

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

**Clonación y expresión de la isoforma 2 de la hormona hiperglucémica de
crustáceos de *Litopenaeus vannamei* (Liv-CHH-SG2) en *Pichia pastoris***

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

HAYDEÉ LÓPEZ RODRÍGUEZ

Ensenada, Baja California, México, Diciembre de 2009

RESUMEN de la tesis de **HAYDEÉ LÓPEZ RODRÍGUEZ**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Diciembre de 2009.

Clonación y expresión de la isoforma 2 de la hormona hiperglucémica de crustáceos de *Litopenaeus vannamei* (Liv-CHH-SG2) en *Pichia pastoris*

Resumen aprobado por:

Dr. Elizabeth Ponce Rivas
Director de Tesis

La fisiología de los crustáceos está regulada por las neurohormonas peptídicas de la familia CHH/MIH/GIH, las cuales se producen y liberan a la hemolinfa por el complejo órgano X- glándula del seno (OX-GS). La neurohormona hiperglucémica de crustáceos (CHH) está involucrada en la regulación y metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como también en los procesos de muda, reproducción y osmorregulación. Dentro del grupo de las neurohormona CHH se han identificado isoformas producidas por corte y empalme alternativo del gen *chh*. En *Litopenaeus vannamei* se han encontrado dos isoformas de este tipo: Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-SG2. Los 40 primeros aminoácidos de los péptidos maduros son idénticos, pero presentan una composición muy diferente en los últimos 30-31 aminoácidos del C-terminal. Los neuropéptidos de la familia CHH son difíciles de estudiar ya que son sintetizados en cantidades pequeñas y son similares en tamaño y estructura a otros neuropéptidos producidos en el pedúnculo ocular lo que dificulta su aislamiento y purificación. La tecnología del ADN recombinante es una herramienta útil para producir los neuropéptidos en cantidades suficientes para estudiar su papel fisiológico y las relaciones estructura-actividad. El ADNc de Liv-CHH-SG1 ha sido clonado y expresado en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* y se determinó su actividad biológica. Sin embargo, Liv-CHH-SG2 no ha sido clonada ni expresada.

En el presente trabajo se obtuvo el transcrito *chh-sg2* de camarones sometidos a estrés (salinidad y temperatura) y a través de reacciones de RT-PCR se obtuvo el ADNc. El transcrito fue clonado y expresado en *P. pastoris*. Se obtuvieron dos diferentes construcciones: CHH-SG2STOP y CHH-SG2EK. Para obtener la

hormona nativa (CHH-SG2STOP) el ADNc de *chh-sg2* fue amplificado utilizando unos cebadores que adicionaron el codón del aminoácido glicina antes del codón de término, para que pueda ser amidada después de purificarla. En la segunda construcción, se agregó el sitio de reconocimiento de enterocinasa antes del epitopo *c-myc* y la secuencia de polihistidinas, para poder remover estas etiquetas después de purificación de CHH-SG2EK. Ambas construcciones se linearizaron para ser integradas en el genoma de *P. pastoris* KM71. Una vez integradas, se determinaron las condiciones de expresión para ambas proteínas. Los resultados sugieren que bajo las condiciones probadas, *P. pastoris* expresa otra proteína del mismo peso molecular que CHH-SG2STOP. Las condiciones óptimas de expresión para CHH-SG2EK fueron con metanol al 4% durante un día. La proteína CHH-SG2EK, con un peso molecular aparente de 12.61 kDa, fue detectada en geles de Tricina-SDS-PAGE y confirmada mediante un ensayo de Western Blot utilizando un anticuerpo anti-*c-myc*.

Palabras Clave: *L. vannamei*, CHH, proteínas recombinantes, *P. pastoris*, pPICZ α A

ABSTRACT of the thesis presented by **HAYDEÉ LÓPEZ RODRÍGUEZ** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree with orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México. December, 2009.

Cloning and expression of the crustacean hyperglycemic hormone isoform 2 from *Litopenaeus vannamei* (Liv-CHH-SG2) in *Pichia pastoris*

The crustacean physiology is regulated by neuropeptide hormones of the CHH/MIH/GIH family, which are produced and secreted to hemolymph via the X-organ-sinus gland complex (XO-SG). The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) is involved in the regulation and metabolism of carbohydrates and lipids, as well in the processes of molting, reproduction and osmoregulation. Within the CHH neurohormone group, different isoforms produced by alternative splicing of the *chh* gene have been identified. In *Litopenaeus vannamei* two isoforms have been detected: Liv-CHH-SG1 and Liv-CHH-SG2. The first 40 residues of the mature peptides are identical, but they have a very different composition in the last 30-31 amino acid residues of the C-terminal. Neuropeptide members of the CHH family are difficult to study because they are synthesized in small quantities and similarities in size and primary structure to other eyestalk neuropeptides limit their isolation and purification. DNA recombinant technology is useful in generating these crustacean peptides in sufficient quantities to enable further study of their physiological roles and structure-activity relationships. Liv-CHH-SG1 cDNA has already been cloned and expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its biological activity has been determined. However, Liv-CHH-SG2 has not been cloned and expressed.

In this work, the *chh-sg2* transcript was obtained from shrimps submitted to stressful conditions (salinity and temperature) and RT-PCR reactions were performed to obtain cDNA. The transcript was cloned and expressed in *Pichia pastoris*. Two different constructions were obtained: CHH-SG2STOP and CHH-SG2EK. To obtain the native hormone (CHH-SG2STOP) *chh-sg2* cDNA was amplified using primers that add the glycine codon before the stop codon, so the recombinant hormone could be amidated after purification. For the second construction, the enterokinase recognition site was added before the *c-myc* epitope and the polyhistidine tag sites, so these tags could be removed after purification of CHH-SG2EK. Both constructions were linearized to be integrated into the *Pichia pastoris* KM71 genome. Once integrated, expression conditions were determined for both recombinant proteins. Results suggested that under the conditions tested, *P. pastoris* expressed a protein of the same molecular weight of CHH-SG2STOP. Optimal conditions for the expression of CHH-SG2EK were 4% methanol for one

day. The CHH-SG2EK protein, which had an apparent molecular weight of 12.61 kDa, was detected in Tricine-SDS-PAGE analysis and confirmed by Western Blot assay with the anti-c-*myc* antibody

Keywords: *L. vannamei*, CHH, recombinant proteins, *P. pastoris*, pPICZ α A.

Dedicatorias

A mis padres...

Agradecimientos

Al CONACyT a través de los proyectos FOMIX y Ciencia Básica, por otorgarme la beca para realizar la maestría en Ciencias con orientación en Biotecnología Marina en el CICESE.

A mi directora de tesis, la Dra. Elizabeth Ponce, por permitirme realizar mi tesis y por sus consejos y asesorías.

A los miembros del comité, los doctores Alexei F. Licea Navarro y Jorge A. Rosales Casián, por sus consejos y paciencia.

A mis compañeros de laboratorios, Dante Magdaleno, Edna Sánchez, Tania Camacho, Pavel Lugo y Oscar González por su ayuda y consejos.

Al Dr. José Luis Stephano, por permitirme utilizar su equipo de laboratorio y por sus consejos.

CONTENIDO

	Página
Resumen español.....	i
Resumen inglés.....	iii
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
II.1. Sistema neuroendocrino en crustáceos.....	3
II.2. Neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH.....	4
II.3. CHH.....	7
II.4. Producción de neurohormonas recombinantes.....	9
II.5 Sistema de expresión: <i>Pichia pastoris</i>	11
II.5.1 Metabolismo del metanol.....	11
II.5.2 Cepas.....	12
II.5.3 Vector de expresión pPICZ α A.....	13
II.6 Isoformas de CHH.....	14
III. Justificación.....	18
IV. Objetivos.....	19
V. Materiales y Métodos.....	20
V.1 Obtención de <i>chh-sg2</i>	20
V.1.1 Aclimatación de los organismos.....	20
V.1.2 Extracción de ARN.....	21
V.1.3. RT-PCR.....	22
V.1.4 Clonación TOPO-TA y transformación de <i>E. coli</i>	24
V.1.5 Selección de clonas.....	24
V.1.6. Extracción de plásmido.....	25
V.2. Clonación en pPICZ α A.....	25
V.2.1. Diseño de cebadores.....	25
V.2.2. PCR.....	26
V.2.3. Digestión.....	27
V.2.4. Ligación en pPICZ α A.....	28
V.2.5. Transformación en <i>E. coli</i>	28
V.3 Trasfección en <i>Pichia pastoris</i>	29
V.3.1. Linearización de los vectores.....	29
V.3.2. Diseño de cebadores y amplificación del vector.....	30
V.3.3. Purificación de los vectores lineares.....	31
V.3.4 Preparación de células electrocompetentes.....	31
V.3.5 Transfección de <i>P. pastoris</i> KM71.....	32

CONTENIDO (continuación)

	Página
V.4 Síntesis de neurohormonas recombinantes.....	33
V.4.1 Inducción.....	33
V.4.2 Sedimentación de las proteínas.....	34
V.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	34
V.4.4 Western Blot de CHH-SG2EK.....	35
VI. Resultados y discusión.....	37
VI.1 Obtención de <i>chh-sg2</i>	37
VI.2 Clonación en el vector pPICZ α A.....	39
VI.3 Transfección en <i>Pichia pastoris</i>	46
VI.3.1 Digestión de los vectores Pchh-sg2STOP y Pchh-sg2EK...	46
VI.3.2 Diseño de cebadores para amplificar los plásmidos Pchh-sg2Stop y Pchh-sg2EK.....	48
VI.3.3 Electroporación en <i>P. pastoris</i>	49
VI.4 Expresión de las neurohormonas recombinantes CHH-SG2STOP y CHHSG2EK.....	52
VII. Conclusiones.....	57
VIII. Literatura citada.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Estructura del pedúnculo ocular. LG, lámina ganglionar; ME, médula externa; MI, médula interna; MT, médula terminalis; ON, nervio óptico; SG, glándula del seno; XO, órgano X.	4
2.	Regulación de CHH mediante estímulos externos o internos. El símbolo + indica estimulación, y el símbolo - indica inhibición. Modificado de Santos y Keller (1993) y Fanjul-Moles (2006).	9
3.	Mapa del vector pPICZ α A (Invitrogen).	13
4.	Estructura de la secuencia del gen <i>chh-sg</i> y sus dos transcritos producidos por corte y empalme alternativo, <i>chh-sg1</i> y <i>chh-sg2</i> . Modificado de Lago-Lestón (<i>et al.</i> , 2007).	17
5.	Construcciones para clonar en el vector pPICZ α A. a) Construcción <i>chh-sg2STOP</i> , b) Construcción <i>chh-sg2EK</i> .	26
6.	Cebadores diseñados dentro de la secuencia del promotor 5'AOX para amplificar el vector completo.	30
7.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a las bandas de <i>chh-sg1</i> y <i>chh-sg2</i> de camarones aclimatados a 20 °C y diferentes salinidades.	37
8.	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de la amplificación de PCR de la banda extraída de gel, correspondiente a <i>chh-sg2</i> .	38
9.	Electroforesis en agarosa al 1.5 % del PCR realizado a las clonas blancas que crecieron en las placas.	39
10.	Electroforesis en agarosa al 1.5 % del PCR realizado para insertar el fragmento de <i>chh-sg2</i> en el vector pPICZ α A	41
11.	Electroforesis del vector pPICZ α A digerido con <i>Xho</i> I y <i>Xba</i> I.	42
12.	Electroforesis en agarosa al 1.5 % del PCR realizado a las clonas que crecieron en las placas de LB agar/zeocina.	42

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
13.	Mapa de los plásmidos Pchh-sg2STOP (a) y Pchh-sg2EK (b).	43
14.	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del plásmido Pchh-sg2STOP proveniente de la secuenciación con los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1. La secuencia del α -Factor se encuentra remarcada por arriba, la secuencia de la neurohormona se representa en negritas y subrayada y el símbolo * indica el codón de terminación.	44
15.	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del plásmido Pchh-sg2EK proveniente de la secuenciación con los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1. La secuencia del α -Factor se encuentra remarcada por arriba, la secuencia de la neurohormona se representa en negritas y subrayada y el símbolo * indica el codón de terminación.	45
16.	Electroforesis en agarosa al 1 % de la digestión con <i>Bst</i> X I.	46
17.	Electroforesis en agarosa al 1 % de la digestión con <i>Bst</i> X I.	47
18.	PCR de los plásmidos chh-sg2STOP y chh-sg2EK.	49
19.	Amplificación de PCR de las colonias de la construcción chh-sg2STOP obtenidas después de la transfección.	50
20.	Amplificación de PCR de las colonias de la construcción chh-sg2EK obtenidas después de la transfección.	51
21.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5 % de los ensayos de expresión de la construcción chh-sg2STOP con diferentes concentraciones de metanol.	53
22.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5 % de los ensayos de expresión de la construcción chh-sg2EK con diferentes concentraciones de metanol.	54
23.	Revelado del inmunoblot en la placa fotográfica.	55

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Secuencia de los cebadores utilizados.	23
II.	Preparación de los geles de poliacrilamida SDS-Tricina.	35

I. Introducción

En los últimos años, se ha incrementado la demanda por productos marinos, generando una sobreexplotación de estos recursos, por lo que se ha optado por el cultivo de estos organismos. La camaronicultura ha incrementado considerablemente en los últimos años a nivel mundial. Datos de la FAO indican que en el 2006 se alcanzó una producción mundial de 6.6 millones de toneladas. El camarón blanco *Litopenaeus vannamei* es una de las diez principales especies cultivadas en nuestro país y en el mundo, debido a sus características de resistencia a enfermedades, su capacidad de adaptación al medio y su rápido crecimiento en comparación de otros camarones. Los avances en los campos de fisiología, bioquímica, endocrinología, nutrición, patología y genética, han resultado en avances tecnológicos que han mejorado las ganancias de la acuicultura del camarón (Huberman, 2000). El estudio específico de la endocrinología de camarón ha sido fortalecido por los estudios de crustáceos en general. Esto debido a que para responder a los diferentes factores externos como fotoperiodo, temperatura, salinidad, nutrición y estrés, los crustáceos utilizan el sistema neuroendocrino.

La fisiología de los crustáceos está regulada por neurohormonas peptídicas las cuales se producen y liberan a la hemolinfa por el complejo OX-GS. A estas neurohormonas se le conoce como la familia CHH/MIH/GIH y regulan una diversa variedad de procesos fisiológicos, como la muda, metabolismo de glucosa, reproducción y balance hidromineral (Gu *et al.*, 2001). Dentro de esta familia se encuentran la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), la hormona inhibidora de la muda (MIH) y la hormona inhibidora de la gónada (GIH) también conocida como inhibidora de vitelogénesis (VIH). La hormona hiperglucémica de crustáceos es la más abundante y mejor estudiada de la familia peptídica, la cual juega un papel importante en el control de los niveles de glucosa y lípidos en la hemolinfa, así como en los procesos de muda, reproducción y osmorregulación (Fanjul-Moles, 2006).

El trabajo con las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH se ha visto facilitado al obtenerlas de manera recombinante, ya que la cantidad obtenida de los organismos es reducida. Una vez clonadas en vectores de expresión, su obtención se vuelve más rápida y sencilla. Para su producción recombinante, el ADN codificante para CHH de diferentes organismos a sido clonado tanto en vectores de expresión para sistemas eucarióticos como procarióticos.

Los genes que codifican para las neurohormonas MIH y CHH de *L. vannamei* fueron clonados por Lago-Lestón *et al* (2007). Asimismo, en este estudio se identificaron dos transcritos diferentes producidos por corte y empalme alternativo del gen *chh* (antes *mih*). Debido a que el arreglo estructural y las características de la secuencias obtenidas para los dos transcritos correspondían a la subfamilia CHH se les nombró como Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-SG2. Liv-CHH-SG1 fue clonada y expresada en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (Sánchez-Castrejón, 2008). Los ensayos de actividad biológica mostraron que Liv-CHH-SG1 tiene actividad hiperglucémica y no inhibidora de la muda. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que tenga actividad inhibidora de la muda, ya que se utilizó una hormona recombinante con un extremo adicional en el C-terminal, utilizado para su análisis y purificación, que pudo interferir con la actividad. La isoforma SG2 ha sido observada solo en condiciones de estrés por temperaturas bajas (20 °C). Esta neurohormona presenta todas las características estructurales de una CHH típica. Sin embargo, a diferencia de la isoforma SG1 que tiene 73 aminoácidos, SG2 tiene 74 aminoácidos y presenta el extremo C-terminal amidado. A la fecha no se ha llevado a cabo la clonación y expresión de este gen por lo que en este proyecto se plantea el llevar a cabo la clonación y expresión de la isoforma SG2 en la levadura *Pichia pastoris*. Esto permitirá contar con suficientes niveles de la neurohormona para ensayos posteriores de actividad biológica, para determinar su función, producción de anticuerpos y otros estudios endocrinológicos.

II. Antecedentes

El camarón blanco del Pacífico *Litopenaeus vannamei* pertenece a la familia Penaeidae. Es nativo de las costas del Pacífico, habita desde Sonora, México hasta el norte de Perú. Los adultos viven y se reproducen en mar abierto, mientras que las postlarvas migran a las costas a pasar la etapa juvenil en estuarios, lagunas costeras y manglares. En la primera etapa, la larva, denominada nauplio, nada intermitentemente y es fototáctica positiva. Los nauplios no requieren alimentación externa, sino que se nutren de su reserva embrionaria. Las siguientes etapas larvarias (protozoa, mysis y postlarva temprana) continúan siendo planctónicas por algún tiempo y se alimentan del fitoplancton y del zooplancton. Las postlarvas cambian sus hábitos planctónicos unos 5 días después de su metamorfosis a postlarva, migran a la costa y empiezan a alimentarse de detritos bentónicos, gusanos, bivalvos y crustáceos (FAO).

II.1 Sistema neuroendocrino en crustáceos

Los crustáceos presentan un sistema neuroendocrino complejo que involucra elementos de regulación a corto, mediano y largo plazo que les permite responder a los factores externos ajustando sus funciones vitales a las necesidades de cada momento. Entre las condiciones externas que regulan estos factores destacan la salinidad, la temperatura, el fotoperiodo, la nutrición y el estrés (Ferraris *et al.*, 1994). La temperatura y la salinidad son dos de los factores más importantes involucrados en crecimiento y reproducción en *L. vannamei*. Díaz *et al* (2000) demostraron que este organismos experimenta menos estrés en temperaturas entre los 27 y 30 °C y a una salinidad cercana al punto isosmótico que va de 25 a 27 ‰.

Los estudios en la endocrinología del camarón permiten el entendimiento del control de los diferentes procesos fisiológicos, los cuales están regulados en su mayoría por neurohormonas de origen peptídico, las cuales se han identificado en una amplia variedad de crustáceos; entre ellos *L. vannamei*.

El sistema endocrino en crustáceos está distribuido en el pedúnculo ocular y en los ganglios subesofágicos, torácico y abdominales. La glándula del seno (GS) ubicada en la superficie lateral del ganglio óptico en el pedúnculo ocular es considerada como el principal sistema endocrino en los crustáceos. Está conectada con el órgano X (OX), el cual se localiza en la médula terminalis. El complejo OX – GS está conformado por 150 – 200 somas correspondientes al órgano X, en los cuales se sintetizan los diferentes neuropéptidos que serán transportados hasta las terminales neurosecretoras que conforman la glándula del seno en donde son almacenados y posteriormente secretados (Fig.1).

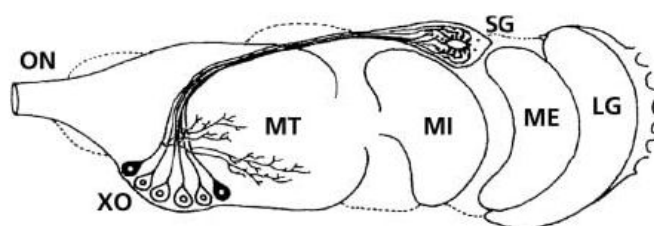


Figura 1. Estructura del pedúnculo ocular. LG, lámina ganglionar; ME, médula externa; MI, médula interna; MT, médula terminalis; ON, nervio óptico; SG, glándula del seno; XO, órgano X.

II.2 Neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH

En el complejo OX–GS se producen diferentes clases de péptidos con diferentes actividades, entre ellos los de la familia CHH/MIH/GIH, la cual incluye a la hormona hiperglucémica de crustáceos (CHH), que actúa en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, así como en el proceso de osmorregulación; la hormona inhibidora de la muda (MIH), regula el proceso de ecdisis por la inhibición de la síntesis de ecdiesteroides por el órgano Y; la hormona inhibidora de la gónada (GIH) también conocida como inhibidora de vitelogénesis (VIH), impidiendo la maduración del ovario y la vitelogénesis en las hembras, y en machos inhibe el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios actuando sobre la glándula

androgénica; por último la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH), la cual inhibe la liberación de metil farnesoato en el órgano mandibular. Dada la similitud en la secuencia de estas hormonas, no es extraño que sus funciones se sobrelapen.

Tras la caracterización de varias de estas neurohormonas, se ha revelado que existen homologías en su organización genómica. Los neuropéptidos pertenecientes a la familia CHH/MIH/GIH tienen un peso molecular de 7 – 9 kDa y presentan una secuencia de aminoácidos similar, contienen seis residuos de cisteína, dos argininas, un aspartato, una fenilalanina y una asparagina en posiciones idénticas. Las seis cisteínas forman tres enlaces disulfuro intramoleculares que las estabilizan (Katayama *et al.* 2004). Con base a la estructura primaria de la hormona madura se dividen en dos subfamilias. En la subfamilia I ó grupo I, están ubicados todos los péptidos CHH y la subfamilia II ó grupo II comprende a los péptidos MIH, GIH y MOIH. Los péptidos del grupo I en general presentan una secuencia o péptido señal, el péptido relacionado al precursor de CHH (CPRP), un sitio de procesamiento dibásico (KR o RR). La hormona madura que consta de 72 – 74 aminoácidos presenta el C-terminal amidado y el N-terminal bloqueado por un piroglutamato en el caso de langostas y cangrejos o el N-terminal libre como en los camarones. La amidación del C-terminal es una característica importante que confiere actividad biológica a un gran número de péptidos, tanto en invertebrados como en vertebrados. Los péptidos de la subfamilia II o grupo II presentan solo el péptido señal y la hormona madura, la cual es mas variable en longitud, ya que consta de 74 – 81 aminoácidos. Estos péptidos tienen tanto el extremo N-terminal como el C-terminal libres, además de presentar una glicina en la posición 12, ausente en los péptidos del grupo I (Keller, 1992; Lacombe *et al.*, 1999; Böking, *et al.*, 2002).

Además de las diferencias en la estructura de la hormona, los miembros de esta familia también se distinguen por la organización del gen que las codifica, separándose en dos grupos debido a las diferencias de la organización exón-intrón. Los genes de tipo I están constituidos por cuatro exones y tres intrones, dentro de este grupo se encuentran los genes que codifican para CHH. Los genes de tipo II presentan tres exones y dos intrones, en este grupo se ubican los genes que codifican para CHH-like de diferentes organismos así como MIH, GIH y MOIH. En los genes de tipo I el exón 1 contiene la región 5'UTR y una pequeña parte del péptido señal. El exón II codifica para la mayor parte del péptido señal, el péptido precursor de CHH (CPRP) y la mitad correspondiente al N-terminal del péptido maduro. En la mayoría de los genes de tipo I se ha reportado la presencia de dos transcritos: una conteniendo el exón III y la otra sin este exón en la región codificante. El péptido codificado por el transcrito con los exones I-II-IV es reportado como CHH mientras que el transcrito con los exones I-II-III-IV es considerado una nueva isoforma.

Cuando el transcrito está compuesto de los exones I-II-IV, el exón IV corresponde a la segunda parte del péptido hasta el C-terminal y la región 3'-UTR. Cuando el exón III está presente (I-II-III-IV) este codifica para la región C-terminal. En los genes del tipo II, los exones I y II contienen la región 5'-UTR, el péptido señal y la mitad N-terminal de la hormona madura. El exón III codifica para el C-terminal y la región 3'-UTR. El marco del péptido maduro está separado por un intrón fase 2 en ambos casos, el residuo en el sitio de hidrólisis está localizado a la derecha de la cuarta cisteína. Solo se han reportado arginina o lisina en este sitio (Chen *et al.*, 2005).

II.3 CHH

Los animales necesitan regular la concentración de glucosa en sangre para asegurar que se tienen los niveles necesarios para cubrir las necesidades energéticas de todas las células en el organismo. En el caso de los crustáceos, la neurohormona CHH juega un papel importante en los requerimientos de energía. Esta neurohormona se encarga de regular los niveles de glucosa en la hemolinfa movilizándola desde las reservas de glucógeno en el hepatopáncreas y músculo. Adicionalmente, también está involucrada en la regulación de lípidos (Kummer y Keller, 1993).

Las fluctuaciones de CHH durante el ciclo de vida de los organismos están reguladas mediante cambios en el sistema central neuromodulador provocados por estímulos ambientales o endógenos. La serotonina (5-HT), dopamina (DA), octopamina y Leu/Met-enkefalina son los principales neuromoduladores que regulan la secreción de CHH. Estudios en diferentes especies de crustáceos han demostrado que 5-HT tiene un efecto hiperglucémico, pero solo en organismos a los que no se le han ablacionado los pedúnculos oculares, sugiriendo una relación de la CHH secretada por el complejo OX-GS. Adicionalmente cuando se administra ciproheptadina (CPH), un antagonista de 5-HT, se inhibe el efecto hiperglucémico (Lorenzon, 2005). Para el caso de otros neuromoduladores como la dopamina y la Leu/Met-enkefalina, su papel en la regulación de glucosa no es tan claro. En *Palaemon elegans*, la inyección de DA provoca un descenso en los niveles de glucosa en hemolinfa (Lorenzon *et al.*, 2004) mientras que en *Carcinus maenas* (Lüschen *et al.*, 1993), *Penaeus monodon* (Kuo *et al.*, 1995) y *Macrobrachium malcolmsonii* (Komali *et al.*, 2005) tiene un efecto hiperglucémico. Las L/M encefalinas inducen hipoglucemia en *C. maenas* (Lüschen *et al.*, 1991) y en *Procambarus clarkii* (Sarojini *et al.*, 1995). Sin embargo, en *Astacus leptodactylus* tiene un efecto hiperglucémico (Lorenzon *et al.*, 2004) así como también en *P. elegans* (Lorenzon *et al.*, 1999), *Penaeus indicus* y *Metapenaeus monocerus* (Kishori *et al.*, 2001). La secreción de CHH también está asociada

como una respuesta de los organismos en condiciones de estrés. En *Homarus americanus* sometido a condiciones de estrés como hipoxia, cambios de salinidad y temperatura, se ha observado un aumento de CHH en hemolinfa (Chang *et al.*, 1998). Asimismo, al exponer a *P. elegans* a contaminación por cobre, se observa la liberación de 5-HT, seguido de la liberación masiva de CHH.

Experimentos *in vivo* muestran que CHH funciona como un sistema de retroalimentación negativa que regula la concentración de glucosa en la hemolinfa; las células del complejo OX-GS responden a una hiperpolarización producida por activación de una corriente de K^+ ocasionada por la D-glucosa, lo que inhibe la liberación de CHH (Fig.2). Cuando se entra en un estado de hipoglucemia las células se despolarizan lo que permite que CHH sea excretada y se genere glucosa a partir del glucógeno. Para ser transportada hacia los órganos y tejidos blanco, CHH se une a subunidades de la hemocianina. Una vez en estos induce la movilización de glucosa a partir del glucógeno. Entre los principales órganos blanco se encuentran el intestino medio y el músculo. La regulación de ácidos grasos y fosfolípidos se da mediante el catabolismo de las reservas de lípidos en el intestino medio (Fanjul-Moles, 2006). Adicionalmente a estas funciones, también está involucrada en el proceso de muda (De Kleijn y van Herp, 1995) y osmorregulación (Charmantier-Deures *et al.*, 1994; Spannings-Pierrot *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2003).

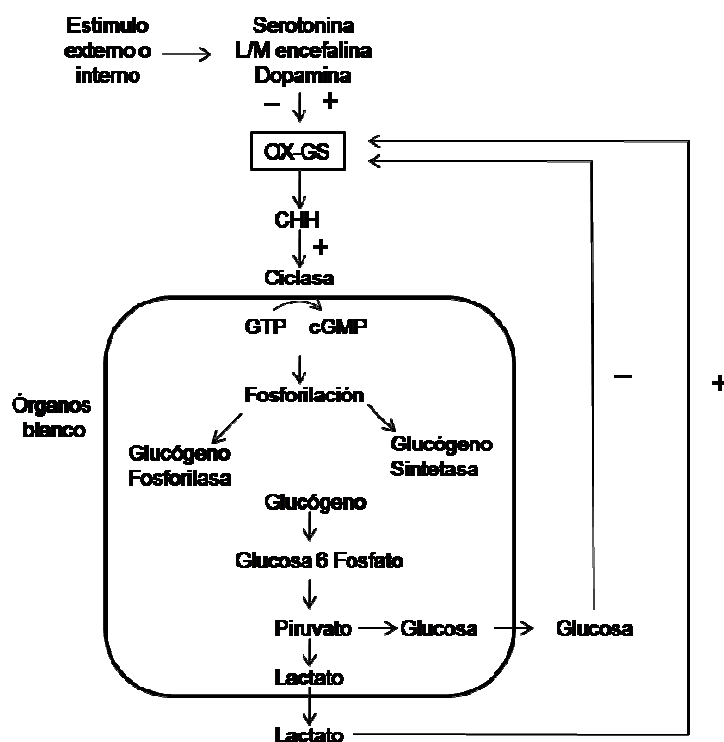


Figura 2. Regulación de CHH mediante estímulos externos o internos. El símbolo + indica estimulación, y el símbolo - indica inhibición. Modificado de Santos y Keller (1993) y Fanjul-Moles (2006).

II.4 Producción de neurohormonas recombinantes

Las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH han sido descritas para varias especies de crustáceos, sumando alrededor de 50 péptidos. El ADNc o ADN codificante para la neurohormona CHH ha sido clonado y secuenciado en diferentes especies de crustáceos. Entre estas se encuentran las CHH's de *H. americanus* (Tensen *et al.*, 1991), *Nephrops norvegicus* (Mettulio *et al.*, 2004), *Jasus lalandii* (Marco *et al.*, 2003), *C. pagarus* (Chung *et al.*, 1998) *C. maenas* (Kegel *et al.*, 1989; Dircksen *et al.*, 2001), *Gecarcinus lateralis* (Lee *et al.*, 2007), *Orconectes limosus* (Kegel *et al.*, 1991), *Procambarus bouvieri* (Huberman *et al.*, 1993), *Procambarus clarkii* (Yasuda *et al.*, 1994), *M. rosenbergii* (Sithgorngul *et al.*,

1999; Chen *et al.*, 2004), *P. japonicus* (Ohira *et al.*, 1997), *P. monodon* (Udomkit *et al.*, 2004; Wiwegweaw *et al.*, 2004), *M. ensis* (Gu *et al.*, 2000), *L. schmitti* (Huberman *et al.*, 2000) y *L. vannamei* (Lago-Lestón *et al.*, 2007).

El trabajo con las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH se ve facilitado al obtenerlas de manera recombinante, ya que la cantidad obtenida de los organismos es reducida, y es necesaria una gran cantidad de muestras. Una vez clonadas en vectores de expresión su obtención se vuelve más rápida y sencilla. Para su producción recombinante, el ADN codificante para CHH de diferentes organismos a sido clonado tanto en vectores de expresión para sistemas eucarióticos como procarióticos.

En los sistemas de expresión procarióticos se utiliza *Escherichia coli* como organismo productor de estas neurohormonas. En *E. coli* se han producido neurohormonas recombinantes de diferentes camarones; Mee-MIH-A (Gu *et al.*, 2001), Mee-MIH-B (Gu *et al.*, 2002), Mee-CHH (Gu, *et al.*, 2000) de *M. ensis*; Pem-CHH (Treerattrakool, *et al.*, 2005) de *P. monodon*; Pej-CHH (Ohira, *et al.*, 1997), Pej-MIH (Ohira, *et al.*, 1999), Pej-SGP-I (Katayama, *et al.*, 2002), Pej-SGP-VII (Nagai, *et al.*, 2009) de *P. japonicus*; Mar-CHH2, Mar-CHH-L (Ohira, *et al.*, 2006) de *Macrobrachium rosenbergii* y Liv-CHH-SG1, Liv-CHH-A (Organes, 2004) de *L. vannamei*. La utilización de *E. coli* provee ciertas ventajas ya que es un organismo fácil de manipular, crece en altas densidad, los medios de cultivo son económicos y se tiene un amplio conocimiento sobre su genoma, lo que permite la utilización de una gran variedad de cepas modificadas, según se necesite. Sin embargo, *E. coli* presenta cierta ineficiencia para secretar proteínas, ya que se agregan en cuerpos de inclusión y se encuentran de manera insoluble, por lo que al purificarlas es necesario solubilizarlas y renaturalizarlas. Esto presenta un problema al expresar proteínas de origen eucariótico, ya que la mayoría de estas sufren modificaciones post-traduccionales (Rai y Padh, 2001). Estos problemas pueden ser superados utilizando sistemas de producción de proteínas recombinantes eucarióticos.

II.5 Sistema de expresión: *Pichia pastoris*

La utilización de la levadura *P. pastoris* para la producción de proteínas recombinantes se ha incrementado en las últimas décadas, ya que puede ser fácilmente manipulada genéticamente, expresa altos niveles de proteínas recombinantes, intracelular y extracelularmente, y puede realizar modificaciones postraduccionales requeridas en la mayoría de las proteínas eucarióticas (glicosilación, formación de enlaces disulfuro, etc.). Más de 500 proteínas han sido producidas en *P. pastoris* (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

II.5.1 Metabolismo del metanol

P. pastoris es una levadura metilotrófica, es decir, que puede utilizar metanol como fuente de carbono. Algunas de las enzimas requeridas para el metabolismo de metanol están presentes en altos niveles solo cuando las células se encuentran creciendo en medio con metanol. El primer paso para el metabolismo de metanol es catalizado por la enzima alcohol oxidasa (AOX), la cual oxida el metanol a formaldehído y peróxido de hidrógeno. Esto se lleva a cabo dentro del peroxisoma para evitar la toxicidad del peróxido de hidrógeno. Posteriormente, en el peroxisoma el peróxido de hidrógeno es degradado a oxígeno y agua por la enzima catalasa. Una porción del formaldehído generado sale del peroxisoma y es oxidado a formato y CO₂ por dos deshidrogenasas citoplasmáticas. Este proceso de oxidación genera la fuente de energía que permite el crecimiento de las células en metanol.

La segunda enzima involucrada en el metabolismo del metanol es la dihidroxiacetona sintetasa (DHAS), la cual condensa el formaldehído restante en el peroxisoma con xilulosa-5-fosfato. Los productos de esta reacción, gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona, abandonan el peroxisoma y entran a la ruta citoplasmática, la cual regenera xilulosa-5-fosfato y por cada 3 ciclos se genera una molécula neta de gliceraldehído-3-fosfato. Ambas enzimas, AOX y

DHAS están presentes en altos niveles en las células creciendo en metanol, pero no son detectables en cultivos con otra fuente de carbono (glicerol, glucosa, etc.). Existen dos genes que codifican para la enzima alcohol oxidasa: *AOX1* y *AOX2*. El gen *AOX1* es el principal responsable de la actividad de esta enzima en la célula (Ellis *et al.*, 1985). La expresión del gen *AOX1* es regulada e inducida por metanol a nivel de la transcripción. En los cultivos de *P. pastoris* en medio con metanol, aproximadamente el 5% de ARN poli(A)⁺ proviene del gene *AOX1*, sin embargo en presencia de otras fuentes de carbono no es detectable (Tshopp *et al.*, 1987). La regulación del gene *AOX* involucra 2 mecanismos: represión/derepresión e inducción. Sin embargo, la ausencia del represor no da como resultado la transcripción del gene *AOX1* ya que para que esto suceda es necesaria la presencia del inductor metanol.

II.5.2 Cepas

Existen tres tipos de cepas de *P. pastoris* dependiendo de su capacidad para metabolizar metanol. La mayoría de las cepas crecen en metanol a una tasa similar a las cepas silvestres y se les denomina fenotipo Mut⁺ (methanol utilization plus). Sin embargo otras cepas como es el caso de KM71 (*his4 arg4 aox1Δ::SARG4*) presentan una disrupción en el gen *AOX1*, en esta cepa es debido a la inserción del gen *ARG4* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Cregg, *et al.*, 1987). Como estas cepas dependen solo de *AOX2* para metabolizar metanol crecen más lento cuando se encuentran en esta fuente de carbono, a este fenotipo se le denomina Mut^s (methanol utilization slow). Finalmente el tercer fenotipo presenta disrupciones en ambos genes *AOX*, por lo que es incapaz de crecer en presencia de metanol, y se le denomina Mut⁻ (methanol utilization minus) (Cregg, *et al.*, 1987).

II.5.3 Vector de expresión pPICZ α A

El vector pPICZ α A está diseñado para la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, pero también puede ser replicado en *E. coli* ya que cuenta con el origen de replicación de pUC. El casete de expresión está compuesto por 941 pb correspondientes a la secuencia del promotor AOX1 y la secuencia del gene AOX1 requerida para la terminación de la transcripción. El sitio de clonación múltiple (MCS) se encuentra en medio de las dos secuencias anteriores. Para la secreción de las proteínas heterólogas al medio, cuenta con la señal de secreción llamada factor de apareamiento α de *S. cerevisiae*. También contiene el gen *Sh ble* de *Streptoalloteichus himdustanus* que le confiere resistencia a Zeocina™. Adicionalmente cuenta con el epítipo c-myc, el cual permite la detección de la proteína recombinante y una etiqueta de polihisidinas que facilita su purificación mediante columnas de afinidad a níquel (Fig. 3).

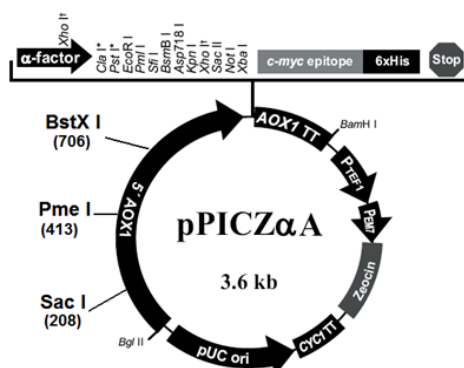


Figura 3. Mapa del vector pPICZ α A (Invitrogen).

En *P. pastoris* se han producido las neurohormonas de los camarones Pem-MIH I (Yodmuang, *et al.*, 2004), Pem-CHH2, Pem-CHH3 (Udomkit, *et al.*, 2004), Pem-CMG (Treerattrakool, *et al.*, 2002, 2003) de *P. monodon*; Pej-SGP-III de *P. japonicus* (Ohira *et al.*, 2003) y Liv-MIH-like (Sun, 1997), Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH de *L. vannamei* (Sánchez-Castrejón, 2008).

II.6 Isoformas de CHH

Los trabajos con neurohormonas recombinantes han permitido conocer la estructura genómica de estas neurohormonas así como su función en ensayos *in vivo* utilizando las neurohormonas recombinantes. En estos trabajos se han reportado diferentes isoformas de CHH ya sea mediante la secuenciación de la neurohormona o la clonación tanto de ADNc como ADN genómico. Algunas isoformas se producen mediante modificaciones postraduccionales, como la isomerización D/L del residuo fenilalanina en la posición 3, como se ha reportado en *P. clarkii*, CHH I y II (Yasuda *et al.*, 1994), *P. bouvieri* (Aguilar, *et al.*, 1995), *Astacus leptodactylus* (Serrano, *et al.*, 2003), *Orconectes limosus* (Soyez *et al.*, 1998) y *Cherax destructor* (Bulau *et al.*, 2003). También en *C. pagarus* se han purificado dos isoformas, CHH-I y CHH-II, en las cuales la única diferencia es la formación de un piroglutamato en CHH-II. Esta modificación también se observa en las neurohormonas CHH-I, pyro-CHH-I y CHH-I, pyro-CHH-II de *C. productus* (Hsu *et al.*, 2008). También se han descrito múltiples variantes de CHH codificadas por distintos genes, para *H. americanus* y *C. destructor* se han descrito dos variantes (Tensen *et al.* 1991; Bulau *et al.*, 2003), cinco para *P. monodon* (Davey *et al.*, 2000) y seis para *P. japonicus* (Yang *et al.*, 1997; Khayat *et al.*, 1998).

Además de esos tipos de isoformas, existen otras que se dan por corte y empalme alternativo del gen que codifica para estas neurohormonas. El cangrejo *C. maenas* presenta dos variantes de CHH de este tipo, una localizada en el complejo OX-SG, llamada Cam-CHH o Cam-SG-CHH y la que está presente en los órganos pericárdicos llamada Cam-PO-CHH (Dirksen *et al.*, 2001); Chen *et al.* (2004), reportaron dos isoformas CHH por corte y empalme alternativo en *M. rosenbergii*, Mar-CHH la cual se expresa en OX-GS y Mar-CHH-L encontrada en branquias, corazón, glándula antenal y ganglios torácicos. En el año 2006 Toullec y colaboradores describieron isoformas de este tipo en *Potamon ibericum*,

PoiCHHXO en pedúnculo ocular y PoiCHHPO en órganos pericárdicos, así como también en *Pachygrapsus marmoratus* siendo PamCHHA XO la isoforma obtenida de pedúnculo ocular y PamCHHB PO encontrada en órganos pericárdicos. También en *P. clarkii* se reportaron las isoformas Pcr-CHH y Pcr-CHH-L, las cuales se expresan en el pedúnculo ocular y en los ganglios torácicos, respectivamente (Lago-Lestón, *et al.*, 2007) y también se han reportado dos isoformas en *Scylla olivacea*, Sco-CHH en pedúnculo ocular y Sco-CHH en ganglios torácicos y órganos pericárdicos (Tsai *et al.*, 2008)

En *L. vannamei* se han realizado una serie de trabajos sobre las neurohormonas CHH. Sun (1994) amplificó el ADNc de la neurohormona que denominó MIH-like utilizando cebadores que diseñó a partir de la región conservada del gen que codifica para la MIH de *H. americanus* (Hoa-MIH), que era la secuencia de MIH del organismo más cercano a *L. vannamei* que se había publicado en ese entonces. Posteriormente Sun (1997) expresó MIH-like en *P. pastoris*, sin embargo, no pudo ser observada en geles desnaturalizantes de poliacrilamida teñidos con azul Coomassie. Sin embargo mediante Western Blot fueron detectadas dos bandas, una de 8 kDa (la esperada) y otra de 14 kDa, por lo que la autora sugirió que esta segunda banda se debía a un producto derivado de la glicosilación o de la agregación debida a los enlaces disulfuro. Cuando Lago-Lestón *et al* (2007) amplificaron el ADNc de *chh-sg1* y *chh-sg2* utilizaron cebadores derivados de *mih-like* por lo que originalmente nombraron a las isoformas codificadas por el gen *chh-sg*, como Liv-MH1 y Liv-MIH2. Sin embargo, estas neurohormonas son referidas al grupo CHH por las características que comparten con otros miembros de este grupo, como son la presencia del CPRP, la organización del gen *chh-sg* de cuatro exones, el extremo C-terminal amidado para el caso de Liv-CHH-SG2 y la falta de la glicina en posición 12 característica de las MIH. En trabajos más recientes se clonaron los genes de Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-A para su expresión en procariotas (Organes, 2004). Posteriormente *chh-sg1* y *chh* fueron clonados en vectores de expresión para eucariotas y expresados en *P. pastoris* (Sánchez-

Castrejón *et al.*, 2008). La isoforma Liv-CHH-SG1 fue clonada, expresada y utilizada en ensayos hiperglucémicos. Asimismo se realizaron ensayos de inhibición de la muda, ya que existía la posibilidad de que al igual que Hoa-MIH tuviera actividad de MIH. Los ensayos de actividad hiperglucémica utilizando la neurohormona Liv-CHH-SG1 con un C-terminal adicional (6X His, *c-myc*) mostraron un incremento en los niveles de glucosa en hemolinfa, por lo tanto Liv-CHH-SG1 presenta actividad hiperglucémica. En cuanto a la actividad inhibidora de la muda, no hubo diferencias significativas entre el control negativo y la neurohormona recombinante. Sin embargo, no se descarta la posibilidad que el extremo C-terminal adicional presente en Liv-CHH-SG1 pudiera interferir con la actividad inhibidora de la muda.

Ambas isoformas han sido observadas en el pedúnculo ocular. Liv-CHH-SG2 se produce particularmente a una temperatura de 20 °C y en salinidades de 10, 16, 22, 34 y 40‰. Las isoformas Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-SG2 son idénticas en los primeros 40 aminoácidos, sin embargo presentan una composición muy diferente en los últimos 30-31 aminoácidos de la región C-terminal. Esto se debe a que esta parte está codificada por diferentes exones del gen (Fig. 4). Generalmente el ARNm de las neurohormonas CHH está compuesto por cuatro exones (I-IV). Sin embargo, la secuencia de la prohormona se encuentra codificada en los exones I, II y III (Liv-CHH-SG1). Adicionalmente, por circunstancias que se desconocen, se da un proceso de corte y empalme alternativo en el que el exón III es removido, quedándose solo los exones I, II y IV; entonces el extremo C-terminal de la nueva proteína (Liv-CHH-SG2) está codificado en el exón IV. Por lo tanto mediante este proceso se producen neurohormonas diferentes. La isoforma Liv-CHH-SG1 está compuesta por 73 aminoácidos mientras que Liv-CHH-SG2 por 74 aminoácidos.

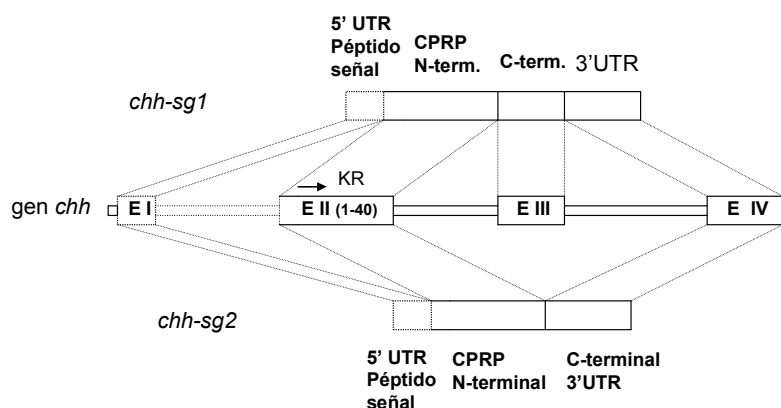


Figura 4. Estructura de la secuencia del gen *chh-sg* y sus dos transcritos producidos por corte y empalme alternativo, *chh-sg1* y *chh-sg2*. Modificado de Lago-Lestón *et al.*, 2007.

Al igual que Liv-CHH-SG1, los transcritos de las neurohormonas Prc-CHH-L, Mar-CHH-L y Cam-PO-CHH están compuestos por los exones I – IV; mientras que las isoformas Prc-CHH, Mar-CHH y Cam-CHH-SG presentan los mismos exones que Liv-CHH-SG2 (I, II y IV). Adicionalmente, Liv-CHH-SG2 presenta un sitio de procesamiento en el extremo C-terminal, lo que indica que esta isoforma está amidada, como se reporta en la mayoría de las CHH de otros organismos. Entre ambas isoformas existe un 65.8% de homología.

Isoformas similares a Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-SG2 han sido reportadas en branquias, ganglios torácicos, intestino y cerebro de *L. vannamei*. Estas isoformas fueron nombradas LvCHH y LvITP (Tiu *et al.*, 2007). LvITP presenta un porcentaje de similitud de 95.4% con Liv-CHH-SG1 y LvCHH 95.9% con Liv-CHH-SG2. El alto porcentaje de similitud se debe a que solo varían en unos cuantos residuos de aminoácidos.

La isoforma Liv-CHH-SG2 no ha sido expresada por lo que en el presente trabajo se pretende clonar y expresar Liv-CHH-SG2 en *P. pastoris* y purificarla para contar con suficiente cantidad para subsecuentes estudios moleculares y fisiológicos que ayuden a dilucidar el papel de esta isoforma en *L. vannamei*.

III. Justificación

Las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH controlan la mayoría de los procesos fisiológicos que rigen el ciclo de vida de los crustáceos.

Para poder estudiar los efectos fisiológicos de las neurohormonas de la familia CHH/MIH/GIH en *L. vannamei* es necesario extraerlas de las glándulas del seno ubicadas en los pedúnculos oculares del camarón. Sin embargo, debido a la poca cantidad que se obtiene de cada glándula es necesario llevar a cabo la extracción de glándulas de una gran cantidad de organismos. Asimismo, su purificación se dificulta por la similitud en tamaños entre las neurohormonas de esta familia. Una alternativa a este problema es la producción de neurohormonas recombinantes ya que una vez clonadas en vectores de expresión, es posible obtener las cantidades necesarias de una forma rápida y sencilla. Las neurohormonas Liv-CHH-SG1 y Liv-CHH-A han sido expresadas en *E. coli* y en *P. pastoris*, sin embargo la neurohormona Liv-CHH-SG2 no ha sido expresada de manera recombinante y se desconoce su actividad biológica. Por ello en este trabajo se pretende obtener la proteína de manera soluble, utilizando un sistema de expresión eucariota. Esto permitirá obtener una mayor cantidad de la hormona para llevar a cabo ensayos posteriores *in vivo* e *in vitro* que permitan entender el papel de esta isoforma en la fisiología de *L. vannamei* y su posible aplicación a la acuicultura del camarón.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener y clonar el transcrito del gen *chh-sg2* para la expresión de la proteína recombinante de la isoforma 2 de la hormona hiperglucémica de crustáceos de *Litopenaeus vannamei* (Liv-CHH-SG2) en *Pichia pastoris*

Objetivos específicos

Inducir la expresión del transcrito *chh-sg2* en camarones sometidos a estrés por temperatura y salinidad.

Clonar el ADNc del gen *chh-sg2* obtenido de pedúnculos oculares de camarones juveniles de *L. vannamei* sometidos a estrés.

Expresar la hormona recombinante Liv-CHH-SG2 a partir de un vector de expresión eucariota.

V. Materiales y Métodos

V.1 Obtención de *chh-sg2*

V.1.1 Aclimatación de los organismos

Con el propósito de obtener el transcrito *chh-sg2*, se aclimataron organismos a las condiciones de salinidad y temperatura donde ha sido observada la presencia del transcrito: 20 °C y a las salinidades de 22, 34 y 40 ‰. Para ello se utilizaron 23 camarones juveniles de un peso de 10-12 g donados por la granja acuícola Vizsomar (San Felipe, B.C.), los cuales se distribuyeron en tres acuarios de 40 L y se aclimataron a una temperatura de 20 °C en agua de mar. Los acuarios 1 y 2 contenían ocho organismos mientras que el acuario 3 contenía siete organismos. El cambio de temperatura se realizó de manera gradual durante tres días, se partió de una temperatura inicial de 25 °C, el segundo día se disminuyó a 23 °C y en el tercer día se alcanzó la temperatura de 20 °C. Los organismos permanecieron por tres días a esta temperatura y posteriormente se hizo un cambio gradual de salinidad durante dos días. El acuario 1 se mantuvo con agua de mar (34 ‰), en el acuario 2 se redujo la salinidad de manera gradual el primer día a 28 ‰ y se continuó el segundo día hasta alcanzar una salinidad de 22 ‰ y en el acuario 3 se aumentó la salinidad a 37‰ durante el primer día y se continuó el segundo día hasta obtener una concentración final de 40‰. Los organismos permanecieron en estas condiciones por tres semanas durante las cuales se les alimentó con un 10 % de su peso húmedo con purina comercial (Camaronina) dividido en dos raciones, se realizaron dos recambios de agua del 20% diarios y se mantuvieron con fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

V.1.2 Extracción de ARN

Después de las tres semanas en las que los camarones estuvieron en las condiciones de estrés mencionadas anteriormente, ambos pedúnculos oculares de los camarones fueron ablacionados y almacenados temporalmente en solución salina (NaCl 450 mM; KCl 10 mM) (Racotta y Palacios, 1998), mientras se les removía la capa de pigmentos y así evitar interferencia con la extracción de ARN total. Una vez limpios se utilizaron seis pedúnculos (50-100 mg) para la extracción de ARN total de cada condición. Primero se homogenizaron en 1 ml de solución TRI (Sigma-Aldrich) con la ayuda de un pistilo, se centrifugó a $16060 \times g$ (todas las centrifugaciones fueron a la misma velocidad) 10 minutos a 4°C . La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de BCP (1-Bromo-3-Cloropropano), se agitó por 15 s y dejó reposando 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 4°C y la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio. Se le adicionaron $500 \mu\text{l}$ de isopropanol y se incubó diez minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurridos los diez minutos se centrifugó por 15 minutos a 4°C ; se descartó el sobrenadante y se le adicionó 1 ml de etanol, se le agitó y se centrifugó por diez minutos a 4°C . El sobrenadante fue removido y el pellet con el ARN total se dejó secar por cinco minutos y después se disolvió en $20 \mu\text{l}$ de agua desionizada tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC).

Antes de realizar la reacción de Transcripción Reversa (RT) el ARN total fue tratado con la enzima DNasa I Grado Amplificación (Invitrogen) para remover el ADN que pudiese estar presente en la muestra. La reacción se llevó a cabo en un volumen de $10 \mu\text{l}$, se agregaron $2 \mu\text{l}$ de ARN proveniente de la extracción, Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), MgCl_2 2 mM, KCl 50 mM, DNasa 1 U y $6 \mu\text{l}$ de agua desionizada tratada con DEPC. La reacción se incubó 15 min a temperatura ambiente y para inactivarla se agregó $1 \mu\text{L}$ de EDTA 25 mM y se incubó a 65°C por diez minutos. Este proceso se realizó con todas las muestras provenientes de las diferentes salinidades.

V.1.3. RT-PCR

Una vez tratado el ARN total extraído de cada una de las condiciones con la enzima DNasa I, se realizó la síntesis del ADNc utilizando el kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) a partir de un oligo (dT)₂₀. En un tubo estéril se mezcló oligo (dT)₂₀ 50 µM, ARN tratado con DNasa I 2 µl, dNTP mix 2 mM y 6 µl de agua tratada con DEPC. Esta reacción se incubó durante cinco min a 65 °C y posteriormente se incubó en hielo por dos minutos. En otro tubo se hizo la mezcla con el resto de los reactivos, Tris-HCl (pH 8.4) 40 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 20 mM, RNaseOut 40 U y SuperScript III RT 200 U. Después de incubar en hielo, la mezcla fue adicionada al tubo que contenía el ARN, incubada a 55 °C durante una hora e inactivada incubándola durante cinco min a 85 °C.

Para realizar la amplificación por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se tomaron 2 µl de ADNc de cada una de las muestras y se incorporaron en un tubo con Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, dNTP's 1 mM, 1.5 mM de MgCl₂, MIH-FOR (Tabla I) 10 pmol, cebador MIHREV (Tabla I) 10 pmol y por último se le agregaron 1.25 U de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen) y 13.65 µl agua destilada para obtener un volumen final de la reacción de 20 µl. Los ciclos utilizados en el termociclador fueron: un ciclo a 94 °C por cinco min, 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 60 °C por 45 s 72 °C por 1.5 min; y un ciclo de extensión final a 72 °C por diez min. Debido a que los cebadores utilizados amplifican ambas isoformas, ya que hibridizan con las secuencias de los exones II y IV y ambos transcritos contienen estos exones; se separaron las bandas correspondientes a *chh-sg1* y *chh-sg2* mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla I. Secuencia de los cebadores utilizados.

<p>Amplificación del ADNc de los transcritos <i>chh-sg1</i> y <i>chh-sg2</i> MIH-FOR: 5'-TTGAGAAGCTGCTGCTGTCGTCCT-3' MIHREV: 5'-CTTGTTTCCTCCACATTAGCG-3'</p>
<p>Amplificación de la secuencia del péptido maduro mihFor-t: 5'-GACACCTTCGACCAC-3' MIH2REV: 5'-CCCTACCAGCTGGAC-3'</p>
<p>Amplificación del inserto en el vector TOPO[®]TA pCR[®] 2.1 M13 Forward: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' M13 Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'</p>
<p>Inserción de sitios de restricción a <i>chh-sg2</i> para clonar en pPICZαA MIHXhoF: 5'CCGCTCGAGAAAAGAGACACCTTCGACCACTCCTGCAAGGGCATCTACG-3' MIH2XbaIStop-R: 5'-GCTCTAGATTACCCTACCAGCTGGACGGGTTACGTACTCGTC-3' MIH2XbaIEK-R: 5'GCTCTAGAGCCTTGTCATCGTCATCCTCCCTACCAGCTGGACGTG-3'</p>
<p>Amplificación del inserto en el vector pPICZαA 5' AOX1: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3' 3' AOX1: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'</p>
<p>Amplificación del vector pPICZαA completo PicFor: 5'GGCTTTCTGAGTGTGGGGTC 3' PicRev: 5'CTCATCTGGAGTGATGTTTCG 3'</p>

Después de haber corrido las amplificaciones en gel, se purificó la banda correspondiente a *chh-sg2* utilizando QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) siguiendo el protocolo proporcionado en el kit. Ya purificada esta banda se utilizó para realizar un PCR con los cebadores mihFor-t y MIH2REV (Tabla I) que amplifican la región que codifica para el péptido maduro CHH-SG2. Las reacciones contenían 100 ng de ADN, Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, dNTP's 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, mihFor-t 20 pmol, MIH2REV 20 pmol, Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen) 1.25 U y 13.65 μ l agua destilada para obtener un volumen final de la reacción de 20 μ l. Las condiciones en el termociclador fueron: 1 ciclo a 94 °C por tres min, seguido por 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 50 °C y 45 s a 72 °C y por último un ciclo de extensión de diez min a 72 °C. El fragmento obtenido fue una banda de 222 pb.

V.1.4 Clonación TOPO-TA y transformación de *E. coli*

Después de la amplificación por PCR del transcrito de *chh-sg2* con los cebadores mihFor-t y MIH2REV se clonó en el vector TOPO[®]TA pCR[®]2.1 (Invitrogen). Para esta clonación se utilizaron 3 µl del producto de PCR, 2 µl de solución salina (NaCl 1.2 mM, MgCl₂ 60 mM), 1 µl de agua destilada estéril y 10 ng del vector TOPO[®]TA pCR[®]2.1. Esta mezcla se incubó por 30 min a temperatura ambiente y después se colocó en hielo, en el cual se mantuvo hasta su uso. Una vez realizada la reacción de ligación se continuó con la transformación en las células TOP10. La reacción de clonación fue adicionada a 50 µl de células TOP10 químicamente competentes incubándose durante media hora en hielo y después se le dio un choque térmico a 42 °C durante un min. Inmediatamente después se incubó en hielo durante un min y posteriormente se le agregaron 250 µl de medio S.O.C. (extracto de levadura 0.5, triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) y se incubó durante una hora a 37 °C a 250 rpm. Una vez transcurrida la hora de incubación se sembró en placas de medio Luria Bertani (LB) (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%, pH 7.5) con ampicilina (50 µg/ml) y 40 µl de X-Gal (40 mg/ml) y se incubaron a 37 °C toda la noche.

V.1.5 Selección de clonas

Las colonias blancas que crecieron en las placas fueron re-estriadas en placas de LB/ampicilina (50 µg/ml) y las que crecieron fueron sometidas a un PCR de colonia con los cebadores mihFor-t y MIH2REV así como también con los cebadores M13 Forward y M13 Reverse presentes en el plásmido TOPO-TA (Tabla I). En las reacciones se mezclaron Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, dNTP's 2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, MIH-FOR (Tabla I) 20 pmol y MIHREV (Tabla I) 20 pmol para una de las reacciones y en la otra se utilizaron 100 ng del cebador M13 Forward (Tabla I) y 100 ng del cebador M13 Reverse (Tabla I). Después se picaron las colonias con una punta estéril y se inocularon los tubos de PCR y por último se le agregaron 1.25 U de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen) y 13.65 µl de agua destilada estéril para obtener un volumen final de la reacción de 20 µl. El programa

utilizado fue el siguiente: un ciclo a 94 °C por tres min, seguido por 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 50 °C y 45 s a 72 °C y por último un ciclo de extensión de 10 min a diez °C. La amplificación se corrió en un gel de agarosa al 1.5%.

V.1.6. Extracción de plásmido

Las clonas positivas fueron crecidas en tres ml de LB con ampicilina (50 µg/ml) a 37 °C durante 12 horas y se les extrajo plásmido utilizando el kit Allele Miniprep. Este plásmido fue enviado a secuenciar (SeqxCel, San Diego, CA, USA) para corroborar que el fragmento que había sido extraído del gel y clonado en el vector efectivamente correspondiera a *chh-sg2*. A este vector se le denominó T*chh-sg2*. Las clonas positivas se criopreservaron a -70 °C.

V.2. Clonación en pPICZαA

V.2.1. Diseño de cebadores

Para clonar la secuencia correspondiente a *chh-sg2* en el vector de expresión eucariota pPICZαA fue necesario agregar, mediante cebadores, sitios de restricción de enzimas compatibles con el vector. Para realizar esta parte del trabajo se siguieron dos estrategias, en la primera se amplificó el fragmento de *chh-sg2* con los cebadores MIHXhoF y MIH2XbaIStop-R (Tabla I) Al utilizar el cebador sentido (forward) MIHXhoF se agregó el sitio de corte de la enzima *Xho* I y se restituyó el sitio de corte de la aminopeptidasa Kex2, ya que al clonar con esta enzima en el vector pPICZαA se remueve el sitio de corte para dicha endopeptidasa. Además también se eliminaron los sitios de corte de la aminopeptidasa Ste13. El cebador antisentido (reverse) MIH2XbaIStop-R agrega el sitio de corte de la enzima *Xba* I, además adiciona un codón de termino para evitar que al momento de la expresión de la neurohormona recombinante en *P. pastoris*, estén presentes los sitios de polihistidinas y el epitopo de *c-myc* que se incluyen en el vector pPICZαA. Esto nos permite obtener la neurohormona nativa. Asimismo con este cebador se elimina la última lisina en la secuencia de la neurohormona quedando como aminoácido final una glicina la cual servirá como

sitio de amidación por la enzima peptidilglicina α -amidating ya que la secuencia de Liv-CHH-SG2 indica que esta tiene el extremo C-terminal amidado.

Para la segunda estrategia se utilizó el mismo cebador sentido, MIHXhoF (Tabla I) pero como cebador antisentido se utilizó MIH2XbaIEK-R (Tabla I) el cual también agrega el sitio de restricción para *Xba* I. Adicionalmente el cebador incorpora el sitio de reconocimiento de la endopeptidasa Enterocinasa el cual nos permite eliminar los sitios de polihistidinas y el del epitopo *c-myc*. Como en esta construcción no se incluyó el codón de termino esto nos permite purificar la neurohormona mediante el sitio de polihistidinas o el epitopo de *c-myc* y después eliminarlos con la enzima enterocinasa (Fig. 5).

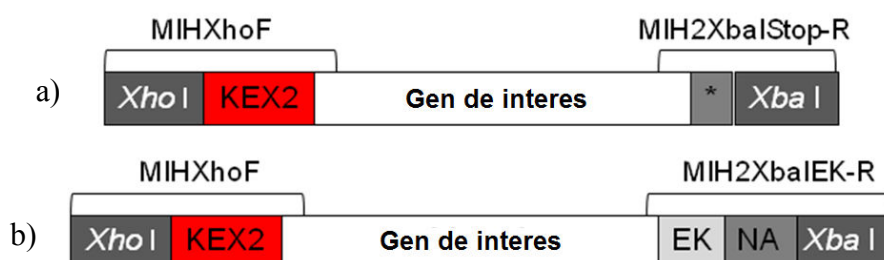


Figura 5. Construcciones para clonar en el vector pPICZ α A. a) Construcción chh-sg2STOP, b) Construcción chh-sg2EK.

V.2.2. PCR

Una vez que se diseñaron los cebadores para agregar los sitios de corte de *Xho* I y *Xba* I así como la incorporación de un codón de terminación y el sitio de reconocimiento de la endopeptidasa Enterocinasa. Las reacciones de PCR contenían Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, 0.2 mM de cada nucleótido, de MgCl₂ 1.5 mM, MIHXhoF (Tabla I) 20 pmol, MIH2XbaIStop-R (Tabla I) 20 pmol, para la construcción que contiene el codón de terminación y MIH2XbaIEK-R

(Tabla I) 20 pmol, para la construcción que contiene el sitio de enterocinasa, 100 ng de vector Tchh-sg2 y 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa Platinum. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de tres min a 94°C, 30 ciclos de 45 s 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C y un ciclo final de extensión a 72°C por diez min. Las reacciones se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%.

Una vez comprobada la amplificación en gel se purificaron los productos directamente de PCR utilizando el kit MERmaid Spin (QBIOGENE) y se cuantificaron por espectrofotometría a 260 nm (ND-1000, NanoDrop Technologies). La construcción que presenta el codón de término se denominó chh-sg2STOP mientras que a la construcción que presenta el sitio de reconocimiento de la enzima enterocinasa se le llamo chh-sg2EK.

V.2.3. Digestión

Los fragmentos de PCR purificados y cuantificados fueron digeridos con las enzimas *Xba* I y *Xho* I (Fermentas) en una doble digestión utilizando el buffer Y Tango, en el cual la enzima *Xba* I tiene un 50-100% de actividad a una concentración 2X mientras que *Xho* I presenta una actividad del 100%. La reacción contenía Tris-acetato (pH 7.9 a 37°C) 66 mM, acetato de magnesio 20 mM, acetato de potasio 20 mM, BSA 0.2 mg/ml, 1.5 µg de producto de PCR purificado, *Xba* I 20 U y *Xho* I 10 U, ajustado con agua destilada estéril a un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó 12 h a 37°C y después fue inactivada a 65°C durante 20 min. Para ambos productos purificados de PCR, chh-sg2STOP y chh-sg2EK las condiciones de digestión fueron las mismas. Posteriormente las reacciones fueron purificadas utilizando el kit MERmaid Spin (QBIOGENE).

Las condiciones de digestión del vector pPICZαA fueron: Tris-acetato (pH 7.9 a 37°C) 66 mM, acetato de magnesio 20 mM, acetato de potasio 132 mM, BSA 0.2 mg/ml, vector 3 µg, *Xba* I 40 U y *Xho* I 20 U, ajustado con agua destilada estéril a

un volumen final de reacción de 20 μ l. La reacción se incubó durante 16 h a 37 °C y después se inactivó a 65 °C por 20 min. Posteriormente la reacción de digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% y se recuperó el fragmento correspondiente al vector digerido utilizando el kit QIAquick gel extraction (Qiagen).

V.2.4. Ligación en pPICZ α A

Una vez que los fragmentos chh-sg2STOP, chh-sg2EK y el vector pPICZ α A fueron digeridos y purificados, se realizó la reacción de ligación, la cual contenía Tris-HCl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP (pH 7.8 a 25 °C) 0.5 mM, 1 U de T4 DNA ligasa (Fermentas), vector 140 ng, inserto 70 ng y ajustado con agua destilada estéril a un volumen final de reacción de 20 μ l. La reacción fue incubada durante 12 h a temperatura ambiente. Las ligaciones del vector con ambos insertos se realizaron bajo las mismas condiciones.

V.2.5. Transformación en *E. coli*

La reacción de ligación se transformó en células TOP10 químicamente competentes mediante choque térmico. Ambas reacciones de ligación se incubaron con 50 μ l de células competentes durante media hora en hielo y posteriormente se les dio un choque térmico a 42 °C por un minuto e inmediatamente después fueron transferidas a hielo en el cual permanecieron un minuto y después se les agregaron 250 μ l de medio SOC y se incubó una hora a 37 °C a 250 rpm. Después se sembraron 50 μ l en placas con LB agar y zeocina (25 μ g/ml).

Para comprobar la presencia del inserto se realizó un PCR de colonia utilizando los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1 (Tabla I) que flanquean el sitio de clonación (Tabla I). Las reacciones contenían: Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, 0.2 mM de cada nucleótido, MgCl₂ 1.5 mM, 0.4 μ M de cada cebador, Taq DNA polimerasa Platinum 1.25 U y una porción de la colonia en un volumen total de 20 μ l. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de tres minutos a 94 °C, 30 ciclos de 45 s a

94 °C, 45 s 55 °C, 1 min 72 °C y un ciclo final de extensión por diez min a 72 °C. De las clonas que presentaron un fragmento del tamaño esperado se eligieron dos de cada construcción, se les extrajo plásmido con el kit PureLink™ HQ Mini Plasmid DNA Purification (Invitrogen) y fueron enviados a secuenciar (SeqxCel, San Diego, CA, USA). Los plásmidos construidos fueron denominados Pchh-sg2STOP y Pchh-sg2EK.

V.3 Trasfección en *Pichia pastoris*

V.3.1. Linearización de los vectores

El vector pPICZαA cuenta con tres sitios de restricción únicos (*BstX* I, *Sac* I y *Pme* I) dentro de la secuencia de 5'AOX1 los cuales nos permiten linearizarlo para una recombinación más eficiente con el genoma de *P. pastoris* (Fig. 6). De estas enzimas de restricción se seleccionó a *BstX* I ya que en la secuencia del inserto se encuentra un sitio de restricción para *Sac* I y la enzima *Pme* I deja extremos rasurados. Se extrajo plásmido utilizando el kit PureLink™ HQ Mini Plasmid DNA Purification (Invitrogen) y se realizaron reacciones de digestión tanto para el plásmido chh-sg2STOP como para chh-sg2EK bajo las mismas condiciones. Las reacciones contenían 10 µg de vector, Tris-HCl (pH 7.9 a 37 °C) 6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM y *BstX* I (Fermentas) 5 U, en un volumen de 50 µl. Se probaron diferentes tiempos de digestión de la enzima: 2, 4, 5 y 8 h a 55 °C. Posteriormente se realizó una re-extracción con fenol/cloroformo y se precipitó con 2.2 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 volúmenes de acetato de sodio. Esto se realizó tanto para el vector Pchh-sg2STOP como para el vector Pchh-sg2EK. Posteriormente las reacciones se corrieron en un gel al 1% para visualizar los productos de las digestiones.

V.3.2. Diseño de cebadores y amplificación del vector

Se diseñaron cebadores que nos permitieran amplificar el vector pPICZαA completo y así poder obtenerlo de manera lineal. Los cebadores se diseñaron dentro de la secuencia de 5'AOX1, específicamente en la parte donde se encuentran los tres sitios de restricción de las enzimas *Sac* I (base 208), *Pme* I (base 413) y *BstX* I (base 706) que son las que nos permiten linearizar el vector dentro de esta secuencia. De esta manera al realizar un PCR el vector queda ya de manera lineal con el número de bases de la secuencia 5'AOX1 en los extremos, los cuales son necesarios para efectuar la recombinación (Fig. 6). Los cebadores resultantes fueron PicFor que hibridiza con las bases 276 -286 y el cebador PicRev que hibridiza con las bases 258 – 275 del vector pPICZαA (Tabla I).

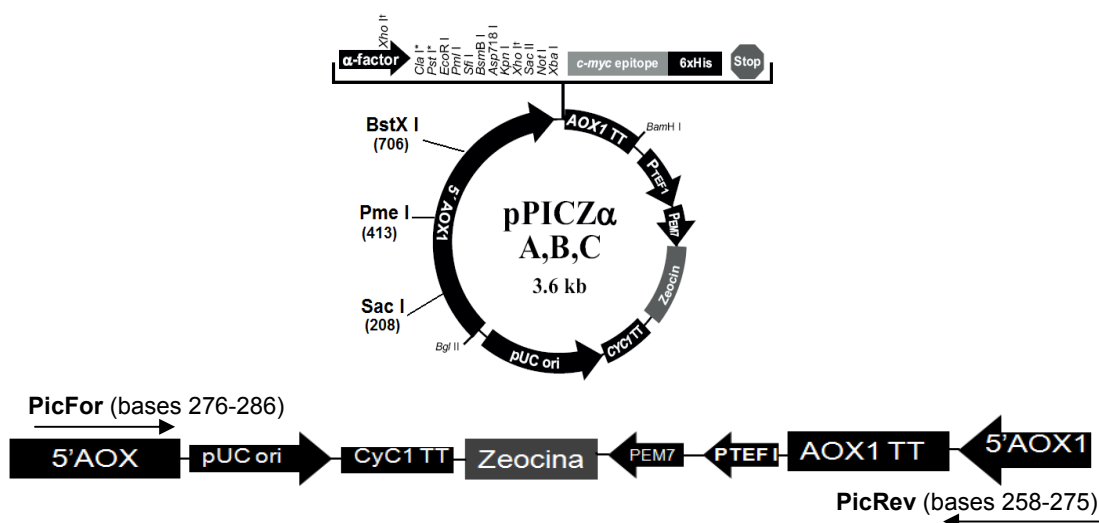


Figura 6. Cebadores diseñados dentro de la secuencia del promotor 5'AOX para amplificar el vector completo.

Se realizaron varias reacciones de PCR para encontrar las condiciones óptimas de amplificación del vector. La reacción contenía 1X de buffer de amplificación *Pfx*, $MgSO_4$ 1 mM, 0.3 mM de cada nucleótido, PicFor (Tabla I) 20 pmol, PicRev (Tabla I) 20 pmol, plásmido Pchh-sg2STOP 150 ng y *Pfx* DNA polimerasa platinum

(Invitrogen) 1.5 U, en un volumen de 20 μ l. Para la amplificación del plásmido Pchh-sg2EK las condiciones de reacción fueron las mismas. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 30 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 60 °C, 3 min a 68 °C y un ciclo final de extensión a 68 °C durante 10 min. Las reacciones se corrieron en un gel de agarosa al 1%.

V.3.3. Purificación de los vectores lineares

Una vez amplificados los vectores se procedió a su purificación para llevar a cabo la electroporación en *P. pastoris*. Los plásmidos amplificados por PCR fueron purificados del gel utilizando el método de fenol congelado. Las bandas removidas del gel se colocaron en tubos de 1.5 ml y se les agregó un volumen de fenol, se mezcló mediante vórtex y se puso en hielo seco por cinco minutos, después se incubó dos minutos a 55 °C. Esto se repitió dos veces más. Se volvió a congelar y se centrifugó congelado por 15 min a 16060 x *g* a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa, se le agregó un volumen de fenol y se centrifugó dos minutos a 16060 x *g*. Después se recuperó de nuevo la fase acuosa, se re-extrajo con un volumen de fenol/cloroformo, se precipitó con 2.2 vol de etanol absoluto y 1/10 vol de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y se resuspendió en agua destilada estéril. Una vez obtenida la cantidad necesaria de vector linearizado se procedió a la electroporación de *P. pastoris*.

V.3.4 Preparación de células electrocompetentes

Para preparar células electrocompetentes de *P. pastoris* KM71 se tomó una colonia de esta cepa previamente sembrada en placas con medio YPD (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2% y agar 20%), se inoculó en tres ml de medio YPD y se incubó 18 h a 30 °C y 300 rpm. Posteriormente se tomaron 0.6 ml y se inocularon en 250 ml de medio YPD en un matraz el cual se incubó a 30 °C y 300 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ 2.3. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada el cultivo se centrifugó a 1500 x *g* por cinco minutos a 4 °C, se resuspendió el paquete celular en 250 ml de agua destilada estéril fría mediante

vórtex y se centrifugó de nuevo bajo las condiciones anteriores. El paquete se resuspendió en 125 ml de agua destilada estéril utilizando vórtex y se volvió a centrifugar. Las células se resuspendieron con 10 ml de sorbitol al 1 M, se volvieron a centrifugar y por último se resuspendieron en 200 μ l de sorbitol al 1 M frío. Las células se almacenaron en hielo hasta su uso durante el mismo día.

V.3.5 Transfección de *P. pastoris* KM71

Para electroporar las células se utilizó el equipo MicroPulser Electroporator (BioRad). Primero se incubaron 2 celdas de electroporación de 0.2 cm 5 min en hielo, después se les adicionaron 80 μ l de células electrocompetentes y los vectores lineales: 5.4 μ g de Pchh-sg2STOP y 6.7 μ g de Pchh-sg2EK. Se les dio un pulso (2.0 kv, 25 μ F, 200 Ω , 5 ms) e inmediatamente después se les agregó un ml de sorbitol 1 M y se transfirió el contenido a tubos estériles de 15 ml y se incubaron una hora sin agitación a 30 °C, después se les agregó un ml de medio YPD y se incubó una hora a 30 °C en agitación. Posteriormente las células se sembraron en cajas con medio YPDS (1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% de glucosa, 20% de agar y 1 M de sorbitol) y se incubaron a 30 °C hasta observar colonias.

Se eligieron diez colonias de cada construcción y se les hizo PCR de colonia con los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX para verificar si estas contenían el inserto. Antes de realizar el PCR se tomó una porción de la colonia, se resuspendió en 10 μ l de agua estéril y se le adicionaron 25 U de liticasa, se incubó 20 min a 30 °C y después se incubó 20 min a -70 °C. Esto se hizo con el fin de lisar las células y liberar el ADN. La reacción de PCR contenía: Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, 0.2 mM de cada nucleótido, MgCl₂ 1.5 mM, 5'AOX1 0.4 μ M, 3' AOX1 0.4 μ M, 2.5 μ l del lisado celular y Taq DNA polimerasa Platinum 1.25 U. Las condiciones fueron un ciclo de tres minutos a 94 °C, 25 ciclos de 1 min a 94 °C, un min 58 °C, un min 72 °C y un ciclo final de extensión por diez minutos a 72 °C.

Se seleccionaron dos clonas positivas de cada construcción y se mandó a secuenciar el producto de PCR (SeqxCel, San Diego, CA, USA). Las clonas positivas se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V.4 Síntesis de neurohormonas recombinantes

V.4.1 Inducción

Para determinar la concentración de metanol y el tiempo apropiado para la expresión de las neurohormonas recombinantes se hizo un ensayo con tres diferentes concentraciones de metanol así como un control sin metanol, tomando muestras diariamente.

Se inocularon tres ml de medio YPD con zeocina ($100\text{ }\mu\text{g/ml}$) con cada una de las clonas que contenían las diferentes construcciones y se incubaron en agitación durante 18 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se tomó un ml del cultivo anterior y se inoculó en 500 ml de medio BMGY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, de fosfato de potasio pH (6.0) 100 mM, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5} y glicerol 1%) y se incubaron en agitación a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una $\text{OD}_{600}=3$. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada el cultivo se transfirió a tubos cónicos y se centrifugaron durante cinco minutos a $3000\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y cada uno se resuspendió con 50 ml de agua estéril fría, se centrifugó de nuevo y cada paquete celular se resuspendió con diez ml de medio BMMY (extracto de levadura 1%, peptona 2%, de fosfato de potasio pH (6.0) 100 mM, YNB 1.34%, biotina 4×10^{-5}). Estos fueron transferidos a cuatro matraces obteniendo un volumen final de 50 ml con las diferentes concentraciones de metanol (0,1 2 y 4% (v/v)). Los cultivos se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 300 rpm durante siete días. Durante este tiempo se les adicionó metanol para mantener la inducción. Posterior a la adición de metanol se tomaron muestras de dos ml diariamente, las cuales se centrifugaron tres minutos a $16060\times g$, recuperándose el sobrenadante y almacenándolo a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

V.4.2 Sedimentación de las proteínas

Las muestras almacenadas se precipitaron con 150 μ l de TCA (100%) por cada ml de muestra y se incubaron durante 12 h a 4 °C. Después se centrifugó a 4 °C por 20 min a 16060 x *g*, se decantó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de acetona fría y se centrifugó bajo las condiciones anteriores, se removió el sobrenadante, se secó el pellet a temperatura ambiente durante cinco minutos y se resuspendió en 25 μ l de buffer de carga 2X (Tris-HCl (pH 6.8) 125mM, SDS 4%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.004%).

V.4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las expresión de las proteínas se visualizó en geles de poliacrilamida al 16.5 % (Tabla II). Previo a la electroforesis las muestras fueron incubadas diez minutos a 95 -100 °C. Después se cargaron las muestras en el gel y se corrió a un amperaje constante de 50 mA durante 2 – 3 h. Los geles se tiñeron con una solución de azul Coomasie (azul Coomasie 1%, metanol 40% y ácido acético 10%), incubándose en esta solución durante 12 h. Posteriormente fueron lavados para desteñir con la solución anterior pero sin el colorante. Se hicieron suficientes recambios hasta obtener el contraste deseado de las bandas y finalmente los geles fueron preservados con una solución que contenía etanol 25% y glicerol 10%, incubándose en esta solución durante una hora y envolviéndose en papel celofán para su análisis y documentación.

Tabla II Preparación de los geles de poliacrilamida SDS-Tricina.

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida/Bis-acrilamida (29:1)	4.6 ml	0.64 ml
Gel buffer (Tris-HCl (pH 8.45) 3 M y SDS 0.3%)	3.6 ml	1.2 ml
Glicerol (100%)	1.2 ml	-----
Agua destilada	1.54 ml	3.16 ml
Persulfato de amonio (10%)	110 μ l	50 μ l
TEMED	11 μ l	5 μ l

V.4.4 Western Blot de CHH-SG2EK

Para confirmar que la proteína detectada en los geles de poliacrilamida correspondía a CHH-SG2EK se realizó un Western blot. La proteína CHH-SG2EK cuenta con el epitopo *c-myc* y para detectarla se utilizó el anticuerpo Anti-*myc*-HRP (Invitrogen). Primero se corrió un gel de poliacrilamida bajo las mismas condiciones anteriores y después se realizó una transferencia semi-seca a una membrana de nitrocelulosa Trans-Blot Transfer Medium de 0.45 μ m. Para llevar a cabo la transferencia se equilibraron seis papeles filtro Whatman y la membrana en el buffer de transferencia Towbin 1X (Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (pH 8.3)). El gel se incubó durante 15 min en el buffer de transferencia. Una vez equilibrados se colocaron en el sistema de transferencia Semi-Dry Electrobloetter (CLP) en el siguiente orden, tres papeles filtro, la membrana, el gel y tres papeles filtro. La transferencia se llevó a cabo durante una hora a 200 mA constantes.

Después de transferir a la membrana se procedió a la inmunodetección. La membrana se incubó toda la noche en PBST (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, Tween 20 0.05%, pH 7.4) con 5% de leche descremada (Svelty). Posteriormente se incubó por dos horas con el anticuerpo Anti-*myc*-HRP diluido 1:3500 en PBST con 1% de leche descremada y después se

lavó cuatro veces durante 15 min en PBST con agitación moderada. Por último se detectó la proteína utilizando el kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare). Para ello se mezclaron dos ml de la solución A con 50 μ l de la solución B y se vertió la mezcla sobre membrana en el lado que se encontraban las proteínas. Se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente y después se removió el exceso de líquido y se envolvió la membrana con el lado de las proteínas hacia abajo en una hoja plástica. Posteriormente se reveló en una placa fotográfica (Kodak) según las instrucciones del proveedor.

VI. Resultados y discusión

VI.1 Obtención de *chh-sg2*

En todas las condiciones a las cuales se sometieron los camarones, se logró la extracción de ARN total. Una vez tratado con DNasa I y sometido a la reacción de RT-PCR, se lograron amplificar tanto *chh-sg1* como *chh-sg2*, obteniéndose dos bandas en el gel de agarosa una de 472 pb que corresponde a *chh-sg1* y la otra de 354 pb que corresponde a *chh-sg2*. El transcrito *chh-sg2* fue observado en todos los camarones sometidos a estrés (Fig. 7). Estos resultados coinciden con los observados en el estudio realizado por Lago-Lestón *et al.* 2007.

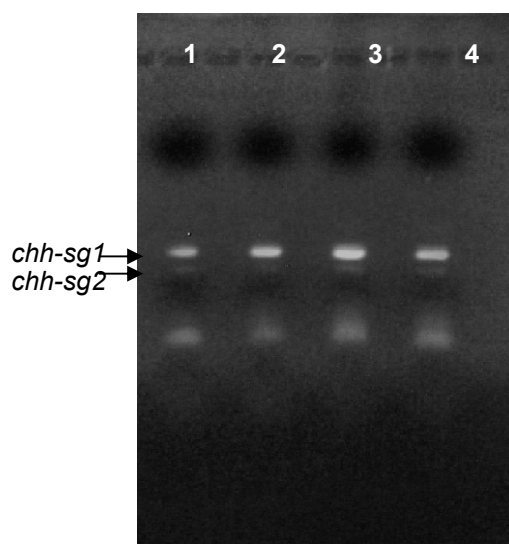


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los fragmentos amplificados por PCR correspondientes a las bandas de *chh-sg1* y *chh-sg2* de camarones aclimatados a 20 °C y diferentes salinidades. Carriles 1 y 2, 22 ‰; carril 3, 34 ‰; carril 4, 40 ‰.

Para poder trabajar exclusivamente con el transcrito de *chh-sg2* fue necesario purificar la banda correspondiente del gel. Una vez extraída del gel, este fragmento se utilizó para hacer a un PCR en el que se utilizaron cebadores diferentes a los antes utilizados; estos cebadores permiten solo la amplificación del transcrito que codifica para el péptido maduro de Liv-CHH-SG2. En esta

amplificación se obtuvo un fragmento de 222 pb que corresponde al tamaño de *chh-sg2* (Fig. 8).

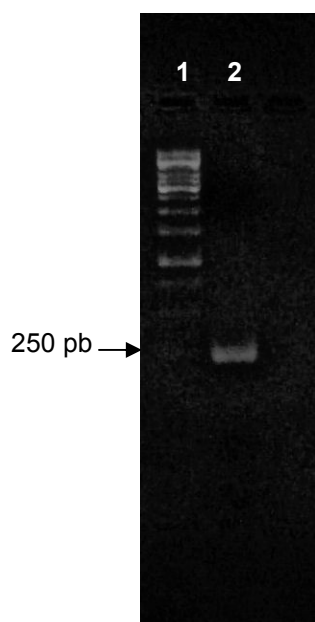


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de la amplificación de PCR de la banda extraída de gel, correspondiente a *chh-sg2*. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); carril 2, amplificación por PCR de *chh-sg2*.

Una vez amplificado por PCR el fragmento correspondiente a *chh-sg2*, éste se clonó en el plásmido TOPO[®]TA pCR[®] 2.1 para tener el fragmento aislado y además agregarle los sitios de restricción para poder clonar en el vector de expresión eucariota pPICZ α A. Luego de transformar en *E. coli* TOP10 se realizó un PCR de colonia para comprobar la inserción del fragmento en el vector así como su presencia dentro de las células. Para esto se utilizaron de nuevo los cebadores miHFor-t y MIH2REV obteniéndose un fragmento de 222 pb, correspondientes a la secuencia del péptido maduro y un fragmento de 423 pb con los cebadores M13 Forward y M13 Reverse; 222 pb correspondientes al péptido maduro y 201 pb pertenecientes al vector TOPO[®]TA pCR[®] 2.1 (Fig. 9).

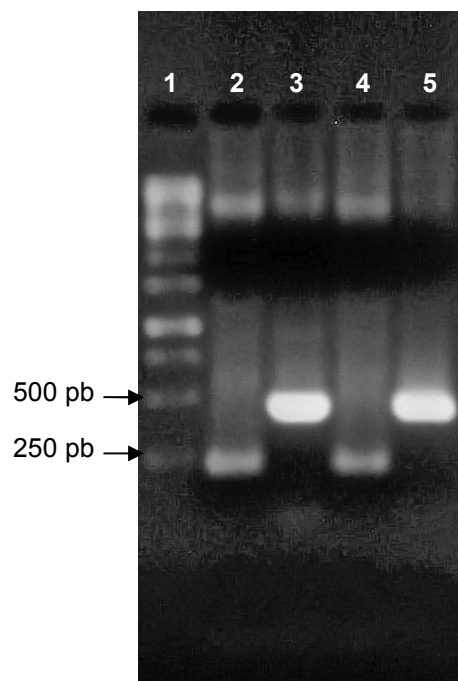


Figura 9. Electroforesis en agarosa al 1.5 % del PCR realizado a las clonas blancas que crecieron en las placas. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas); carril 2 y 4, amplificación de las clonas 1 y 2 respectivamente con los cebadores mihFor-t y MIH2REV; carriles 3 y 5, amplificación de las clonas 1 y 2 respectivamente con los cebadores M13 Forward y M13 Reverse.

Mediante la secuenciación de las clonas que resultaron positivas en la amplificación por PCR se comprobó que el fragmento clonado en el vector TOPO[®]TA pCR[®] 2.1 efectivamente correspondía al ADN del péptido maduro de Liv-CHH-SG2 (GeneBank AY167046).

VI.2 Clonación en el vector pPICZ α A

La amplificación por PCR del fragmento de *chh-sg2* clonado en TOPO[®]TA pCR[®] 2.1 permitió agregarle los sitios de corte de las enzimas *Xba* I y *Xho* I. Adicionalmente los cebadores utilizados en la construcción *chh-sg2STOP* permitieron la eliminación de la lisina final con el fin de tener como aminoterminal una glicina. Esto servirá como sustrato para la enzima peptidilglicina α -amidasa y así poder amidar la proteína después de purificarla para posteriores estudios.

Estos cebadores también agregaron un codón de terminación en *chh-sg2STOP* y en la construcción *chh-sg2EK* agregaron el sitio de restricción de enterocinasa e incorporaron nucleótidos extra para el epitopo *c-myc* y la etiqueta de polihistidinas quedaran en fase de lectura; y en ambos se eliminó el sitio *Ste13* y se restituyó el sitio de corte de la aminopeptidasa *KEX2*. Esto es importante ya que en trabajos anteriores (Sánchez-Castrejón, 2007) donde se clonaron otras neurohormonas de *L. vannamei*, el N-terminal de las proteínas no se hidrolizó adecuadamente por lo que las neurohormonas tenían aminoácidos extra en el N-terminal, los cuales correspondían al sitio de hidrólisis de *Ste13*. El fragmento amplificado *chh-sg2STOP* fue de 245 pb, 219 correspondientes a la secuencia del péptido maduro sin la lisina, 12 bases correspondientes a los sitios de restricción de *Xho I* y *Xba I*, seis bases del sitio de corte de la aminopeptidasa *KEX2*, tres bases del codón de terminación y 5 bases extra en los extremos para asegurar el corte de las enzimas de restricción. La amplificación de la construcción *chh-sg2EK* fue de 262 pb; 222 pb de la secuencia del péptido maduro y al igual que la construcción *STOP* contiene las 12 bases de los sitios de restricción de *Xho I* y *Xba I*, las seis bases correspondientes al sitio de corte de la aminopeptidasa *KEX2*, así como las cinco bases extra en los extremos para asegurar el corte de las enzimas de restricción. Adicionalmente contiene 15 bases del sitio de hidrólisis de enterocinasa y dos bases extra para evitar que se perdiera el marco de lectura del epitopo *c-myc* (Fig.10)

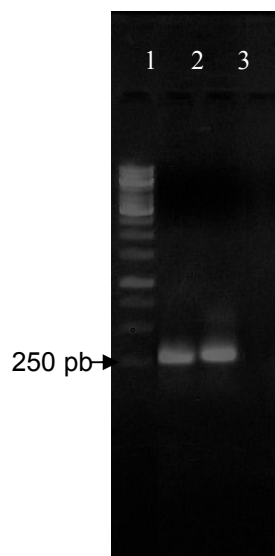


Figura 10. Electroforesis en agarosa al 1.5 % del PCR realizado para insertar el fragmento de *chsg2* en el vector pPICZ α A. Carril 1, marcador de peso molecular (1 Kb, Fermentas); Carril 2, PCR realizado con los cebadores MIHXhoF y MIH2XbaIStop-R; Carril 3, PCR realizado con los cebadores MIHXhoF y MIH2XbaIEK-R.

Después de la digestión del vector pPICZ α A se pudo visualizar en el gel de agarosa que este fue digerido completamente (Fig. 11). Al visualizar que el vector está siendo digerido completamente, esto nos permite purificar el ADN directamente de la reacción sin la necesidad de correrlo en un gel y posteriormente extraerlo de este.

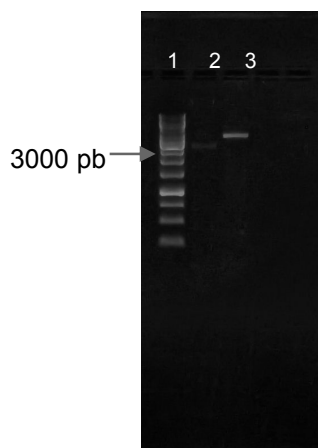


Figura 11. Electroforesis del vector pPICZαA digerido con *Xho* I y *Xba* I. Carril 1, Marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); Carril 2, vector pPICZαA sin digerir; Carril 3, vector pPICZαA digerido.

En las clonas positivas de la construcción chh-sg2STOP se obtuvo un fragmento de 741 pb mientras que en las clonas de la construcción chh-sg2EK se obtuvo el fragmento esperado de 758 pb. Como control se utilizo el vector pPICZαA sin inserto obteniendo una amplificación de 589 pb (Fig.12).

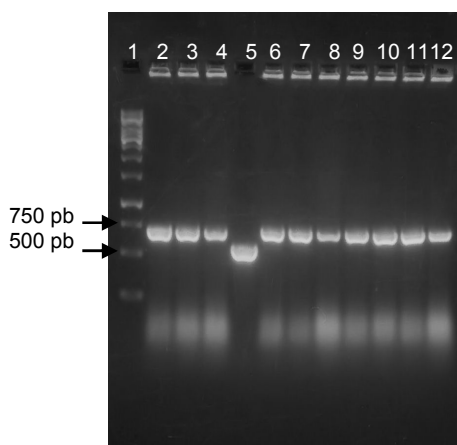


Figura 12. Electroforesis en agarosa al 1.5 % del PCR realizado a las clonas que crecieron en las placas de LB agar/zeocina. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb (Fermentas); carril 2-4, amplificación de las clonas de la construcción STOP; carril 5, amplificación de pPICZαA como control; carril 7-12, amplificación de las clonas EK.

Después de observar los tamaños de los productos clonados y comprobar por secuenciación que las cuatro clonas tenían la secuencia correcta, los plásmidos resultantes fueron nombrados Pchh-sg2STOP y Pchh-sg2EK (Fig.13). En el plásmido chh-sg2STOP la secuencia correspondía a *chh-sg2* además del codón de terminación que se agregó con el cebador MIH2XbaIStop-R (Fig.14); en el plásmido chh-sg2EK también se encontró la secuencia de *chh-sg2*, además del sitio de reconocimiento de enterocinasa y las dos bases agregadas para evitar la pérdida del marco de lectura del epítipo *c-myc* y la secuencia de polihistidinas (Fig.15). En ambos casos los fragmentos estaban en fase con el marco de lectura de la señal de secreción (α - Factor).

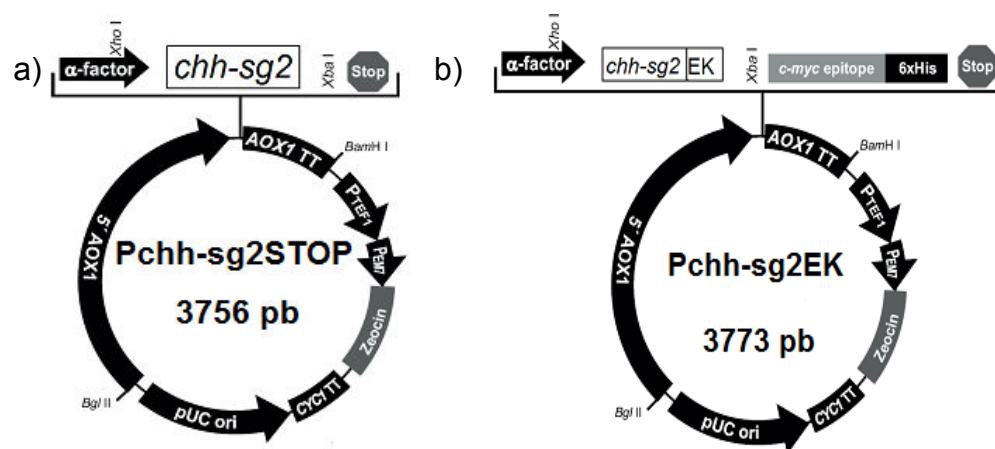


Figura 13. Mapa de los plásmidos Pchh-sg2STOP (a) y Pchh-sg2EK (b).

Cebador 5' AOX1

GACTGGTTCCAATTGACAAGC TTTTGATTTT AACGACTTTT AACGACAAC TGAAGAATC AAAAAACAAC TAATTATTCG

AAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA

M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P

GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA

V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L

GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT

E G D F D V A V L P F S N S T N N G L L F I N

α -Factor Xho I

ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA **GAC ACC TTC GAC CAC**

T T I A S I A A K E E G V S L E K R D T F D H

TCC TGC AAG GGC ATC TAC GAC CGG GAG CTC TTC AGA AAG CTG GAC CGC GTC TGC GAG GAC TGC TAC AAC

S C K G I Y D R E L F R K L D R V C E D C Y N

CTG TAC CGC AAG CCC TAC GTG GCC ACC GAG TGC AAG AGT AAC TGC TAC GCC AAC TTC GTA TTC AAG CAG

L Y R K P Y V A T E C K S N C Y A N F V F K Q

TGC CTC GAC GAT CTC CTT ATG GTC GAC GCC ATT GAC GAG TAC GTG AAC ACC GTC CAG CTG GTA GGG TAA

C L D D L L M V D A I D E Y V N T V Q L V G *

Xba I

TCTAGA ACAAAAATC ATCTCAGAAG AGGATCTGAA TAGCGCCGTC GACCATCATC ATCATCATCA TTGAGTTTGT

AGCCTTAGAC ATGACTGTTC CTCAGTTCAA GTTGGGCACT TACGAGAAGA CCGGTCTTGC TAGATTCTAA TCAAGA

Cebador 3' AOX1

GGATGTCAGAATGCCATTTGC

Figura 14. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del plásmido Pchh-sg2STOP proveniente de la secuenciación con los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1. La secuencia del α -Factor se encuentra remarcada por arriba, la secuencia de la neurohormona se representa en negritas y subrayada y el símbolo * indica el codón de terminación.

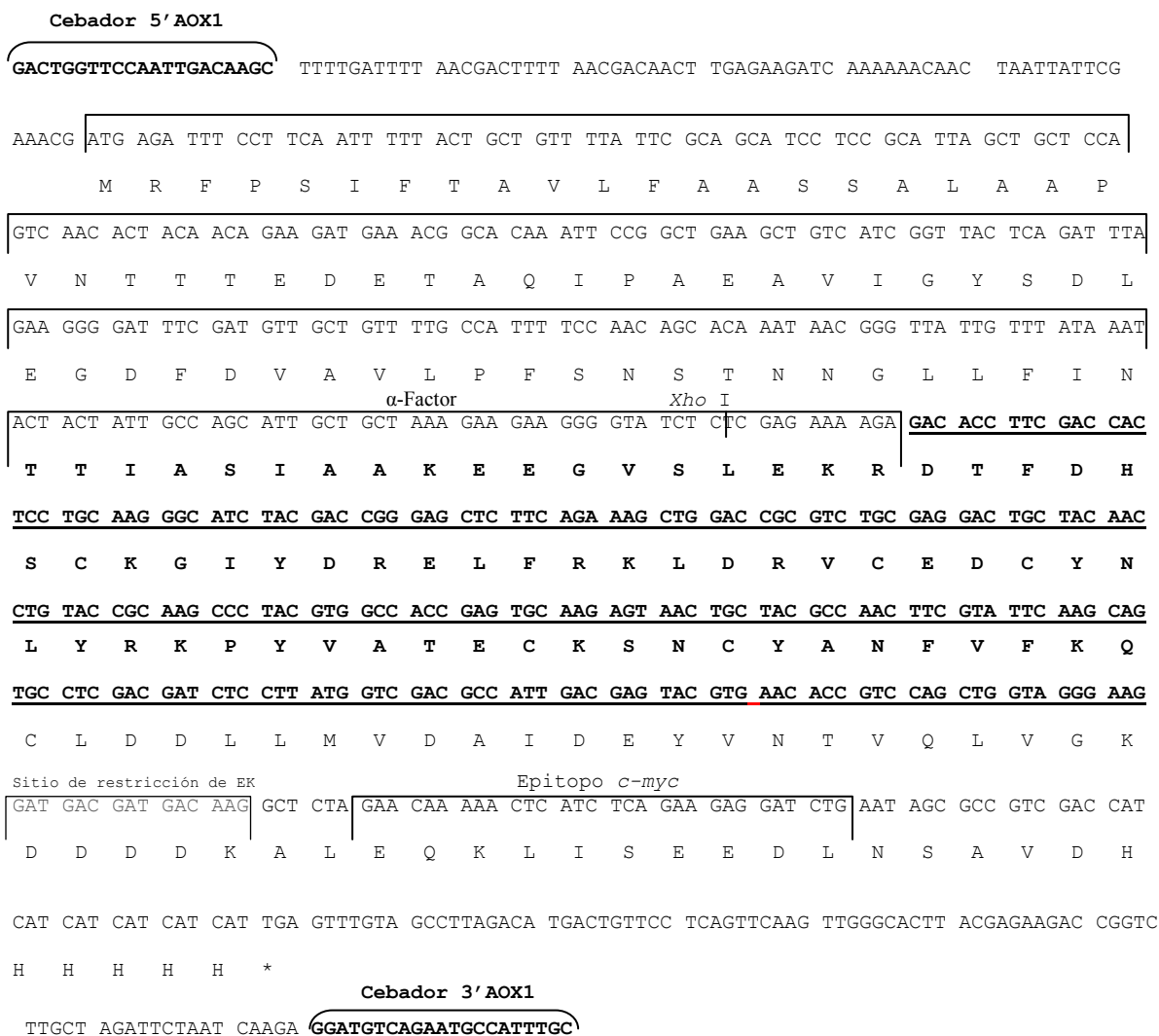


Figura 15. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del plásmido Pchh-sg2EK proveniente de la secuenciación con los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1. La secuencia del α -Factor se encuentra remarcada por arriba, la secuencia de la neurohormona se representa en negritas y subrayada y el símbolo * indica el codón de terminación.

VI.3 Transfección en *Pichia pastoris*

VI.3.1 Digestión de los vectores Pchh-sg2STOP y Pchh-sg2EK

Una vez secuenciados los plásmidos Pchh-sg2Stop y Pchh-sg2EK se realizó la reacción de digestión con la enzima *BstX* I para linearizarlos. Sin embargo, al correr el vector digerido en el gel se observó una banda debajo del tamaño esperado (de alrededor de 500 pb), lo que sugirió que probablemente se degradó durante la digestión, ya que al correr la muestra de los vectores sin digerir estos aparecían del tamaño esperado (Fig.16).

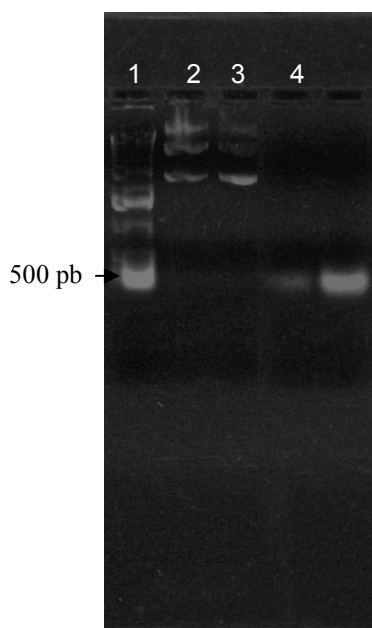


Figura 16. Electroforesis en agarosa al 1 % de la digestión con *BstX* I. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); carril 2, Pchh-sg2STOP sin digerir; carril 3, Pchh-sg2EK sin digerir; carril 4, Pchh-sg2STOP digerido; carril 5, Pchh-sg2EK digerido.

Para tratar de resolver el problema se realizó una nueva extracción de plásmido utilizando el mismo kit comercial, pero en esta ocasión se incubó menos tiempo (cinco horas) y se tomaron muestras a las dos y cuatro horas. Las muestras junto con la digestión completa se corrieron en un gel de agarosa y en todas las

digestiones se observó un barrido, lo que confirmó que la enzima estaba degradando el vector aun a tiempos de digestión cortos (Fig.17).

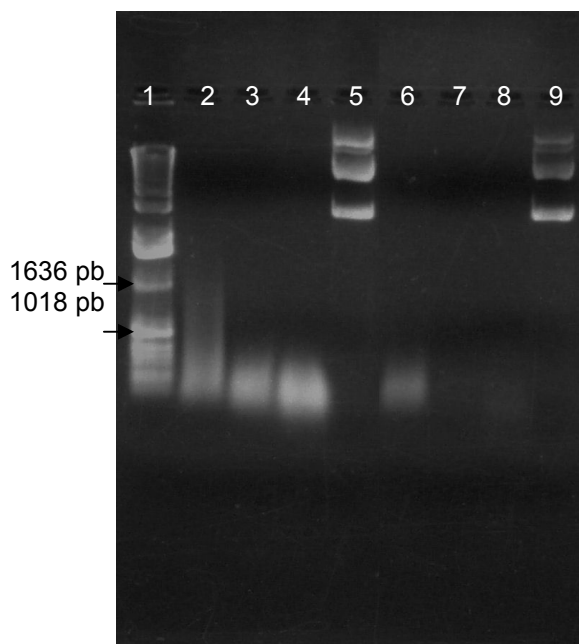


Figura 17. Electroforesis en agarosa al 1 % de la digestión con *BstX* I. Carril 1, marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen); carril 2, Pchh-sg2STOP digerido 2 hrs; carril 3, Pchh-sg2STOP digerido 4 hrs; carril 4, Pchh-sg2STOP digerido 5 hrs; carril 5, Pchh-sg2STOP sin digerir; carril 6, Pchh-sg2EK digerido 2 hrs; carril 7, Pchh-sg2EK digerido 4 hrs; carril 8, Pchh-sg2EK digerido 5 hrs; carril 9 Pchh-sg2EK sin digerir.

Los resultados de las digestiones de otros plásmidos con la enzima *BstX* I, así como de los plásmidos Pchh-sg2STOP y Pchh-sg2EK con otra enzima mostraron que el problema no era la enzima *BstX* I, ya que los otros vectores eran digeridos de manera normal con esta enzima. Por lo tanto, el problema estaba asociado directamente con los plásmidos Pchh-sg2STOP y Pchh-sg2EK, ya que al realizarse una digestión con otra enzima, los resultados fueron muy similares a los obtenidos en la digestión con *BstX* I. Como el problema era únicamente con estos plásmidos, se decidió revisar el proceso de extracción. Los plásmidos fueron

extraídos mediante dos métodos, uno fue utilizando el mismo kit comercial de Invitrogen y otro utilizando soluciones preparadas en el laboratorio; ambos protocolos son basados en extracción mediante lisis alcalina. Una vez extraídos los plásmidos mediante los dos métodos, estos fueron digeridos y se comprobó que el problema era el método de extracción. Los plásmidos digeridos que fueron extraídos con el kit comercial presentaron un barrido al ser corridos en gel mientras que los extraídos con soluciones preparadas en el laboratorio fueron digeridos exitosamente. Por lo tanto se extrajeron los plásmidos utilizando el método de lisis alcalina con soluciones preparadas en el laboratorio, el rendimiento de 3 ml de cultivo fue de 1.5 μ g de plásmido y después de ser digerido fue necesario re extraerlo con fenol/cloroformo sin embargo, en este paso se perdía hasta un 30 % de la cantidad de plásmido que se utilizó originalmente en la digestión. Debido a que para electroporar en *P. pastoris* se recomienda utilizar de 5 – 10 μ g de plásmido linearizado, se optó por la estrategia de amplificación descrita en materiales y métodos.

VI.3.2 Diseño de cebadores para amplificar los plásmidos Pchh-sg2Stop y Pchh-sg2EK

Los cebadores diseñados para amplificar todo el vector se encuentran dentro de las bases 208 - 706 del plásmido, ya que dentro de este fragmento están los sitios de restricción de las enzimas utilizadas para linearizar el vector. Los cebadores PicFor y PicRev se diseñaron de tal manera que donde empezaba a hibridar uno fuese justo después del término de la hibridación del otro, para evitar perder alguna base y de esta manera el vector queda de manera lineal con las secuencias del promotor 5'AOX1 en los extremos para recombinarse con el genoma de *P. pastoris*. Después de varias reacciones de PCR se encontraron las condiciones óptimas para la amplificación de los plásmidos. Los tamaños de amplificación fueron 3,756 pb para el plásmido Pchh-sg2Stop y 3,773 pb para el plásmido Pchh-sg2EK (Fig.18).

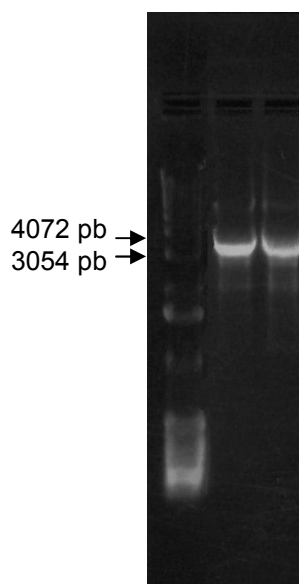


Figura 18. PCR de los plásmidos chh-sg2STOP y chh-sg2EK. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen); carril 2, PCR de Pchh-sg2EK con los cebadores PicFor y PicRev; carril 3, PCR de chh-sg2STOP con los cebadores PicFor y PicRev.

VI.3.3 Electroporación en *P. pastoris*

Los vectores amplificados tuvieron que ser purificados de gel, ya que a pesar de que teóricamente los cebadores hibridan con sola una secuencia del vector pPICZ α A, al realizar el PCR se obtuvieron una serie de bandas adicionales, aunque más tenues que la amplificación correspondiente al vector entero. La purificación se realizó mediante el método de fenol congelado. Por cada banda de PCR se recuperaban 30 ng/ μ l. Después de varias reacciones se logró obtener una cantidad suficiente de plásmido lineal para realizar la transfección en *P. pastoris*, ya que se requieren por lo menos 5 μ g de vector lineal para realizar la transfección.

La cantidad de colonias obtenidas después de la transfección de *Pichia pastoris* KM71 fue de más de 100 para cada construcción. De esas colonias se eligieron diez, y se realizó un PCR con los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1 para confirmar la

integración dentro del genoma de *P. pastoris*. Para la construcción chh-sg2STOP, nueve colonias presentaron una amplificación correspondiente al tamaño esperado que es de 741 pb (Fig.19), mientras que para la construcción chh-sg2EK las diez clonas fueron positivas presentando una amplificación de 758 pb (Fig. 20). Se analizó la secuencia nucleotídica de dos de las colonias para cada construcción y se comprobó que no se tenían mutaciones y ambas construcciones estaban dentro del marco de lectura correcto.

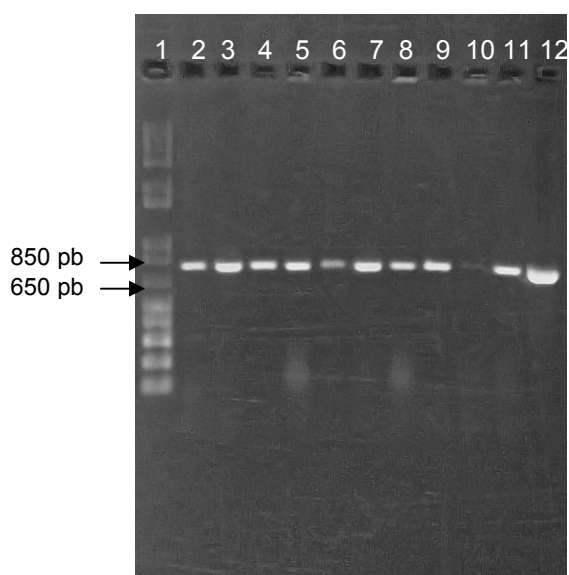


Figura 19. Amplificación de PCR de las colonias de la construcción chh-sg2STOP obtenidas después de la transfección. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); carriles 2-10, amplificación de las clonas 1 a 10; carril 12, amplificación del plásmido Pchh-sg2STOP.

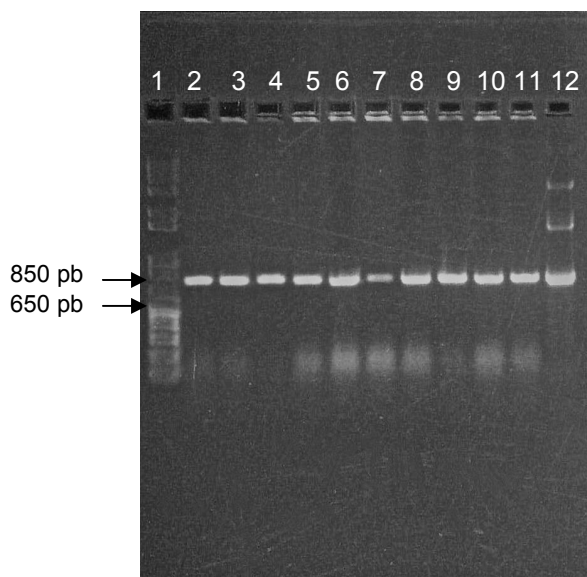


Figura 20. Amplificación de PCR de las colonias de la construcción chh-sg2EK obtenidas después de la transfección. Carril 1, marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen); carriles 2-10, amplificación de las clonas 1 a 10; carril 12, amplificación del plásmido Pchh-sg2EK.

Estos resultados permitieron corroborar que el vector se había recombinado en el genoma de *P. pastoris* dentro de la secuencia del promotor del gen de la enzima AOX1. La cepa KM71 tiene una escisión en el gen de la enzima AOX1, por lo que el metabolismo del metanol se realiza mediante la enzima AOX2. Al depender exclusivamente del la enzima AOX2 el metabolismo del metanol se vuelve más lento, por que se denomina fenotipo Mut^s. Ha sido reportado que en algunos casos la utilización de cepas con el fenotipo Mut^s da mejores resultados, ya que las proteínas recombinantes producidas son de mejor calidad, a diferencia de las cepas Mut⁺ que presentan una alta tasa de expresión pero el plegamiento de las proteínas recombinantes es incorrecto (Cereghino y Cregg, 2000).

VI.4 Expresión de las neurohormonas recombinantes CHH-SG2STOP y CHHSG2EK

Se eligió una de las clonas de cada construcción para realizar el análisis de expresión. El análisis de expresión de ambas construcciones se realizó durante siete días con diferentes concentraciones de metanol; como control de inducción se mantuvo un cultivo sin metanol y tres cultivos más con 1%, 2% y 4% de metanol.

Para el caso de CHH-SG2STOP en el cultivo sin metanol, no se detectó expresión de ninguna proteína en el gel, mientras que en los cultivos inducidos con las diferentes concentraciones de metanol se detectó la presencia de una banda dentro del peso teórico esperado, el cual es de 8.61 kDa. La banda fue consistente durante los 7 días de inducción así como en las tres diferentes concentraciones de metanol (Fig. 21). Sin embargo, en el ensayo de expresión de CHH-SG2EK se presenta una banda de este peso molecular, además de la esperada de CHH-SG2EK, por lo tanto sugiere que la banda correspondiente a 8.61 kDa puede ser una proteína de *P. pastoris*. En el trabajo de Sánchez-Castrejón (2008) al expresarse CHH-SG1 se detectó una banda del mismo peso, y esta banda fue recuperada y secuenciada, se encontró que efectivamente ahí se encontraba CHH-SG1, pero además, había péptidos adicionales de *P. pastoris*. También se han expresado en *P. pastoris* las hormonas hiperglucémicas de *P. monodon* Pem-CMG, Pem-CHH2 y Pem-CHH3 (Treerattrakool *et al.*, 2003; Udomkit *et al.*, 2004) y en todos los casos la banda correspondiente a las neurohormonas recombinantes fue la observada alrededor de 8 kDa. Por estas razones es muy probable que esta banda si corresponda a CHH-SG2STOP. Sin embargo, para descartar la posibilidad de que solo sea una proteína de *P. pastoris*, se podría realizar un ensayo de Western Blot utilizando anticuerpos anti-CHHSG1 ya que los primeros 40 aminoácidos de las isoformas son idénticos por lo que se esperaría que los anticuerpos policlonales pudieran reconocer a CHH-SG2.

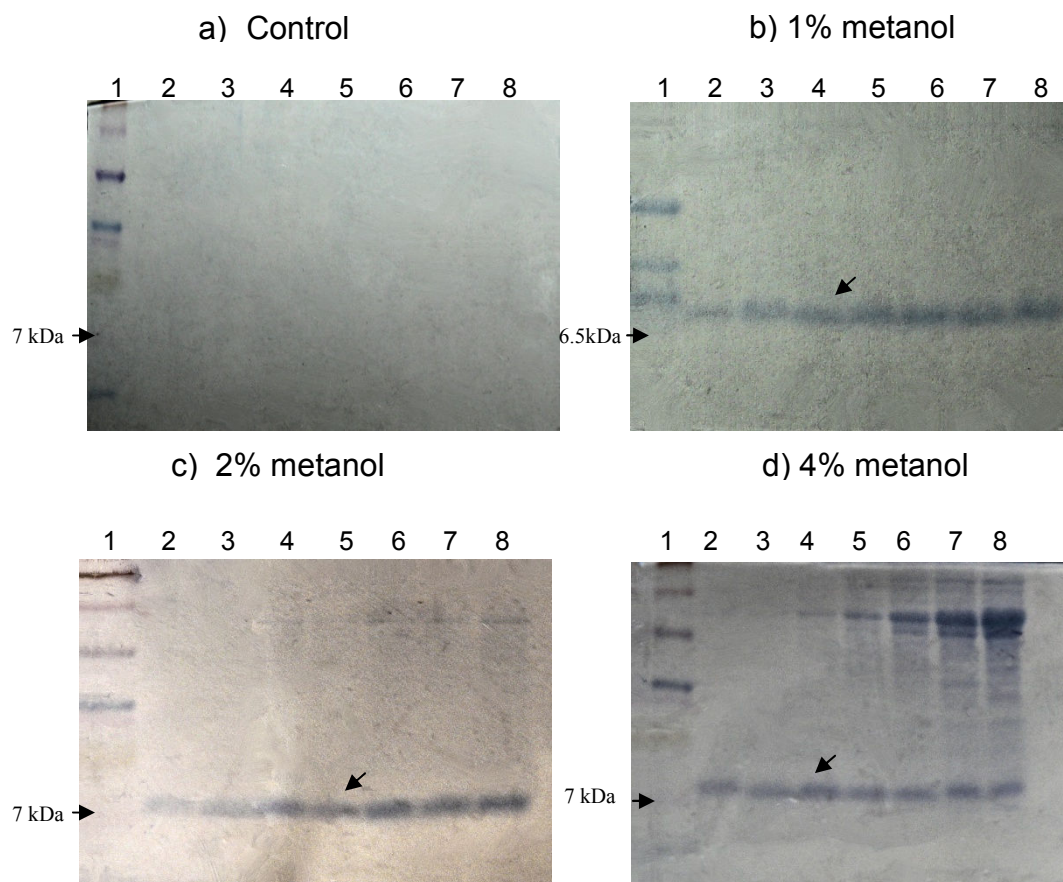


Figura 21. Electroforesis en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5 % de los ensayos de expresión de la construcción chh-sg2STOP con diferentes concentraciones de metanol. Carril 1, Marcador de peso molecular MultiMark Multi-colored (Invitrogen) (Geles a, c y d); Carril 1, Marcador de peso molecular Polypeptide SDS-PAGE (BioRad) (Gel b); Carriles 2 – 8 Inducción de los días 1 – 7 (Geles a, b, c y d).

El análisis de expresión de CHH-SG2EK, reveló la presencia de una banda correspondiente al peso molecular esperado, el cual es de 12.01 kDa. En el control solo se presentó la expresión de algunas proteínas hasta el séptimo día. En las tres concentraciones de metanol se hizo visible una banda del peso esperado solamente durante los primeros 3 días de inducción (Fig. 22). Al analizar los geles de esta construcción, se detectó la presencia de una banda de menor masa molecular, alrededor de los 8 – 9 kDa; esta banda fue consistente en las 3

concentraciones de metanol así como durante los 7 días de inducción, por lo que se sugiere que sea la proteína de *P. pastoris* mencionada anteriormente.

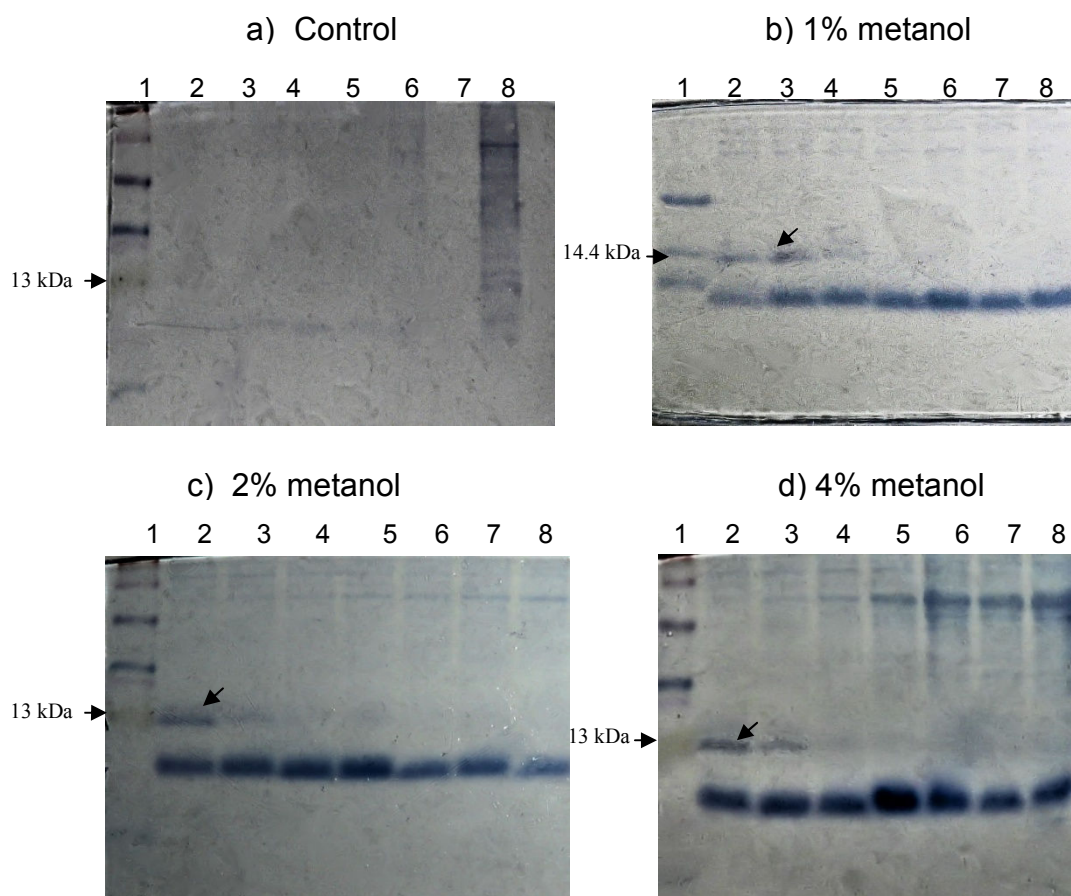


Figura 22. Electroforesis en geles de poliacrilamida (Tricina-SDS-PAGE) al 16.5 % de los ensayos de expresión de la construcción chh-sg2EK con diferentes concentraciones de metanol. Carril 1, Marcador de peso molecular MultiMark Multi-colored (Invitrogen) (Geles a, c y d); Carril 1, Marcador de peso molecular Polypeptide SDS-PAGE (BioRad) (Gel b); Carriles 2 – 8 Inducción de los días 1 – 7 (Geles a, b, c y d).

Para detectar a CHH-SG2EK, se realizó un ensayo de inmunodetección con el anticuerpo Anti-*myc*-HRP, el cual reconoce en epítipo *c-myc* que es agregado a nuestra proteína. Se tomaron muestras de 1 ml de los cultivos inducidos con las concentraciones de metanol al 2% y 4%, se precipitó con TCA y se realizó la

inmunotransferencia. Al revelar la placa fotográfica, se evidenció que la señal era más intensa en la concentración de 4% de metanol en el primer día de inducción, por lo que se infiere que estas son las mejores condiciones de expresión para la neurohormona CHH-SG2EK (Fig. 23).

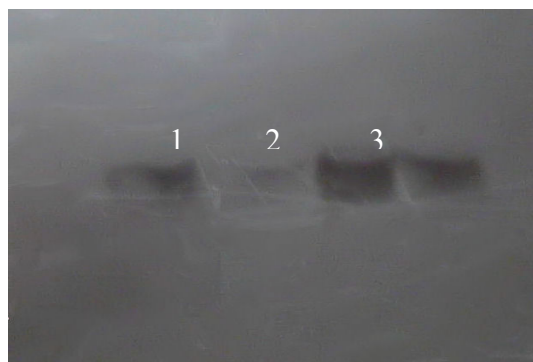


Figura 23. Revelado del inmunoblot en la placa fotográfica. Carril 1, 2% metanol con 1 día de inducción; carril 2, 2% metanol con 2 días de inducción; carril 3, 4% metanol con 1 día de inducción y carril 4, 4% metanol con 2 días de inducción.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden servir de base para obtener mayores cantidades de la neurohormona CHH-SG2, lo que permitirá realizar ensayos de actividad biológica y otros ensayos endocrinos.

A diferencia de la isoforma SG-1 que tiene el aminoácido C-terminal libre (prolina), SG2 resulta de gran interés por la presencia del extremo C-terminal amidado. Se ha demostrado que la amidación del extremo C-terminal de las neurohormonas CHH es muy importante en cuanto a actividad se refiere. Dos variantes de la neurohormona Pej-SGP-I de *P. japonicus* fueron obtenidas de manera recombinante; en una de ellas le amidaron el aminoácido final (glicina) y la otra versión tenía como aminoácido final una valina. Al realizar pruebas *in vivo* se demostró que la neurohormona con el extremo C-terminal amidado tenía actividad hiperglucémica similar a la de la neurohormona nativa de *P. japonicus*, mientras la neurohormona con el extremo C-terminal libre solo mostraba actividad

hiperglucémica cuando se administraba en altas dosis (Katayama *et al.*, 2002). De igual manera en *P. japonicus* se produjeron dos versiones de Pej-SGP-VIII (Nagai *et al.*, 2008) y se observó que solo la versión amidada tuvo actividad hiperglucémica comparable con la neurohormona nativa. Estos mismos resultados fueron observados al expresar dos variantes de la neurohormona AsI-rcHH en *A. leptodactylus* (Mosco *et al.*, 2008). Por estas razones, fue que se planteó obtener una neurohormona que posteriormente pudiese ser amida en el extremo C-terminal. De esta manera se esperaba que en estudios posteriores se encontrara que Liv-CHHSG2 tuviera actividad biológica similar a la hormona nativa de *L. vannamei*. Esto explicaría las diferencias en actividad entre las dos isoformas.

VII. Conclusiones

- Se obtuvo el transcrito *chh-sg2* de camarones sometidos a 20°C y a las salinidades de 22, 34 y 40 ‰.
- El cDNA de la región que codifica para el péptido maduro de Liv-CHH-SG2 fue clonado en *E. coli*.
- Se logró la clonación de las construcciones *chh-sg2STOP* y *chh-sg2EK* en el vector de expresión pPICZαA y su expresión en la levadura *Pichia pastoris*
- Se determinaron las condiciones óptimas de expresión de CHH-SG2STOP y CHH-SG2EK, las cuales fueron a una concentración de metanol al 4% durante 1 día.
- El ensayo de inmunodetección (Western blot) permitió corroborar la expresión de la neurohormona recombinante CHH-SG2EK, la cual tiene un peso molecular de 12.61 kDa..

VIII. Literatura citada

Aguilar, M.B., Soyez, D., Falchetto, R., Arnott, D., Shabanowitz, J., Hunt, D. y Huberman, A. 1995. Aminoacid sequence of the minor isoform of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-II) of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann): presence of a d-amino acid. *Peptides*.16: 1375-1383 p.

Böcking, D., Dircksen, H., Keller, R. 2002. The crustacean neuropeptide of the CHH/MIH/GIH family: structures and biological activities. *The Crustacean Nervous System*. Springer Verlag. Primera edición. New York, USA. 623 p.

Bulau, P., Meisen, I., Reichwein-Roderburg, B., Peter-Katalinic, J., Keller, R., 2003. Two genetic variants of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the Australian crayfish, *Cherax destructor*: detection of chiral isoforms due to posttranslational modification. *Peptides* .24: 1871–1879 p.

Cereghino, J.L y Cregg, J.M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 45-66 p.

Chang, E.S., Keller, R. y Chang, S.A. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111: 359-366 p.

Charmantier-Deures, M., Charmantier, G., Jansen, K.P.C., Aiken, D.E. y Van Herp, F. 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster, *Homarus americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94:281-293 p.

Chen, S.H., Lin, C.Y. y Kuo, C.M. 2004. Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): evidence of alternative splicing. *Mar. Biotechnol.* 6: 83–94 p.

Chen, S.H., Lin, C.Y. y Kuo, C.M. 2005. In silico analysis of crustacean hyperglycemic hormone family. *Mar. Biotechnol.* 7:193–206 p.

Chung, J.S., Wilkinson, M.C. y Webster, S.G. 1998. Amino acid sequences of both isoforms of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and corresponding precursor-related peptide in *Cancer pagurus*. *Regul. Pept.* 77:17–24 p.

Cregg, J.M., Tschopp, J.F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W.S., Buckholz, R.G., Madden, K.R., Kellaris, P.A., Davis, G.R., Smiley, B.L., Cruze, J., Torregrossa, R., Velicelebi, G. y Thill, G.P. 1987. High level expression and recent assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *BioTechnology*. 5: 479-485 p.

Davey, M.L., Hall, M.R., Willis, R.H., Oliver, R.W.A., Thurn, M.J. y Wilson, K.J. 2000. Five crustacean hyperglycemic family hormones of *Penaeus monodon*: complementary DNA sequences and identification in single sinus gland by electrospray ionization-fourier transform mass spectrometry. *Mar. Biotechnol.* 2: 80-91.

De Kleijn, D.P.V. y Van Herp, F. 1995. Molecular biology of neurohormone precursors in the eyestalk of crustacean. *Comp. Biochem. Physiol.* 112: 573-579 p.

Díaz, F., Farfán, C., Sierra, E. y Re, A. D. 2000. Effects of temperatura and salinity fluctuation on the ammonium excretion and osmoregulation of *Penaeus vannamei*, Bonne. *Mar. Fresh. Behav. Physiol.* 34:93-104 p.

Dirksen, H., Böcking, D., Heyn, U., Mandel, C., Chung, J.S., Baggerman, G., Verhaer, P., Daufeldts, S., Plösch, T., Jaros, P.P., Waelkens, E., Keller, R. y Webster, S.G. 2001. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor- related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochem. J.* 356: 159-170 p.

Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. y Gingeras, T.R. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol. Cell.Biol.* 5: 111-1121 p.

Fanjul-Moles, M. L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comp. Biochem. Physiol.* 142C: 390-400 p.

FAO. 2000. The State of World Fisheries and Aquaculture. FAO. Rome. 160 p.

Ferraris, J.D., Fauchald, K. y Kensley, B. 1994. Physiological responses to fluctuation in temperature and salinity in invertebrates. Adaptations of *Alpheus viridari* (Decapoda, Crustacea), *Terebellides parva* (Polychaeta) and *Golfigia cylindrata* (Sipunculida) to the mangrove habitat. *Mar. Biol.* 120: 397-406 p.

Gu, P.L., Yu, K.L. y Chan, S.M. 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins. *FEBS Lett.* 472: 122–128 p.

Gu, P.L., Chu, K.H. y Chan, S.M. 2001. Bacterial expression of the shrimp molt-inhibiting hormone (MIH): Antibody production, immunocytochemical study and biological assay. *Cell Tiss. Res.* 303: 129–136 p.

Gu, P.L., Tobe, S.S., Chow, B.K.C., Chu, K.H., He, J.G. y Chan, S.M. 2002. Characterization of an additional molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the shrimp *Metapenaeus ensis*. *Peptides.* 23:1875–1883 p.

Hsu, A.Y., Weller, J.R., Christie, A.E. y De la Iglesia, H. O. 2008. Molecular cloning of four cDNAs encoding prepro-crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the eyestalk of the red rock crab *Cancer productus*: Identification of two genetically encoded CHH isoforms and two putative post-translationally derived CHH variants. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155: 517-525 p.

Huberman, A., Aguilar, M.B., Brew, K., Shabanowitz, J. y Hunt, D.F. 1993. Primary structure of the major isoform of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH-I) from the sinus gland of the Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortman): interspecies comparison. *Peptides.* 14: 7–16 p.

Huberman, A. 2000. Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture.* 191:191-208 p.

Katayama, H., Ohira, T., Yumoto, F., Tanokura, M. y Nagasawa, H. 2003. The solution structure of molt-inhibiting hormone from the karuma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *J Biol. Chem.* 278:9620-9623.

Katayama, H., Ohira, T. y Nagasawa, H. 2004. Structure-activity relationship of crustacean molt-inhibiting hormone from the karuma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Biochemistry.* 43:9629-9635 p.

Katayama, H., Ohira, T., y Nagasawa, H. 2002. Significance of a carboxyl-terminal amide moiety in the folding and biological activity of crustacean hyperglycemic hormone. *Peptides.* 23:1537-1546 p.

Kegel, G., Reichwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinic, J. y Keller, R. 1989. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. FEBS Lett. 255 (1): 10–14 p.

Kegel, G., Reichwein, B., Tensen, C. y Keller, R. 1991. Amino acid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the crayfish, *Orconectes limosus*: emergence of a novel neuropeptide family. Peptides. 12 (5): 909–913 p.

Keller, R. 1992. Crustacean neuropéptidos: Structures, functions and comparative aspects. Experientia. 48:439-448 p

Khayat, M., Yang, W., Aida, K., Nagasawa, H., Tietz, A., Funkenstein, B. y Lubzens, E. 1998. Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis *in vitro* incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 110: 307–318 p.

Kishori, B., Premasheela, B., Ramamurthi, R. y Reddy, S. 2001. Evidence for hyperglycemic effect of methionine enkephalin in the prawns *Penaeus indicus* and *Metapenaeus monocerus*. Gen. Comp. Endocrinol. 123: 90-99 p.

Komali, M., Kalarani, V., Venkatrayulu, C.H. y Reddy, D.C.S. 2005. Hyperglycemic effects of 5-hydroxytryptamine and dopamine in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*. J. Exp. Zool. 303: 448-455 p.

Kummer, G. y Keller, R. 1993. High-affinity binding of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to hepatopancreatic plasma membranes of the crab *Carcinus maenas* and the crayfish *Orconectes limosus*. Peptides. 14:103-108 p.

Kuo, C., Hsu, C. y Lin, C. 1995. Hyperglycemic effects of dopamine in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture. 135: 161-172 p.

Lacombe, C., Grève, P. y Martin, G. 1999. Overview on the subgrouping of the crustacean hyperglycemic hormone family. Neuropeptide. 33: 71–80 p.

Lago-Lestón A., Ponce E. y Muñoz Ma. E. 2007. Cloning and expression of hyperglycemic (CHH) and molt inhibiting (MIH) hormones mRNAs from the eyestalk of shrimps of *Litopenaeus vannamei* grown in different temperature and salinity conditions. Aquaculture. 270: 343–357 p.

Lee K.J., Doran, R.M. y Mykles D.L. 2007. Crustacean hyperglycemic hormone from the tropical land crab, *Gecarcinus lateralis*: cloning, isoforms, and tissue expression. *Gen Comp Endocrinol.* 54: 174-83 p.

Lorenzon, S., Pasqual, P. y Ferrero, E.A. 1999. Biogenic amines control blood glucose level in the shrimp *Palaemon elegans*. The biodiversity crisis and crustacean. 12: 471- 480 p.

Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P.G., Mettulio, R. y Ferrero, E.A., 2004. Variation of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *J. Exp. Biol.* 207: 4205-4213 p.

Lorenzon, S. 2005. Hyperglycemic stress response in Crustacea. *Inv Surv J.* 2: 132-141 p.

Lüschen, W., Buck, F., Willig, A. y Jaros, P.P. 1991. Isolation, sequence analysis and physiological properties of enkephalins in the nervous tissue of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Accad. Sci.* 88: 8671-8675 p.

Lüschen W., Willig, A. y Jaros P.P. 1993. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapods crustacean, *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105: 291-296 p.

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B. y Hayvey, L.M. 2005. Heterologous production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 22:249–270 p.

Marco, H.G., Hansen, I.A., Scheller, K. y Gäde, G. Molecular cloning and localization of a cDNA encoding a crustacean hyperglycemic hormone from the South African spiny lobster, *Jasus lalandii*. *Peptides* 26(6): 845-851 p.

Mettulio, R., Edomi, P., Ferrero, E.A., Lorenzon, S. y Giulianini, P.G. 2004. The crustacean hyperglycemic hormone precursors a and b of the Norway lobster differ in the propeptide but not in the mature peptide. *Peptides* 25: 1899-1907 p.

Mosco, A., Edomi, P., Guarnaccia, C., Lorenzon, S., Pongor, S., Ferrero, E. A. y Giulianini, P. G. (2008). Functional aspects of cHH C-terminal amidation in crayfish species. *Reg. Peptides* 147: 88-95 p.

Nagai, C., Asazuma, H., Nagata, S., Ohira, T. y Nagasawa, H. 2009. A convenient method for preparation of biologically active recombinant CHH of the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*, using the bacterial expression system. *Peptides*. 30: 507-517 p.

Ohira, T., Watanabe, T., Nagasawa, H. y Aida, K. 1997. Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.* 14: 785–789 p.

Ohira, T., Nishimura, T., Sonobe, H., Okuno, A., Watanabe, T., Nagasawa, H., Kawazoe, I. y Aida, K. 1999. Expression of a recombinant molt-inhibiting hormone of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(9):1576-81 p.

Ohira, T., Katayama, H., Aida, K y Nagasawa, H. 2003. Expression of recombinant crustacean hyperglycemic hormone of kuruma prawn *Penaeus japonicus* in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Fisheries Sci.* 69:95-100 p.

Ohira, T., Tsutsui, N., Nagasawa, H. y Wilder, M.N. 2006. Preparation of two recombinant crustacean hyperglycemic hormones from the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and their hyperglycemic activities. *Zoolog .Sci.* 23(4):383-91 p.

Organes De los Santos, H.C. 2004. Clonación y expresión de los genes *chh* y *mih* para la producción de las neurohormonas hiperglucémica e inhibidora de la muda recombinantes de *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría. CICESE. Ensenada, B.C. México. 90 p.

Racotta, I.S. y Palacios, E., 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 351– 356 p.

Rai, M y Padh, H. 2001. Expression system for production of heterologous proteins. *Curr. Sci.* 80(9):1121-1128 p.

Sambrook, J. y Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tercera edición. New York. 2368 p.

Sanchez-Castrejón E. 2008. Producción de la hormona recombinante hiperglucémica de crustáceos (CHH) e inhibidora de la muda (MIH) del camarón

blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado. CICESE. Ensenada, B.C. México. 138 p.

Sánchez-Castrejón, E., Ponce-Rivas, E., Aguilar, B.M. y Díaz, F. 2008. Molecular cloning and expression of a putative crustacean hyperglycemic hormone of *Litopenaeus vannamei* in *Pichia pastoris*. Electron. J. Biotechnol.11:4

Santos, E.A. y Keller, R. 1993a. Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone-evidence of a dual feedback control system. J. Comp. Physiol. 163: 374–379 p.

Sarojini, R., Nagabhushanam, R. y Fingerman, M. 1995. Dopaminergic and enkephalinergic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. Gen. Comp. Endocrinol. 97: 160-170 p.

Serrano, L., Blanvillain, G., Soyez, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F. y Spanings-Pierrot, C. 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. J. Exp. Biol. 206: 979-988 p.

Sithigorngul, W., Jaideechoey, S., Saraithongkum, W., Longyant, S. y Sithigorngul, P. 1999. Purification and characterization of an isoform of crustacean hyperglycemic hormone from the eyestalk of *Macrobranchium rosenbergii*. J. Exp. Zool. 284: 217–224 p.

Soyez, D., Laverdure, A.M., Kallen, J. y Van Herp, F. 1998. Demonstration of a cell-specific isomerization of invertebrate neuropeptides. Neuroscience. 82: 935-942 p.

Spanings-Pierrot, C., Soyez, D., Van Herp, F., Gompel, M., Skaret., G., Grousset, E. y Charmantier, D. 2000. Involvement of Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Control of Gill Ion Transport in the Crab *Pachygrapsus marmoratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 119: 340-250 p.

Sun, P.S., 1994. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a molt-inhibiting hormone-like neuropeptide from the white shrimp *Penaeus vannamei*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 31:1–6 p.

Sun, P.S. 1997. Recombinant molt-inhibiting hormone-like neuropeptide produced in the yeast *Pichia pastoris*. Pacon 97 Proceedings. Symposium on Resource Development. Hong Kong, China. 509-518 p.

Tensen, C.P., De Kleijn, D.P.V., Van Herp, F. 1991. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding two crustacean hyperglycemic hormone from the lobster *Homarus americanus*. Eur. J. Biochem. 200:103–106 p.

Tiu, S. H., He, J. G. y Chan, S. M. (2007). The LvCHH-ITP gene of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*) produces a widely expressed putative ion transport peptide (LvITP) for osmo-regulation. *Gene*. 396: 226-235.

Toullec, J., Serrano, L., Lopez, P., Soyez, D. y Spanings-Pierrot, C. 2006. The crustacean hyperglycemic hormones from an euryhaline crab *Pachygrapsus marmoratus* and a fresh water crab *Potamon ibericum*: Eyestalk and pericardial isoforms. *Peptides*. 27: 1269-1280 p.

Treerattrakool, S., Eurwilaichitr, L., Udomkit, A. y Panyim, S. 2002. Secretion of pem-CMG, a peptide in the CHH/MIH/GIH family of *Penaeus monodon*, in *Pichia pastoris* is detected by secretion signal of the α -mating factor from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35: 476-481 p.

Treerattrakool, S., Udomkit, A., Eurwilaichitr, L., Sonthayanon, B y Panyim S. 2003. Expression of biologically active crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of *Penaeus monodon* in *Pichia pastoris*. *Mar. Biotechnol.* 5: 373-379 p.

Treerattrakool, S., Udomkit, A. y Panyim, S. 2005. Anti-CHH antibody causes impaired hyperglycemia in *Penaeus monodon*. *J Biochem. Mol. Biol.* 39(4):371-6 p.

Tsai, K., Chang, S., Wu, H., Shih, H., Chen, C. y Lee, C. 2008. Molecular cloning and differential expression pattern of two structural variants of the crustacean hyperglycemic hormone family from the mud crab *Scylla olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159: 16-25 p.

Tschopp, J.F., Brust, P.F., Cregg, J.M., Stillman, C.A. y Gingeras, T.R. 1987. Expression of the LacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* 15: 3859-3876 p.

Udomkit, A., Treerattrakol, S. y Panyim, S. 2004. Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. *J. Exp. Mar. Ecol.* 298: 79–91 p.

Wiwegweaw, A., Udomikit, A. y Panyim, S. 2004. Molecular Structure and Organization of Crustacean Hyperglycemic Hormone Genes of *Penaeus monodon*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology.* 37(2): 177-184 p.

Yang, W.J., Aida, K. y Nagasawa, H. 1997. Amino acid sequences and activities of multiple hyperglycemic hormones from the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Peptides.* 18: 479–485 p.

Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T. y Naya, Y. 1994. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms and diverse function. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 387–398 p.

Yodmuang, S., Udomkit, A., Treerattrakool, S. y Panyim, S. 2004. Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 312: 101–114 p.