show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA.*, 1, 239-249.
26. **Woychik, R. P., Camper, S. A., Lyons, R. H., Goodwin, E. C., y Rottman, F. M.** (1982). Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. , 10, 7197-7210.
26. **Derosiers, R. D., J. Kamine, A. Bakker, D. Silva, R. P. Woychik, D. D. Sakai and F. M. Rottman.** (1985). Synthesis of bovine growth hormone in primates by using a Herpesvirus vector. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 2796-2803.
27. **Gordon, D. F., Quick, D. P., Erwin, C. R., Donelson, J. E., y Maurer., R. A.** (1983). Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. *Mol. Cell. Endocrinology.*, 33, 81-95.
28. **Troung, A. T., Duez, C., Belayew, A., Renard, A., Pictet, R., Bell, G. I., y Martial, J. A.** (1984). Isolation and characterization of the human prolactin gene. *The EMBO Journal*, 3, 429-437.
29. **Hampson, R. K., y Rottman, F. M.** (1987). Alternative processing of bovine growth hormone mRNA: Nonsplicing of the final intron predicts a high molecular weight variant of bovine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 2673-2677.
30. **Roskman, W. G., y Rougeon, F.** (1979). Molecular cloning and nucleotide sequence of human growth hormone structural gene. *Nucl. Acids. Rés.*, 7, 305-320.
31. **Igout, A., Scippo, M. L., Frankenne, F., y Hennen, G.** (1988). Cloning and nucleotide sequence of placental hGH-V cDNA. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, 96, 63-67.
32. **Miller, W. L., Martial, J. A., y Baxter, J. D.** (1980). Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *J. Biol. Chem.*, 255, 7521-7524.

- 33. Keshet, E., Rosner, A., Bernstein, Y., Gorecki, M., y Aviv, H. (1981).** Cloning of bovine growth hormone gene. *Nucl. Acids. Res.*, 9, 19-30.
- 34. Seeburg, P. H., Sias, S., Adelman, J., Boer, H. A. d., Hayflick, J., Jhurani, P., Goeddel, D. V., y Heyneker., H. L. (1983).** Efficient bacterial expression of bovine and porcine growth hormones. *DNA*, 2, 37-45.
- 35. Santome, J., J.M. Dellacha, Paladini, A. C., Pena, C., Biscoglio, M. J., Daurt, S. T., Poskus, E., y Wolfenstein, C. E. M. (1973).** Primary structure of bovine growth hormone. *Eur. J. Biochem.*, 37, 164-170.
- 35. George, H. J., L'Italien, J. J., Pilacinski, W. P., Glassman, D. L., y Krzyek., R. A. (1985).** High-level expression in *Escherichia coli* of biologically active bovine growth hormone. , 4, 273-281.
- 36. Chiou, C. S., Chen, H.-T., y Chang., W.-C. (1990).** The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). *Biochim. Biophysica Acta.*, 1087, 91-94.
- 37. Koren, Y., Sarid, S., Ber, R., y Daniel., V. (1989).** Carp growth hormone: molecular cloning and sequencing of cDNA. , 77., 309-315.
- 38. Ho, W. K. K., Tsang, W. H., y Dias., N. P. (1989).** Cloning of the grass carp growth hormone cDNA. *Biochem. Bioph. Res. Comm.*, 161, 1239-1243.
- 39. Gonzalez-Vilase-or, L. I., P. Z., Chen, T. T., y Powers., D. A. (1988).** Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA. , 65, 239-246.
- 40. Sekine, S., Mizukami, T., Nishi, T., Kuwana, Y., Saito, A., Sato, M., Itoh, S., y Kawauchi., H. (1985).** Cloning and expression of cDNA for salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 4306-4310.
- 41. Momota, H. Kosugi, R., Ohgai, H, Hora, A e Ishioka H. 1988.** Sequence of flounder growth hormone deduced from a cDNA sequence. *Nuc. Acids. Res.* 16:10362.
- 42. Rentier-Delure, F., D. S., Mercier, L., Lion, M., Benrubi, O., y Martial., J. A. (1989).** Molecular cloning and characterization of two forms of trout growth hormone cDNA: Expression and secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. , 8, 109-117.

- 43. Watahiki, M. M., Tanaka, N., Masuda, M., Yamakawa, Y., Y. Y., y Nakashima., K. (1988).** cDNA cloning and primary structure of Yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) pregrowth hormone. *Gen. Comp. Endocr.*, 70, 401-406.
- 44. Lorens, J., Nerland, A. H., Male, R., Lossius, I., Telle, W., y Totland., G. (1989).** The nucleotide sequence of Atlantic salmo growth hormone cDNA. *Nuc. Acids. Res.*, 17, 2352.
- 45. Sato, N., Watanabe, K., Murata, K., Sakaguchi, M., Kariya, Y., Kimura, S., Nonaka, M., y Kimura, A. (1988).** Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochem. Biophysica Acta.*, 949, 35-42.
- 46. Pan, F.-M., y Chang., W.-C. (1988).** Cloning and sequencing of bullfrog growth hormone complementary DNA. *Biochem. Biophysica Acta.*, 950., 238-242.
- 47. Chen, H.-T., Pan, F.-M., y Chang, W.-C. (1988).** Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Bioch. Biophysica Acta*, 949, 247-251.
- 48. Lamb, I.C., Galehouse, D.M., y Foster, D.N. (1988).** Chicken growth hormone cDNA sequence. *Nucleic Acid. Res.* 16,9339.
- 49. Foster, D.N., Kim, SV, Enyeart, JJ y Foster, LK 1990.** Nucleotide sequence of the complementary DNA for turkey growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 173:967-975.
- 50. Stewart, F. y PP. Tuffnell. (1991).** Cloning the cDNA for horse growth hormone and expression in *Escherichia coli*. *J. Molecular Endocrinology.* 6,189-196.
- 51. Ascacio-Martinez, JAI y Barrera-Saldana, HA. 1994.** Sequence of a cDNA encoding horse growth hormone. *En prensa.*
- 52. Yamano, Y., Oyabayashi, K., Okuno, M., Yato, M., Kioka, N., E, M., Hashi, H., Sakai, H., Komano, T., Utsumis, K., y Iritani, A. (1988).** Cloning and sequencing of cDNA that encodes goat growth hormone. , 228, 301-304.

- 53. Shoji, K., Ohara, E., Watabiki, M., y Yoneda, Y. (1990).** Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the mink growth hormone. *Nucl. Acids Res.*, 18, 64-25.
- 54. Vize, P. D., y Wells, J. R. E. (1987).** Isolation and characterization of the porcine growth hormone gene. , 55, 339-344.
- 55. Orian, J.M., Mahoney, J.V., y Brandon M.R. (1988).** Cloning and sequencing of the ovine growth hormone gene. *Nucl. Acids Res.* 16:359-362.
- 56. Seeburg, P.H., Shine, J., Martial, J.A., Baxter, J.D. Goodman, H.M. (1977)** Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. 270, 486-491.
- 57. Ascacio-Martinez, JAI y Barrera-Saldana, HA.** Dog growth hormone complementary DNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone. En prensa.
- 58. Schoner, B. E., Hsiung, H. M., Belagaje, R. M., Mayne, N. G., y Schoner, R. G. (1984).** Role of mRNA translational efficiency in bovine growth hormone expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 5403-5407.
- 59. Klein, B. K., Hill, S. R., Devine, C. S., Rowold, E., Smith, C. E., Galosy, S., y Olins, P. O. (1991).** Secretion of active bovine somatotropin in *Escherichia coli*. , 9, 869-872.
- 60. Watson, N., y Olson, E. R. (1990).** Point mutations in a pBR322-based expression plasmid resulting in increased synthesis of bovine growth hormone in *Escherichia coli*. , 86, 137-144.
- 61. Martial, J.A., Hallewell, R.A., Baxter, J.D., Goodman, H.M. (1979).** Human growth hormone: complementary DNA cloning and expression in bacteria. *Science*. 205. 602-607.
- 62. Goeddel, D. V., H.L. Heyneker, T. Hozumi, R. Arentzen, K. Itakura, D.G. Yansura, M.J. Ross, G. Miozzari, R. Crea and P. Seeburg (1979).** Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. , 281, 544-548.
- 63 Gray, G. L., Baldrige, J. S., McKeown, K. S., Heyneker, H. L., y Chang, C. N. (1985).** Periplasmic production of correctly processed human growth

hormone in *Escherichia coli*: natural and bacterial signal sequences are interchangeable. , 39, 247-254.

64. Matteucci, M., y Lipetsky, H. (1986). Alkaline phosphatase fusions: a tag to identify mutations that result in increased expression of secreted human growth hormone from *E. coli*. *Biotechnology*. 4, 51-55.

65. Becker, G. W., y Hsiung, H. M. (1986). Expression, secretion and folding of human growth hormone in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 204, 145-150.

66. Chang, C. N., M. Rey, B. Bochner, and, H. H., y Gray, G. (1987). High-level secretion of human growth hormone by *Escherichia coli*. , 55, 189-196.

67. Hsiung, H. M., Cantarell, A., Luirink, J., Oudega, B., Veros, A. J., y Becker, G. W. (1989). Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. , 7, 267-271.

68. Kato, C., Kobayashi, T., Kudo, T., Furusato, T., Murakami, Y., Tanaka, T., Baba, H., Oishi, T., Ohtsuka, E., Ikehara, M., Yanagida, T., Kato, H., Moriyama, S., y Horikoshi, K. (1987). Construction of an excretion vector and extracellular production of human growth hormone from *Escherichia coli*. , 54, 197-202.

69. Pavlakis, G.N., Hizuka, N., Gorden, P., Seburg, P.H., y Hamer, D.H. (1981) Expression of two human growth hormone genes in monkey cells infected by simian virus 40 recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7398-7402.

71. Kopchick, JJ, Malauca, RH, Livelli, TJ y Leung FC. 1985. Use of avian retroviral-bGH DNA recombinants to direct expression of biologically active growth hormone by cultured fibroblasts. *DNA*. 4:23-31.

72. Martin-Gallardo, F, Montoya-Zavala, M Kelder, B. Taylor, J. Chen, H. Leung FC y Kopchick JJ. 1988. A comparison of bGH gene expression in mouse L cells directed by the mouse Moloney leukemia virus long terminal repeat, Simian Virus 40 early promoter or citomegalovirus immediate early promoter. *Gene*. 70:51-6.

73. Selden, R.F., Howie, K.B., Rowe, M.E., Goodman, H.M., y Moore, D.D. (1986). Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3173-3179.

- 74. Leung, F. C., Bowen, D. L., y Chandler., D. P. (1990).** Construction of a biologically active recombinant DNA plasmid containing a mouse metallothionein promoter and genomic bovine growth hormone gene. *Nuc. Acids Res.*, 18, 4942.
- 75. Ramabhadran, T. V., Reitz, B. A., y Shah, D. M. (1985).** High level expression of the bovine growth hormone gene in heterologous mammalian cells. , 38, 11-118.
- 76. Derosiers, R.D., Kamine, J., Bakker, D., Silva, RP, Woychik, D Sakai, D y Rottman F. 1085.** Synthesis of bovine growth hormone in primates by using herpes virus vector. *Mo. Cell.Biol.* 5:2796-2803.
- 77. McAndrew, S. J., Chen, N.-Y., Wiehl, P., DiCaprio, L., Yun, J., Wagner, T. E., Okada, S., y Kopchick., J. (1991).** Expression of truncated forms of the bovine growth hormone gene in cultured mouse cells. *J. Biol. Chem.*, 266, 20965-20969.
- 78. Friedman, J.S., Cofer, C.L., Anderson, C.L., Kushner, J.A., Gray, P.P., Chapman, G.E., Stuart, M.C., Lazarus, L., Shine, J. y Kushner, P.J. (1989).** High expression in mammalian cells without amplification. *Biotechnology*. 7,359-362.
- 79. Ramírez-Solís, R. (1989).** ¿Es el gen humano hPL-1 un pseudogen? Análisis de su expresión *in vitro* usando técnica de ingeniería genética. Tesis. Facultad de Medicina. UANL.
- 80. Franchi, E., Maisano, F., Testori, S. A., Galli, G., Toma, S., Parente, L., Ferra, F. d., y Grandi, G. (1991).** A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnology*, 18, 41-54.
- 81. Gray, G., Selzer, G., Buell, G., Shaw, P., Escanez, S., Hofer, S., Voegeli, P., y Thompson., C. J. (1984).** Synthesis of bovine growth hormone by *Streptomyces lividans*. , 32, 21-30.
- 82. 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. , 39, 117-120.

- 83. Saito, A., Sekine, S., Komatsu, Y., Sato, M., Hirano, T., y Itoh., S. (1988).** Molecular cloning of eel growth hormone cDNA and its expression in *Escherichia coli.* , 73., 545-571.
- 84. Agellon, L. B., y Chen., T. T. (1986).** Rainbow trout growth hormone: Molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli.* DNA, 5., 463-471.
- 85. Warwick, J. M., Wallis, O. C., y Wallis., M. (1989).** Cloning, sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNA for ovine pregrowth hormone. Biochem. Biophysica Acta., 1008, 247-250.
- 86. Wallis, O. C., y Wallis, M. (1989).** Production of plasmids giving high expression of recombinant DNA-derived ovine growth hormone variants in *Escherichia coli.* , 250, 371-376.
- 87. Igout, A., Scippo, M. L., Frankenne, F., y Hennen, G. (1989).** Expression and secretion of the human placental growth hormone in *Escherichia coli.* Nucl. Acids Res., 3998.
- 88. Balbas, P. y Bolívar, F. (1990).** Design and construction of expression plasmid vectors in *Escherichia coli.* en: Methods in Enzymology. 185, 14-37.
- 89. Uhlén, M. y Moks, T. (1990).** Gene fusions for purpose of expression: an introduction. en Methods in Enzymology. 185, 129-143.
- 90. Anaba, J., Baty, D., Lloubes, R., Pages, J.-M., Joseph-Liauzun, E., Shire, D., Roskaman, W., y Lazdusnsi, C. (1987).** Expression vector promoting the synthesis and export of the human growth-hormone-releasing factor in *Escherichia coli.* , 53, 219-226.
- 91. Smith, D. B., y Johnson., K. S. (1988).** Single-step purification of polypeptides in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene, 67, 31-40.
- 92. Guan, K. L., y Dixon., J. E. (1991).** Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli:* An improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with Glutathione S-Tranferase. Annal. Biochem., 192, 262-267.
- 93. Carter, P. y Wells, A.J. (1987)** Engineering enzyme specificity by "substrate-assisted catalysis". Science. 237, 394-399.

- 94. Duplay, P., H. Bedouelle, A. Fowler, I. Zabin, W. Saurin and M. Hofnung.** (1984). Sequences of the *malE* gene and its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.*, 259, 10606-10613.
- 95. Nagai, K., y Thorgensen, C.** (1984). Generation of *B*-globin by sequence specific proteolysis of a hybrid protein in *Escherichia coli*. , 309, 810-812.
- 96. Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea, A. G., Slatko, B. E., Maoran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A., y Guan., C. d.** (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. , 67, 366-373.
- 97. Guan, C., Li, P., Riggs, P. D., y Inouye., H.** (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. , 67, 21-30.
- 98. Brosius, J., y Holy., A.** (1984). Regulation of ribosomal RNA promoters with synthetic lac operator. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 6929-6933.
- 99. Martson, F. A. O.** (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 240, 1-12.
- 100. Amann, E., y Brosius., J.** (1985). "ATG vectors" for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. , 40, 183-190.
- 101 Curry, K. A. a. C.-S. C. T.** (1988). Effect of ribosome binding site on gene expression in *Escherichia coli*. *DNA*, 7, 173-179.
- 102. Dalboge, H., S. Carlsen, Jensen, E. B., and, T. C., y Dahl, H. H. M.** (1988). Expression of recombinant growth hormone in *Escherichia coli*: effect of the region between the Shine-Dalgarno sequence and the ATG initiation codon. , 7, 399-405.
- 103, Tomich, CH, Kaytes, PS, Olsen, MK ,y Patel H.** 1988. Use of lacZ expression to monitor transcription. *Plasmid*.20:167-70.
- 104. Hsiung, H. M., y MacKellar., W. C.** (1987). Expression of bovine growth hormone derivatives in *Escherichia coli* and the use of the derivatives to produce natural sequence growth hormone by cathepsin C cleavage. *Meth. Enzymology.*, 153, 390-401.

- 105. Hui, A., y Boer, H. A. D.** (1987). Specialized ribosome system: preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 4762-4766.
- 106. Sconer, B. E., Belagaje, R. M., y Schoner, R. S.** (1986). Translation of a synthetic two-cistron mRNA in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 8506-8510.
- 107. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Y Maniatis, T.** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Segunda edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor.
- 108. Wu, R., Wu, T., y Ray, A.** (1987). Adaptors, linkers and methylation. Methods in Enzymology, 152, 343-349.
- 109. Gardella, T. J., Rubin, D., Abou-Samra, A.-B., Keutmann, H. T., Potts, J. T., Kroenberg, H. M., y Nussbaum, S. R.** (1990). Expression of human parathyroid hormone-(1-84) in *Escherichia coli* as a factor X-cleavable fusion protein. J. Biol. Chem., 265, 15854-15859.
- 110. Matsuka, YV; Medved LV; Brew SA; Ingham KC.** (1994) The NH₂-terminal fibrin-binding site of fibronectin is formed by interacting fourth and fifth finger domains. Studies with recombinant finger fragments expressed in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 269:9539-46.
- 111. Eldin, P; Le Cunff M; Vosberg HP; Mornet D; Leger JJ.** (1994) Mapping of the actomyosin interfaces. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:2772-6.
- 112. Zhanh, T, Cieslak, PR y Stanley, SL.** (1994) Protection of gerbils from amebic abscess by immunization with a recombinant *Entamoeba histolytica* antigen. Infection and Immunology. 62:1166-70.
- 113. Saavedra-Alanis, VM, Rysavy, P, Rosenberg, LE, y Kalouse, KK.** (1994). Rat liver mitochondrial processing peptidase. Binding of synthetic retinoids and transcriptional activation. J. Biol. Chem. 269:9284-8.
- 114. Lombardo, A. Costa, E., Chao WR, Toll, L, Hobbs, PD, Jons, L, Lee, MO, Pfahl, M, Ely, KR y Dawson, MI.** (1994) Recombinant human retinoic acid activator beta. Binding of synthetic retinoids and transcriptional activation. J. Biol. Chem. 194:7297-303.