

2-A  
2 ejm

03068

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

UACPyP DEL CCH.

**"CARACTERIZACION DE LA HETEROGENEIDAD  
MOLECULAR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO DE  
POLLO (cGH)."**

TESIS

Que para obtener el titulo de

**MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

presento

*José Luis Montiel Hernández.*

México, D.F. 1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**"Aquí yace el lector  
que nunca abrirá este libro  
Aquí está muerto para siempre".**

**El presente trabajo de tesis se realizó en el laboratorio del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el departamento de Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas.**

**Durante la realización del trabajo se contó con la asesoría de los Dres. Flavio Mena Jara, Gonzalo Martínez de la Escalera y Carlos Arámburo de la Hoz.**

## INDICE

ANTECEDENTES.	Pág.
A. HETEROGENEIDAD DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISIARIAS.	2
B. HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO.	3
C. HETEROGENEIDAD FUNCIONAL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO.	8
D. HORMONA DE CRECIMIENTO DE POLLO.	10
a) Diversidad funcional.	11
b) Variación molecular.	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	19
OBJETIVOS PARTICULARES.	21
MATERIALES Y METODOS.	
Reactivos.	22
Equipo	22
Material Biológico.	23
Métodos Analíticos.	
Análisis electroforéticos	24
Inmunoelctrotransferencia (IET)	25
A. Heterogeneidad molecular de la cGH circulante.	
Aislamiento de la cGH a partir de suero mediante cromatografía de inmunoafinidad.	25
Aislamiento de la GcGH a partir de suero por cromatografía de afinidad (Con A sefarosa).	26
B. Fosforilación de las GHs y PRLs.	
a) Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> .	27
b) Cinéticas de fosforilación para las GHs y PRLs.	28
c) Determinación de fosfato esterificado a las hormonas.	29

C. Aislamiento de las variantes de la cGH.	
a) Electroelución de geles nativos de poliacrilamida (ND-PAGE).	30
b) Empleo de geles despolimerizables.	31
c) Isoelectroenfoque preparativo (IEFp).	31
d) Cromatofenofque preparativo (CFp).	32
<b>RESULTADOS.</b>	
A. Heterogeneidad molecular de la cGH circulante.	34
B. Fosforilación de las GHs y PRLs.	42
C. Aislamiento de las variantes moleculares de la cGH.	54
<b>DISCUSION .</b>	
A. Heterogeneidad molecular de la cGH circulante.	64
B. Fosforilación de las GHs y PRLs.	68
C. Aislamiento de las variantes moleculares de la cGH.	73
<b>CONCLUSIONES.</b>	81
<b>APENDICES.</b>	
<b>A. SISTEMAS DE ELECTROFORESIS .</b>	
A.1. <u>ND-PAGE</u>	82
A.2. <u>SDS-PAGE</u>	83
A.2. <u>IEF</u>	84
A.4. <u>2D-PAGE</u>	85.
A.5. <u>IET</u>	86
<b>B. AISLAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-cGH.</b>	88
<b>C. SINTESIS DE LA COLUMNA DE INMUNOAFINIDAD.</b>	89
<b>D. PREPARACION DE LA COLUMNA DE CONCANAVALINA A-SEFAROSA.</b>	90
<b>E. ELECTROELUCION DE GELES DE ND-PAGE.</b>	91
<b>F. GELES DESPOLIMERIZABLES.</b>	92
<b>G. ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO (IEFp).</b>	94
<b>H. ANALISIS DE INMUNORREACTIVIDAD POR "DOT-BLOT".</b>	96
<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	97

## RESUMEN.

La hormona de crecimiento de pollo (cGH) ejerce diversos efectos metabólicos (Scanes, 1986). Como explicación de esta variación funcional, una hipótesis propone que la hormona es una familia de proteínas homólogas donde cada variante ejercería efectos fisiológicos relativamente específicos. En apoyo de esta hipótesis, hemos demostrado que en la hipófisis, la cGH es polimórfica y que dos de sus variantes de carga muestran efectos diferentes en dos bioensayos homólogos (Arámburo et al., 1990a). Sin embargo, se ignoraba si la heterogeneidad hormonal observada en la hipófisis se expresaba en la circulación, lo cual apoyaría el hipotético papel funcional diversificador de las variantes de la cGH.

El presente trabajo tuvo como primer objetivo demostrar y comparar la heterogeneidad molecular de la cGH hipofisiaria y circulante. Asimismo, con el interés de profundizar en el estudio de los mecanismos de generación de dicha heterogeneidad, se intentó demostrar si la fosforilación *in vitro* de la cGH (Arámburo et al., 1989a; 1990b) es un proceso específico y si puede explicar, al menos parcialmente, la existencia de variantes de carga. Paralelamente, como último objetivo, se probaron y optimizaron diversas técnicas para el aislamiento de las variantes de carga de la cGH.

Para evidenciar el polimorfismo de la cGH en el suero, se aisló la hormona mediante una cromatografía de inmunofinidad (acoplada con anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -cGH). La heterogeneidad molecular de la cGH sérica se comparó al patrón obtenido con extractos hipofisiarios frescos de pollos, mediante diversas técnicas electroforéticas. La variante glicosilada obtenida a partir de la cGH sérica (Berghman et al., 1987; Arámburo et al., 1991) se purificó por una segunda cromatografía de afinidad (concanavalina A-sefarosa).

Como segunda parte del estudio, se realizaron ensayos de fosforilación *in vitro* de la cGH, y de otras GHs y PRLs, con la proteína cinasa dependiente de AMPc (APK) y  $\gamma$ -<sup>32</sup>ATP. Las variantes fosforiladas se analizaron por electroforesis, por inmunoelectrotransferencia y por autoradiografía. A la par, también se determinaron las cinéticas de fosforilación de las diferentes GHs y PRLs, así como el contenido de fosfato esterificado a las preparaciones hormonales puras como un índice del grado de especificidad de la modificación por fosforilación.

En este estudio se confirmó la heterogeneidad molecular de la cGH, y se demostró la existencia de variantes de masa, de carga y glicosilada de la hormona, tanto en la hipófisis como en el suero. La gran similitud encontrada entre las isoformas de la hormona en ambos tejidos nos permite sugerir que las variantes de la hormona son secretadas a la circulación. Asimismo, se demostró que la cGH, así como otras GHs y PRLs, son fosforiladas *in vitro* por la APK de manera altamente específica. Por las cinéticas de fosforilación se demostró que la incorporación de fosfato es un proceso dependiente del tiempo y saturable. Por otro lado, la presencia de fosfato en las preparaciones puras de las hormonas sugiere que la transformación por fosforilación es real. En su conjunto, estos datos apoyan la hipótesis de que las variantes de la cGH son reales y potencialmente podrían ejercer diferentes efectos sobre los órganos blanco. Así también, demostramos que la fosforilación es un mecanismo plausible en la formación de las variantes de carga de la cGH. Finalmente, después de probar distintas técnicas, el isoelectroenfoque y el cromatoenfoque preparativos parecen ser las técnicas más promisorias para aislar variantes de la cGH.

## GLOSARIO

APK	proteína cinasa dependiente del AMPc.
ATP	trifosfato de adenosín.
$\gamma$ 32P- ATP	trifosfato de adenosín marcado radiactivamente en la posición gama.
cGH	hormona de crecimiento de pollo.
cPRL	prolactina de pollo.
ConA	Concanavalina A
ConA-P	Concanavalina A-peroxidasa
D.O.	densidad óptica
FSH	hormona estimulante del foliculo
G-cGH	hormona de crecimiento de pollo glicosilada
IEF	isoelectroenfoque
IET	inmunolectrotransferencia.
LH	hormona luteinizante
KIU	Unidades inhibidoras de kalikreína
MAb $\alpha$ -cGH	anticuerpo monoclonal anti-cGH
ND-PAGE	electroforesis no desnaturalizante .
oPRL	prolactina ovina.
pI	punto isoeléctrico
PM o MW	peso molecular
Rf	migración electroforética relativa.
RIA	radioinmunoensayo
rPRL	prolactina de rata.
tGH	hormona de crecimiento de pavo.
tPRL	prolactina de pavo.
TSH	hormona estimulante de la tiroides
SDS-PAGE	electroforesis desnaturalizante con dodecil sulfato de sodio
2D-PAGE	electroforesis bidimensional.

## ANTECEDENTES

La época actual se puede caracterizar por su gran incertidumbre, pues hoy más que nunca, los acontecimientos presentes entierran a los acontecidos ayer. Las teorías antes fundamentales para explicar y dar dimensión a la realidad, hoy son sustituidas o reformuladas ante los nuevos avances conceptuales.

Dentro de este contexto, la neuroendocrinología no ha sido la excepción. No hace mucho tiempo se consideraba al sistema nervioso y al endócrino como entidades físicas y funcionales independientes. Los nuevos descubrimientos demostraron que existían más relaciones que diferencias entre estos dos sistemas; y el estudio de dichas interrelaciones propició la generación de una nueva área del conocimiento: la neuroendocrinología. Sin embargo, los nuevos descubrimientos en esta área, en lugar de permitir la formulación de una teoría unificadora funcional, demuestran que las interrelaciones entre el sistema nervioso y las glándulas endócrinas son mucho más complejas de lo que se pensaba. De manera adicional, en la última década, se ha demostrado la existencia de una amplia comunicación entre el sistema inmune y el neuroendócrino (Weigert y Blalock, 1987); lo cual complica aún más el esquema posible de la comunicación entre estos sistemas.

A nivel subcelular, ante los nuevos avances, se encontró una interrelación y complejidad tan grande entre los distintos sistemas citoplasmáticos, que se puede remontar a tiempos muy tempranos en la evolución y en el desarrollo embrionario. De acuerdo a un esquema simplista, las moléculas que son empleadas en el transporte de información (mensajes intercelulares) debían ser estables y particulares para cada función, limitando en lo posible la regulación ambigua. Posteriormente se demostró que la variación en las moléculas mensajeras permite amplificar las posibilidades funcionales en la comunicación intercelular y confiere una mayor integración entre diferentes sistemas, con respecto a la función que se desencadena en un órgano blanco (LeRoith, et al., 1989). Los resultados del presente trabajo son un ejemplo de que la heterogeneidad de una molécula mensajera (hormona, neurotransmisor, etc.) no sólo es posible sino que es real.



## A. HETEROGENEIDAD DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISIARIAS.

Durante bastante tiempo se consideró que las entidades hormonales secretadas por la hipófisis eran entidades moleculares singulares, y que cada una, a su vez ejercía efectos particulares, muy diferentes de los desempeñados por las demás hormonas. Un caso "curioso" era la existencia de tres hormonas (TSH, LH y FSH), que compartían la subunidad  $\alpha$  (Sairam y Papkoff, 1974; Pierce, 1974). Sin embargo, a pesar de que hechos como los anteriores contradecían la completa autonomía de las hormonas, durante años las variantes hormonales fueron consideradas como contaminaciones y artificios de las técnicas de purificación y de análisis (Barrett, 1962; Ferguson y Wallace, 1963). En la actualidad ya es aceptado que las hormonas adenohipofisarias son heterogéneas. Así entonces, se han podido reconocer diferencias en la estructura primaria de la hormona adenocorticotrópica (ACTH) y en la hormona estimulante de melanocitos (MSH). Se presume que las diferencias pueden ser causadas por procesamientos alternativos del transcrito primario (Hofman, 1974). Recientemente, se ha demostrado que al menos el 30 % de la ACTH se encuentra fosforilada (Boulton, 1987). Asimismo, en las hormonas estimulante del folículo (FSH), luteinizante (LH) y estimulante de la tiroides (TSH) se ha descrito gran heterogeneidad en la porción de carbohidratos (principalmente glucosamina y galactosamina) y en las regiones amino y carboxilo terminales, como consecuencia de proteólisis limitada (Pierce, 1974; Sairam y Papkoff, 1974). Recientemente, se ha demostrado que la heterogeneidad molecular de la porción de carbohidratos ocasiona un cambio conformacional en la estructura de la hormonas (Keutmann, 1985) que, a su vez, provoca diferencias de afinidad para con sus receptores (Ryan, 1987) y, como consecuencia, redundando en su heterogeneidad funcional (Nomura et al., 1989).

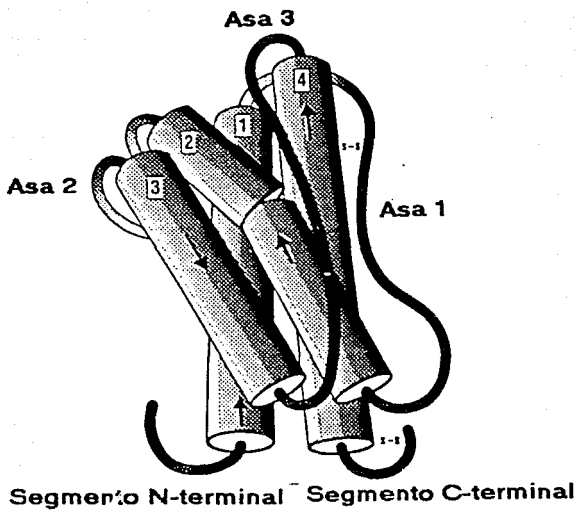
En años recientes se ha reunido gran cantidad de información que demuestra el polimorfismo de la prolactina (PRL). Se han descrito variantes con diferencias en la conformación proteínica, de carga (por ejemplo, fosforilación [Oetting et al., 1986]), de masa (agregaciones incluso de carácter covalente [Lewis, 1984]), fragmentos (21-23 kDa) productos de la acción de la kallikreína (Ho et al., 1991) y fragmentos de 16 kDa con bioactividad diferente a la hormona completa (Clapp et al., 1988). También se ha descrito la transformación de la PRL por un mecanismo de transferencia de tiol-disulfuro, como un prerrequisito en la formación de hormona liberable (Mena et al., 1986). Más recientemente, se ha mostrado la existencia de

variantes de PRL con diferentes grados de glicosilación (Shah y Hymer, 1989) lo que repercute en su bioactividad (Markoff et al., 1988). Así también, se han aislado algunas isoformas de la PRL ovina (Haro y Talamantes, 1985).

## B. HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO.

La hormona de crecimiento (GH) consiste en una cadena polipeptídica de 191 aminoácidos, con dos puentes disulfuro (Cys 53-164 y 181-189), lo cual da como consecuencia la formación de dos asas; una mayor y otra menor. Aunque en la actualidad existen elementos para descartar la idea de que la GH existe como una sola entidad molecular, la variante monomérica y mayoritaria (22 kDa) se reconoce como la representante de la familia hormonal, e incluso se ha sugerido que esta isoforma constituye la molécula original, sobre la cual se llevan a cabo distintas modificaciones.

En la actualidad, se ha avanzado bastante en el estudio bioquímico de esta entidad hormonal. En la figura 1 se observa un esquema de la estructura de la GH porcina obtenida por cristalografía de rayos X (Abdel-Meguid et al., 1987). Como se puede observar, la variante principal de la hormona es una proteína con un alto porcentaje de conformación  $\alpha$ -hélice (55 %), y donde estas secciones se compactan alrededor de un núcleo relativamente hidrofóbico (Carfacci et al., 1991). A su vez, se pueden reconocer cuatro regiones helicoidales: dos grandes (aminoácidos 7-34 y 153-183) y dos menores (aminoácidos 65-96 y 106-128). Por experimentos de mutagénesis dirigida se ha podido demostrar la existencia de al menos dos regiones de la hormona (hGH) que interaccionan con el receptor (Cunningham et al., 1989; *ibid*, 1990; *ibid*, 1991). Se ha propuesto, por esos trabajos, que el primer tercio de la primera  $\alpha$ -hélice, la región de residuos de aminoácidos 54-68 y la primera mitad de la cuarta  $\alpha$ -hélice, constituyen, en su conformación tridimensional, la región de unión a los receptores hepáticos. El segundo sitio de posible interacción del receptor con la forma mayoritaria de la hormona se halla constituido primordialmente por los residuos Glu<sub>31</sub> y Glu<sub>34</sub>, una región que se ha postulado como sitio de quelación de Ca<sup>2+</sup>, el cual se sabe influye en la unión del receptor hepático como la hormona (Barnard y Waters, 1988; Barnard et al., 1989). Recientemente, el receptor hepático de la hGH fue secuenciado y clonado, lo cual ha permitido identificar las regiones del receptor fundamentales en la unión con el ligando (Burnside et al., 1991; Bass et



**Figura 1. Estructura tridimensional de la GH porcina (tomado de Abdel-Meguid, S.S. 1987).**

al., 1991). Este interés por la estructura molecular de la GH no es un hecho fortuito, sino que es la consecuencia de la extensa labor de grupos anteriores (Paladini et al., 1983; Li, 1988 y Wallis, 1989).

Aunque fue común referirse a la GH como un solo componente, ahora se sabe que la hormona existe en diferentes formas. Como consecuencia, la GH que se aísla de la hipófisis presenta heterogeneidad molecular.

En las primeras purificaciones de la GH (Li, 1945; *ibid*, 1948), las fracciones de hormona pura contenían otros componentes que se consideraron como "impurezas". Esta microheterogeneidad se explicó considerando la agresividad de los métodos de purificación entonces empleados (Lewis, 1962; *ibid*, 1963; Sluyer, 1963; Hansan et al., 1966; Wilhelmi, 1974). Así entonces, se describió la fragmentación de la hormona debido a las técnicas de purificación basadas en las extracciones con ácidos y disolventes; también se encontró heterogeneidad en la preparación hormonal después de largos períodos de almacenamiento (Wilhelmi, 1974). Poco tiempo después, se demostró la presencia de proteasas ácidas en las fracciones de la purificación hormonal. Aparentemente las condiciones del protocolo de aislamiento permiten la activación de las enzimas proteolíticas y su acción sobre la GH (Lewis, 1962; *ibid*, 1963; *ibid*, 1980). Aunque los protocolos de purificación se optimizaron, las condiciones se mejoraron y se incrementaron medidas para no alterar a las hormonas, el polimorfismo de las preparaciones hormonales persistió (Ferguson y Wallace, 1963; Gorden et al., 1973; Lewis et al., 1980; Baumann, 1991).

El fenómeno de variación molecular no fue privativo de la GH humana, sino que también se observó en otras especies, tanto en los mamíferos como fuera de esta clase (Nicoll et al., 1971), lo cual evidencia la enorme amplitud del fenómeno de heterogeneidad hormonal.

Se han identificado algunos mecanismos que pueden contribuir a la existencia de variantes de la GH; estos se encuentran a diferentes niveles:

a) Duplicación génica.- En el humano, además del gen que codifica a la GH hipofisiaria (hGH-N) se ha demostrado la presencia de otro gen paralelo (hGH-V) que codifica una secuencia similar, aunque no idéntica (Seeburg, 1982; Chawla et al., 1983; Hirt et al., 1987). Este segundo gen parece que no se expresa en la hipófisis, pero sí en otros tejidos (p.ej. en la placenta, Cooke et al., 1988).

b) Procesamiento diferencial del transcrito primario.- Se ha demostrado la presencia de formas variantes (20 y 17.5 kDa) generadas por el procesamiento "ambiguo" del ARNm de la GH (Lewis et al., 1980; Howland, et al., 1987; Lecomte et al., 1987). Se ha descrito que la variante con PM de 20 kDa (20 K), a diferencia de la variante de 17.5 kDa, se encuentra tanto en la hipófisis como en la circulación (Chawla, 1983; Lewis, 1984).

c) Modificación postraduccional.- Se ha demostrado la presencia de variantes de masa [agregados covalentes y no covalentes (Stolar et al., 1984; Becker et al., 1987; Gorden et al., 1973; Lewis, 1977; *ibid*, 1980; *ibid*, 1984); fragmentos (Chawla et al., 1983; Paladini, 1983; Yokoya y Friesen, 1986; Davis et al., 1987; Relegui et al., 1987; Wallis, 1989; Wroblewski et al., 1991)] y variantes de carga [desamidación (Lewis et al., 1980; Chawla et al., 1983), acetilación (Paladini et al., 1983) y fosforilación (Baldwin et al., 1983; Liberti, 1985; *ibid*, 1986; Arámburo et al., 1989a; *ibid*, 1990b)] en muy variadas especies (Wallis, 1989; Baumann, 1991). Un hecho a destacar es que estas variantes se han detectado tanto en extractos hipofisarios como en cultivo de células y en la circulación sistémica (Talamantes et al., 1981; Stolar et al., 1984). Asimismo, recientemente se ha mostrado la existencia de formas glicosiladas de la GH (Sinha et al., 1986; Berghman et al., 1987; Arámburo et al., 1991). Además de la heterogeneidad de la GH, se ha demostrado el polimorfismo del factor de liberación de la hormona de crecimiento (GRF), principal hormona hipotalámica que estimula la secreción de la GH hipofisaria (Sasaki et al., 1989).

Como la mayoría de las proteínas de secreción, las hormonas peptídicas, y con ellas la GH, son transformadas durante su tránsito por el retículo endoplasmático, complejo de Golgi, su empaquetamiento y almacenamiento en gránulos de secreción, y su liberación al torrente sanguíneo (Alberts et al., 1989; Burgess y Kelly, 1987). Al mismo tiempo que las proteínas de secreción son traducidas por los polisomas, la cadena polipeptídica entra al retículo endoplasmático. Durante este tránsito, el péptido líder (región discreta del extremo N-terminal) es procesado proteolíticamente (Blobel, 1980). Una vez dentro del retículo endoplasmático, la proteína de secreción puede sufrir un primer nivel de N-glicosilación; al mismo tiempo, la proteína se pliega, adquiere su conformación nativa, y puede formar oligómeros (Hurtly et al., 1989). Durante el tránsito por el complejo de Golgi, la glicosilación de la proteína aumenta en proporción y en complejidad;

asimismo, por acción de enzimas específicas, se pueden dar procesos de acilación y sulfatación proteínica (Alberts et al., 1989; Rothman et al., 1990). En la parte final del complejo de Golgi, las proteínas son "seleccionadas" y empaquetadas en las vesículas de secreción, como grandes agregados, por un mecanismo de intercambio tiol-disulfuro, descrito para la PRL (Mena et al., 1986; Greenan et al., 1990), o por coordinación con cationes divalentes, como se sugiere para la hGH (Cunningham et al., 1991). A partir de este momento, las proteínas de secreción pueden ser procesadas proteolíticamente, lo cual da origen a las proteínas activas o maduras (Alberts et al., 1989; Burgess y Kelly 1987). En el caso particular de la GH, se demostró la existencia de una proteína cinasa en la membrana de los gránulos de secreción, y se observó la incorporación de fosfato radiactivo a una proteína con movilidad electroforética semejante a la de GH en la rata (Brattin y Portanova 1981). Estas evidencias permiten sugerir que la fosforilación de la hormona podría llevarse a cabo en los gránulos de secreción.

Antes de realizar el estudio analítico sobre variación molecular de la GH, se inició la búsqueda de los sitios estructurales importantes para la expresión de la actividad biológica. La causa de este gran entusiasmo, que aún subsiste, fue la demostración de que la proteólisis limitada de la GH generaba fragmentos que conservaban su bioactividad e incluso presentaban actividad mucho mayor (Levine et al., 1973; Sigh et al., 1974; Wieser et al., 1974; Reagan et al., 1975; Ng y Bornsteins, 1978; Mills et al., 1980; Lewis et al., 1980; Graf et al., 1982; Chawla et al., 1983; Paladini et al., 1983; Mondon et al., 1988).

Como contraparte a la variación molecular de la GH, hay claras evidencias de que los receptores para la GH son heterogéneos (Bamad et al., 1985; Hughes y Friesen, 1985; Smith y Talamantes, 1987; Thomas et al., 1987; Postel-Vinay, 1989). Recientemente también se ha demostrado la existencia en el plasma de proteínas que se unen a la GH (GHBP; Baumann, 1988; *ibid.*, 1991). Actualmente se reconocen dos tipos de GHBP, las de alta afinidad (61 kDa) y las de baja afinidad (>100 kDa). La primera, se considera, se origina por procesamiento alternativo del RNAm en la región NH<sub>2</sub>-terminal del receptor de la GH. Esta GHBP podría competir con los receptores por el ligando y prolongar la vida media de la hormona en la circulación. La segunda GHBP une con menor afinidad a la variante monomérica y mayoritaria de la hormona (22 kDa). Sin embargo, esta GHBP presenta

mayor afinidad por la variante de 20 kDa de la hGH lo que quizás indicaría la existencia de un tipo de GHBP con preferencia hacia un tipo particular de variante hormonal.

La importancia de las proteínas de unión no es del todo clara, hay evidencias que indican que confieren a la GH mayor estabilidad y disminuyen su filtración renal (Baumann y Amburn, 1986). Como sugerencia indirecta de la acción relevante de las GHBP está la demostración de que una alta proporción de la GH humana se encuentra asociada a estas proteínas de unión, durante su tránsito por la circulación (Baumann y Amburn, 1986).

### C. HETEROGENEIDAD FUNCIONAL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO.

Conforme se realizaron más estudios sobre esta hormona, se hizo evidente que la GH además de estimular el crecimiento lineal de los tejidos (Wilhelmi, 1974) es capaz de ejercer efectos a muy diferentes niveles, y en variados órganos blanco (Paladini et al., 1979; Chawla et al., 1983). A semejanza de la PRL (Nicoll, 1974), la GH mostró una gran diversidad funcional, que posteriormente se describió también en otras especies de vertebrados (Hall et al., 1986).

Entre las funciones más conocidas de la GH se pueden mencionar, a *grosso modo*, las siguientes:

- 1) Su influencia en el metabolismo de proteínas (estimula el transporte de aminoácidos, la síntesis de proteínas, la expresión de genes específicos, etc. - Chawla et al., 1983; Paladini et al., 1979; *ibid*, 1983).
- 2) Estimula de manera directa la diferenciación celular, y por mediación de las somatomedinas, estimula la mitogénesis (Green et al., 1985; Isaksson et al., 1985).
- 3) Ocasiona un aumento de la concentración de glucosa circulante (actividad diabetógena), cuando se aplica en forma aguda. También provoca un descenso de la glucosa circulante (efecto de tipo insulinoide) en tratamientos crónicos (Chawla et al., 1983; Paladini et al., 1979).
- 4) Tiene efectos en el metabolismo de los lípidos (estimula la lipólisis por una parte, y por otra es capaz de inhibir la lipólisis inducida por glucagon y epinefrina - Paladini et al., 1979; ver tabla I).

5) Estimula la secreción de otros factores hormonales (efectos parácrinos, de retroalimentación y de secreción de somatomedinas hepáticas -Houston y O'Neill, 1988; Leung et al., 1986; Scanes, 1986).

6) Interactúa con el sistema inmune (Weigent y Blalock, 1987).

7) Participa en la regulación del balance hidromineral (Murphy et al., 1986)

Se reconoce que la GH lleva a cabo su acción fisiológica de dos maneras: a) Indirecta. La hormona estimula la expresión y secreción de factores parácrinos y autócrinos, por ejemplo las somatomedinas (factores de crecimiento semejantes a insulina I y II), y estos, a su vez, interactúan con los receptores del órgano blanco. Las somatomedinas provocan principalmente la expansión clonal de células de cartilago

(crecimiento óseo) y acciones semejantes a insulina en tejidos adiposo y muscular (Paladini et al., 1983; Green, 1985) b) Directa. La GH, sin la mediación de otros factores, interacciona con los receptores de los órganos blanco e induce el efecto fisiológico. Los efectos fisiológicos donde no se encontrado mediación por somatomedinas u otros factores son: la actividad diablogénica (Paladini et al., 1983), la estimulación en la expresión y liberación otros factores (Houston y O'Neill, 1988; Leung et al., 1986), la interacción con el sistema inmune celular (Weigent y Blalock, 1987) y la diferenciación celular. (Green, 1985). Incluso en algunas situaciones la hormona parece tener una participación dual: en el crecimiento oseo, en un principio, la hormona directamente provoca la diferenciación de precondrocitos a condrocitos; paralelamente, la hormona estimula la secreción de somatomedinas, que, a su vez, estimulan la mitogénesis de los condrocitos diferenciados (Green, 1985).

Un primer intento para explicar el espectro funcional tan diverso de la GH propuso la hipótesis que sugiere la existencia de regiones discretas de la molécula (dominios bioactivos), las que interactúan con un tipo particular de receptor provocando, por ende, un efecto fisiológico particular (Lewis et al., 1980; Paladini, et al., 1983). Como se mencionaba en la sección anterior, esta hipótesis encausó gran parte de los estudios sobre la GH durante más de una década. En la actualidad, esta hipótesis, a pesar de ser aún conceptualmente atractiva, no parece ser suficiente para explicar la gran diversidad funcional de la GH pues, entre otros aspectos, no explica la presencia constante de variantes moleculares de la hormona, tanto en la hipófisis como en la circulación.



Algunos autores intentaron explicar la diversidad funcional de la hormona, asociando ésta a su complejo patrón molecular (Lewis, 1984). Según esta hipótesis, las variantes moleculares de la GH, resultantes de diferentes mecanismos de procesamiento, podrían interactuar en mayor o menor grado con uno u otros tipo de receptor y de esta manera ejercer un efecto biológico particular. La suma de estos efectos individuales explicaría el diverso patrón funcional de la GH total. Durante los años posteriores se han incrementado los datos que apoyan esta explicación. Sin embargo, esta hipótesis no es excluyente y precisa de la complementación de diversos mecanismos: variación molecular de la hormona, dominios bioactivos diferenciales, heterogeneidad de receptores, etc. En la figura 2 se representa esquemáticamente una propuesta sobre los mecanismos que originan la heterogeneidad funcional de la GH.

#### D. HORMONA DE CRECIMIENTO DE POLLO.

La hormona de crecimiento se encuentra en prácticamente todas las especies de vertebrados; además de los mamíferos, en aves (Farmer et al., 1974; Papkoff et al., 1982), a reptiles (Yasuda et al., 1989), anfibios (Kobayashi et al., 1991), peces (Wagner et al., 1985; Kawachi et al., 1986; Skibeli et al., 1990). Aunque se mantienen grados de similitud entre ellas también existen notables diferencias funcionales y estructurales (Hall, 1986; Nicoll et al., 1971). Esto da origen a las variaciones en la potencia biológica de las hormonas al ser probadas en bioensayos heterólogos (sobre distintas especies) (Chawla et al., 1983). Estas diferencias interespecíficas son un reflejo de la historia evolutiva de la hormona, razón por la cual algunos autores intentan encontrar en las diferencias moleculares interespecíficas el origen de las variaciones funcionales de la hormona (Kawachi et al., 1986; Nicoll, 1986).

Con respecto a las aves, la hormona de crecimiento de pollo (cGH), se purificó por primera vez en 1974 (Farmer et al., 1974), pero fue en años siguientes que se perfeccionaron las técnicas de aislamiento de la hormona logrando con ello aumentar el rendimiento obtenido (Harvey y Scanes, 1977; Lai et al., 1984; Leung et al., 1984; Arámburo et al., 1989a). Posteriormente se logró dilucidar su estructura primaria a partir del ADNc (Souza et al., 1984; Lamb et al., 1988). En años muy recientes, con el propósito de estudiar otras

hormonas de aves, se consiguió determinar la estructura primaria de la GH de pavo (Foster et al., 1990) y la PRL de pollo (Hanks et al., 1989), dos hormonas bioquímica y evolutivamente muy cercanas a la cGH.

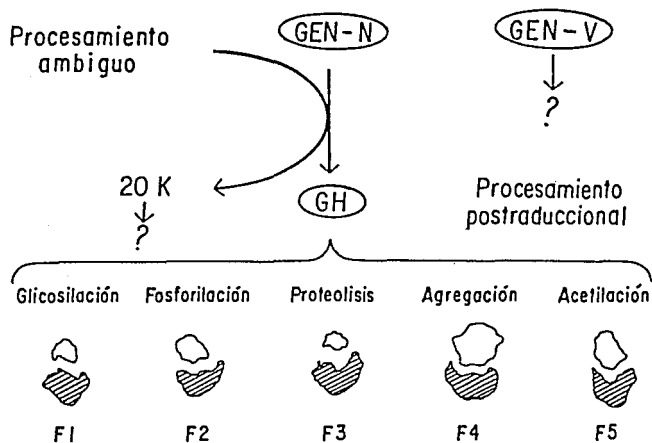
Al contar con la cGH pura, los estudios iniciales fueron de carácter farmacológico y fisiológico (Harvey et al., 1977; Harvey y Scanes, 1977; Scanes et al., 1984; ibid, 1985; ibid, 1986; Campbell y Scanes, 1985). Aunque se llevaron a cabo algunos estudios analíticos de la hormona, éstos sólo proporcionaban una imagen somera de las características bioquímicas de esta proteína (Lai et al., 1984; Leung et al., 1984; Souza et al., 1984). En el año de 1988 el grupo de Houston y Goddard publicó un trabajo que intentaba demostrar y caracterizar la variación molecular de la cGH. Al mismo tiempo, y de manera totalmente independiente, en nuestro laboratorio ya se contaba con evidencias sobre la heterogeneidad molecular de la preparación pura de la cGH, y que además era activa en varios bioensayos heterólogos y homólogos (Arámburo et al., 1989a).

#### **a) Diversidad funcional.**

A semejanza de la GH de mamíferos, la GH de pollo presenta gran diversidad en su patrón de efectos fisiológicos. En la Tabla I se enlistan los principales efectos demostrados para la cGH. Como se observa, la heterogeneidad funcional de la cGH es muy semejante a la observada en las GHs de mamíferos (véase sección anterior).

#### **b) Variación molecular.**

Actualmente, el trabajo de investigación sobre la estructura de la cGH se ha incrementado. Al contar con la secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos (Souza et al., 1984; Lamb, 1988) se ha posibilitado comparar su estructura primaria y secundaria teórica con otras hormonas homólogas (Nicoll et al., 1986; Abdel-Meguid et al., 1987), esto quizás permitirá establecer relaciones en la historia evolutiva de la familia GH-PRL. Otra contribución que será muy importante en un futuro, fue la reciente clonación y secuenciación de la proteína receptora hepática para la cGH (Burnside et al., 1991).



**Figura 2. Posibles mecanismos que dan origen a la heterogeneidad molecular de la GH. GEN-N: gen normal (se expresa en hipófisis); GEN-V: gen variante (se expresa en placenta); ? : se desconoce su acción posterior; 20 K: variante con PM de 20 kDa, observada en mamíferos; F1 - F5: diferentes efectos fisiológicos.**

TABLA I. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA cGH.

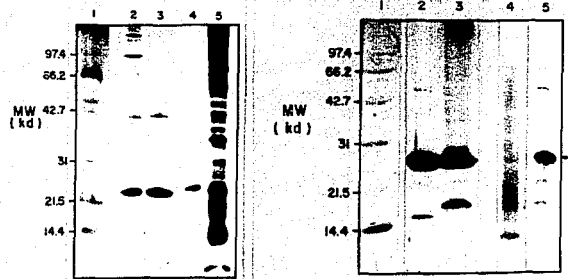
<u>EFECTOS</u>	<u>REFERENCIAS</u>
Lipólisis	1,2,5,6,8,11,13,19,20,23
Inhibición de la lipólisis Inducida por glucagon	1,2,5,6,7,8,10,11,21
Crecimiento corporal	16,19,20,21,23
Actividad diabética	4,13,20,21
Estimulación de la 5' desyodación de tironinas	12,19,23
Mitogénesis en osteoblastos	21,22
Actividad insulinoide	4
Aumento de corticosterona	11
Aumento de insulina	3
Posible efecto a nivel del sistema nervioso central	15
Altera distribución de sodio (osmorregulación)	17

- Arámburo et al., 1989a.
- Arámburo et al., 1990a.
- Burke et al., 1987.
- Cameron et al., 1985.
- Campbell y Scanes, 1985.
- Campbell y Scanes, 1988a.
- Campbell y Scanes, 1988b.
- Campbell et al., 1990.
- Carsia et al., 1985.
- Cogburn et al., 1989.
- Cheung et al., 1988.
- Darras et al., 1990.
- Hall et al., 1987.
- Houston y O'Neill, 1991.
- Leo y Harvey, 1990.
- Leung et al., 1986.
- Murphy et al., 1986.
- O'Neill et al., 1990.
- Rosebrough et al., 1991.
- Scanes et al., 1984.
- Scanes, 1986.
- Slootwet et al., 1988.
- Vaslatos-Younken et al., 1988.

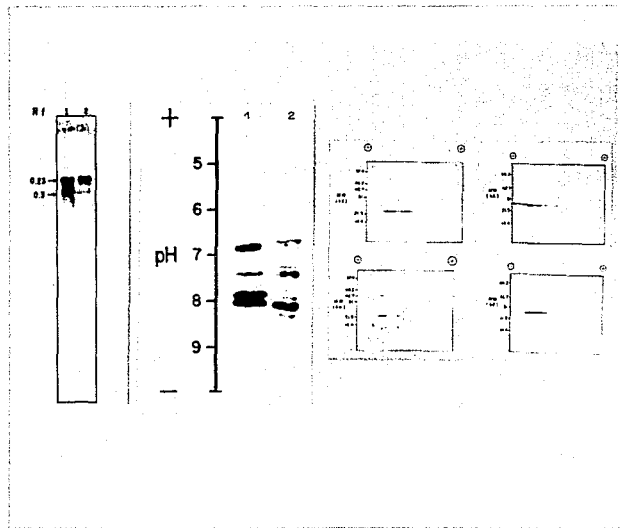
A partir del año 1986 (Arámburo y Scanes, 1986) se iniciaron los trabajos de caracterización del polimorfismo de la cGH por nuestro grupo de investigación, trabajo que fue seguido por estudios de caracterización analítica más profundos (Montiel, 1989). En la parte inicial del proyecto, se implementó un protocolo eficiente de purificación de la hormona hipofisaria, (Arámburo et al., 1989a). Posteriormente, se demostró la heterogeneidad molecular tanto de la cGH purificada en el laboratorio como de extractos hipofisarios frescos de pollo (Arámburo et al., 1990a). Mediante el sistema de electroforesis desnaturizante con SDS (SDS-PAGE), en condiciones no reductoras, se observaron variantes de la cGH con PM de 22, 45 y >66 kDa (Figura 3). En condiciones reductoras, las variantes hormonales tuvieron PM de 16, 22, 26 y 52 kDa (Figura 3). Estos resultados constituyen una indicación de que las variantes de alto PM, son agregados no covalentes de las formas monoméricas (obsérvese que en condiciones reductoras la amplia heterogeneidad de variantes de alto PM se reduce a una banda de 52 kDa posible dímero resistente a la reducción- y, paralelamente, se incrementa el grosor de la banda de la variante monomérica). Así también se describió, por primera vez, la presencia de fragmentos de la cGH (16 kDa) presentes en la hipófisis, provenientes de formas cortadas de la hormona.

Se ha mostrado, asimismo, la presencia de tres variantes de carga por el sistema de electroforesis no desnaturizante (ND-PAGE), tanto en los extractos hipofisarios frescos como en la proporción de cGH purificada., con pIs de 0.23, 0.30 y 0.35. (Figura 4a). Por isoelectroenfoque analítico (IEF) se observaron al menos 8 variantes de carga (pI: 5.9, 6.8, 7.1, 7.3, 7.5, 7.8, 8.05 y 8.15; ver figura 4b). En la preparación pura de la cGH se observó la ausencia de sólo dos de las variantes de carga minoritarias, lo que supone que durante la purificación se recuperan las principales variantes de carga de la GH hipofisaria. La heterogeneidad molecular de la cGH fue confirmada por el análisis bidimensional (2D-PAGE), y además, se evidenció que algunas variantes de carga de la hormona presentan el mismo PM (Figura 4c).

Dentro de este esquema de heterogeneidad molecular de la cGH, se demostró la presencia de una variante glicosilada de la cGH (G-cGH) en hipófisis (Berghman et al., 1987), y poco tiempo después se confirmó la existencia de variantes de la G-cGH (Arámburo et al., 1991). Para llevar a cabo ese estudio se desarrolló un protocolo de purificación específico para esta variante hormonal. En este método,



**Figura 3. VARIACION DE MASA DE LA cGH HIPOFISIARIA.** En el recuadro superior se muestra el análisis por SDS-PAGE, en condiciones no reductoras, del extracto hipofisiario de pollo (carriles 2 y 5) y de cGH pura (carriles 3 y 4). En el recuadro inferior se observa el análisis por SDS-PAGE, en condiciones reductoras, del extracto hipofisiario (carriles 3 y 4) y de la cGH pura (carriles 2 y 5). En ambos recuadros, los carriles 2 y 3 se tiñeron con anticuerpo policlonal  $\alpha$ -cGH, los carriles 4 y 5 se tiñeron con plata, y el carril 1 (marcadores de PM) se tiñó con negro amido.



**Figura 4. VARIACION DE CARGA DE LA cGH: IEF (A), ND-PAGE (B) y 2D-PAGE (C). A) Carril 1: cGH pura (fracción BDE-1), carril 2: extracto hipofisiario. B) Carril 1: cGH pura, carril 2: extracto hipofisiario. C) Cuadros 1 y 2: cGH pura, cuadros 3 y 4: extracto hipofisiario; cuadros 1 y 3: condiciones no reductoras, cuadros 2 y 4: condiciones reductoras. En todos los casos, las variantes se detectaron por inmunotinción con anticuerpo policlonal.**

el extracto hipofisiario se fraccionó por precipitaciones secuenciales de sulfato de amonio. La fracción precipitada al 80 % de saturación se cromatografió en una columna de concanavalina A-sefarosa. Luego de eluir a la fracción glicoproteínica retenida a la columna, se cromatografió en una columna de inmunoafinidad (anticuerpos policlonales  $\alpha$ -cGH acoplados a Affi-Gel 10); la fracción resultante fue la cGH glicosilada.

En estudios preliminares se presentaron las primeras evidencias sobre la fosforilación de la cGH y se demostró que una cierta proporción de la cGH pura contenía fosfato esterificado (Arámburo et al., 1989a). Además se describió que la cGH puede ser fosforilada *in vitro*, por la proteína cinasa dependiente del AMPc, y que las células hipofisarias de pollo, en cultivo, incorporan  $^{32}\text{P}$  en una proteína inmunológicamente semejante a cGH (Arámburo et al., 1990b; *ibid*, 1992).

La heterogeneidad de la cGH hipofisaria también se mostró al analizar los extractos hipofisarios por varios sistemas de electroforesis (Houston y Goddard, 1988). Un hecho importante de ese trabajo fue la demostración de que la heterogeneidad de la hormona varía con respecto a la etapa de desarrollo de los animales. Este hecho aporta otra sugerencia adicional de la importancia fisiológica de las variantes de la cGH.

La diversidad funcional de la cGH se demostró al probar a la hormona en diferentes bioensayos, tanto heterólogos (ensanchamiento del cartilago epifisario de la tibia y activación de la ornitín descarboxilasa hepática; ambos en ratas hipofisectomizadas [Arámburo et al., 1989a], como homólogos (actividad lipolítica e inhibición de la lipólisis inducida por glucagon, en explantes de tejido adiposo de pollos [Arámburo et al., 1989c; *ibid*, 1990a]).

Más recientemente, se obtuvieron claras evidencias de que la heterogeneidad molecular de la cGH puede explicar al menos parcialmente la diversidad funcional de la hormona (Arámburo et al., 1990a). Se consiguió aislar a dos variantes de carga de la hormona (Rf: 0.23 y 0.30) mediante ND-PAGE, y se demostró que ambas variantes eran reconocidas por el mismo anticuerpo por RIA, aunque sólo la variante 0.23 presentó actividad lipolítica en explantes de tejido adiposo (Arámburo, C. et al., 1989c) En un estudio ulterior ambas variantes se probaron en dos bioensayos homólogos: estimulación de la lipólisis por una parte, e inhibición de la lipólisis inducida por glucagon por la otra. La variante 0.23 estimuló la lipólisis y no inhibió la



**acción lipolítica inducida por glucagon; a su vez, la variante 0.30 mostró un claro efecto antilipolítico (Arámburo et al., 1990a). Estos resultados son muy prometedores pues constituyen evidencias claves en apoyo a la hipótesis de que la variación molecular de la cGH explicaría su diversidad funcional.**

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente proyecto de investigación se planeó con el objetivo general de aumentar las evidencias de que la heterogeneidad molecular de la cGH es un fenómeno real, no producto de artificios de laboratorio, y que tiene el potencial para originar su diversidad funcional. Para llevar a cabo este trabajo se eligió a la GH de pollo como modelo debido a que daba la posibilidad de incursionar en el estudio de la transformación de la GH, con estudios originales, comparar estos mecanismos con los observados en mamíferos, y quizás en un futuro, poder describir los mecanismos generales que se han empleado durante la evolución para generar la heterogeneidad molecular y funcional. Asimismo, por el lado práctico, el material biológico empleado para estudiar la hormona fue relativamente accesible y tiene un claro potencial en el área biotecnológica.

Con base en las anteriores evidencias, consideramos que si la heterogeneidad molecular de la cGH puede explicar su diversidad funcional, entonces las variantes de la hormona en la hipófisis deberían ser secretadas y, por lo tanto, podría demostrarse la existencia de variantes correspondientes en la circulación sanguínea. Por otra parte, la presencia de variantes de carga de la cGH implica la existencia de mecanismos de modificación de la estructura proteínica que provoque la aparición de cargas positivas o negativas en la molécula original. Un mecanismo muy favorecido es el de la fosforilación de proteínas. Por ello, se planteó la posibilidad de analizar si la cGH puede presentar este tipo de modificación y con ello contribuir a la heterogeneidad de carga.

Como se ha descrito en los Antecedentes, la cGH es polimórfica tanto en la hipófisis como en la preparación pura. Sin embargo, no se ha demostrado si la heterogeneidad de la hormona se expresa también en la circulación, medio a partir del cual la hormona puede interactuar con sus órganos blanco, y por ende, provocar sus efectos fisiológicos. Es por eso que nos propusimos aislar a la cGH a partir del suero por cromatografía de afinidad y analizarla electroforéticamente, lo cual nos permitiría demostrar la existencia de variantes de la cGH y estudiar su relación con las formas presentes en la hipófisis.

Dado que la cGH presenta variantes de masa y carga, la pregunta más inmediata entonces es ¿cómo es qué se originan las diferentes variantes hormonales? Con el fin de iniciar el estudio de los mecanismos de la formación de las variantes de la hormona, se intentó estudiar el proceso de fosforilación hormonal. Como se ha descrito (Brattin y Portanova, 1981; Baldwin et al., 1983; Liberti et al., 1985; Liberti and Joshi, 1986), la fosforilación de la GH de mamíferos es un mecanismo empleado por la célula, y que podría dar origen a algunas de las variantes de carga, como se sugiere para la rPRL (Oetting et al., 1986). Con estos antecedentes, nos propusimos demostrar si la fosforilación de la cGH es específica, para lo cual analizamos sus cinéticas y las autorradiografías de sus productos de fosforilación *in vitro*. Alternativamente, intentamos demostrar que la fosforilación es un fenómeno real, para lo cual determinamos la cantidad de fosfato esterificado presente en las preparaciones de cGH pura, y se comparó con otras GHs y PRLs.

De gran importancia resulta, en una tercera vertiente, el aislamiento de las variantes de la cGH, pues ello representaría la posibilidad de relacionar el tipo de variante hormonal y el efecto fisiológico desencadenado. Es por eso que se inició el desarrollo y ensayo de varios protocolos de purificación de variantes de la cGH.

## OBJETIVOS PARTICULARES.

### Variación de la cGH en la circulación.

- a) Aislar a la cGH presente en el suero.
- b) Demostrar y caracterizar la heterogeneidad molecular de la cGH sérica.
- c) Comparar la heterogeneidad molecular de la cGH en la hipófisis y en la circulación.

### Fosforilación de la cGH y otras hormonas.

- a) Demostrar la fosforilación in vitro de la cGH.
- b) Demostrar la fosforilación in vitro de la tGH, C-cGH, rPRL, oPRL, cPRL, IPRL.
- c) Estudiar la cinética de fosforilación de estas hormonas.
- d) Estudiar el grado de fosforilación de la oGH, la cGH, oPRL, rPRL y IPRL nativos.

### Aislamiento de variantes de la cGH.

- a) Ensayar condiciones de electroelución de geles de ND-PAGE en la purificación de variantes hormonales.
- b) Probar condiciones de recuperación de variantes hormonales mediante el uso de los geles despolimerizables.
- c) Optimizar las condiciones de separación de variantes de la cGH por el sistema de isoelectroenfoque preparativo.
- d) Ensayar las condiciones de aislamiento de variantes hormonales por el uso del sistema de cromatoenfoque.

## MATERIALES Y METODOS.

### REACTIVOS.

La aprotinina, el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), el azul de bromofenol, la concanavalina A (ConA)-sefarosa 4B, la ConA acoplada a peroxidasa de rábano, el nonidet P-40 y los aminoácidos lisina, arginina, ácido glutámico y ácido aspártico, se obtuvieron de Sigma Chem Co. (St. Louis, Mo, EEUU). La sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno, la proteína A-sefarosa, las anfolinas de un intervalo de pH de 8.5 a 10 (cromatoenfoque) y el intercambiador PBE-94 fueron de Pharmacia (Uppsala, Suecia). La acrilamida, N'N-metilenbisacrilamida (BIS), N'N-bis=acrilicistamina (BAC), N'N-dihidroxi-etilen-bis-acrilamida (DHEBA), N'N-dialiltartardiamida (DATD), N'N'N'N-tetrametilendiamina (TEMED), el persulfato de amonio, dodecil sulfato de sodio (SDS),  $\beta$ -mercaptoetanol, las anfolinas de intervalos de pH de 3-10 y 6-8, la membrana de nitrocelulosa, la gelatina, el azul brillante de coomassie R-250 y G-250, el reactivo de Bradford (para determinación de proteína), el negro amido 10B, el soporte para el isoelectroenfoque preparativo (BioLyte), el 4-cloronaftol, fueron de Bio Rad (Richmond, CA, EEUU). El immobilon fue de Millipore (Bedford, MA, EEUU). Las anfolinas en un intervalo de pH de 9-11 fueron de LKB (Bromma, Sweden). La urea fue de Merck (Edo. de México, México). El  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Act. esp.  $>7000$  Ci/mmol, preparación cruda) fue de ICN Radiochemicals (Irvine, CA, EEUU) y el ATP no radiactivo fue de Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). Las placas para autorradiografía X-OMAT, el Dektol y la solución fijadora fueron de Kodak (México, D.F.). Los demás reactivos fueron de grado analítico, y el agua empleada fue desionizada ( $\text{DDH}_2\text{O}$ ) en un equipo Milli-Q (Millipore).

### EQUIPO.

En el presente trabajo se emplearon los siguientes equipos:

Agitador "end over end" (Mülligen).	Agitador rotatorio.
Balanzas analíticas (Mettler).	Cámara de electroforesis miniProtean (BioRad).
Cámara de Biophoresis horizontal (BioRad).	Centrífuga (Sorvall RC-5B).
Centrífuga (Beckman 6R).	Contador beta (Packard 1500).
Colector de fracciones, espectrofotómetro de flujo, conductímetro, graficador, bombas peristálticas y columnas de cromatografía (LKB).	Concentrador centrífugo (Savant).
Electrodo de superficie (BioRad).	Espectrofotómetro (Gilford).
Potenciómetro SS-2 (Beckman).	Liofilizadora (Labconco).
Microbalanza electrónica (Cahn).	Microfuga (Beckman).
Potenciómetro (Radiometer).	Sistema de electroelución MiniProtean (Bio Rad).

## MATERIAL BIOLÓGICO.

1) Extractos hipofisarios. Se colectaron hipófisis de pollos de engorda (raza Pilch), machos, jóvenes (8 semanas de edad), pocos segundos después de su sacrificio. Inmediatamente después las glándulas se congelaron en hielo seco, y se mantuvieron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La homogeneización se llevó a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ , con una solución de inhibidores de proteasas (PMSF 0.5 mM y aprotinina 50 KIU/ml, pH 7.2) a una concentración de 0.3 g/ml. Después de la centrifugación en microfuga, el sobrenadante se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por electroforesis.

2) Suero de pollo. Se obtuvo de pollos (Pilch) jóvenes sanos, pocos momentos después de su decapitación. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente, se centrifugó, y el suero sobrenadante se almacenó en iotes de 10 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

3) Hormonas. En estos experimentos empleamos GH de pollo -cGH-, purificada en el laboratorio (Arámburo et al., 1989a); cGH recombinante -rcGH- (Amgen); GH de pavo, obtenida por cromatofluoreo -IGH- (Proudman y Opel, 1990); cGH glicosilada -GcGH- (Berghman et al., 1987); prolactina de pollo -cPRL- (AFP-4444b, donada por el Dr. Parlow, Torrance, CA.); PRL de pavo -rPRL- (Corcoran y Proudman, 1991); PRL de rata -rPRL- (NIDDK rPRL-B6); PRL ovina -oPRL- (NIADK-oPRL 17). Todas las hormonas se solubilizaron a una concentración de  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$  en amortiguador de bicarbonato de sodio 10 mM, pH 8.4, y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

4) Anticuerpos. Los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -cGH producidos en conejo se prepararon en el laboratorio (Arámburo et al., 1989b). Los anticuerpos monoclonales  $\alpha$ -cGH (MAbcGH) fueron proporcionados por el Dr. Berghman (Bélgica). En algunas ocasiones, se purificaron los MAbcGHs a partir de líquido de ascitis, por cromatografía en proteína A-seferosa, en condiciones de alta fuerza iónica (véase apéndice B). Los anticuerpos policlonales  $\alpha$ -cPRL fueron proporcionados por el Dr. Parlow (Pituitary Hormone and Antisera Center). También se emplearon anticuerpos  $\alpha$ -IgG de conejo, de origen caprino, acoplado con peroxidasa de rábano (Bio Rad). Como testigos, algunas veces se emplearon anticuerpos (IgG) porcinos.

5) Otras proteínas. La subunidad catalítica de la proteína cinasa A (Lot. 127F-19505), la histona H1 y la albúmina sérica bovina (Sigma, No. A-7030), fueron de

Sigma. La albúmina bovina (patrón en la determinación de proteína) y los marcadores de peso molecular (PM), para el SDS-PAGE, y de punto isoeléctrico (pI), para el isoelectroenfoque, fueron de Bio Rad.

## METODOS ANALITICOS.

### Análisis electroforéticos.

1) Electroforesis no desnaturizante (ND-PAGE), en cilindro, según Davis (1964) y Ornstein (1964). Los geles resolvidores se prepararon al 7.5 % de concentración de poliacrilamida, y los geles separadores al 3.125 %. El amortiguador de corrida fue Tris 5 mM Gly 38 mM, pH 8.35. Durante la corrida se aplicaron 3 mA por gel (Véase Apéndice A1)

2). Electroforesis desnaturizante con SDS (SDS-PAGE), se realizó según Laemmli, (1970), tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Estos análisis se llevaron a cabo con el equipo miniProtean. Los geles resolvidor y concentrador se prepararon al 12.5 % y al 4 % de poliacrilamida, respectivamente. El amortiguador de corrida fue Tris 25 mM, Gly 190 mM, SDS 0.1%, pH 8.6. Durante la electroforesis se aplicaron 150 V constantes (Véase Apéndice A2).

3) Isoelectroenfoque analítico (IEF), realizado en la cámara de Biophoresis horizontal. El gel empujado tuvo una concentración de 5 % de poliacrilamida y 2 % de anfolinas. Los amortiguadores empleados fueron: Lys 20 mM, Arg 20 mM, etanolamina 2M (cátodo) y Asp 20 mM, Glu 20 mM (ánodo). En promedio, en la electroforesis se aplicaron 4000 Vxh (aumentos graduales entre 5-10 W durante 1:30 h y 2 h a 1500 V) (Véase Apéndice A3).

4) Electroforesis bidimensional (2D-PAGE), que se realizó en el sistema miniProtean. El gel de la primera dimensión se preparó al 4.35% de poliacrilamida, 2% de anfolinas y 6 M de urea; la segunda dimensión consistió en un análisis de SDS-PAGE (ver arriba). Para la 1a. dimensión se aplicaron 3100 Vxh (500 V durante 10 min y 750 V durante 4 h). Para más detalles véase Apéndice A4.

### Inmunolectrotransferencia (IET).

Después de la electroforesis, las bandas de proteína se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa o de Immobilon durante 30 min a 200 mA en un amortiguador de Tris 25 mM, Gly 192 mM, metanol 20%, pH 8.3, para esto se empleó el sistema de miniProtean (Towbin et al., 1979; Arámburo et al., 1990a). A continuación, las membranas se bloquearon con una solución de gelatina al 3 % en PBS 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7.6 (tinción para variantes de cGH) o con albúmina sérica bovina (No. A-7030), al 3% en PBS, pH 7.6 (tinción de las formas glicosiladas).

Posteriormente, para localizar a las variantes de la cGH, las membranas se inmunotizaron por un sistema de doble anticuerpo: el primer anticuerpo (policlonal  $\alpha$ -cGH, originado en conejo [Arámburo et al., 1989b]) se empleó a una concentración de 1:2000 (v/v). El segundo anticuerpo fue  $\alpha$ -IgG de conejo, de origen caprino, acoplado a peroxidasa de rábano, diluido 1:3000 (v/v) en TPBS. Finalmente, las bandas inmunorreactivas se revelaron con una solución de 4-cloronaftol 0.05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.015% en metanol al 16.6% y PBS, durante 30 min. Para localizar las variantes glicosiladas, se empleó la concanavalina A acoplada a peroxidasa de rábano (ConA-P) a una concentración de 4  $\mu$ g/ml de solución al 1 % de albúmina, en PBS/Tween 20 0.05%, pH 7.6. (Véase Apéndice A5).

## A. HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA cGH CIRCULANTE.

### Aislamiento de la cGH a partir de suero mediante cromatografía de inmunoafinidad.

La cGH total presente en el suero fue aislada mediante cromatografía de inmunoafinidad, en un columna de sefarosa 4B acoplada con el MAb  $\alpha$ -cGH (Para mayores detalles del aislamiento del anticuerpo monoclonal ver Apéndice B), como se indica en el Apéndice C. En el presente estudio, las preparaciones de cGH circulante se analizaron al menos en cuatro ocasiones por diferentes sistemas de electroforesis.

Para cada purificación se emplearon lotes de 10 ml de suero de pollos jóvenes, de raza Pilch, los cuales se conservaron congelados (-20°C) hasta su uso. Toda la cromatografía se realizó a temperatura ambiente, y al término de ésta, la columna se almacenó a 4°C. La cromatografía se llevó a cabo haciendo recircular el suero por la



columna a un flujo de 12 ml/h durante 2.5 h. Se eluyó la proteína no retenida con el amortiguador de aplicación (fosfato 50 mM, NaCl 0.9%, Tween-20 0.01%, pH 7.6) y, a continuación, el amortiguador de alta fuerza iónica (fosfato 50 mM, NaCl 1 M, Tween-20 0.01%, pH 7.6). Posteriormente, la proteína adsorbida específicamente a la columna se obtuvo al lavar con el amortiguador de elución (Gly 50 mM, NaCl 0.9%, Tween-20 0.01%, pH 3-3.5), y cada fracción se recolectó en amortiguador de Tris/HCl 100 mM, pH 7.5. Al final, se reequilibró la columna con el amortiguador de aplicación.

Durante la cromatografía se colectaron fracciones de 1 ml, y se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm. Las fracciones eluidas se dializaron contra  $\text{DDH}_2\text{O}$  y se liofilizaron para su posterior análisis por SDS-PAGE, en condiciones reductoras y no reductoras, por IEF y por 2D-PAGE; las bandas se analizaron por tinción con azul de coomassie R-250 o por IET.

Volumen de columna:	3.5 ml
Fracciones:	1 ml
Flujo:	12 ml/h
D.O.	280 nm

### Aislamiento de la G-cGH a partir de suero por cromatografía de afinidad (Con A sefarosa).

La columna de concanavalina A-sefarosa 4B se preparó según el protocolo ya publicado (Arámburo et al., 1991; véase Apéndice D). El volumen total de resina fue de 2 ml (que equivale a 30 mg de Con A acoplada a la columna).

Después de su liofilización, la preparación de cGH sérica (un total aproximado de 500  $\mu\text{g}$  de proteína), se solubilizó en 2 ml del amortiguador de aplicación (Tris/HCl 20 mM, NaCl 0.15 M,  $\text{MnCl}_2$  1 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, pH 7.0). Se aplicó la muestra de proteína a la columna y se dejó en contacto con ésta durante 30 min. Pasado este tiempo, la proteína no retenida a la columna se eluyó con el amortiguador de aplicación. Cuando la absorbencia del eluido se acercó a cero, se eluyó la proteína retenida con el  $\alpha$ -metil-manósido 10 mM. La proteína retenida restante se eluyó con  $\alpha$ -metil-manósido 100 mM. Como último paso, la columna se regeneró por lavados secuenciales de: i) Tris/HCl 100 mM, NaCl 0.5 M, pH 8.5; ii) amortiguador de acetatos 100 mM, NaCl 0.5 M, pH 4.5; y iii) amortiguador de acetatos 100 mM, NaCl 1 M,  $\text{MgCl}_2$  1 mM,  $\text{MnCl}_2$  1 mM, azida de sodio 0.1 %, pH 6.0. y finalmente se almacenó a 4°C.

Volumen del lecho:	2 ml
Volumen de las fracciones:	1 ml
Flujo:	15 ml/h.
D.O.:	280 nm

Las fracciones se agruparon en tres lotes: 1) elución con amortiguador de aplicación, 2) elución con  $\alpha$ -metil-manósido 10 mM y 3) elución con  $\alpha$ -metil-manósido 100 mM. Todas las preparaciones se dializaron contra DDH<sub>2</sub>O y se liofilizaron.

Para identificar la cGH sérica glicosilada, se analizaron las fracciones de la cromatografía por SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras, e IET (tinción con suero policlonal  $\alpha$ -cGH y con Con A-peroxidasa).

## B. FOSFORILACION DE LAS GHs Y PRLs.

### a) Ensayo de fosforilación *in vitro*

La fosforilación *in vitro* de la cGH se realizó según las condiciones ya descritas (Arámburo et al., 1990b; Oetting et al., 1986), con algunas modificaciones.

Para estos experimentos empleamos las hormonas (GHs y PRLs) referidas en la sección de Material Biológico. Todas las hormonas se solubilizaron a una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l en amortiguador de bicarbonato de sodio 10 mM, pH 8.4, y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

En el presente trabajo se realizaron dos tipos de ensayos de fosforilación: a) empleando sólo ATP radiactivo (Arámburo et al., 1990b), y b) con la adición de un exceso de ATP no radiactivo, esto último tenía como finalidad poner a competir los ATPs radiactivo y no radiactivo por los sitios de fosforilación específicos de las distintas hormonas. En el primer tipo de ensayo, se tomó como testigo negativo la enzima más ATP marcado, pero sin hormona. Para el segundo ensayo, se tomaron en cuenta, como testigos negativos, las incubaciones de las hormonas con ATP radiactivo, pero sin enzima; y la incubación de la APK mas ATP marcado, pero sin hormona.

Ambos tipos de ensayo de fosforilación consistieron en incubar 3  $\mu$ g de cada hormona con 30 unidades de la solución de proteína cinasa A (APK) y con la

solución de ATP radiactivo, y así obtener un volumen de reacción total de 30  $\mu$ l. La APK se solubilizó en amortiguador de fosforilación (Tris-HCl 50 mM,  $MgCl_2$  10 mM, pH 7.4) y con 5% de DTT (que se añadió a partir de una solución de DTT concentrada 500  $\mu$ g/ $\mu$ l). En estos experimentos se empleó sólo  $\gamma^{32}P$ -ATP (primer tipo de ensayo) o una solución de ATP consistente en una mezcla de  $\gamma^{32}P$ -ATP y un exceso de ATP no radiactivo, que constituyó el segundo tipo de ensayo.

En cada ensayo se emplearon 10  $\mu$ Cl de  $\gamma^{32}P$ -ATP, lo que equivale a 0.47  $\mu$ M en la mezcla total de reacción. Para los ensayos de fosforilación de GHs se emplearon proporciones de 1:10;  $\gamma^{32}P$ -ATP:ATP no radiactivo; en ensayos con PRLs se emplearon proporciones de 1:100.

Tanto la solución de ATP como la de APK se agregaron a la solución de hormona mientras el tubo eppendorf se mantenía en hielo. Fue hasta que todas las mezclas de reacción estuvieran listas que se inició la incubación de los tubos a 30°C durante 60 min. Durante este lapso, se tomaron alícuotas para determinar la cinética de fosforilación. Para el análisis por electroforesis desnaturante en condiciones reductoras a la mezcla de reacción restante se le agregó amortiguador de muestra (5% de  $\beta$ -mercaptoetanol) y con SDS (SDS-PAGE). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min antes de colocarlas en los carriles del gel. Al término de la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de coomassie R-250 o se electrotransferieron a membranas de Immobilon, según las condiciones ya descritas (Apéndice A5).

Los geles teñidos con azul de coomassie y secos, y las membranas de Immobilon se incubaron a -10°C con película para autorradiografía X-OMAT. Las placas fotográficas se revelaron con un lavado de 1-5 min en la solución reveladora (Dektol 1:2 en agua). Después de lavar con abundante agua de la llave, la placa se lavó 5 min en la solución fijadora. Finalmente, la película se lavó en agua y se dejó secar.

Las membranas de Immobilon, después de la autorradiografía, se inmunotifieron (véase Inmuno-electrotransferencia, arriba o Apéndice A5).

## b) Cinéticas de fosforilación para las GHs y PRLs.

Con objeto de optimizar las condiciones para estudiar la cinética de fosforilación, inicialmente se empleó la histona H1 como sustrato de la fosforilación en un ensayo preliminar. Con base en las condiciones descritas arriba para la fosforilación *in vitro*

se tomaron alícuotas a los tiempos de 0, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min y se colocaron en cuadros de diferentes tipos de soporte: papel de fosfo celulosa (Whatman P81), papel Whatman No. 41 y papel Whatman 3MM. Estos se lavaron (como se describe enseguida), y se contaron con líquido de centelleo [PPO ( $C_{25}H_{10}NO$ ) 4%, POPOP ( $H_{24}H_6N_2O_2$ ) 0.1% en tolueno].

Para llevar a cabo la determinación de las cinéticas de fosforilación de las GHs y PRLs, a los tiempos de 0, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 min, se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción (2  $\mu$ l), y se colocaron en cuadros de fosfo celulosa (Whatman P81, 1 x 1 cm, uno para cada tiempo y cada hormona). Los papeles se dejaron secar durante 2-3 min. A continuación, se pasaron a frascos de vidrio y ahí se lavaron un total de 6 veces con una solución de TCA al 10% frío (3 ml en cada frasco); cada lavado duró aproximadamente 15 min. Después, se lavaron los papeles con isopropanol, primero, y después con acetona. Al final los papeles se cambiaron a frascos limpios, se les agregó 5 ml de líquido de centelleo y se midió la radiactividad incorporada en un contador beta, durante 1 min.

La cinética de fosforilación de cada hormona se determinó por triplicado, siendo los tres ensayos efectuados al mismo tiempo. En cada ocasión, se pusieron como testigos la APK con ATP marcado, pero sin hormona; y la solución de ATP sin APK y sin hormona. A las cuentas por minuto (CPM) de cada frasco se le restó la contribución promedio de los testigos.

### c) Determinación de fosfato esterificado a las hormonas.

La determinación del contenido de fosfato esterificado, se realizó en preparaciones puras de oGH (1.5 y 3 nmoles), oGH, tPRL, oPRL, rPRL y  $\alpha$ -caseína, como testigo positivo (0.25 y 0.5 nmoles), por el método de Buss y Stull (1983).

En cada ensayo, se trataron alícuotas de las diferentes muestras con 25  $\mu$ l del reactivo de ceniza [ $Mg(NO_3)_2$  10 % en etanol al 95%] y se calentaron hasta obtener un residuo blanco. Después, para disolver el residuo, se añadieron 150  $\mu$ l de HCl 1.2 N y 50  $\mu$ l del reactivo de fosfato (molibdato de amonio 10% en HCl 4 N, verde de malaquita 0.2%, 1:3, v/v). Después de 15 min, el color resultante se midió a 660 nm en microceldillas. La curva patrón se preparó con  $KH_2PO_4$  (0-1.5 nmol P<sub>i</sub>/ml).

### C. AISLAMIENTO DE LAS VARIANTES DE LA cGH.

#### a) Electroelución de geles nativos de poliacrilamida (ND-PAGE).

Este protocolo se basó en las técnicas de Davis (1964) y Ornstein (1964), con modificaciones de Nicoll (1971). Para más detalles ver la sección de métodos analíticos (arriba) y Apéndice E. En cada experimento se realizaron 8 electroforesis paralelas, donde se agregaron entre 40 y 60  $\mu\text{g}$  de cGH a cada gel. Después de la electroforesis, se cortaron secciones de los geles que correspondieron a las bandas de las tres variantes de carga de la cGH ( $R_f = 0.23, 0.30$  y  $0.35$ ). Uno de los geles se tiñó con "Quick stain" (3.5% de ácido perclórico, 0.025% de azul de coomassie G-250) y se empleó como patrón.

Posteriormente, las secciones de gel se electroeluyeron. Para hallar las mejores condiciones de electroelución se probaron amortiguadores de distinta fuerza iónica y pH, así como diferentes sistemas de electroelución (véase Apéndice E).

#### Condiciones de electroelución.

a) En una cámara ISCO, con amortiguador de Tris-acetatos 40 mM (cámara interna) y 400 mM (cámara externa), pH 9.1. La electroelución se llevó a cabo durante 6 h a una potencia constante de 3 W y a 4°C.

b) En el sistema de electroelución MiniProtean, se empleó un amortiguador de Tris-acetatos 50 mM pH 9.1. La electroelución se realizó a 10 mA por cada muestra, durante 5 h a 4°C.

c) En el sistema MiniProtean, se empleó el amortiguador de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 9.5. Las condiciones de corrida fueron de 13-15 mA por muestra durante 5 h a 4°C.

d) En condiciones ácidas y en el sistema MiniProtean, se empleó amortiguador de acetatos 50 mM, pH 4.5. Las condiciones de corrida fueron de 13-15 mA por muestra durante 5 h a 4°C.

Las fracciones recuperadas se dializaron contra  $\text{DDH}_2\text{O}$  y se liofilizaron. Entonces se determinó la cantidad de proteína y se analizaron las fracciones por SDS-PAGE e IET.

### b) Empleo de geles despolimerizables.

Para la implementación de este sistema de aislamiento de variantes hormonales, nos basamos en las condiciones descritas con anterioridad (Andrews, 1986; Baumann y Chrumbach, 1976; Ghaffari, 1988; Hansen, 1977; Hansen et al., 1980; Hansen, 1981; O'Connell y Brady, 1977; Tas et al., 1979; Young et al., 1980).

Para este trabajo, en la elaboración de geles para el análisis de ND-PAGE, se probaron tres tipos de entrecruzadores: N'N'-bis=acrililcistamina (BAC); N'N'-dihidroxiétilen-bis-acrilamida (DHEBA); y N'N'-dialiltartardiamida (DATD) (véase Apéndice F).

Para el presente protocolo de aislamiento de variantes de cGH se empleó el BAC como entrecruzador. Al término de la electroforesis, las secciones de gel correspondientes a las distintas variantes se cortaron (ver sección anterior). La proteína contenida en los geles se obtuvo según las condiciones de despolimerización descritas en el Apéndice F.

A continuación, se intentó descartar los contaminantes de la despolimerización (restos de poli(acrilamida) y  $\beta$ -mercaptoetanol) por diferentes métodos:

- a) La mezcla de despolimerización se filtró en membranas de  $0.45 \mu\text{m}$  (Millipore).
- b) Se cromatografió por una columna de sefadex G-150, con un amortiguador de bicarbonato de amonio  $10 \text{ mM pH } 8.6$ .
- c) Se dializó contra agua, y la solución, sin  $\beta$ -mercaptoetanol, se concentró por liofilización.

Finalmente, en todos los casos, la cantidad de proteína recuperada se determinó por la reacción de Bradford la presencia de hormona por el análisis de inmunorreactividad en "dot blot" (véase Apéndice H), y la proteína finalmente recuperada se analizó por SDS-PAGE.

### c) Isoelectroenfoque preparativo (IEFp).

Para el isoelectroenfoque preparativo se empleó el sistema de Biophoresis Horizontal. En la preparación del soporte, las condiciones de corrida, la técnica para

detectar las proteínas separadas y la recuperación de proteína, se tomaron en cuenta las condiciones descritas por Frey y Radola, 1982, Andrews, 1986, y por los laboratorios de Bio Rad. Para detalles de esta técnica ver Apéndice G.

En los experimentos preliminares se emplearon 5 mg de cGH (NIADDK-0GH-13, NIH), en los dos ensayos posteriores se ocuparon 3 y 4.5 mg de cGH pura (fracción BDE-1). En los ensayos de IEFp se aplicaron 900 V durante 16 h antes de aplicar la muestra; tras agregar la hormona, se aplicaron 2000 V durante 5 h a 4°C (24,400 Vxh totales).

Al término del IEFp, se determinó el gradiente de pH con un electrodo de superficie y con un potenciómetro, se localizaron las variantes separadas y se fraccionó la resina según la separación de las variantes. La proteína de cada fracción se recuperó por extracción de la resina con  $\text{DDH}_2\text{O}$ .

Posteriormente, se probaron distintas condiciones para eliminar las anfólicas:

- a) Cromatografía en sefadex G-10 en amortiguador de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8.4.
- b) Electroelución en bicarbonato de amonio 10 mM, pH 8.
- c) Precipitación al 50 % de saturación con sulfato de amonio.

Finalmente, se determinó la cantidad de proteína recuperada y se analizó por SDS-PAGE, por IEF y por IET.

#### d) Cromatofoco preparativo (CFp).

Para esta técnica se empleó el intercambiador iónico PBE-94 y "polibuffer 96". Para la preparación de la columna y para optimizar las condiciones de la cromatografía, nos basamos en lo recomendado por Pharmacia.

#### Preparación de la columna.

- 1) Se preparó el amortiguador inicial (etanolamina/ácido acético 25 mM, pH 9.4).
- 2) El amortiguador de elución se obtuvo después de diluir el "polibuffer" (25 ml) con agua 1:10 (v/v), ajustar el pH a 6.0 con ácido acético, diluir 1:10 con agua, y desgasificar.
- 3) Se equilibró el PB-94 en el amortiguador inicial (se empleó 20 ml de gel). Esta suspensión se desgasificó.

- 4) Se empacó la resina al mayor flujo posible (30 ml/h). Se lavó la columna hasta que el pH del eluyente fuera similar al pH del amortiguador inicial.

### Cromatografía.

Como un ensayo preliminar, se intentó la separación de las variantes de carga de la GH ovina -oGH-.

- 1) Se pesaron 5,5 mg de oGH, y se disolvieron en 0,5 ml de amortiguador inicial.
- 2) Se ajustó el flujo de la cromatografía a 25 ml/h.
- 3) Se pasó 5 ml del amortiguador de elución por la columna.
- 4) Se aplicó, entonces, la muestra.
- 5) Se agregó el amortiguador de elución y se colectaron las fracciones cada 3 ml.

Columna:	k9/30 (Farmacia)
Dimensiones:	9 x 280 mm
Volumen del lecho:	17 ml
Flujo:	25 ml/h
Vol. de cada fracción:	3 ml

6) Con objeto de localizar los picos de proteína separados por el cromatograma, se analizaron alícuotas de cada fracción mediante la reacción de Bradford y leyendo su D.O. a 595 nm. .

7) Para su posterior análisis, la proteína se precipitó con sulfato de amonio al 100 % de saturación, durante 3-4 h, a temperatura ambiente y se centrifugó a 28,800xg durante 1 h a 4°C.

8) Finalmente, las fracciones se dializaron contra  $\text{DDH}_2\text{O}$  y se liofilizaron, antes de analizarlas por electroforesis (SDS-PAGE e IEF), y localizar la proteína por tinción con azul de coomassie R-250 o por inmunotinción específica.



## RESULTADOS

### A. HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA cGH CIRCULANTE.

#### A1. Aislamiento de la cGH sérica por cromatografía de inmunofinidad.

La cGH sérica se aisló por cromatografía de inmunofinidad en una columna de sefarosa 4B con MAb  $\alpha$ -cGH; en la figura 5 se muestra el patrón de elución típico obtenido a partir de lotes de 10 ml de suero. Para este estudio, se realizaron 8 ensayos de aislamiento de cGH circulante y los patrones de elución fueron semejantes. En su primera parte (fracciones 1 a 10), la proteína eluida corresponde a las moléculas no retenidas a la columna. Las proteínas retenidas inespecíficamente se eluyeron con el amortiguador de alta fuerza iónica (AFI) (fracciones 10 a 40). La proteína retenida específicamente (cGH) se recuperó lavando con el amortiguador de elución (E), y se recolectó en Tris 100 mM, pH 7.5, para neutralizar las muestras. Finalmente, las condiciones iniciales fueron restituídas al lavar con el amortiguador de aplicación, y entonces, se eluyó otra porción de proteína (R).

Mediante el análisis de Inmunorreactividad y electroforesis (SDS-PAGE, ver sección que sigue) se comprobó que las fracciones E y R correspondieron a cGH. En esta técnica, la cantidad de proteína colectada a partir de cada lote de suero fue variable (entre 20 y 80  $\mu$ g de proteína).

#### A2. Caracterización electrofóretica de las variantes.

A partir de cada una de las preparaciones de cGH circulante aisladas, se llevaron a cabo los análisis electrofóreticos correspondientes y, en todos los casos, los resultados siempre fueron constantes. En estudios anteriores se caracterizó al anticuerpo policlonal y se mostró que éste, en ensayos de RIA, no reconoce a otras GHs ni PRLs (Arámburo et al., 1989b); asimismo en ensayos de Inmunoelctrotransferencia, se observó baja inmunorreactividad de otras GHs (datos no presentados). En la figura 6 se observan los resultados del análisis por electroforesis desnaturizante con SDS (SDS-PAGE) e IET de la fracción purificada de cGH sérica. En la misma figura se compara el patrón electrofóretico y de inmunorreactividad del extracto hipofisario fresco de pollo. En condiciones no reductoras, la fracción de cGH sérica mostró 7 variantes

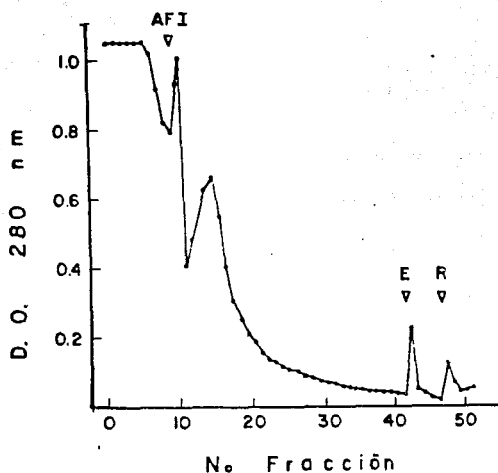


Figura 5. AISLAMIENTO DE LA cGH SERICA POR CROMATOGRAFIA DE INMUNOAFINIDAD. Elución de proteína no retenida: fosfato 50 mM, NaCl 1 M, tween-20 0.05%, pH 7.6 (AFI: amortiguador de alta fuerza iónica); elución de proteína retenida: glicina 50 mM, NaCl 0.1 M, Tween-20 0.05%, pH 3.5 (E: amortiguador de elución); reconstitución (R): fosfato 50 mM, pH 7.6. Volumen de columna: 3.5 ml; volumen de las fracciones: 1 ml; flujo: 12 ml/h, D.O. 280 nm.

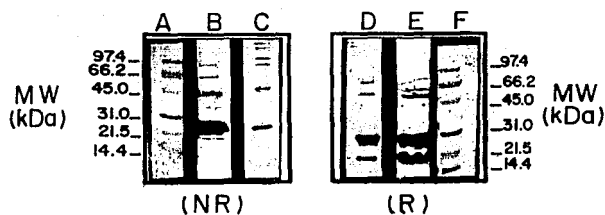


Figura 6. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LAS VARIANTES DE MASA DE LA cGH SERICA (SDS-PAGE). Las variantes se localizaron por la inmunotinción con antisero específico. Recuadro de la izquierda: condiciones no reductoras (NR); recuadro de la derecha: condiciones reductoras (R). Carriles A Y D; extracto hipofisiario de pollo; carriles B Y C; cGH aislada a partir de suero. Obsérvese la coincidencia en los patrones de heterogeneidad molecular para la cGH obtenida de tejidos diferentes.

de masa, con pesos moleculares de: 22, 45, 50, 80, 87 y dos variantes con PM mayor de 100 kDa (carril B). A su vez, el extracto hipofisiario mostró variantes de 22, 45, 62 y 80 kDa (carril A). En las condiciones reductoras, en la fracción de cGH sérica (carril D) se observaron también 7 variantes de 16, 22, 26, 52, 62, 64 y 66 kDa; y en el extracto hipofisiario (carril C) se encontraron variantes de 16, 22, 26, 52 y 56 kDa. En la tabla III se resumen estos resultados.

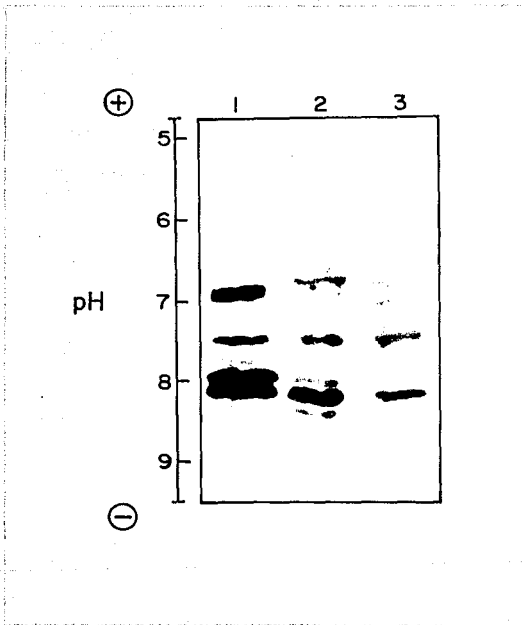
Los resultados anteriores hacen evidente que la proteína aislada a partir del suero de pollo se comporta, por criterios de migración electroforética y de inmunorreactividad, como cGH. Así también, podemos observar que hay gran semejanza en la heterogeneidad molecular presente en el extracto hipofisiario y la encontrada en la cGH sérica.

En la figura 7 se muestran los resultados del análisis por IEF e IET. En la misma figura se presenta una comparación de los patrones de variación de carga de la cGH hipofisiaria pura (fracción BDE-1) (carril 1), del extracto de hipófisis de pollo (carril 2) y de la fracción de cGH circulante (carril 3). La fracción BDE-1 mostró seis variantes de carga con pls de 6.8, 7.1, 7.3, 7.5, 7.9 y 8.1. Por su parte, en el extracto hipofisiario se observaron variantes con pls de 5.9, 6.8, 7.1, 7.3, 7.5, 7.9, 8.1 y 8.2. En el caso de la cGH circulante se encontraron isoformas con pls de 5.45, 6.2, 6.8, 7.1, 7.5 y 8.1, además de otras dos variantes ácidas (que no se aprecian bien en la fotografía), presentes en mucha menor proporción. En la tabla II se resumen los resultados de la heterogeneidad de carga.

En la figura 8 se observa el análisis bidimensional y de IET de la cGH presente en la circulación. Por esta técnica se observaron al menos 6 variantes de la cGH, con diferencias en la carga y con el mismo PM (26 kDa, condiciones reductoras). Este patrón bidimensional es semejante al observado para la cGH hipofisiaria pura (BDE-1) y el extracto hipofisiario de pollo (Arámburo et al., 1990a; véase también figura 4).

### A.3. Aislamiento de la G-cGH sérica por cromatografía de afinidad.

La purificación de la G-cGH sérica se muestra representada en la figura 9. El pico principal (lado izquierdo) lo constituye la proteína no retenida a la columna de ConA-sefarosa (hormona no glicosilada), que se eluyó al lavar la columna. Para eluir la proteína retenida, se agregó  $\alpha$ -metil-manósido 10 y 100 mM (A y B, respectivamente). De esa elución se recuperaron dos pequeños picos de proteína (en el recuadro se observa una amplificación); para su análisis electroforético,



**Figura 7. ANALISIS POR ISOELECTROENFOQUE (IEF) DE LAS VARIANTES DE CARGA DE LA cGH.** Las variantes se localizaron por inmunotinción específica. Carril 1: cGH pura; carril 2: extracto hipofisiario; carril 3: fracción de cGH sérica. La preparación de cGH sérica mostró isoformas con pls de 5.45, 6.2, 6.8, 7.1, 7.5 y 8.1; obsérvese que las variantes mayoritarias (pl DE 6.2, 6.8, 7.1, 7.5 y 8.1) coinciden con las existentes en el extracto hipofisiario y en la fracción pura de la hormona.

**TABLA II.**  
**VARIANTES DE CARGA DE cGH PRESENTES EN HIPOFISIS Y**  
**EN CIRCULACION.**

pI	Hipófisis	Suero
5.45	-	+
5.9	+	-
6.2	-	+
6.8*	+	+
7.1*	+	+
7.3	+	-
7.5*	+	+
7.9	+	-
8.1*	+	+
8.2*	+	-

+ = presencia, - = ausencia. \* = variantes mayoritarias.

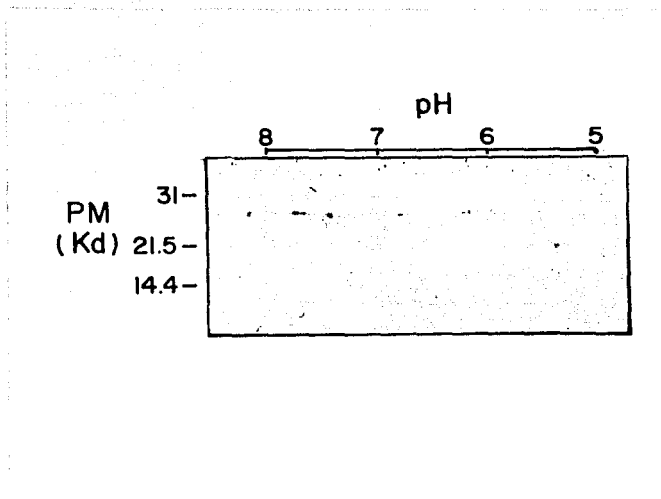
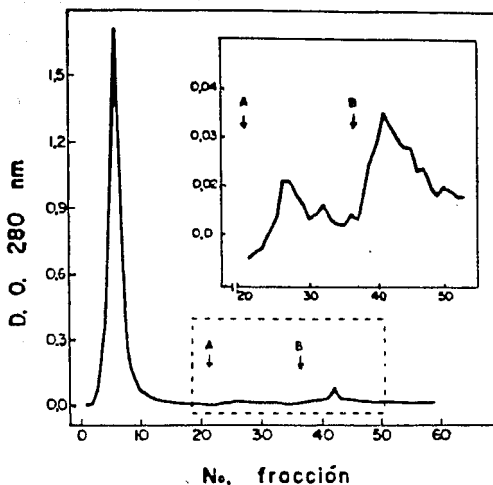


Figura 8. CARACTERIZACION DE LAS VARIANTES DE CARGA DE LA cGH CIRCULANTE POR ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL. Las variantes se observaron por inmuntinción específica. En esta figura se observan al menos 7 isoformas de la cGH con el mismo peso molecular y diferente punto isoeléctrico.



**Figura 9. PURIFICACION DE LA VARIANTE GLICOSILADA DE LA eGH CIRCULANTE POR CROMATOGRAFIA EN CONCANAVALINA A-sefarosa. Elución de proteína no retenida: Tris/HCl 20 mM, NaCl 0.15 M, MnCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7.0; elución de la proteína adsorbida: 10 y 100 mM de  $\alpha$ -metil-manósido, fracciones A Y B respectivamente. En el recuadro superior se observa la amplificación de la región de elución de la variante glicosilada. Volumen del lecho: 2 ml; volumen de las fracciones: 1 ml; flujo: 15 ml/h.**



ambas fracciones se dializaron y liofilizaron por separado. Por su estudio en SDS-PAGE e IET con anticuerpo policlonal, se observó que las proteínas de los picos A y B eran idénticas, por lo que se reunieron en una sola.

En la figura 10 se observan los resultados del análisis por SDS-PAGE e IET de las distintas fracciones de la cromatografía en Con A-sefarosa, así como de las preparaciones de la hormona pura (carril B) y de extracto hipofisiario fresco de pollo (carril C).

En la preparación de cGH pura se encontró el patrón de heterogeneidad de masa ya antes publicado (Arámburo et al., 1990a): fragmento (16 kDa), la forma monomérica (26 kDa), agregados (40-55, 62 kDa) y formas posiblemente resistentes a la reducción con  $\beta$ -mercaptoetanol (22 kDa). El extracto hipofisiario mostró resultados muy semejantes: fragmentos (16 y 18 kDa), monómero (26 kDa), agregados (40-55, 62 y cercanos a 100 kDa), formas resistentes a la reducción (22 kDa) y variantes glicosiladas (29 kDa).

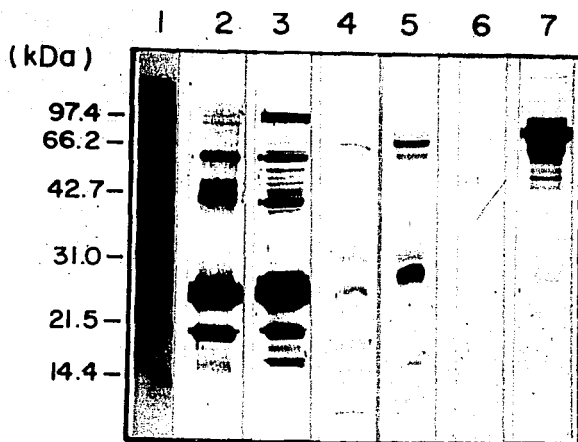
Por su lado, las fracciones de la cromatografía de afinidad se analizaron por duplicado: unas fracciones se inmunotizaron con el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -cGH (carriles D y E) y las otras se tiñeron con ConA-P (carriles F y G). En la fracción de proteína no retenida a la columna se observaron varias bandas inmunorreactivas al anticuerpo policlonal (carril D) con PM de: 16, 18, 26, 31 y 62 y 66 kDa. Cuando esta fracción se tiñó con la ConA-P (carril F) no se observaron bandas reactivas a la lectina. La fracción retenida a la columna de afinidad mostró, asimismo, varias bandas inmunorreactivas al anticuerpo policlonal (carril E) con PM de: 16, 29, 31, 62 y 66 kDa; con la tinción de la ConA-P (carril G) se observaron bandas de 29, 55, 62 y 66 kDa. En la tabla III se muestra una comparación total de la heterogeneidad de masa de la cGH que se observó en este estudio (Figuras 6 y 10).

La presencia de una forma inmunorreactiva a los MAb  $\alpha$ -cGH, suero policlonal, y reactiva a la concanavalina, en la fracción retenida a la columna de afinidad, permite sugerir que se trata de la forma glicosilada de la cGH circulante.

## B. FOSFORILACION DE LA GHs y PRLs.

### B.1. Fosforilación *in vitro*

En las figuras 11 y 12 se observan los productos de la fosforilación provocada por la subunidad catalítica de la proteína cinasa dependiente del AMPc (APK), después de una incubación de 30 min en presencia de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP. En la primera de estas



**Figura 10. ANALISIS ELECTROFORETICO (SDS-PAGE, en condiciones reductoras) DE LAS FRACCIONES ELUIDAS DE LA COLUMNA DE CONCAVALINA A-sefarosa. El carril A se tiñó con negro amido; los carriles B a E se inmunotifieron con suero  $\alpha$ -cGH; y los carriles F y G se tiñeron con concanavalina A-peroxidasa. Carril A: marcadores de peso molecular; carril B: cGH pura; carril C: extracto hipofisiario; carriles D y E: fracción no adsorbida a la columna; carriles F y G: fracción retenida a la columna. Obsérvese la presencia de una proteína de 29 kDa, inmunoreactiva al anticuerpo policlonal y reactivo a la concanavalina A (carriles E y G), una banda de peso molecular similar se observa también en el extracto hipofisiario.**

**TABLA III**  
**VARIANTES DE MASA DE αGH PRESENTES EN HIPOFISIS Y**  
**EN SUERO.**

Peso Molecular (kDa)	(R)		(NR)	
	HIPOFISIS	SUERO	HIPOFISIS	SUERO
16.8*	+	+	-	-
22.0*	+	+	+	+
26.0*	+	+	-	-
28.8	+	+	-	-
31.0	-	+	-	-
45.0*	-	-	+	+
50.0	-	-	-	+
52.0	+	+	-	-
56.0	+	-	-	-
62.0	+	+	+-	-
64.0	-	+	-	-
66.0	+	+	-	-
80.0	-	-	+-	+
86.7	-	-	+	+
>100	-	-	+	+

R= condiciones reductoras, NR= condiciones no reductoras, +=presencia, -= ausencia, +/-= posible presencia, \*= variantes mayoritarias.

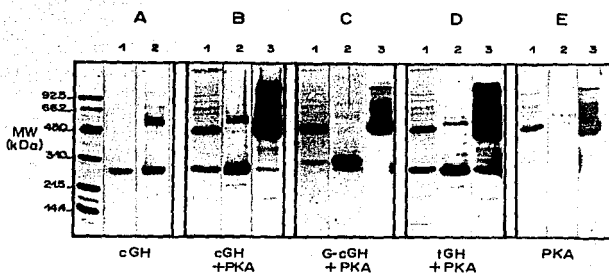


Figura 11. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS PRODUCTOS DE FOSFORILACION DE LAS HORMONAS DE CRECIMIENTO (GH) DE AVES POR LA PROTEINA CINASA DEPENDIENTE DE AMPc Y EN PRESENCIA DE  $\gamma^{32}$ P-ATP. Carril 1: tinción con azul de coomassie; carril 2: electrotransferencia e inmunotinción con  $\alpha$ -cGH; carril 3: autorradiografía. Panel A: marcadores de peso molecular y cGH como patrón. Panel B: cGH más APK. Panel C: G-cGH más APK. Panel D: tGH mas APK. Panel E: APK sola. Las películas se expusieron durante 24 h.

figura, en el panel A se observa, al lado de los marcadores de PM, la preparación pura de la cGH teñida con coomassie R-250 (carril A1) y por IET (carril A2). Este patrón electroforético y de inmunotinción es semejante al ya mostrado (Arámburo et al., 1990a). En los paneles B y D, la cGH y tGH, respectivamente, se incubaron con la APK y el  $\gamma^{32P}$ -ATP. En los carriles B1 y D1 (tinción con coomassie), y carriles B2 y D2 (inmunotinción) se observa la presencia de la forma monomérica de las preparaciones hormonales. Es en los carriles B3 y D3 que se observan los análisis por autorradiografías de los geles anteriores. En ambos casos, se observa la presencia de una banda marcada en la misma posición que las hormonas correspondientes: las otras bandas con marca radiactiva corresponden a los componentes de la preparación de APK, como se muestra en el carril donde se adicionó sólo la APK (carril E3). En el panel C se observan los resultados obtenidos con la variante glicosilada de la cGH. Aunque se observó la presencia de la variante hormonal (29 kDa), tanto por tinción con coomassie como por IET (carriles C1 y C2), no se encontró una banda marcada radiactivamente, después de 24 h de exposición con la película. El mismo resultado se obtuvo cuando se incubó la preparación hormonal durante 60 min.

En la figura 12 se observan los resultados de la incubación con APK, durante 30 min, con las diferentes preparaciones de PRL. En el panel A se observan los marcadores de PM (carril A1), y la cGH usada como testigo, teñida con coomassie (carril A2) y por IET (carril A5). En los carriles 1 y 2, de los paneles B-E, se observan las proteínas teñidas con coomassie y por inmunotinción con anticuerpo  $\alpha$ -cGH, respectivamente; en estos carriles 2 no se observa ninguna banda inmunorreactiva, lo cual demuestra, por una parte, la gran especificidad del anticuerpo para la cGH, y por la otra que las preparaciones de PRL no estaban contaminadas con GH. En los paneles B3-D3 se observa la presencia de bandas marcadas radiactivamente que corresponden con las bandas de PRL teñidas con coomassie (carriles B1 y D1). En el caso de la cPRL y oPRL se observó sólo una banda fosforilada. Sin embargo, con la tPRL se observaron dos bandas marcadas, y que correspondieron a las dos bandas teñidas con coomassie (carril C1); esto es debido a que la preparación hormonal empleada contiene a la holoproteína y a la variante glicosilada sin separar. Este hecho mostró que, a diferencia de lo que sucede con la G-cGH, la G-tPRL es fosforilada muy eficientemente por la APK. Finalmente, en el panel E se muestran los resultados del análisis de APK sola y que sirvió como testigo. Como se puede observar, en este, ninguna banda marcada se hizo

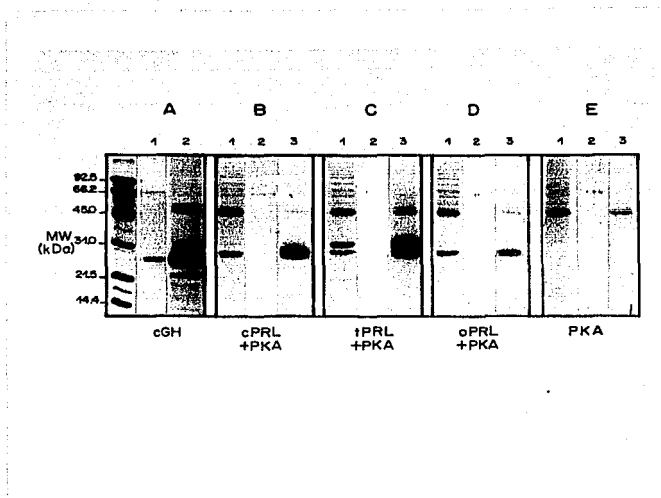


Figura 12. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS PRODUCTOS DE FOSFORILACION DE LAS PROLACTINAS (PRL) DE AVES POR LA PROTEINA CINASA DEPENDIENTE DE AMPc Y EN PRESENCIA DE  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Carril 1: tinción con azul de coomassie; carril 2: electrotransferencia e inmunotinción con  $\alpha$ -cGH; carril 3: autoradiografía. Panel A: marcadores de peso molecular y cGH como patrón. Panel B: cPRL más APK. Panel C: tPRL y G-tPRL más APK. Panel D: oPRL más APK. Panel E: APK sola. Las películas se expusieron durante 1 h.

evidente en la zona correspondiente a las PRLs. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando se incubaron las muestras durante 60 min. A diferencia de los ensayos de GH, los análisis autorradiográficos de los ensayos de PRL son el resultado de la exposición de la película fotográfica durante 1 h.

En la figura 13 se observan los resultados de un segundo tipo de ensayo de fosforilación; donde el  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP se puso a competir con un exceso de ATP no marcado. En los paneles A y B se analizaron las PRLs, y en los paneles C y D se analizaron las GHs. En el panel A se muestran los productos de fosforilación, visualizados por autorradiografía, al incubar las PRLs (cPRL, tPRL, rPRL y oPRL, respectivamente) con  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, pero sin adicionar la APK. Como se observa, no se detectó ninguna banda marcada en la zona de las PRLs; esto demuestra que el proceso de fosforilación es totalmente específico y dependiente de la actividad de la APK. En el panel C observamos los resultados de un análisis similar, donde las GHs (cGH, tGH y G-cGH, respectivamente) se incubaron con  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, pero sin APK. Aquí también, ante la ausencia de la enzima no se observó la presencia de alguna banda marcada radiactivamente, lo cual demuestra que la incorporación de fosfato radiactivo es el resultado de un proceso específico de la APK. En el panel B se observan los resultados de incubar las PRLs con la APK, con  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP y con un exceso de 100 veces de ATP no radiactivo. En estas condiciones se observaron bandas marcadas radiactivamente en las zonas correspondientes a las PRLs, al mismo tiempo, desaparecieron las bandas marcadas que correspondían a la propia preparación de APK (comparese con la figura 12, carriles B3-D3). Estos resultados son una prueba clara de la competencia entre los ATPs radiactivo y no-radiactivo por los mismos sitios de fosforilación en las diferentes hormonas. En el panel D se observan los resultados de ensayos similares de fosforilación con GHs, en los cuales se adicionó un exceso de 10 veces de ATP no radiactivo con respecto al  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP. Aquí también se hicieron visibles bandas marcadas en las zonas de la cGH (carril 1) y tGH (carril 2), pero no en la G-cGH (carril 3), lo cual es coherente con lo observado en la figura 11. Así también, en este análisis se observa una importante reducción de la intensidad de marca radiactiva de las bandas propias de la preparación de la APK, aunque no desaparecieron.

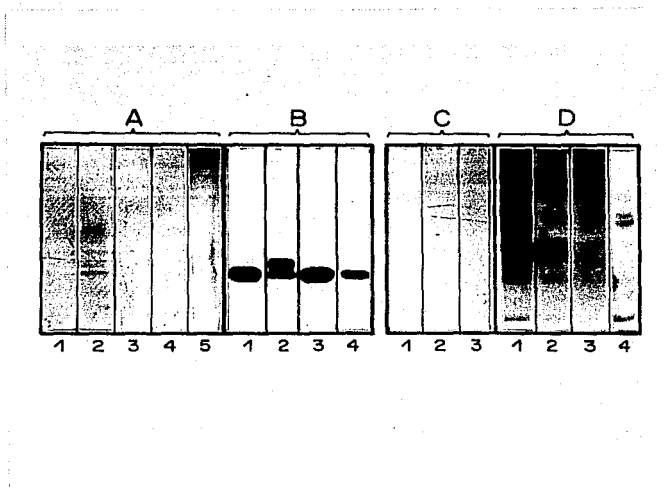


Figura 13. ANALISIS ELECTROFRETICO DE LOS PRODUCTOS DE FOSFORILACION DE LOS ENSAYOS SIN APK Y EN COMPETENCIA CON UN EXCESO DE ATP NO RADIOACTIVO. Paneles A y B: prolactinas (carril 1: cPRL; carril 2: tPRL y G-tPRL; carril 3: rPRL; y carril 4: oPRL). Paneles C y D: hormonas de crecimiento (carril 1: cGH; carril 2: tGH; carril 3: G-cGH; y carril 4: APK sola. En los paneles A y C se muestran los resultados por autorradiografía de ensayos de fosforilación sin la adición de APK. En el paneles B y C se observan los resultados de ensayos de fosforilación donde se pusieron a competir  $\gamma^{32}$ ATP y ATP no radiactivo (Panel B: 1:100; en el panel D: 1:10).



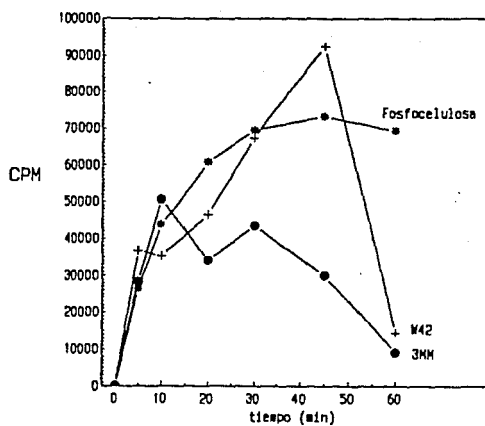


Figura 14. CINÉTICAS DE FOSFORILACION DE LA HISTONA 1. En la gráfica se observan los resultados de probar tres tipos de soporte (papel de fosfoelulosa P81, papel Whatman W42 y papel Whatman 3MM, ver pág. 25).

b) Determinación de la cinética de fosforilación.

En un primer ensayo, con el objeto de optimizar las condiciones experimentales, se empleó la Histona H<sub>1</sub> como sustrato a ser fosforilado, se probaron distintos papeles, para servir como soporte en la precipitación de la proteína fosforilada. Como se muestra en la Figura 14, al aumentar el tiempo de incubación, cuando se empleó el papel de fosfocelulosa P81, la cinética de fosforilación de la histona H<sub>1</sub> fue más regular, y coherente con un aumento continuo y gradual de la proteína marcada. En los otros casos, las curvas presentaron cambios bruscos e inconstantes entre un tiempo y otro. Por este análisis decidimos trabajar con la fosfocelulosa P81, como soporte para retener a las hormonas fosforiladas precipitadas con TCA.

En las figuras 15 y 16 observamos las cinéticas de fosforilación de las GHs y PRLs, respectivamente. Es importante señalar que estos ensayos de fosforilación se llevaron a cabo al poner a competir ATP radiactivo con un exceso de ATP no radiactivo. Para cada cinética se muestra el promedio de tres ensayos independientes. La desviación estándar promedio de las cinéticas fue: cGH= 1200; tGH= 3800; cPRL= 900; tPRL= 2100 y rPRL= 7200. Como se observa en ambas figuras, la incorporación de fosfato radiactivo aumenta de una manera claramente dependiente del tiempo de incubación. Después de 30 a 40 min de incubación, la incorporación de marca radiactiva alcanza un nivel máximo, lo que sugiere la saturación de los sitios de fosforilación. Como se observó en la Figura 13, aquí también se obtuvo una mayor incorporación de fosfato radiactivo en las PRLs que en las GHs, lo cual nos habla de la mayor capacidad de la APK para fosforilar a las primeras con respecto a las segundas. Así entonces, estos resultados muestran que la fosforilación de las hormonas es un proceso altamente específico, donde el fosfato radiactivo y no radiactivo compitieron por un número finito de los mismos sitios de fosforilación.

c) Determinación analítica de fosfato esterificado a las hormonas.

Como una prueba de que la fosforilación de las hormonas (GHs y PRLs) es un proceso de transformación que ocurre en la hipófisis de manera real, se determinó el contenido de fosfato esterificado a las correspondientes proteínas. Los resultados de este estudio los vemos en la tabla IV. Tanto las preparaciones puras de PRL como de GH tuvieron una cierta cantidad de fosfato, que aquí se comparan tomando en cuenta la relación molar de fosfato esterificado con respecto al número de moles de proteína. En este análisis se observa que la  $\alpha$ -caseína presenta una cantidad muy

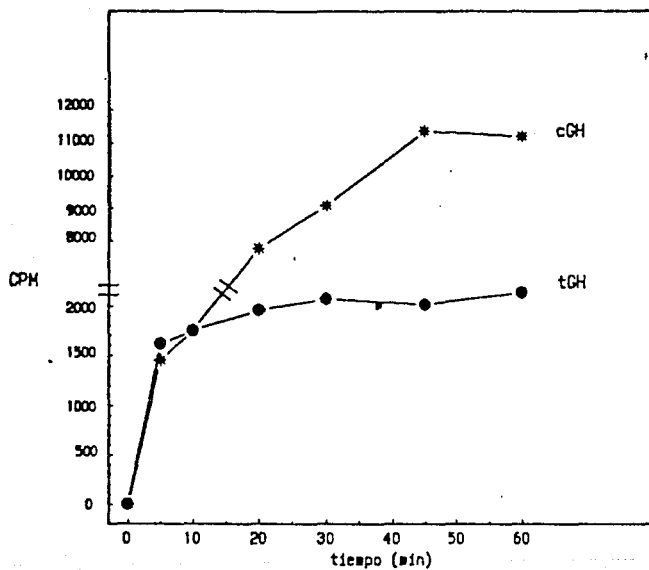


Figura 15. CINETICA DE FOSFORILACION IN VITRO DE LAS GHs (cGH, tGH y oGH). Cada punto representa el promedio de tres ensayos independientes.

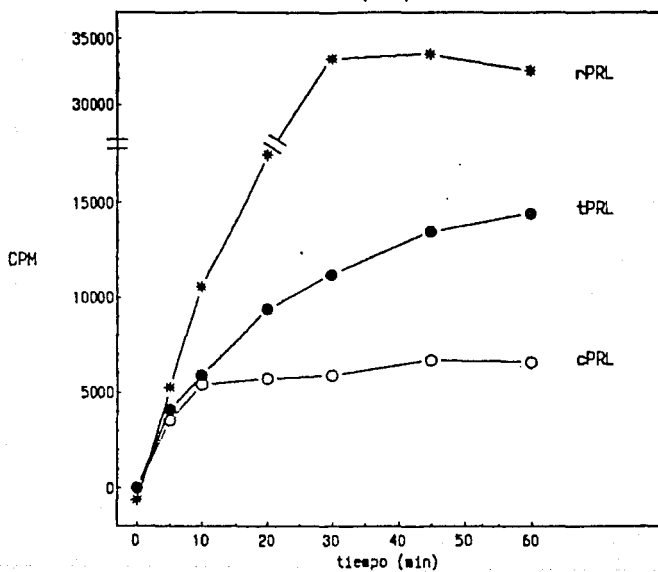


Figura 16. CINETICA DE FOSFORILACION *IN VITRO* DE LAS PRLs (cPRL, tPRL y rPRL). Cada punto representa el promedio de tres ensayos independientes.

TABLA IV  
CONTENIDO DE FOSFATO EN GH Y PRL.

Muestra	Contenido de fosfato nmolPO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /nmol proteína (x ± SEM)
oGH	0.39 ± 0.03 (n=8)
cGH	0.44 - 0.54 *
oPRL	0.24 ± 0.02 (n=8)
rPRL	0.16 - 0.25 *
tPRL	0.63 - 0.74 *
α-caseína	5.01 ± 0.23 (n=12)

\* Determinaciones por duplicado.

alta de fosfato esterificado (5.01 nmol/nmol de proteína) y semejante al contenido ya mostrados (Arámburo et al., 1989a), y es por esto que se utilizó como el testigo positivo y patrón de comparación para las hormonas hipofisarias ensayadas. Entre las hormonas probadas, la tPRL presentó la mayor cantidad de fosfato esterificado (0.68 nmol/nmol de proteína), seguido por la cGH (0.48 nmol/nmol) y la oGH (0.39 nmol/nmol). Cantidades menores tuvieron las oPRL (0.24 nmol/nmol) y rPRL (0.21 nmol/nmol). Los anteriores resultados apoyan nuestra hipótesis de que las hormonas GH y PRL son transformadas por fosforilación de manera natural.

### C. AISLAMIENTO DE LAS VARIANTES MOLECULARES DE LA cGH.

#### C.1. Electroelución.

Por este protocolo se consiguió aislar a tres variantes de carga de la cGH con Rf's de 0.23, 0.30 y 0.35 separadas por ND-PAGE (Arámburo et al., 1989a; ibid, 1990a). En cada gel se cargó entre 80 y 100 µg de cGH total. La eficiencia de las condiciones de electroelución fue evaluada por medio de la cantidad final de proteína recuperada.

Con el empleo de la cámara ISCO y un sistema de amortiguadores (Tris-acetatos 40 y 400 mM) con pH 9.1, se consiguió recuperar entre 40-50% de la proteína inicialmente aplicada a los geles. Al emplear el sistema de electroelución miniProtean, y con un amortiguador semejante (Tris/acetatos 50 mM, pH 9.1) se recuperó aproximadamente el 50%. Con el empleo de un amortiguador más alcalino (bicarbonato de amonio 50 mM, pH 9.5), se obtuvo una mayor recuperación (50-60%).

Finalmente, para la electroelución, se probaron condiciones ácidas (acetatos 50 mM, pH 4.5). Durante estos ensayos acontecieron algunos problemas técnicos, posiblemente causados por el uso de un amortiguador muy volátil, lo que explica que la recuperación resultó muy baja (20-30%). En la tabla VI se resumen los porcentajes de recuperación obtenidos por las diferentes condiciones de electroelución.

## C.2. Despolimerización de geles.

Con la finalidad de incrementar el porcentaje de proteína aislada y extraída de los geles de ND-PAGE, se probaron varias condiciones de despolimerización de geles. En un inicio, se probaron tres tipos de entrecruzadores (BAC, DHEBA y DATD) para sustituir a la BIS-acrilamida en la elaboración de los geles.

Con el BAC se elaboraron geles totalmente transparentes, mecánicamente resistentes y con un comportamiento adecuado para el enfoque de las bandas de proteína. La despolimerización fue rápida (<30 min) y se emplearon condiciones no demasiado drásticas (aprox. 4% de  $\beta$ -mercaptoetanol durante 30 min a temperatura ambiente para despolimerizar). Con los entrecruzadores DHEBA y DATD se obtuvieron geles con características muy semejantes: transparentes, resistentes, adecuados para el enfoque de la proteína. Sin embargo, la despolimerización de estos últimos fue más lenta (toda la noche) y algo más drástica (solución de ácido peródico al 5%). Por estos resultados, elegimos al BAC como el más propicio para el intento de aislar las variantes hormonales.

Una vez despolimerizado el gel que contenía la proteína fue necesario limpiar a ésta última de los contaminantes: poli(acrilamida) y  $\beta$ -mercaptoetanol, para lo cual se probaron distintas técnicas:

I. Se intentó eliminar las hebras de poli(acrilamida) filtrando el gel despolimerizado a través de filtros de 0.45  $\mu$ m (Millipore); este procedimiento no fue efectivo porque se obliteraron los filtros.

II. Se pretendió aislar la proteína por cromatografía de exclusión molecular (sefadex G-150). Durante la cromatografía, el lecho se alteró y se bloqueó el flujo por la columna.

III. Finalmente, se intentó eliminar inicialmente el  $\beta$ -mercaptoetanol por diálisis, y se concentró la solución de proteína por liofilización. Se observó que una cantidad importante de las hebras de poliacrilamida coalescía, lo cual permitía su eliminación. De esta manera, se recuperó una preparación de proteína donde se podía llevar a cabo la determinación de proteína y el análisis electroforético.

Empleando geles con BAC como entrecruzador, y siguiendo el último protocolo en la separación de los contaminantes de la despolimerización, se consiguió aislar a dos variantes de carga de la cGH (Rf= 0.23 y 0.30). Se aplicó a cada gel 80 a 100  $\mu$ g de hormona y se recuperó aproximadamente un 30% de la proteína inicial (véase tabla VI).

### C.3. Isoelectrofoque preparativo.

En los ensayos preliminares, utilizando la cGH como material de ensayo se optimizaron las condiciones de la técnica. En dos ocasiones posteriores se empleó esta técnica para la separación de las variantes de carga de la cGH (fracción BDE-1). En la figura 17 se observa el gradiente de pH (porción superior de la figura) del soporte del IEFp. Como se observa, en la región catódica, se presenta una región más lineal, y es ahí donde se separan las variantes de la hormona. En la porción inferior de la figura se muestra la representación esquemática de las tiras de papel que señalan la separación de proteína. La muestra de proteína se aplicó aproximadamente a la mitad de la longitud del soporte, y se observó una clara migración diferencial de las variantes hormonales: desde proteínas más bien ácidas (11-14 cm) a variantes alcalinas (1.7 - 3 cm).

Para eliminar las anfolinas de las fracciones de proteína recién recuperadas se intentaron varios métodos:

I. Con la cromatografía en sefadex G-10 prácticamente no se consiguió remover a las anfolinas.

II. Con la electroelución no se descartó la porción de anfolinas.

III. Con precipitación con sulfato de amonio se pudo eliminar en casi todas las fracciones a las anfolinas presentes. Sin embargo, en el proceso se perdió una cantidad importante de la proteína. A pesar de la pérdida

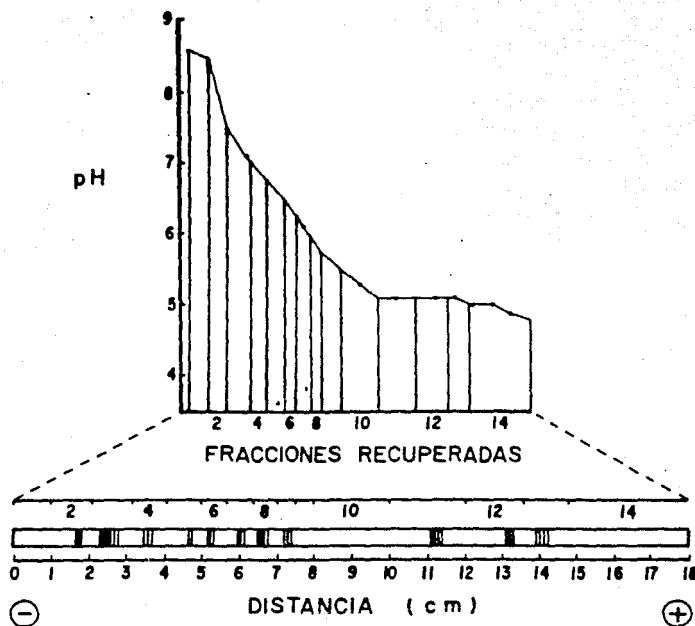


Figura 17. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL GRADIENTE DE pH (arriba) Y SEPARACION DE VARIANTES DE LA cGH (abajo), POR ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO. El gradiente de pH se determinó directamente en el soporte del IEFp, con un electrodo de superficie. Abajo, se muestran las variantes aisladas, su localización con respecto al gradiente de pH y la manera en que se recuperaron las fracciones del soporte.



de proteína, se empleó este último protocolo para limpiar las fracciones que contenían a las variantes de la cGH y poder analizarlas electroforéticamente. En estos últimos ensayos, con las fracciones 2 (pH entre 7.5 y 8.3), 3 (pH entre 7 y 7.5), 6 (pH entre 6.1 y 6.3), 7 (pH entre 5.9 y 6.1) y 8 (pH entre 5.8 y 5.9), se recuperó aproximadamente 30 a 40 % (véase tabla VI) de la proteína inicialmente aplicada al sistema de purificación.

Por el análisis en IEF e IET (resultados no mostrados) se comprobó que la proteína recuperada era cGH (inmunorreactiva al anticuerpo específico para la hormona). En el mismo análisis se obtuvo un patrón de variación de carga (fracciones 2, 3, 6-8) complejo. Aunque entre las diferentes fracciones existen diferencias en la concentración de proteína, y en la proporción de algunas bandas, los resultados son semejantes al patrón de heterogeneidad de carga de la cGH total (véase figura 4).

#### C.4. Cromatofluore.

En la figura 18 se muestra el cromatograma de la separación de las variantes de carga de la oGH por cromatofluore. En esta figura se observan los picos de proteína (determinación de proteína por la reacción de Bradford) de las diferentes fracciones de la cromatografía; así se puede observar que varios picos de proteína se separan claramente. De cinco de estas fracciones - A, B, C, E y F- ( $pI$ s= 8.08, 7.82, 7.56, 7.28 y 7.05), que representaban la mayor cantidad de la proteína, se recuperó la hormona para su análisis electroforético, por precipitación con sulfato de amonio al 100% de saturación.

En la figura 19 se observa el análisis por SDS-PAGE e IET de las fracciones del cromatofluore (carriles 5-9). En la misma figura, se presenta el patrón electroforético del extracto hipofisario de pollo, la cGH pura y oGH (carriles 2, 3 y 4). La forma mayoritaria de la oGH (23 kDa) se encontró en todas las fracciones, el fragmento de 15-16 kDa y el dímero de 45 kDa se observaron en las fracciones A-C y E, variantes entre 35-40 kDa se observaron en las fracciones B y C, variantes mayores de 50-60 kDa se observaron en las fracciones B, C y E, y variantes de PM menor a 14.4 kDa se hicieron evidentes en las fracciones B y C.

En la figura 20 y en la tabla V se muestran los resultados del análisis por IEF e IET de las fracciones A-C (carriles 2-4, respectivamente), en el carril 1 se observa la variación de carga de la cGH pura (fracción BDE-1).

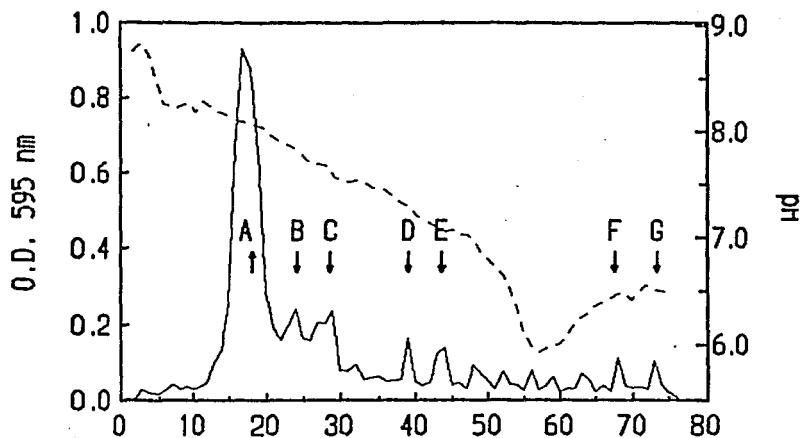


Figura 18. SEPARACION DE LAS VARIANTES DE CARGA DE LA  $\alpha$ GH MEDIANTE CROMATOENFOQUE. Columna k9/30 (9 x 260 mm); elución Polibuffer 96, pH 6.0; flujo: 25 ml/h; volumen de cada fracción: 3 ml.

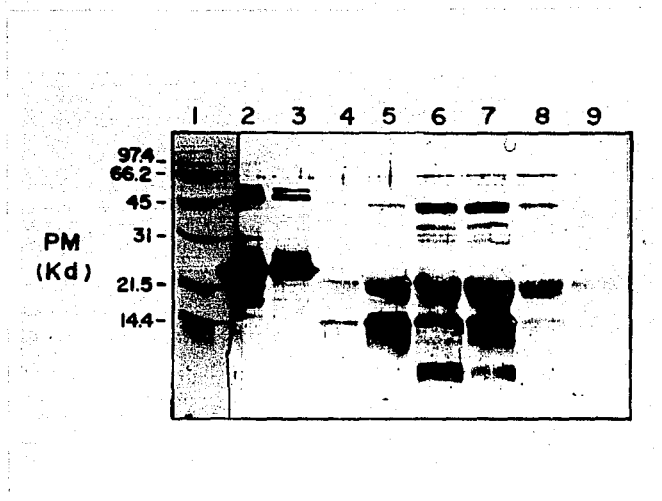
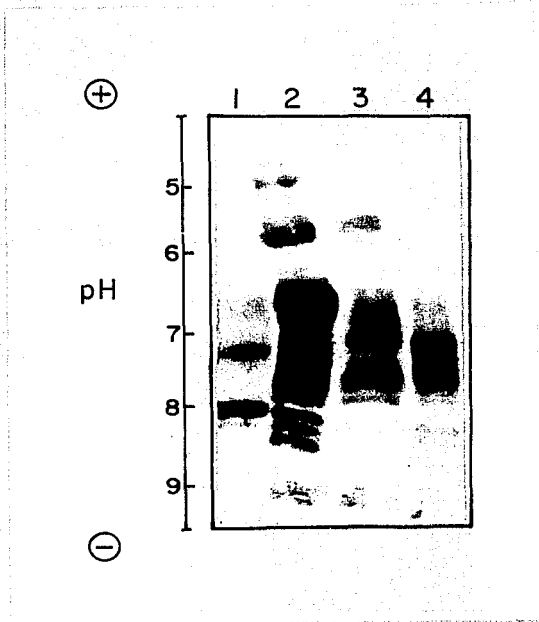


Figura 19. ANALISIS ELECTROFORETICO (SDS-PAGE) DE LAS FRACCIONES DE oGH, SEPARADAS POR CROMATOENFOQUE. Las bandas de proteína se inmunotificaron con anticuerpo específico. Carril 1: marcadores de PM (tinción con negro anido); carril 2: oGH pura (fracción BDE-1); carril 3: oGH recombinante; carril 4: oGH pura (NIH); carriles 5-9: fracciones del cromatoenfoque A-C, E y F, respectivamente.



**Figura 20. ANALISIS POR ISOELECTROENFOQUE (IEF) DE LAS FRACCIONES DE  $\alpha$ GH, SEPARADAS POR CROMATOENFOQUE. Carril 1:  $\alpha$ GH pura (fracción BDE-1); carril 2-4: fracciones A-C. El pH se determinó por la distribución de los marcadores de pI (BioRad), y directamente por un electrodo de superficie.**

**TABLA V**  
**VARIANTES DE CARGA PRESENTES EN LAS FRACCIONES**  
**OBTENIDAS POR**  
**CROMATOENFOQUE PREPARATIVO,.**

FRACCIONES	A	B	C
pI	<5.0	-	-
	5.0	-	-
	5.2	-	-
	5.8	5.8	-
	6.5-6.8	6.7-6.9	6.8-6.8
	7.0	7.0	7.0
	-	-	7.2
	7.5-7.8	7.5	7.5-7.8
	-	7.7-7.8	-
	8.0	8.0	8.0
	8.2	-	8.2
	8.4	-	8.4

Finalmente, a manera de recopilación, en la tabla VI se presentan los resultados en la recuperación de proteína obtenida por los diferentes métodos de aislamiento de variantes de la cGH.

TABLA VI

RECUPERACION DE PROTEINA POR LAS TECNICAS  
DE AISLAMIENTO DE VARIANTES DE LA cGH.

<u>Sistemas de Purificación</u>	<u>Amortiguador</u>	<u>Recuperación (%)</u>
<b>ELECTROELUCIÓN</b>		
cámara ISCO	Tris-acetatos 40 y 400 mM, pH 9.1	40-50
miniProtean	Tris-acetatos 40 y 400 mM, pH 9.1	50
miniProtean	bicarbonato de amonio 50 mM, pH 9.5	50-60
miniProtean	acetatos 50 mM, pH 4.5	20-30
<b>GELES DESPOLIMERIZABLES</b>		
		30
<b>IEFP</b>		
		30 a 40
<b>CROMATOENFOQUE</b>		
		40

## DISCUSION

A partir de 1986 (Carranza y Arámburo, 1986) se demostró la existencia de variantes moleculares en preparaciones de cGH pura (Arámburo et al., 1986; ibid. 1989) y la presencia de variantes de la hormona en la hipófisis de pollo (Arámburo et al., 1990a). En ese tiempo ya era conocido que la cGH tenía efectos fisiológicos tan diversos como los reportados para las GHs de mamíferos. Estos hechos apoyaban la hipótesis de que las variantes de la cGH podrían explicar su complejo patrón funcional. Las primeras evidencias claras que correlacionaban la heterogeneidad de la cGH y su multifuncionalidad fueron obtenidas por nuestro grupo de trabajo. En dichos experimentos se consiguió obtener preparaciones enriquecidas en las variantes con  $Rf = 0.23$  y  $0.30$  (sistema de ND-PAGE), las cuales se probaron en dos bioensayos homólogos (estimulación de la lipólisis e inhibición de la lipólisis inducida por glucagon). Los efectos de las variantes fueron diferentes: la 0.23 estimuló la lipólisis mientras que la 0.30 inhibió la acción lipolítica del glucagon (Arámburo et al., 1990a). Otro hallazgo que apoya esta hipótesis fue la demostración de que algunas variantes de carga aparecen en etapas particulares del desarrollo ontogénico (Houston y Goddard 1988).

En este trabajo, los objetivos centrales fueron la demostración de que la heterogeneidad molecular de la cGH es un hecho real (presente en la hipófisis y en la circulación) y que la modificación de la hormona por fosforilación tiene el potencial de explicar parcialmente la heterogeneidad de carga de esta proteína. Finalmente, la tercera parte de este trabajo constituyó el ensayo y desarrollo de diferentes protocolos metodológicos para poder separar a las variantes de la cGH.

### A. HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA cGH CIRCULANTE.

La cromatografía de inmovilización, empleando MABs  $\alpha$ -cGH, constituyó un método práctico y reproducible en los 8 ensayos de aislamiento efectuados. La gran ventaja de esta técnica es que en un sólo paso se consiguió aislar una fracción muy enriquecida en la hormona circulante. Con ayuda de esta herramienta técnica sería posible determinar analíticamente la aparición de las variantes hormonales durante el desarrollo del organismo.

La hormona así obtenida se analizó por diversos sistemas electroforéticos y de inmunorreactividad, comparándola además con la cGH obtenida a partir de la glándula hipofisiaria, lo cual nos demostró que la proteína eluída en las fracciones E y R realmente era cGH. Aunque los lotes de suero empleados derivan de una mezcla de sangre de 40 pollos, de la misma edad y raza, y que se sacrificaron al mismo tiempo, al no determinar la concentración de hormona no se pudo asegurar que la cantidad de ésta fuera la misma en todos los lotes. Otro aspecto que sin duda influyó en la cantidad de cGH circulante recuperada fue la pérdida de capacidad de la columna de inmunoadinidad conforme se emplea en más ocasiones. Una indicación de este hecho es que el MAb  $\alpha$ -cGH comienza a desprenderse del soporte de sefarsa cuando ésta ha sido usada varias veces y durante mucho tiempo.

Por otro lado, para poder demostrar la existencia de la variante glicosilada de la cGH en la circulación, fue necesario pasar la fracción hormonal aislada a partir del suero por una columna de concanavalina A-sefarsa. Gracias a este paso de aislamiento, se localizó una proteína con las características electroforéticas (29 kDa) y de afinidad (reactiva a la inmuntinción con el anticuerpo policlonal y a la tinción con concanavalina A-peroxidasa) observadas en la G-cGH hipofisiaria (Berghman et al., 1987; Arámburo et al., 1991a). Basados en las condiciones técnicas empleadas para el aislamiento de la G-cGH, parecería que esta variante se encuentra en proporción muy baja en la circulación. Sin embargo, es necesario obtener mayores datos para poder indicar qué porcentaje de G-cGH, se encuentra en la circulación.

En estudios anteriores se mostró que el anticuerpo policlonal era muy específico para la cGH, tanto en RIA (Arámburo et al., 1989b) como en inmunoelectrotransferencia (Arámburo et al., 1990a). En ensayos ulteriores, se observó que el MAb  $\alpha$ -cGH y el anticuerpo policlonal reconocen a las mismas variantes hipofisiarias de la cGH, aunque el MAb  $\alpha$ -cGH parece ser menos reactivo a los oligómeros de la hormona (datos no mostrados). Estos antecedentes nos daban la seguridad de que se aislaron la mayoría de las variantes moleculares de la cGH circulante, y de que las bandas inmunorreactivas con el anticuerpo policlonal eran en realidad variantes de la cGH.

En las tablas II y III se comparan las variantes inmunorreactivas de la cGH localizadas en la hipófisis y en el suero, cada cuadro está basado en un tipo de análisis electroforético particular, así la tabla III, donde se observan las variantes de



masa, se empleó técnica de SDS-PAGE (véase figuras 6 y 10). Para la tabla II, en donde se comparan las variantes de carga de la hipófisis y de la circulación, se empleó el método de IEF, que nos permitió determinar con cierta exactitud los pIs de las variantes hormonales.

Cuando se compara la heterogeneidad molecular de la cGH observada en la hipófisis y la encontrada en el suero se observan gran cantidad de semejanzas. En la variación de masa, en condiciones reductoras, se observó paralelismo en el 78% de los casos. Para las condiciones no reductoras, la coincidencia fue del 83%. En la comparación de la heterogeneidad de carga se observó que el 80% de las variantes mayoritaria tuvieron su contraparte en el suero.

Por otro lado, en este estudio también se demostró la presencia de una variante glicosilada de la cGH, con características electroforéticas y de reactividad a concanavalina A similares a las formas ya antes mostradas en la hipófisis (Berghman et al., 1987; Arámburo et al., 1991). En este estudio, se comprobó que la variante glicosilada también está presente en los extractos hipofisarios, pero no en la preparación pura de la cGH. La ausencia de la variante glicosilada en la preparación pura de la hormona (fracción BDE-1) es coherente con estudios anteriores (Arámburo et al., 1991), en donde se demostró que era necesario desarrollar una técnica particular para aislar la G-cGH, pues durante la purificación convencional de cGH hipofisaria, esta variante permaneció en fracciones alternativas.

Los resultados anteriores apoyan la idea de que la cGH es transformada inicialmente en la glándula hipofisaria. Sin embargo, las variantes no sólo permanecen en la hipófisis sino que son secretadas a la circulación, de ahí que podamos encontrar en el suero isoformas semejantes a las encontradas en la glándula. La idea de que las variantes son secretadas es clave en estos estudios, ya que constituye otra evidencia de peso para sugerir que la heterogeneidad de la hormona no es un hecho fortuito, sino que tiene repercusión en la fisiología de la hormona. (Montiel et al., 1992)

En el estudio electroforético de la variante glicosilada, también se observó la presencia de algunas proteínas de alto PM (55-66 y 66-85 kDa). Como se observa en el análisis de inmunoreactividad, estas proteínas son teñidas débilmente por el anticuerpo policlonal  $\alpha$ -cGH, pero son muy reactivas a la tinción con la concanavalina A. Esto nos indica que estas proteínas contienen una proporción grande de carbohidratos, y menor inmunoreactividad con el anticuerpo policlonal. Por análisis ulteriores (datos no presentados) se mostró que las proteínas con PM de 55-60 kDa constituyen contaminación de los MAb  $\alpha$ -cGH, que se soltaron de la

columna. La(s) proteína(s) de 85-66 kDa, parece tener un origen distinto, pues presentó características electroforéticas diferentes a las cadenas pesadas del MAb, aunque su presencia fue una constante en la purificación de cGH a partir de suero. Una posible explicación de su presencia en la fracción glicoproteínica es de que se trate(n) de agregados de la propia variante glicosilada. Alternativamente, en publicaciones anteriores, se ha reconocido la existencia de una amplia diversidad de proteínas de unión a la GH y se ha demostrado que los anticuerpos  $\alpha$ -GH humana son capaces de reconocer a la hGH cuando se encuentra formando un complejo con GHBP (Baumann, G. 1991). Más recientemente, se demostró la presencia de este tipo de proteínas de unión a la cGH (Jones, D.L. et al., 1990). Este hecho nos permite sugerir que la(s) proteína(s) de 66-85 kDa podrían ser un complejo de hormona-proteína de unión. Esto explicaría porqué proteínas tan poco inmunorreactivas al anticuerpo  $\alpha$ -cGH fueron adsorbidas a la columna de inmunoadfinidad.

La posibilidad de que nuestros resultados sean consecuencia de artificios de las técnicas de purificación y análisis es muy baja. El gran poder de la cromatografía de inmunoadfinidad permitió reducir el aislamiento de la cGH sérica a un solo paso, con lo que se reduce notablemente el manejo y las posibilidades de modificar artificialmente a la hormona. Además, la gran semejanza en la heterogeneidad de la hormona en hipófisis y en suero, es contraria a la idea de haber generado variantes artificiales. Aunque no se emplearon los mismos individuos para obtener el suero y las hipófisis, los pollos fueron de la misma raza, edad y crecidos en la misma granja avícola, además los resultados obtenidos son tan claros y constantes que excluye la posibilidad de que se trate de características particulares de cada organismo.

Tomados en conjunto los presentes resultados muestran que la cGH es una hormona con gran heterogeneidad molecular (variantes de masa y carga), presente tanto en la hipófisis como en la circulación sanguínea. Asimismo se mostró que la cGH es sujeto a ser modificada mediante glicosilación y fosforilación, mecanismos los cuales podrían explicar parcialmente su heterogeneidad característica. Con anterioridad, se demostró que la cGH tiene provoca efectos en bioensayos tanto heterólogos como homólogos (Arámburo et al., 1989a). Así también se observó que variantes de carga de la hormona, separadas por ND-PAGE, inducen efectos distintos al ser provadas en bioensayos homólogos (Arámburo et al., 1990a). Estas evidencias nos permiten sugerir que la heterogeneidad molecular de la cGH podría explicar, al menos en parte, la diversidad funcional de la hormona. En contraposición a esta hipótesis, el grupo de Houston (1990) mostró que la variante

principal (más abundante) de la hormona presenta todas las bioactividades por ellos probadas, lo cual, consideran los autores, son pruebas de que la heterogeneidad molecular es un fenómeno sin repercusión fisiológica. Como se mostró en el presente trabajo, la gran semejanza entre las variantes hipofisarias y las existentes en la circulación, permite sugerir que las isoformas de la hormona tienen el potencial de interaccionar con los diferentes órganos blanco e inducir efectos fisiológicos.

Con anterioridad se reportó la presencia de variantes de la GH en la circulación en diferentes especies (Chawla et al., 1983; Stolar y Baumann 1984); en las aves, sin embargo, no se había mostrado de manera analítica la posible correlación entre la hormona hipofisaria y la circulante. Los resultados de este trabajo refuerzan la idea, entonces ya considerada, de que las variantes de la GH son secretadas a la circulación. La secreción de variantes de la hormona se ve apoyada por la demostración de que las variantes de carga y masa de la GH son secretadas al medio en cultivos de células hipofisarias (Talamanca et al., 1981; Yokoya y Friesen, 1986). En un estudio reciente (Pellegrini et al., 1990) se demostró que la secreción de la PRL de rata sigue una ruta diferente dependiendo de si ésta está o no glicosilada. Esta evidencia nos llama la atención sobre la importancia que las modificaciones hormonales pueden tener sobre el proceso de secreción.

## B. Fosforilación de las GHs y PRLs.

A pesar de que la fosforilación de proteínas constituye uno de los mecanismos más utilizados para regular sus funciones (Taylor et al., 1990), poco se conoce sobre la repercusión funcional de la incorporación de fosfato a una hormona. Desde el punto de vista estructural, la adición de fosfato aporta cargas negativas en sitios muy localizados de la proteína. Este aumento de la carga negativa será más o menos importante dependiendo del tamaño y la composición de la molécula sujeta a transformación. Sin embargo, la fosforilación de un sitio de la proteína posiblemente provocaría un rearrreglo conformacional de los grupos cercanos. Quizás vistos de manera global, los cambios sean mínimos, pero si consideramos que los sitios modificados por la incorporación de fosfato podrían afectar las regiones de unión a receptores, o que en estas áreas tiene lugar un tipo de transformación de mayor repercusión (por ejemplo, procesamiento proteolítico), la consecuencia funcional de la fosforilación sería trascendental.

En extractos completos de hipófisis se había observado que tanto la GH como la PRL eran fosforilados (Brattin y Portanova, 1981) y que la proteína tirosin-cinasa era capaz de fosforilar a la GH de rata (Baldwin et al., 1983). Posteriormente, se demostró que la cGH contenía fosfato esterificado en su estructura proteínica (Liberti et al., 1985) y, en cultivo de células, que GH de rata fosforilada era secretada al medio de cultivo (Liberti et al., 1986). Más recientemente se ha demostrado, en la GH de salmón, que el contenido de fosfato está relacionado con su heterogeneidad de carga, ya que el tratamiento de esta hormona con fosfatasa alcalina parece eliminar la mayoría de las variantes de carga. (Skibelli et al., 1990) En estudios realizados con la rPRL, se demostró que las dos variantes más ácidas, del grupo de tres visualizado por su sistema de electroforesis bidimensional, eran consecuencia del grado de fosforilación; esto es, mientras tuviera mayor incorporación de fosfato mayor sería el desplazamiento electroforético hacia el ánodo (Oetting et al., 1986).

En la hipófisis de aves, se ha mostrado la presencia de GH con una amplia heterogeneidad de masa y carga (Houston y Goddard, 1988; Arámburo et al., 1989a; ibid, 1990a). Empleando sistemas de electroforesis no desnaturizante (ND-PAGE), isoelectroenfoque y electroforesis bidimensionales se ha observado la presencia de formas variantes de pI más ácido que la forma principal. En nuestro análisis por IEF describimos 8 isoformas inmunorreactivas, mientras Houston B. y cols. (1988) describieron 10 variantes de carga. Por la técnica de electroforesis bidimensional también se observó la presencia de 6-8 variantes de carga con el mismo PM. En pocas palabras, una proporción importante de la heterogeneidad de la cGH presenta pequeños cambios en la carga de la molécula. En otros estudios se demostró que la preparación pura de cGH nativa presentaba fosfato esterificado (Arámburo et al., 1989a). Este hecho constituye la primera evidencia de que la fosforilación de esta hormona podría ser un fenómeno real. Con los primeros ensayos de fosforilación *in vitro* para la cGH, mostramos que la hormona podía ser fosforilada por la proteína cinasa dependiente de AMPc (Arámburo et al., 1990b). Sin embargo, en esa ocasión no se pudo avanzar más en el análisis de la fosforilación de la hormona.

Retomando los anteriores resultados, en el presente trabajo se intentó demostrar que la fosforilación *in vitro* de la cGH es un proceso específico, que se presenta en las hormonas nativas, y que en consecuencia constituiría un agente potencial de generación de variantes de carga de la hormona.

En la primera parte del estudio de fosforilación se demostró que la cGH, al ser incubada con el  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP y con la subunidad catalítica de la APK, es capaz de ser fosforilada. Esto ocurrió en dos tipos diferentes de experimentos: a) empleando únicamente ATP radiactivo y b) en presencia de un exceso de ATP no radiactivo. El que la hormona haya incorporado el fosfato radiactivo en este segundo experimento, es indicativo de que la hormona tiene una alta capacidad de ser fosforilada, ya que con el exceso de ATP no radiactivo, la probabilidad de incorporación inespecífica del ATP marcado era bastante menor. La disminución en la autofosforilación de las moléculas de la preparación enzimática son una clara evidencia de la competencia del ATP marcado con el ATP no radiactivo. Esta competencia demuestra que los sitios de fosforilación son regiones discretas y se encuentran en número reducido. Para demostrar la especificidad de este proceso de transformación fue de gran importancia la realización de los experimentos testigo incubando a la hormona, con el  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, pero sin la enzima APK; en estos casos la incorporación de la marca radiactiva fue nula, lo que confirma que la fosforilación de la hormona es un proceso específico de la APK.

Por este estudio de la fosforilación de la cGH se observó que la variante monomérica, variante mayoritaria, es capaz de ser fosforilada por la APK. En estudios preliminares, que tienen como objetivo el aislar a la hormona fosforilada *in vitro*, se observó que la variante de 16 kDa también incorpora el fosfato radiactivo. En experimentos anteriores (Arámburo et al., 1990b), realizados en cultivo de células hipofisiarias se demostró que la variante fosforilada de la cGH es secretada por las células. Sin embargo, contra lo que se esperaba, la hormona marcada y secretada, fue una forma de mayor PM que el de la hormona monomérica. Se propuso entonces que estas variantes fosforiladas podrían corresponder al dímero de la cGH. Sin embargo, aún es incierto el papel que desempeña el fosfato en la estructura de la variante dimérica, aunque es posible pensar que la unión entre los dos monómeros hormonales podría estar dada por un enlace fosfodiéster.

De manera paralela al estudio de la cGH, se probaron otros tipos de hormonas. Como se observa en las figuras 11 y 13, la tGH también es fosforilada de manera específica por la APK y que esta hormona no incorporó el fosfato radiactivo en ausencia de la enzima. Al estudiar las condiciones de fosforilación en la variante glicosilada de la cGH, la incorporación del fosfato radiactivo resultó nula, tanto en los experimentos con un exceso de ATP no radiactivo como en ensayos con ATP radiactivo solo. Esta incapacidad de ser fosforilada por la APK podría deberse a que el grupo de carbohidratos interfiere directa y estéricamente en el sitio o sitios de

fosforilación, o, que ocasiona un cambio conformacional de la hormona que hace poco accesibles los sitios de fosforilación. En los carriles 1 y 2, de ambas figuras, se observa la localización de la banda de las GHs, tanto por tinción con azul de coomassie como por inmunotinción específica. Esto excluye la idea de que las cantidades reales de las diferentes hormonas haya contribuido en las diferencias del grado de fosforilación.

En estudios anteriores se mostró que la rPRL tiene la capacidad de ser fosforilada *in vitro* (Oetting, 1986) y que esto contribuye a su variación de carga. Con el objetivo de demostrar que la fosforilación es factible de producirse en PRLs de otras especies, se incubaron alícuotas de cPRL, tPRL, rPRL y oPRL en las condiciones de ensayo utilizadas para la cGH. En ensayos donde se adicionó sólo ATP radiactivo se obtuvo una importante incorporación de marca radiactiva, aunque se observó también la presencia de bandas marcadas por el fosfato radiactivo en proteínas de la preparación de la propia enzima. En la ausencia de APK no hubo incorporación inespecífica de ATP radiactivo, y ante un exceso de 100 veces de ATP no radiactivo en relación al ATP marcado, se observó una clara fosforilación de la banda de la PRL. Aquí también, en los testigos de proteína total de las hormonas se muestra que en todos los casos se trabajó con cantidades idénticas de las PRLs, por lo que las diferencias en el grado de fosforilación son reales. Si comparamos estos resultados con la fosforilación observada de las GHs, es evidente la mayor capacidad de las PRLs para ser fosforilada por la APK con respecto a las GHs.

Los resultados fueron muy similares tanto en la cPRL como en la rPRL, ya que fueron fosforiladas por la APK y en presencia o no de un exceso de ATP no radiactivo. En su análisis electroforético se observó que la marca radiactiva sólo se incorporó a la variante monomérica mayoritaria (26 kDa). En el caso de la oPRL, la incorporación de fosfato es baja, en comparación a las otras PRLs y sólo se observó la incorporación radioactiva en la variante monomérica. La preparación pura de la tPRL presenta dos bandas de proteína con PM de 26 y 29 kDa. La banda menor correspondiente a la variante monomérica (holoproteína) y la segunda a la variante glicosilada de la hormona. Al analizar los productos de la fosforilación observamos que tanto la variante monomérica como la glicosilada son fosforiladas por la APK. Esto es diferente a lo observado con la variante glicosilada de la cGH que no es fosforilada por la APK. La glicosilación de la tPRL parece no excluir la modificación por fosforilación, esto puede ser explicado si los sitios de glicosilación y fosforilación están alejados entre sí, a diferencia de lo que podría sugerirse para la G-cGH.

Otra forma en que mostramos que la fosforilación de las hormonas es específica fue por las determinaciones de sus cinéticas de fosforilación. En los ensayos con las hormonas cGH, tGH, cPRL, tPRL y rPRL se mostró un incremento en la incorporación de fosfato radiactivo dependiente del tiempo de incubación. Se observa también que el proceso es saturable (30-40 min). Los anteriores resultados indican que la fosforilación de estas hormonas es un proceso específico, saturable, y sujeto a competencia de la actividad enzimática de la APK.

De manera paralela, se determinó el contenido de fosfato esterificado a las preparaciones puras de las hormonas: cGH, oGH, oPRL, rPRL y tPRL. En este experimento, la  $\alpha$ -caseína sirvió como un testigo, y dió un resultado que estuvo acorde a lo observado anteriormente (Arámburo et al., 1989a). Según los resultados obtenidos, la tPRL y la cGH fueron las hormonas con mayor contenido de fosfato esterificado, mientras que las oPRL y rPRL fueron las hormonas con la menor cantidad. Estos resultados nos permiten sugerir que las hormonas nativas son realmente fosforiladas en la glándula hipofisaria.

Otros estudios indicaron que las células hipofisarias de pollo en cultivo primario son capaces de sintetizar y secretar variantes fosforiladas de cGH y cPRL, tanto en condiciones basales como estimuladas por TPA (un éster de forbol) (Arámburo et al., 1992).

Como se describió en los antecedentes, la heterogeneidad de carga de la GH y la PRL ha sido ampliamente caracterizada (Chawla et al., 1983; Paladini et al., 1983; Lewis, 1984). Dicha variación puede resultar de modificaciones postraduccionales tales como: procesamiento proteolítico, acetilación, desamidación, glicosilación y fosforilación (Baumann, 1988; *ibid.*, 1991; Lewis et al., 1984; *ibid.*, 1988). A pesar de que este tipo de estudios se han realizado principalmente en modelos de mamíferos, las modificaciones postraduccionales de estas hormonas pueden ser una característica presente en otros vertebrados, como lo demuestra el presente trabajo. En la cGH se ha observado heterogeneidad de carga, teniendo algunas variantes pl ácidos, empleando sistemas de electroforesis no desnaturizante, (ND-PAGE), isoelectroenfoque y electroforesis bidimensionales (Houston y Goddard, 1988; Arámburo et al., 1989a; *ibid.*, 1990a) lo que es coherente con la idea de que pueden tratarse de variantes fosforiladas.

### C. Aislamiento de las variantes moleculares de la cGH.

Debido a que el aislamiento de las variantes de la cGH permitiría estudiar sus repercusiones funcionales, decidimos probar diferentes técnicas preparativas y optimizar las condiciones de aislamiento de las variantes de la cGH.

#### Electroelución a partir de geles nativos de poliacrilamida (ND-PAGE).

Con anterioridad se demostró que este método de aislamiento de variantes es práctico para la separación de las variantes de carga de la cGH (Arámburo et al., 1989a), ya que se consiguió el aislamiento de las variantes con Rf 0.23 y 0.30, material que fue probado en los ensayos lipolítico (Arámburo, C. et al., 1989c) y de inhibición de la lipólisis producida por glucagon, lo cual permitió demostrar que en este par de bioensayos las dos variantes se comportaban de manera diferente (Arámburo et al., 1990a). La desventaja de esta técnica era su bajo porcentaje de recuperación (30%).

A causa del bajo rendimiento, se probaron nuevas condiciones de electroelución. Como se aprecia en la tabla VI, las condiciones alcalinas resultaron mejores para la recuperación de la proteína contenida en los geles, mientras que el tipo de amortiguador utilizado no parece tener una gran repercusión. Sin embargo, el empleo de un amortiguador volátil (bicarbonato de amonio 50 mM, pH 9.5) hace más práctica la recolección de la proteína, aunque en términos globales, el rendimiento sea semejante al de otras condiciones. El empleo de condiciones ácidas para la electroelución de la proteína estuvo basado en la observación de que la migración de moléculas ácidas era mayor que la realizada por moléculas más alcalinas. Como continuación de esta idea, se esperaba que en las condiciones ácidas, las proteínas retenidas en la matriz del gel migrarían más, y saldrían del gel con mayor facilidad. Al probar estas condiciones tuvieron lugar algunos problemas técnicos, consecuencia del tipo de amortiguador empleado, etc. De esta manera se desechó como método práctico en el aislamiento de las variantes de carga de la cGH.

#### Geles despolimerizables.

Como alternativa al aislamiento de las variantes por electroelución, se implementaron y se evaluaron las condiciones de purificación de las variantes



solo con la despolimerización del gel y la limpieza de los contaminantes de la solubilización (las hebras de poliácridamida y el  $\beta$ -mercaptoetanol) estaríamos en la posibilidad de rescatar una cantidad mayor de las variantes aisladas. Fue necesario descartar los contaminantes de la despolimerización debido a que interferían en la determinación de proteína y el análisis electroforético, principalmente el  $\beta$ -mercaptoetanol.

El protocolo que permitió recuperar una mayor cantidad de la hormona fue la diálisis del  $\beta$ -mercaptoetanol. La solución dializada se liofilizó hasta sequedad; al intentar solubilizar este polvo resultó en la coalescencia de la poliácridamida, lo cual permitió eliminar la poliácridamida y obtener, en consecuencia, una preparación de proteína suficientemente limpia para poder analizar por electroforesis. En un ensayo posterior, se consiguió aislar las variantes de carga con  $R_{fs}$  de 0.23 y 0.30. Sin embargo, los resultados cuantitativos no fueron tan buenos pues se consiguió recuperar sólo el 30 % de la proteína que inicialmente se agregó.

Como se puede observar, tanto por electroelución como por despolimerización de geles es factible obtener las variantes de carga de la cGH separadas por ND-PAGE, sin embargo, aún es necesario el aislamiento con cantidades grandes de proteína. Además, el sistema de ND-PAGE no ofrece la resolución suficiente como para poder separar variantes con pequeñas diferencias de carga. Posiblemente, las variantes aisladas por estas técnicas son en realidad un conjunto de proteínas con pequeñas diferencias entre ellas.

## IEF

En estudios preliminares (Montiel 1989) se consiguió la separación de dos variantes de carga de la cGH con  $pI$ s de 7.5 y 8.05 mediante IEFp. La desventaja de este estudio fue la baja cantidad de proteína recuperada, 20% de la cantidad de proteína inicialmente empleada. A partir de entonces, se fijó como objetivo el optimizar este sistema de purificación de variantes, y así incrementar el porcentaje de proteína aislada.

Durante los ensayos de optimización el problema principal a resolver fue la eliminación de las anfolinas de las fracciones con las variantes hormonales. De manera similar a la interferencia causada por el  $\beta$ -mercaptoetanol en los análisis electroforéticos y de determinación de proteína (véase arriba), las anfolinas impedían una determinación de proteína correcta, e interferían en el enfoque de las bandas al

analizar por electroforesis. Después de ensayar varias técnicas para eliminar las anfolinas, nos proporcionó mejores resultados la precipitación con sulfato de amonio y el empleo de los concentradores MINICON. En el primer caso, se eliminó a las anfolinas de prácticamente todas las fracciones con proteína; sin embargo, durante este tratamiento se perdió una gran cantidad de la proteína separada por el IEF, consecuencia de ello fue que se consiguiera obtener sólo el 30-40% de la cGH que se añadió en un principio. El empleo de los concentradores MINICON se llevó a cabo con una mezcla artificial de anfolinas y albúmina sérica bovina; aunque los resultados fueron muy aceptables, aún no sabemos como se comportará con una fracción real del IEF preparativo. Por otro lado, la ventaja de este método preparativo fue su gran resolución, como se observa al poder separar variantes con diferencias de carga de décimas de unidad de pH.

Al analizar por IEF analítico las fracciones obtenidas por IEFp, y así comprobar la pureza de las variantes aisladas, se obtuvieron resultados de difícil interpretación. Se observó que las fracciones proteínicas eran aún heterogéneas, esto es, en lugar de observar una sola banda se encontró un grupo de bandas inmunorreactivas a la inmunotinción con anticuerpo policlonal (datos no mostrados). Como se ha visto en los análisis de la heterogeneidad de la cGH en el suero, la inmunotinción es un método específico para identificar las variantes de la hormona. Este análisis sólo fue posible realizarlo con las fracciones con mayor cantidad de proteína, por lo que no se sabe como se comportan otras fracciones del IEFp. Es cierto, también, que se observaron algunas diferencias en las proporciones de las variantes de carga, aunque éstas variaciones no fueron totalmente claras. Una explicación a este fenómeno sería la existencia de un nivel superior de estructuración o estabilización de las moléculas de la hormona, donde éste último nivel podría ser consecuencia de las condiciones de solubilización de la cGH. Así entonces, al añadir la hormona al soporte del IEFp, realmente añadimos "agregados" o complejos estabilizados de la cGH que tendrían características de carga propias. El resultado final sería la separación de estos complejos hormonales por sus diferencias de carga, pero sin separar las variantes reales de la hormona. Al final, en el análisis por IEF analítico de las fracciones recuperadas, se conseguiría deshacer estos complejos y las variantes hormonales verdaderas serían observables.

Este método de aislamiento de variantes de carga puede ser importante para la separación de variantes, sin embargo primero será necesario resolver la paradójica heterogeneidad molecular de las preparaciones de variantes aisladas.

### Cromatofluoreo.

El cromatofluoreo constituye un sistema preparativo reciente con un gran poder de resolución, característica que nos era indispensable para conseguir el aislamiento de las variantes de la cGH. Asimismo, las condiciones de recuperación de las fracciones proteínicas son bastante más sencillas que las empleadas en el IEF preparativo. Estas razones nos impulsaron a probar este sistema de aislamiento de las variantes hormonales.

El primer contratiempo de esta técnica fue la baja densidad óptica (a 280 nm) de las fracciones del cromatofluoreo, por lo cual nos vimos obligados a determinar la cantidad de proteína por la reacción de Bradford, a alícuotas de todas las fracciones de la cromatografía y así poder visualizar los "picos de proteína", correspondientes a las variantes separadas. En este experimento se observó la aparición de cinco picos principales (con mayor cantidad de proteína), con pIs de 8.08, 7.82, 7.56, 7.28 y 7.05. Al precipitar estas fracciones con sulfato de amonio al 100% de saturación se eliminaron las anfolinas usadas en el cromatofluoreo y no se perdió tanta proteína, como cuando se precipitó con sulfato de amonio al 50% de saturación (IEFp, ver arriba).

Aunque en su análisis por SDS-PAGE los patrones de heterogeneidad molecular mostraron algunas semejanzas en las cinco fracciones, hubo diferencias en las proporciones de las variantes de masa. Las variantes de alto PM fueron más evidentes en las fracciones B, C y E que en la fracción A; sólo en las fracciones B y C se observaron bandas inmunorreactivas menores de 14 kDa, y en la fracción E no se alcanzó a observar variantes de bajo PM (26 kDa).

En el análisis por IEF de las fracciones de elución del cromatofluoreo los resultados fueron tan complejos como en el IEF preparativo, aunque también hubieron algunas diferencias. En el intervalo de pH entre 7 y 7.5 hubo semejanza entre las distintas fracciones de elución (véase tabla V), no así en las regiones más alcalinas o más ácidas. La fracción A que eluyó con un pI de 8.08 presenta abundantes variantes de pI entre 8 y 8.5, característica que no presentaron las otras fracciones. Asimismo, sólo en las fracciones A y B se observaron formas muy ácidas (pI entre 5 y 6).

Sin embargo, a pesar de las ligeras diferencias entre las fracciones recuperadas, no existen bases suficientes para explicar la heterogeneidad molecular de las fracciones de variantes hormonales aisladas. En la figura 21, se representa

esquemáticamente una hipótesis para poder explicar los resultados obtenidos por el IEFp y por el cromatofluore.que.

Según esta idea, la hormona solubilizada, y aplicada al sistema de purificación, existe como "aglomerados estabilizados", donde entre ellos hay diferencias de carga. Así entonces, en lugar de separar las variantes de carga, separamos estos aglomerados. Luego, al analizar por IEF analítico, los aglomerados se desintegraron y se hizo evidente, de nueva cuenta, la heterogeneidad molecular real de la cGH.

En años anteriores, también se ha intentado el aislamiento de las variantes de la GH de otras especies sin resultados concluyentes. En la década de los setentas, los grupos científicos contaban con preparaciones de variantes aisladas poco caracterizadas y existía poca correlación de los resultados de unos para con otros laboratorios (Lewis, et al., 1980; Chawla et al., 1983). Pero en la mayoría de las ocasiones, aunque se limpiara al máximo la preparación de variantes, resultaba en la presencia de microheterogeneidad molecular (Lewis et al., 1980; *ibid.* 1984). Con el empleo de técnicas tan poderosas como el cromatofluore, también se intentó el aislamiento de las variantes de carga de la GH humana (Lewis, 1988). En ese trabajo, los resultados fueron semejantes a los observados por nosotros: las fracciones de variantes aisladas continúan siendo heterogéneas. En este punto, los estudios para identificar las regiones y los mecanismos por los cuales las moléculas de la GH interaccionan entre ellas serán imprescindibles para explicar las dificultades para aislar las variantes de la hormona de crecimiento.

Gracias a recientes publicaciones de los estudios moleculares sobre la hGH (Baumann, 1988; *ibid.* 1991;) se puede plantear una visión hipotética de los mecanismos que dan origen a la heterogeneidad molecular de la hormona. En algunas especies además del gen normal, que se expresa en la hipófisis, un gen alternativo se expresa en la placenta, lo cual resulta en proteína(s) variantes. Un segundo nivel de heterogeneidad resulta en el procesamiento ambiguo del transcrito primario, que da origen a formas alternativas a la GH, y se ha demostrado que al menos una de ellas (variante de 20 kDa) es bioactiva y se encuentra en la circulación. Con la finalidad de simplificar el esquema, nos remitiremos a la GH recién traducida. Inmediatamente después de acontecida la traducción del modelo básico de la hormona de crecimiento (probablemente el monómero 22 kDa), tiene lugar su procesamiento, la consecuencia de esto es la generación de diferentes tipos de variantes de la hormona (agregados, fragmentos, acetiladas, glicosiladas, fosforiladas, etc). Las variantes son secretadas a la circulación sanguínea,

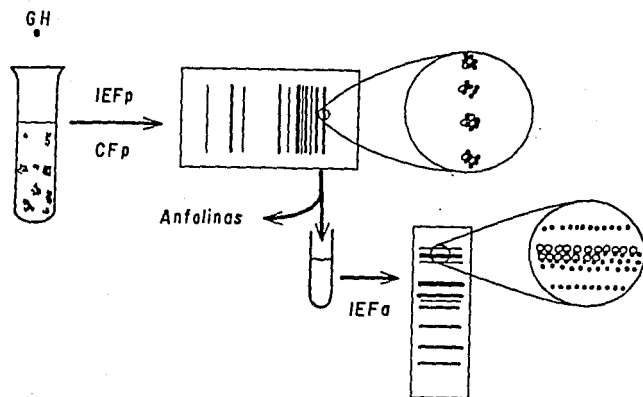


Figura 21. POSIBLE EXPLICACION A LA PARADOJICA HETEROGENEIDAD DE LAS VARIANTES AISLADAS DE LA cGH. IEFp. isoelectroenfoque preparativo; Cfp: cromatoenfoque preparativo; IEFa: isoelectroenfoque analítico. Al solubilizarse la hormona, o durante el IEFp/Cfp, ésta se agrega. Luego, los agregados son separados por su carga global, y son divididos en varias fracciones. Al analizar por IEFa las fracciones, se separan los monómeros variantes de la hormona, lo cual resulta en un patrón electroforético heterogéneo.

donde acontecen varios fenómenos: a) la hormona permanece libre y "viaja" en la sangre hasta alcanzar algún órgano blanco; b) la hormona forma aglomerados, y de esta manera son transportadas por la circulación; c) las hormonas se unen inespecíficamente a moléculas mayores (p. ejemplo la albúmina); d) las hormonas se unen de manera específica a proteínas de unión, este caso constituiría un proceso clave para regular los efectos de la GH; y finalmente, e) la hormona sería degradada por proteasas de la sangre o eliminada por filtración renal. Otra forma que podría ayudar a la heterogeneidad de la hormona, es su procesamiento por el propio órgano blanco, como consecuencia de su unión con el receptor celular, la recaptura y recambio de receptores por parte de la célula, y finalmente, expulsión de los fragmentos de la GH hacia la circulación.

Como se ha observado, en nuestro laboratorio se han desarrollado y optimizado una serie de técnicas de análisis y purificación que nos han permitido profundizar en los estudios moleculares de la cGH, así como reconocer algunos posibles mecanismos de transformación de la hormona (glicosilación, agregación, fosforilación, procesamiento proteolítico, etc). Como siguiente paso, se vuelve indispensable encausar los esfuerzos para reconocer la importancia de las variantes de la cGH a nivel fisiológico. Gracias a la cromatografía de inmunoafinidad podrán evidenciarse correlaciones entre los tipos de variantes hormonales y los estadios fisiológicos del animal. Con una finalidad semejante, pero en dirección contraria, el aislamiento de las variantes de la cGH permitiría reconocer la influencia de las diferentes isoformas en el funcionamiento de tejidos aislados o del organismo completo. Como se observa, el fenómeno de la relación entre las heterogeneidades molecular y funcional es el problema central. Sin embargo, su complejidad hace necesario abordarlo por varios lados a la vez, lo cual también nos permite situar en un marco teórico correcto los nuevos descubrimientos y, como consecuencia, plantear los experimentos para resolver las nuevas incógnitas.

Por otro lado, los datos presentados en este trabajo hacen necesario continuar profundizando en los mecanismos por los cuales la cGH es transformada (glicosilación, fosforilación y procesamiento proteolítico, entre otros), de esta manera se podrá llegar a comprender, y quizás manipular, las causas inmediatas de la heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento de pollo.

La hormona de crecimiento es una de las proteínas más heterogéneas, tanto estructural como funcionalmente, sólo igualada en su heterogeneidad por la PRL. Este hecho subraya el papel central de la GH en el estudio de la comunicación intercelular, pues las investigaciones realizadas sobre la hormona han conformado una nueva visión de las relaciones entre los mensajeros intercelulares y sus órganos blanco. Dentro del panorama de la GH, el estudio de la GH de pollo constituye una aportación novedosa e importante. Es novedosa debido a que comprende el análisis de un modelo biológico diferente al comúnmente empleado, y que algunas veces se peca en considerarlo el único válido. Este estudio también es importante debido a que permite rebasar el umbral de los estudios en mamíferos, y comienza a construir una visión neuroendocrinológica global, donde tengan cabida la diversidad biológica y la evolución.

## CONCLUSIONES.

1. Se desarrolló, mediante cromatografía de inmovilizada afinidad, un sistema práctico y muy específico para el aislamiento de cGH total a partir de suero de pollo.
2. Se desarrolló un protocolo de aislamiento altamente específico para la variante glicosilada de la cGH circulante.
3. En el suero, se demostró la existencia de variantes moleculares de la cGH, tanto de masa como de carga, por diferentes sistemas de electroforesis y de inmunotinción.
4. Se demostró la existencia de una variante glicosilada de la cGH en la circulación.
5. Se observó un gran paralelismo entre la variación molecular de la cGH en la hipófisis y en el suero, esto nos hace proponer que las isoformas hormonales producidas en la glándula son secretadas a la circulación.
6. Se demostró que la cGH, tGH, rPRL, cPRL y tPRL son fosforiladas *in vitro* de una manera específica, por la proteína cinasa dependiente de AMPc.
7. Se observó que la incorporación de fosfato en las hormonas anteriores, mediada por APK, es un proceso saturable, específico y sujeto a competencia.
8. Se demostró y se cuantificó la presencia de fosfato inorgánico esterificado a las hormonas ya antes mencionadas, lo cual apoya la hipótesis de que están fosforiladas de manera natural.
9. Se evaluaron y se optimizaron distintos sistemas para la purificación de las variantes de la cGH. En algunos de ellos, se consiguió recuperar el 60% de la proteína inicial; en otros, se obtuvo la separación de variantes con diferencias de carga muy pequeñas.



## APENDICES

### A. SISTEMAS DE ELECTROFORESIS.

A.1. **ND-PAGE.** Las muestras se analizaron en geles discontinuos y cilíndricos de 5 mm de grosor y 8.5 cm de longitud. El gel concentrador y resolvidor tuvieron una concentración de 3.125 % y de 7.5 % de poliacrilamida, respectivamente (Nicoll y Licht, 1971; Aramburo et al., 1990a).

#### Preparación de los geles.

- Solución A.** Acrilamida y bis-acrilamida T=30%, C=2.6%.  
**Solución B.** HCl 1 N, Tris 1.5 M, TEMED 0.4%, pH 8.9.  
**Solución C.** Persulfato de amonio 0.14% (p/v). Se preparó fresco cada vez.  
**Solución D.** Acrilamida y bis-acrilamida T=6.25%, C=20%.  
**Solución E.**  $H_2PO_4$  1 M, Tris 235 mM, TEMED 0.25%, pH 6.9.  
**Solución F.** Riboflavina 0.002% (p/v).  
**Solución G.** Solución E 25%, glicerol 8% y azul de bromofenol 0.025%.

**Gel resolvidor.** Para 10 ml de solución de gel, se mezclan 2.5 ml de las soluciones A y B, y se desgasifican. Después, se añaden 5 ml de la solución C y la mezcla se agrega a los tubos de vidrio siliconizados. Para cubrir el gel se agrega  $CO_2$ .

**Gel concentrador.** Para 5 ml de solución de gel, se mezclan 2.5 ml de la solución D y 1.25 de la solución E, y se desgasifican. Antes de agregar a los tubos de vidrio, se agrega 1.25 ml de la solución F. Se cubre el gel con  $CO_2$ .

**Condiciones de corrida.** Como amortiguador se empleó Tris 5 mM, Gly 38 mM, pH 8.35. La muestra de proteína (5-50  $\mu$ l) se mezcló con 50  $\mu$ l de la solución G. Al principio de la electroforesis se aplicaron 2 mA por cada gel; al llegar el frente de azul de bromofenol al gel resolvidor, se aplicaron 3.5 mA por cada gel.

**Detección de las bandas de proteína.** Las bandas de proteína se localizaron mediante la tinción con "Quick stain" (ácido perclórico 3.5 %, azul de coomassie G-250 0.025 %). Los geles se incubaron en el colorante durante 5-20 min a temperatura ambiente. Para incrementar la nitidez se reemplaza el colorante por una solución de ácido acético al 7 %.

**A.2. SDS-PAGE.** Los muestras se analizaron en geles de 0.75 mm de grosor, 6 cm de largo y 9.5 de ancho (miniProlean, BioRad), empleando el sistema de amortiguadores de Laemmli (1970). Los geles concentrador y resoledor tuvieron una concentración de 4 y 12.5 % de poliacrilamida, respectivamente.

### **Preparación de los geles.**

**Solución A.** Acrilamida y bis-acrilamida T= 30%, C= 2.6%.

**Solución B.** Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8.

**Solución C.** Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8.

**Solución D.** Persulfato de amonio 10% (p/v).

**Solución E.** Tris 25 mM, Gly 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.6.

**Solución F.** Solución C 12.5%, SDS 0.1%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.05% (5% de  $\beta$ -mercaptoetanol para las condiciones reductoras).

**Gel resoledor.** Para 10 ml de solución de gel, se mezclan 4.16 ml de la solución A, 2.5 ml de la solución B y 3.3 ml de  $\text{DDH}_2\text{O}$ , y se desgasifican. Justo antes de agregar al molde, se añaden 33  $\mu\text{l}$  de la solución D y 8  $\mu\text{l}$  de TEMED. Se cubre con  $\text{DDH}_2\text{O}$  el lecho del gel.

**Gel concentrador.** Para 5 ml de la solución de gel, se mezclan 0.66 ml de la solución A, 1.26 ml de la solución C y 3.08 ml de  $\text{DDH}_2\text{O}$ , y se desgasifican. Antes de agregar al molde, se añaden 25  $\mu\text{l}$  de la solución D y 5  $\mu\text{l}$  de TEMED.

**Condiciones de corrida.** Como amortiguador se empleó la solución E. La muestra de proteína (< 25 ml) se mezcló con la solución F. Durante toda la electroforesis se aplicaron 150 V, y se terminó cuando el frente del colorante se encontrara a 2-3 mm del extremo inferior del gel.

**Detección de las bandas de proteína.** Para la tinción total de proteína, los geles se litaron con azul de coomassie R-250 0.5%, isopropanol 25 % y ácido acético 10 %, durante al menos 2 h, y se deslitaron con lavados de isopropanol 25% y ácido acético 10%. Para localizar específicamente la cGH, tFR $\alpha$  o proteínas glicosiladas los geles se trataron por IET.

**A.3. IEE.** El isoelectrofoque se realizó en geles (105 x 100 x 0.6 cm) con 5% de poli-acrilamida y 2% de anfolinas. El protocolo está basado en lo recomendado por los laboratorios BioRad (Richmond, Ca).

### Preparación de los geles.

Para 30 ml de solución de gel (suficiente para 2 geles de 105 x 100 x 0.6 cm) se mezclaron:

16.5 ml de  $\text{DDH}_2\text{O}$ .

6 ml de solución de acrilamida/bis-acrilamida T=25%, C=3%.

6 ml de glicerol al 25 %.

1.5 ml de anfolinas (500  $\mu\text{l}$  de un intervalo de pH 6-8,  
1 ml de intervalo de pH 3-10).

La mezcla se desgasifica durante 10 min y se le añaden los catalizadores:

45  $\mu\text{l}$  de persulfato al 10% (p/v).

150  $\mu\text{l}$  de riboflavina 0.1% (p/v).

9  $\mu\text{l}$  de TEMED.

Se dejó polimerizar durante 1 h bajo luz blanca.

**Condiciones de corrida.** A la muestra de proteína (5-15  $\mu\text{l}$ ) se le añade 2% de anfolinas (pH 3-10). Se empleó como amortiguador catódico: Lys 20 mM, Arg 20 mM, etanolamina 2M, y como amortiguador anódico: Asp 20 mM, Glu 20 mM. Después de agregar las muestras de proteína, se aplican 5 W, y se va aumentando gradualmente la potencia hasta alcanzar 10 W (duración 1:30 h), a continuación se aplican 1500 V durante 1:30 h (aproximadamente 4000 Vh totales).

**Detección de las bandas de proteína.** Para su análisis, los geles se electrotransfirieron (ET) y se inmunofitieron con anticuerpo policlonal. El gradiente de pH del gel, se determinó por la distribución de los marcadores de pl (BioRad) y, directamente, con un electrodo de superficie y un potenciómetro.

**A.4. 2D-PAGE.** Para el análisis bidimensional se empleó la cámara de electroforesis MiniProteom (BioRad). Esta técnica está basada en el protocolo de O'Farrell (1975) y con modificaciones de Hochstrasser (1988).

### Preparación de los geles.

En la primera dimensión, para la preparación de 20-30 geles (0.1 x 5.5 cm) se mezclan:

5 g de urea  
 3.05 ml de  $\text{DDH}_2\text{O}$ .  
 1.5 ml de acrilamida/bis-acrilamida T=30%, C=2.33%.  
 0.8 ml de anfolinas (100  $\mu\text{l}$ , del pH 8-10.5 y 9-11; 300  $\mu\text{l}$   
 del pH 6-8 y 3-10).  
 12.5 mg de Arg  
 12.5 mg de Lys  
 12.5 mg de Asp  
 120  $\mu\text{l}$  de nonidel P-40.

La mezcla se desgasifica durante 10-15 min, después se agregan los catalizadores:

7  $\mu\text{l}$  de TEMED  
 15  $\mu\text{l}$  de persulfato de amonio 10% (p/v).

Para la segunda dimensión, se prepararon geles para la electroforesis desnaturalizante con SDS (SDS-PAGE), de acuerdo al protocolo descrito en A2.

**Condiciones de corrida.** Las muestras de proteína (5-50  $\mu\text{l}$ ) se mezclaron con la soluciones A (SDS 10 %, DTI 2.32 %) y B (SDS 1 %, urea 54 %, anfolinas 5 %; 1:10; AB). Los amortiguadores fueron: NaOH 20 mM (cátodo) y  $\text{H}_2\text{PO}_4$  10 mM (ánodo). En la primera dimensión se aplicaron aproximadamente 3100 Vh (500 V durante 10 min y 750 V durante 4 h). Al término de la primera dimensión, los geles se acoplaron al gel correspondiente a la segunda dimensión, o bien se almacenaron a  $-10^\circ\text{C}$  hasta su análisis electroforético. No se recomienda almacenar los geles por más de 4 días.

Los geles de la primera dimensión se colocan sobre el gel concentrador y se agrega amortiguador (solución F de SDS-PAGE, en condiciones reductoras). Para esta segunda dimensión, las condiciones de corrida fueron idénticas al sistema de SDS-PAGE (Ver Apéndice A.2)

**Detección de las bandas de proteína.** Para la localización de las variantes de la cGH, los geles se electrotransferían e inmunolifera con anticuerpo policlonal (Ver Apéndice A.5).

## A.5. IET

### I. Electrotransferencia (Western blot).

1. Al término de la electroforesis, el gel se incuba en la solución de transferencia (Tris 25 mM, Gly 192 mM, metanol 20 %, pH 8.3) durante 20-30 min.

2. Se activan las membranas de nitrocelulosa o inmobilon. Para esto, la membrana de nitrocelulosa se moja con el amortiguador de transferencia (previniendo la formación de burbujas de aire). El inmobilon se moja inicialmente en metanol puro durante 1-3 min, después se lava con  $\text{DDH}_2\text{O}$  o con el propio amortiguador de transferencia, durante 5 min.

3. Después, se ensambla el "sandwich" en el siguiente orden: rejilla oscura de ensamblaje, fibra, papel adsorbente grueso (p. ej. Whatman 3MM) o dos papeles delgados (Whatman No. 1), gel, membrana de nitrocelulosa o inmobilon, papel (igual que la capa de papel anterior), fibra y rejilla clara de ensamblaje.

4. El "sandwich" se acopla al sistema de electrotransferencia miniProtein. Conjuntamente se coloca el refrigerante. Entonces, se aplican 200 mA durante 30 min con agitación magnética constante.

5. Finalmente, se recupera la membrana y se separan la región correspondiente a los marcadores de PM o pls (tinción con negro amido) de la región con las muestras problema (tinción con anticuerpo policlonal o con la lectina).

### b) Inmuntinción con anticuerpo policlonal anti-cGH.

1. Las membranas se incuban en una solución de gelatina al 3 % (p/v) en PBS 10 mM, pH 7.6 (PBS) durante 2 h a 40°C o toda la noche a temperatura ambiente.

2. Después, las membranas se lavan con el PBS durante 5 min.

3. Se incuban las membranas con la solución del primer anticuerpo (PBS 10 mM, Tween 20 0.05% pH 7.6 -TPBS-, 1% de gelatina y suero anti-cGH en una concentración 1:2000 [v/v]) durante 2-3 h, a temperatura ambiente y agitación rotatoria constante.

4. A continuación, se lavan las membranas dos veces con TPBS, durante periodos de 5 min c/u.

5. Se incuban las membranas en la solución del segundo anticuerpo (TPBS, 1% de gelatina y anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano en una concentración de 1:3000 [v/v]) durante 1 h, a temperatura ambiente y con agitación rotatoria constante.

6. Se lavan las membranas dos veces con TPBS durante periodos de 5 min c/u.

7. Se lavan con PBS durante 5 min.

8. Se incuban las membranas con la solución reveladora (4-doronafol 0.05% y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.015% en metanol al 16.6% y PBS) durante 30 min.

9. Se enjuagan las membranas con abundante  $\text{DDH}_2\text{O}$ .

### c) Tinción con concanavalina A-peroxidasa.

1. Las membranas de nitrocelulosa o inmobilon, se incuban en una solución de albúmina sérica bovina (No. A-7030) al 3% en PBS, durante 2 h a 40°C o toda la noche a 4°C.

2. Se lavan dos veces con TPBS, durante periodos de 5 min c/u.

3. Se incuban en la solución de la lectina (TPBS, 1% de albúmina y concanavalina A peroxidasa [Sigma] en una concentración de 4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) durante 3-4 h a temperatura ambiente.

4. Se lavan dos veces con TPBS, durante periodos de 5 min c/u.

5. Se lavan con PBS durante 5 min.

6. Se revelan las bandas de proteína reactiva empleando la solución reveladora (sección A.5.b). La incubación dura 10-30 min.

7. Se lavan las membranas con abundante agua.

#### d) Tinción con negro amido.

1. Tras la electrotransferencia, las secciones de nitrocelulosa o immobilon se colocaron en  $\text{DDH}_2\text{O}$ . De esta forma, la tinción con negro amido puede realizarse hasta dos días después de la electrotransferencia.

2. Se descarta el  $\text{DDH}_2\text{O}$  y se liñen las membranas con la solución de negro amido al 1% en una solución de metanol al 45 %, ácido acético 10 %, durante 3-5 min.

3. Luego, se lavan las membranas con una solución de metanol 40% y etanol 10%, estas se lavan tantos veces como sea necesario.

4. Finalmente, las membranas se almacenan en  $\text{DDH}_2\text{O}$  o se secan.

## B. AISLAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-cGH.

La purificación de los MAbs, empleando una columna de proteína A-sefarosa, se realizó a partir de lotes de líquido de ascitis que contenían aproximadamente 15 mg de MAb  $\alpha$ -cGH. Las condiciones de la cromatografía estuvieron basadas en lo recomendado por el Dr. Berghman (belga), y se resume a continuación.

### B.1. Preparación de la columna.

1. Se pesaron 0.9 g de proteína A-sefarosa, que permite obtener aproximadamente 3 ml de resina activa (2mg de proteína A). La resina se hinchó en el amortiguador de aplicación (Cl<sub>2</sub> 1.5 M, NaCl 3 M, pH 8.9) durante 30 min a 4°C.

2. La resina, ya hinchada, se añadió a una jeringa de 10 ml (previamente siliconizada), y ahí se lavó la resina con 20 volúmenes del amortiguador de aplicación.

### B.2. Cromatografía.

1. El líquido de ascitis liofilizado (conteniendo los MAbs específicos  $\alpha$ -cGH, proporcionado por el Dr. Berghman) se resuspendió en 30 ml con agua. La concentración final de MAb en esta solución fue de 0.5 mg/ml.

2. En cada cromatografía se agregó 3 ml de la solución del líquido de ascitis (aproximadamente 1.5 mg de MAb), y se dejó reaccionar con la resina durante 30 min a 4°C.

3. La proteína no adsorbida a la columna se eluyó con el amortiguador de aplicación. Paralelamente, se determinó el espectro de absorción a 280 nm de todas las fracciones.

4. Se inició la elución de la proteína retenida específicamente a la columna cuando la absorción de las fracciones alcanzó el cero. Se hizo pasar por la columna el amortiguador de elución (citratos 50 mM, pH 3.5). Las fracciones de elución se recolectaron en tubos con 500  $\mu$ l de Tris 100 mM, pH 7.5, para neutralizar la acidez.

5. Finalmente, las condiciones iniciales de la resina fueron restituidas al lavarse con el amortiguador de aplicación.

#### Condiciones de la cromatografía

Volúmen del lecho:	3 ml
Fraciones:	1 ml
Flujo:	10 ml/h
D.O.:	280 nm

6. La fracción retenida a la columna (MAb) se dializó contra agua, se liofilizó y se analizó electroforéticamente (SDS-PAGE) para comprobar su pureza.

## C. SINTESIS DE LA COLUMNA DE INMUNOAFINIDAD.

Para este protocolo se tomaron en cuenta las indicaciones del Dr. Berghman y de los laboratorios de Pharmacia.

C.1. Se pesaron 350 mg de sefarosa 4B, activada con CNBr, y se depositó en una jeringa de 10 ml. Esta cantidad al hincharse proporciona aproximadamente 1 ml de resina.

C.2. Se dejó hinchar la sefarosa en HCl 1 mM, pH 3-3.5, durante 15 min. Se agitó durante 15 min con movimientos suaves de extremo a extremo (end over end).

C.3. Se lavó la sefarosa, para eliminar preservativos, con 100 ml de HCl 1 mM.

C.4. Finalmente, la resina se lavó con el amortiguador de acoplamiento (fosfatos 50 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.8).

C.5. En forma paralela, se adicionó 6 ml de agua desionizada a un frasco que contenía aproximadamente 5 mg de anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -cGH, liofilizado con el amortiguador de acoplamiento. Se leyó su absorbencia a 280 nm, para constatar la concentración de proteína (D.O. = 1.4 para 5 mg de MAbs).

C.6. La solución de MAbs se añadió inmediatamente a la resina, después de su lavado en el amortiguador de acoplamiento. La mezcla se agitó con movimientos de extremo a extremo durante 4 h a temperatura ambiente (o durante toda la noche a 4°C).

C.7. Se determinó la eficiencia de acoplamiento, y para eso se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = \frac{1 - \text{absorbencia del sitio } X \text{ } 100}{\text{absorbencia antes de acoplar}}$$

Para considerar que hubo un buen acoplamiento, el valor de eficiencia debe exceder el 90%. En caso de no alcanzar este nivel, se vuelve a agitar la mezcla el tiempo que sea necesario.

C.8. Se removió el sobrenadante y se añadió solución para bloquear los sitios no ocupados en la sefarosa por los MAbs. Para esto se empleó una solución de etanolamina 1 M, pH 8.0. Para este efecto también se puede emplear Tris o Gly 500 mM, pH 7.8. Con esta solución, la resina se agitó de extremo a extremo durante 4-8 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

C.9. Como último paso, se lavó la resina, de manera alternativa, con 2-3 volúmenes de columna, de los amortiguadores de aplicación (fosfatos 50 mM, NaCl 0.9%, Tween-20 0.01%, pH 7.6) y de elución (Gly 50 mM, NaCl 0.9%, Tween-20 0.01%, pH 3-3.5).



#### D. PREPARACION DE LA COLUMNA DE CONCAVALINA A-SEFAROSA.

- D.1. Para la preparación de 2 ml de resina, se tomó 3.1 ml de la suspensión de concanavalina A-sefarosa 4B (Sigma, Lot. 79F-0394, 15 mg ConA/ml de resina empacada).
- D.2. La suspensión de resina se agregó a una jeringa siliconada de 5 ml. Con anterioridad se colocó un soporte de fibra de vidrio en el fondo de la jeringa.
- D.3. La resina se lavó con 20 ml del amortiguador de aplicación (Tris-HCl 200 mM, NaCl 0.15 M,  $MnCl_2$  1 mM,  $CaCl_2$  1 mM, pH 7.0).
- D.4. Se dejó que la resina se empacara por gravedad, durante toda la noche a 4°C.
- D.5. Se eluyó el amortiguador que cubre el lecho de la resina, y se aplicó la muestra de proteína.

## E. ELECTROELUCION DE GELES DE ND-PAGE.

E.1. Se prepararon minimamente 8 geles de poliacrilamida para el sistema de ND-PAGE. Se recomienda preparar geles en exceso, en caso de acontecer accidentes durante su factura.

E.2. Se solubilizó la cSH pura -BDE-1- (concentración entre 50 y 100  $\mu\text{g}$  por cada gel) en el amortiguador de muestra (solución G sistema de electroforesis ND-PAGE, véase Apéndice D).

E.3. Se realizó la electroforesis de acuerdo las condiciones de ND-PAGE (véase Apéndice A.1).

E.4. Al término de la electroforesis, se extrajeron los geles. Uno de ellos se tiñó en "Quick stain" (ácido perclórico 3.5 %, azul de coomassie G-250 0.025 %) durante 10-15 min a temperatura ambiente. Los demás se almacenan a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

E.5. Tomando como base el gel teñido, se corrieron los geles restantes en las zonas con proteína. Así se obtuvieron tres secciones de gel conteniendo los variantes de carga de la hormona.

E.6. Para los ensayos de electroelución en una cámara ISCO se procedió de la siguiente manera:

- Se selló la cámara (o cámaras) interior con membrana para diálisis (cutloff de 3.5 kDa).
- Se colocaron dentro de la cámara las secciones de gel correspondientes a la misma variante hormonal.
- Se agregó el amortiguador interior (Tris-acetatos 40 mM, pH 9.1). Se tuvo cuidado de no dejar burbujas de aire.
- Se agregó el amortiguador (Tris-acetatos 400 mM, pH 9.1) en la cámara externa y se colocó dentro de ella a la cámara interna.
- Se aplicaron 3 W de potencia constante durante 6 h a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Se recuperó el amortiguador de la cámara interna, se dializó contra  $\text{DDH}_2\text{O}$ , se liofilizó y se analizó por electroforesis.

E.7. Para los ensayos de electroelución realizados con el sistema MiniProlean (BioRad) se siguió el presente protocolo:

- Se acopló el sistema de electroelución BioRad. La membrana se lavó desde un día antes en el amortiguador a emplear.
- Sobre el soporte de fibra de vidrio se colocaron las secciones de gel (correspondientes a un tipo particular de variante hormonal).
- Se agregó el amortiguador, tanto en el reservorio con los geles como en la cámara externa. Se empleó un amortiguador y condiciones de electroelución diferentes para cada ensayo (1. Tris-acetatos 40 mM y 400 mM, pH 9.1; 2. Tris-acetatos 50 mM pH 9.1; 3. Bicarbonato de amonio 50 mM, pH 9.5; y 4. Acetatos 50 mM, pH 4.5).
- Finalmente, se recuperó el amortiguador en el compartimiento bajo el soporte de fibra de vidrio, se dializó contra  $\text{DDH}_2\text{O}$ , se liofilizó y se analizó.

## F. GELES DESPOLIMERIZABLES.

### F.1. BAC.

Para este protocolo se tomaron en cuenta las condiciones reportadas por Chaffari, 1976.

#### a) Condiciones de polimerización.

Solución A. La solución de monómeros al 20% se preparó añadiendo acrilamida y BAC en proporciones 19.22:0.78 (p/p). Esto resultó en una concentración relativa de monómeros y entrecruzador de T= 20 y C= 3.9. Se solubilizó la mezcla calentando a 60°C. A continuación, se filtró y se almacenó a temperatura ambiente.

Solución B. Amortiguador de Tris-HCl 89 mM y ácido bórico 89 mM, pH 8.3.

Protocolo. Para obtener 8 ml de solución de gel resolvidor, al 7.5% total de poliacrilamida, se mezclaron las soluciones en las siguientes cantidades:

3 ml de solución A  
 0.8 ml de solución B  
 4 ml de agua desionizada  
 0.2  $\mu$ l de TEMED  
 12  $\mu$ l de persulfato de sodio al 10%

Primeramente, se mezclaron las soluciones A y B con el agua. Se desgasificó durante 5 min y se calentó a 40°C durante 5 min. Exactamente antes de agregar al molde del gel, se añadieron los catalizadores. Es necesario agregar la solución de gel inmediatamente a los tubos pues la reacción de polimerización es muy rápida.

El gel concentrador (superior) se preparó de acuerdo a Ornstein y Davis (véase Apéndice A1), empleando para ello el BS como entrecruzador.

Después de la electroforesis, los geles se cortaron transversalmente, en las zonas correspondientes a las variantes de la hormona (véase Apéndice E). Es recomendable cortar en trozos muy pequeños las fracciones del gel con proteína pues, de esa manera, se hace más eficiente su solubilización.

#### b) Condiciones de despolimerización.

Para la solubilización se mezclaron los trozos de gel con un volumen tres veces mayor de  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%. La despolimerización completa se alcanzó en menos de 10 min a temperatura ambiente, en caso de persistir "grumos" se calentó a 40°C.

## F.2. DHEBA.

Según Tas, 1984.

a) Condiciones de polimerización.

Solución A. La solución de monómeros al 15%, se preparó mezclando 3.75 g de acrilamida y 0.1875 g de DHEBA, se solubilizaron en un volumen de 25 ml con agua desionizada, y se filtró. La solubilización no requiere calentamiento. La solución de monómeros resultante fue de  $T=15.7$  y  $C=4.7$ .

Solución B. Tris 1.28 M, HCl 0.6 N, pH 8.3

Protocolo. Para 10 ml de solución de gel se emplearon las siguientes cantidades:

5 ml de solución A  
5 ml de solución B  
100  $\mu$ l de TEMED  
100  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%

Se mezclaron y desgasificaron las soluciones A y B. Inmediatamente antes de agregar la mezcla al molde para el gel, se adicionaron los catalizadores. También en este caso, la reacción de polimerización fue muy rápida.

## F.3. DATD

Solución A. Para una solución de monómeros al 15 %, se mezclaron 2.75 g de acrilamida y 0.1875 g de DATD, con agua desionizada se llevó a un volumen de 25 ml, y se filtró.  $T=15.7$  y  $C=4.7$ .

Solución B. Tris 1.28 M, HCl 0.6 N, pH 8.3.

Protocolo. Para 10 ml de solución de gel se emplearon las siguientes cantidades:

5 ml de solución A  
5 ml de solución B  
100  $\mu$ l de TEMED  
100  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%

Se mezclaron y desgasificaron las soluciones A y B. Inmediatamente antes de agregar la mezcla al molde para el gel, se adicionaron los catalizadores. También en este caso, la reacción de polimerización fue muy rápida.

Finalmente, se probaron sus características de resistencia mecánica, de separación de las variantes y enfoque en la ND-PAGE; así también, se tomó en cuenta el protocolo que emplea las condiciones de despolimerización menos drásticas.

## 2. Condiciones de despolimerización.

Como primer paso, los trozos de gel se lavaron con abundante agua desionizada durante 20 min. A continuación, se sustituyó el agua por la solución de ácido periódico al 5 %  
En estas condiciones se dejó incubar la mezcla durante toda la noche a temperatura ambiente.

## G. ISOELECTROENFOQUE PREPARATIVO (IEFp).

### G.1. Preparación del soporte.

- Se pesaron 3.6 g de resina (Bioyle, Bio Rad) y se hinchó en agua desionizada durante 2 h.
- La resina se lavó con agua desionizada hasta alcanzar una conductividad de cero.
- Entonces, la resina se resuspendió en un volumen de 70 ml con agua; a la suspensión se añadió 2 % de anfolinas, en proporciones de 1:1:1 para los intervalos de pH de 3-10:6-8:8.5-10.
- El molde se colocó en una superficie totalmente horizontal. Previamente, en el molde se colocaron tiras de papel mojadas, de manera tal que los papeles constituyan las barreras del soporte.
- A continuación, la suspensión se desgasificó y se agregó al molde en el espacio libre; la resina se esparció en toda su superficie.
- Finalmente, la resina se secó por absorción del agua, para lo cual se emplearon papeles secantes adosados a la barrera de papel. El tiempo promedio para secar la resina (hasta un grado que permitiera inclinar el soporte 45° y no sufrir distorsión) fue de 30-50 min.

### G.2. Preparación de la muestra.

Se pesaron 3-5 mg de hormona (oGH o cGH). La oGH se empleó en los ensayos iniciales -evaluación de las condiciones del IEFp-; las condiciones de preparación de la muestra fueron semejantes para la oGH y cGH.

La hormona se solubilizó en 1 ml de agua alcalinizada con NaOH (pH 9.5), y se añadió 2 % (v/v) de anfolinas (intervalo de pH 3-10). En las ocasiones en que no se consiguió una completa solubilización, se agregó urea hasta una concentración de 2 M.

### G.3. Condiciones de corrida.

#### a) Precorrida.

El molde, conteniendo el soporte, se colocó en la cámara de IEF, sobre la cerámica de refrigeración. Previamente, la cerámica se mojó con glicerol al 5% (p/v), para así facilitar la transferencia de temperatura entre el soporte y la cerámica.

A continuación, se mojaron tiras de papel con los amortiguadores correspondientes: anódico (ácido glutámico 20 mM, ácido aspártico 20 mM) y catódico (etilendiamina 2 M, lisina 20 mM, arginina 20 mM); estas tiras se montaron sobre las anteriores tiras de papel, en el extremo correspondiente al tipo de amortiguador.

Se saturó la cámara con N<sub>2</sub> y se inició la precorrida: se aplicó 900 V durante 16 h a 4°C.

#### b) Corrida.

Al término de la precorrida, en el centro del soporte se realizaron ligeras incisiones transversales con un bisturí. La muestra se agregó en estas incisiones. A continuación, se volvió a saturar la cámara con N<sub>2</sub> y se aplicó 2000 V durante 5 h a 4°C.

#### G.4. Visualización de la proteína separada.

Una vez finalizado el IEF, a todo lo largo del soporte se sobrepusieron tiras de papel secante 3MM (Bio Rad). Se permitió que se impregnaran de la proteína del soporte, durante 3 min. Con sumo cuidado, se retiraron las tiras de papel y se secaron a 100°C.

A continuación, las tiras de papel se lavaron con ácido tricloroacético al 10 % durante 5 min (2x), y se lificaron en una solución de azul de bromofenol (0.05%), etanol (90%) y ácido acético (9%), durante 5 min. Los papeles se deslificaron al lavarlos con abundante agua acidificada con ácido acético.

Por otra parte, se determinó el gradiente de pH cada centímetro, a lo largo del soporte empleando un potenciómetro Beckman SS-2 y un electrodo de superficie (Bio-Rad), durante todo el tiempo este sistema se mantuvo sobre hielo.

#### G.5. Recuperación de las proteínas separadas.

Una vez conocida la disposición de las bandas de proteína, se usó ésta como patrón para dividir el soporte en fracciones. Las fracciones se almacenaron a -20°C hasta su extracción.

En frascos de vidrio separados, la resina se lavó durante 30 min a 4°C con 2-3 volúmenes de  $\text{D}_2\text{O}$ . La suspensión se centrifugó a 11500 rpm durante 10 min. Cada fracción se lavó en tres ocasiones. Los sobrenadantes de los lavados se juntaron y lificizaron para posterior análisis.

Para eliminar a las anfolinas contaminantes se intentaron varias técnicas:

**a) Cromatografía en sefadex G-10.** Se preparó una columna de sefadex G-10 (27 x 1.2 cm) en un amortiguador de bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8.4.

La muestra proteínica se solubilizó en agua alcalinizada con NaOH 500 mM (pH 9.5), y así permitir su total resuspensión.

La cromatografía se realizó a un flujo de 20 ml/h, se tomaron fracciones cada ml, y éstas se leyeron en el espectrofotómetro a 280 nm. Se juntaron las fracciones con proteína, se dializaron y concentraron para su posterior análisis electroforético y determinación de proteína.

**b) Electroelución.** Se probaron las condiciones de electroelución en el sistema de MiniProlean (Bio Rad). En este caso, las muestras se solubilizaron en bicarbonato de amonio 10 mM, pH 8, con 20 % de glicerol. Todo el sistema de electroelución se llenó con el amortiguador antes mencionado y se aplicó 40 mA de corriente constante durante 6 h a 4°C. La solución retenida por la membrana de diálisis (cutoff de 12 kDa) se recuperó, dializó, lificizó y analizó por "dot-blot" (véase Apéndice H).

**c) Precipitación con sulfato de amonio.** Por antecedentes del protocolo de purificación de cGH (fracción BOC-1), sabemos que la cGH se precipita con 50 % de saturación de sulfato de amonio, y aprovechando la alta solubilidad de las anfolinas, planeamos separar de esta manera la hormona de sus contaminantes. En este caso las muestras se resuspendieron en 3 ml de agua, se agregó 3 ml de una solución saturada de sulfato de amonio. La mezcla se agitó durante 30 min a 4°C, y se centrifugó a 11500 rpm durante 30 min. El sobrenadante y el precipitado se dializaron y lificizaron para su determinación de proteína y su análisis electroforético.

## H. ANALISIS DE INMUNORREACTIVIDAD POR "DOT-BLOT".

Este protocolo se basó en lo recomendado por los laboratorios de Bio-Rad (Richmond, Ca.), y se adaptaron las condiciones de inmunolinción específica. En esta técnica se empleó el aparato de microfiltración "Bio-Dot" (Bio-Rad).

- 1) La membrana de nitrocelulosa (9 x 12 cm) se hidró con PBS 10 mM, pH 7.6.
- 2) Esta membrana se colocó en el aparato de microfiltración y se aseguró apretando los tornillos.
- 3) Se rehidró la membrana con 100  $\mu$ l de TPBS (PBS + 0.05% de Tween 20) por pozo. Se dejó filtrar el líquido por gravedad.
- 4) Ahora, a los pozos se agregó entre 50-500  $\mu$ l de la muestra proteínica. Es aconsejable agregar una cantidad de muestra semejante en todos los pozos. Se dejó filtrar pasivamente el líquido; generalmente, una muestra de 100  $\mu$ l toma 30-40 min en ser filtrada.
- 5) Se lavaron los pozos con 100  $\mu$ l de TPBS y se permitió la filtración pasiva del amortiguador.
- 6) Entonces, se desarmó el aparato y la membrana se bloquea, para lo cual se incubó en una solución de gelatina al 3% en PBS durante 2 h a 40°C o toda la noche a temperatura ambiente.
- 7) Luego la membrana se trató de manera idéntica a como se realiza en la inmunolinción (véase Apéndice A.5).

## BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Meguid, S.S., Shieh, H.S., Smith, W.W., Dayringer, H.E., Viland, B.N. and Bentle, L.A. 1987. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84:6434-6437.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. (eds.) 1989. Intracellular sorting and the maintenance of cellular compartments. *Molecular Biology of the Cell*, 2nd. edition. Chapter 8. Garland Publishing, Inc. N.Y. EEUU. Pp. 405-479.
- Andrews, A. T. 1986. *Electrophoresis. Theory and biochemical and clinical applications*. 2nd. edition. Oxford University Press. p. 452.
- Arámburo, C., Carranza, M., Sánchez, R. and Perera, G. 1989a. Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76:330-339.
- Arámburo, C., Sánchez R., Fenton, B., Perera, G. y Valverde-R, C. 1989b. Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la detección de hormona de crecimiento de pollo (cGH). *Vel. Mex.* 20:397-405.
- Arámburo, C., Campbell, R.C. and Scanes, C.G. 1989c. Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. *Life Sci.* 45: 2201-2207.
- Arámburo, C., Montiel, J.L., Perera, G., Navarrete, S. and Sánchez, R. 1990a. Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): Different bioactivities of cGH charge variants. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80:59-67.
- Arámburo, C., Donoghue, D., Montiel, J.L., Berghman, L.R. and Scanes, C.G. 1990b. Phosphorylation of growth hormone. *Life Sci.* 47:945-952.
- Arámburo, C., Navarrete, S., Montiel, J.L., Sánchez, R. and Berghman, L.R. 1991a. Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): Evidence of G-cGH isoforms. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84:135-146.
- Arámburo, C., Montiel, J.L., Proudman, J.A., Berghman, L.R. and Scanes, C.G. 1991b. Phosphorylation of prolactin and growth hormone. *J. Mol. Endocrinol.* (en prensa).
- Baldwin, G.S., Grego, B., Hearn, M.T.W., Knesel, J.A., Morgan, F.J. and Simpson, R.J. 1983. Phosphorylation of human growth hormone by the epidermal growth factor-stimulated tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80:5276-5280.
- Barnard, R., Bundesen, P.G., Ryatt, D.B. and Waters, M.J. 1985. Evidence from the use of monoclonal antibody probes for structural heterogeneity of the growth hormone receptor. *Biochem. J.* 231:459-468.
- Barnard, R. and Waters, M.J. 1988. Use of calcium dependence as a means to study the interaction between growth hormone and their binding proteins in rabbit liver. *Biochem. J.* 250:533-538.
- Barnard, R. Rowlinson, S.W. and Waters, M.J. 1989. An electrostatic model for the interaction between growth hormone and its receptor involving chelation of  $Ca^{++}$  to the human growth hormone molecule. *J. theor. Biol.* 140: 355-367.



- Barrett, R.J., Friesen, H. and Astwood, E.B. 1962. Characterization of pituitary and peptide hormones by electrophoresis in starch gel. *J. Biol. Chem.* 237(2):432-439.
- Bass, S.H., Mulkerrin, M.G. and Wells, J.A. 1991. A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88. 4498-4502.
- Baumann, G. and Chrambach, A. 1976. A highly crosslinked, transparent polyacrylamide gel with improved mechanical stability for use in isoelectrofocusing and isothacophoresis. *Anal. Biochem.* 70:32-38.
- Baumann, G. and Amburn, K. 1986. Human growth hormone circulates in large part as a complex associated with(a) plasma protein(s). *Clinical Res.* 34(2):681A.
- Baumann, G. 1988 Heterogeneity of growth hormone. Basic and clinical aspects of growth hormone (Bercu, B.B. ed.). Serona symposia, Plenum Press, USA. Pp. 13-32.
- Baumann, G. 1991. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr. Rev.* 12(4):424-449.
- Becker, G.W., Bowsfier, R.R., Mackeller, W.C., Poor, M.L., Tackitt, P.M. and Riggin, R.M. 1987. Chemical, physical, and biological characterization of a dimeric form of biosynthetic human growth hormone. *Biotech. Appl. Biochem.* 9:478-487.
- Berghman, L.R., Lens, P., Decuypere, E., Kuhn, E.E.R. and Vandersande, F. 1987. Glycosylated chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68:408-414.
- Bertgman, L.R., van Beeumen, J., Decuypere, E., Kuhn, E.R. and Vandersande, F. 1988. One-step purification of chicken growth hormone from a crude pituitary extract by use of a monoclonal immunoadsorbent. *J. Endocrinol.* 118: 381-387.
- Blobel, G. 1980. Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1496-1500.
- Bowen, S.J., Huybrechts, L.M., Marsh, J.A. and Scañes, C.G. 1987. Influence of triiodothyronine and growth hormone of dwarf and normal chickens interactions of hormones and genotype. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A(1):137-142.
- Brattin, W.J. and Portanova, R. 1981. Dibutyl cyclic AMP-induced phosphorylation of specific proteins in adenohipophysial cells. *Cell. Endocrinol.* 23:77-90.
- Burgess, T.L. and Kelly, R.B. 1987. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3:243-293.
- Burke, W.H., Licht, P., Papkoff, H. and Bona-Gallo, A. 1979. Isolation and characterization of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone from pituitary gland of the turkey (Meleagris gallopavo). *Gen. Comp. Endocrinol.* 37:508-520.
- Burke, W.H., Moore, J.A., Ogez, J.R. and Builder, S.E. 1987. The properties of recombinant chicken growth hormone and its effects on growth, body composition, feed efficiency, and others factors in broilers chickens. *Endocrinology* 120(2):651-658.
- Burnside, J., Liou, S.S. and Cogburn, L.A. 1991. Molecular cloning of the chicken growth hormone receptor complementary deoxyribonucleic acid: mutation of the gene in sex-linked dwarf chicken. *Endocrinology* 128(2):3183-3192.
- Buss, J.E. and Stull, J.T. 1983. Measurement of chemical phosphate in proteins. *Meth. Enzymol.* 99: 7-14.
- Cameron, C.M., Kostyo, J.L. and Papkoff, H. 1985. No mammalian growth hormones have diabetogenic and insulin-like activities. *Endocrinology* 116(4):1501-1505.

Campbell, R.M. and Scanes, C.G. 1985. Lipolytic activity of purified pituitary and bacterially derived growth hormone on chicken adipose tissue in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 180:513-517.

Campbell, R.M. and Scanes, C.G. 1988a. Pharmacological investigations on the lipolytic and antilipolytic effects of growth hormone (GH) in chicken adipose tissue in vitro: evidence for involvement of calcium and polyamines. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188:177-184.

Campbell, R.M. and Scanes, C.G. 1988b. Inhibition of growth hormone-induced lipolysis by 3'5'-guanosine monophosphate in chicken adipose tissue in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 189:367-371.

Campbell, R.M., Kostyo, J.L. and Scanes, C.G. 1990. Lipolytic and antilipolytic effects of human growth hormone, its 20-kilodalton variant, a reduced and carboxymethylated derivative, and human placental lactogen on chicken adipose tissue in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 193:269-273.

Carlaei, L., Chou, K.Ch. and Maggiora, G.M. 1991. A heuristic approach to predicting the tertiary structure of bovine somatotropin. *Biochemistry* 30:4389-4398.

Carsia, R.V., Weber, H., King, D.B. and Scanes, C.G. 1985. Adrenocortical cell function in the hypophysectomized domestic fowl: effects of growth hormone and 3,5,3'-triiodothyronine replacement. *Endocrinology* 117(3):928-933.

Clapp, C., Sears, P.S., Rusell, D.H., Richards, J., Levay-Young, B.K. and Nicoll, C.S. 1988. Biological and immunological characterization of cleaved and 16 K forms of rat prolactin. *Endocrinology* 122:2892-2898.

Cogburn, L.A., Liou, S.S., Rand, A.L. and Mcmurtry, J.P. 1989. Growth, metabolic and endocrine responses of broiler cockerels given a daily subcutaneous injection of natural or biosynthetic chicken growth hormone. *J. Nutr.* 119:1213-1222.

Combarnus, Y. 1988. Structure and structure-function relationships in gonadotropins. *Reprod. Nutr. Develop.* 28: 211-228.

Cooke, N.E., Ray, J., Emery, J.G. and Liebhaver, S.A. 1988. Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *J. Biol. Chem.* 263:9001-9006.

Cravener, T.L., Vasilatos-Younken, R. and Wellenreiter, R.H. 1989. Effect of subcutaneous infusion of pituitary-derived chicken growth hormone on growth performance of broiler pullets. *Poult. Sci.* 68:1133-1140.

Cunningham, B.C. and Wells, J.A. 1989. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244:1081-1085.

Cunningham, B.C., Henner, D.J. and Wells, J.A. 1990. Engineering human prolactin to bind to the human growth hormone receptor. *Science* 247:1461-1465.

Cunningham, B.C., Ullsch, M., de Vos A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R. and Wells, J.A. 1991. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science* 254:821-825.

Cupo, M.A. and Cartwright, A.L. 1989. Lipid synthesis and lipoprotein secretion by chick liver cells in culture: influence of growth hormone and insulin-like growth factor-I. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B(2):355-360.

Chawla, R.K., Parks, J.S. and Rudman, D. 1983. Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic, and clinical effects. *Annu. Rev. Med.* 34: 519-547.

Cheung, A., Hall, T.R. and Harvey, S. 1988. Stimulation of corticosterone release in the fowl by recombinant DNA-derived chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69:128-132.

Darras, V.M., Huybrechts, L.M., Berghman, L.R., Kuhn, E.R. and Decuyffere, E. 1990. Ontogeny of the effect of purified chicken growth hormone on the liver 5' monodeiodination activity in the chicken: reversal of the activity after hatching. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77:212-220.

Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis- II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121:404-427.

Davis, R.B., Morris, J. and Ivarie, R. 1987. The polypeptide P16 is a carboxy terminal cleavage product of rat growth hormone in anterior pituitary and GH3 pituitary tumor cells. *Mol. Endocrinol.* 1:102-108.

Doneen, B.A., Bem, H.A. and Li, C.H. 1977. Biological actions of human somatotropin and its derivatives on mouse mammary gland and teleost urinary bladder. *J. Endocr.* 73:377-383.

Dunbar, B. S. 1985. Protein analysis using high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Laboratory methods manual for hormone action and molecular endocrinology.* (W. T. Schrader and B. W. O'Malley, eds.) 9th. edition. Houston Biological Assoc., Inc. pp. 1-35.

Dunn, M.J. and Burghes, A. H. M. 1983. High resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. I. Methodological procedures. *Electrophoresis* 4:97-116.

Farmer, S.W., Papkoff, H., and Hayashida, T. 1974. Purification and properties of avian growth hormones. *Endocrinology* 95:1560-1565.

Ferguson, K.A. and Wallace, A.L.C. 1963. The characterization of pituitary hormones by starch gel electrophoresis. *Rec. Prog. Horm. Res.* 19:1-55.

Foltzer, Ch., Harvey, S., Kormann, H. and Mialhe, P. 1987. Plasma growth hormone, somatostatin and glucagon inter-relationships during infusion of human pancreatic growth hormone-releasing factor in young and adults ducks (*Anas platyrhynchos*). *J. Endocrinol.* 114:25-32.

Foltzer, Ch., Harvey, S. and Mialhe, P. 1987. Somatostatin-like immunoreactivity in duck plasma, hypothalamus and neural lobe during post-hatch growth: comparison with plasma and pituitary growth hormone concentrations. *J. Endocrinol.* 113:57-63.

Foster, D.N., Kim, S.U., Enycart, J.J. and Foster, L.K. 1990. Nucleotide sequence of the complementary DNA for turkey growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173(3):967-975 (Erratum: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175(2):730-731).

Free, C.A. and Sonenberg, M. 1966. Separations and properties of multiple components of bovine growth hormone. *J. Biol. Chem.* 241(21): 5076-5082.

Frey, M. D. and Radola, B. J. 1982. High resolution preparative isoelectrophofocusing in layer of granulated gels. *Electrophoresis* 3:216-226.

Gasc, J.M. and Baulieu, E-E. 1988. Regulation by estradiol of the progesterone receptor in the hypothalamus and pituitary: an immunohistochemical study in the chicken. *Endocrinology* 122(4):1357-1365.

Ghaffari, S.H. 1967. Isolation of proteins for peptide mapping, amino acid analysis, and sequencing using disulfide crosslinked polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 171:352-359.

- Gorden, P., Hendricks, C.M. and Roth, J. 1973. Evidence of "big" and "little" components of human plasma and pituitary growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36:173-184.
- Graf, L., Li, C.H. and Jibson, M.D. 1982. Human somatotropin. Selective removal with trypsin of residues 135-145 from the hormone molecule with no loss of biological activities. *J. Biol. Chem.* 257:2365-2373.
- Green, H., Mokikawa, M. and Nixon, T. 1985. A dual effector theory of growth hormone action. *Differentiation* 29:195-198.
- Greenan, J., Lorensen, M.Y., Coracon, M.V. and Walker, A.M. 1990. Alteration in *in Situ* prolactin secretory granule morphology and immunoactivity by thiols and divalent cations. *Endocrinology* 126:512-518.
- Hall, T.R., Harvey, S., and Scanes, C.G. 1986. Control of growth hormone secretion in the vertebrates: a comparative survey. *Comp. Biochem. Endocrinol.* 84A:231-253.
- Hall, T.R., Cheung, A. and Harvey, S. 1987. Some biological activities of recombinant DNA-derived growth hormone on plasma metabolite concentrations in domestic fowl. *Comp. Biochem. Physiol.* 86A(1):29-34.
- Hanks, M.C., Alarzi, J.A., Sharp, P.J. and Sang, L. 1989. Molecular cloning and sequence analysis of putative chicken prolactin cDNA. *J. Mol. Endocrinol.* 2:21-30.
- Hansan, L.A., Roos, R. and Rymo, L. 1966. Heterogeneity of human growth hormone preparations by immuno-gel filtration and gel filtration electrophoresis. *Nature* 212:948-949.
- Hansen, J.N. 1977. Electrophoretic of ribonucleic acid on a polyacrylamide gel which contains disulfide cross-linkages. *Anal. Biochem.* 76:37-44.
- Hansen, J.N., Pfeiffer, B.H. and Boehnert, J.A. 1980. Chemical and electrophoretic properties of solubilizable disulfide gels. *Anal. Biochem.* 105: 192-201.
- Hansen, J.N. 1981. Use of solubilizable acrylamide disulfide gels for isolation of DNA fragments suitable for sequences analysis. *Anal. Biochem.* 116:146-151.
- Haro, L.S. and Talamantes, F.M. 1985. Secreted mouse prolactin (PRL) and stored ovine PRL I. Biochemical characterization, isolation, and purification of their electrophoretic isoforms. *Endocrinology* 116(1):346-352.
- Hart, I.C., Blake, L.A., Chadwick, P.M.E., Payne, G.A. and Simmonds, A.D. 1984. The heterogeneity of bovine growth hormone. *Biochem. J.* 218:573-581.
- Harvey, S., Scanes, C.G. and Howe, T. 1977. Growth hormone effects in vitro metabolism of avian adipose and liver tissue. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33: 322-328.
- Harvey, S. and Scanes, C.G. 1977. Purification and radioimmunoassay of chicken growth hormone. *J. Endocrinol.* 73:321-0329.
- Harvey, S., Davison, T.F. and Chadwick, A. 1979. Ontogeny of growth hormone and prolactin secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 39:270-273.
- Harvey, S., Lam, S. and Hall, T.R. 1986. Somatostatin tonically inhibits growth hormone secretion in domestic fowl. *J. Endocrinol.* 111:91-97.
- Harvey, S., Scanes, C.G. and Klandorf, H. 1988. Thyrotrophin-releasing hormone induces growth hormone secretion in adult hypothyroid fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69:233-237.

Hirt, H., Kimelman, J., Birnbaum, M.J., Chen, E.Y., Seeburg, P.H., Eberhardt, N.L. and Barta, A. 1987. The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations. *DNA* 6:59-70.

Ho, T.W.C., Balden, E., Chao, J. and Walker, A.M. 1991. Prolactin (PRL) processing by kallikrein: production of the 21-23.5K PRL-like molecules and inferences about PRL storage in mature secretory granules. *Endocrinology* 129(1):184-192.

Hochstrasser, D. F., Harrington, M. G., Hochstrasser, A. C., Miller, M. J. and Meril, C. R. 1988. Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173:424-435.

Hofman, K. 1974. Relations between chemical structure and function of adrenocorticotropin and melanocyte-stimulating hormone. *Handbook of Physiology*, (S.R. Geiger ed.) sec. 7 vol. IV. American Physiological Soc., USA. Pp. 29-58.

Houston, B. and Goddard, C. 1988. Molecular isoforms of growth hormone in the chicken pituitary gland. *J. Endocrinol.* 116:35-41.

Houston, B., O'Neill, I.E., Mitchell, M.A. and Goddard, C. 1990. Purification and biological activity of a single charge isomer of pituitary-derived chicken growth hormone. *J. Endocrinol.* 125:207-215.

Houston, B. and O'Neill, I.E. 1991. Insulin and growth hormone act synergistically to stimulate insulin-like growth factor-I production by cultured chicken hepatocytes. *J. Endocrinol.* 128:389-393.

Howland, D.S., Farrington, M.A., Taylor, W.D. and Hymer, W.C. 1987. Alternative splicing model for the synthesis and secretion of the 20 Kd form of rat growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147:650-657.

Hughes, J.P. and Friesen, H.G. 1985. The nature and regulation of the receptors for pituitary growth hormone. *Annu. Rev. Physiol.* 47:469-482.

Hurtly, S.M. and Helenius, A. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5:277-307.

Isaksson, D.G., Eden, S., and Jansson, J.O. 1985. Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Annu. Rev. Physiol.* 47:483-499.

Johnson, R.J. 1988. Diminution of pulsatile growth hormone secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*): evidence of sexual dimorphism. *J. Endocrinol.* 119:101-109.

Jones, D.L., Andersen, B.J. and Vasilatos-Younken, R. 1990. Identification and verification of the existence of circulating growth hormone (GH) binding activity in domestic poultry. *Poult. Sci.* (suppl. 1):69:70.

Kawauchi, H., Maruyama, S., Yasuda, A., Yamaguchi K., Shirabata, K., Kubota, J. and Hirano, T. 1986. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* 244:542-552.

Keutmann, H.T., Johnson, L. and Ryan, R.J. 1985. Evidence for a conformational change in deglycosylated glycoprotein hormones. *FEBS Lett.* 185:333-338.

Kikuchi, K., Buonomo, F.C., Kajimoto, Y. and Routwein, P. 1991. Expression of insulin-like growth factor-I during chicken development. *Endocrinology* 128(3):1323-1328.

Kobayashi, T., Kikuyama, S., Yasuda, A., Kawauchi, H., Yamaguchi, K. and Yokoo, Y. 1989. Purification and characterization of bullfrog growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73:417-424.

Lai, P.H., Duyka, D.R., Souza, L.H. and Scanes, C.G. 1984. Purification and properties of chicken growth hormone. *IRCS Med. Sci.* 12:1077-1078.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Lamb, I.C., Galchosa, D.M. and Foster, D.N. 1988. Chicken growth hormone cDNA sequence. *Nucl. Acid Res.* 16(19):9339.

Lauterio, T.J., and Scanes, C.G. 1988. The role of thyroid hormones in the growth hormone response to protein restriction the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J. Endocrinol.* 117:223-228.

Lea, E.W. and Harvey, S. 1990. Feedback effects of growth hormone on anterior pituitary function in chickens. *J. Endocrinol.* 125:409-415.

Lecomte, C.M., Renard, A. and Martial, J.A. 1987. A new natural hGH variant -17.5 Kd-produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic. Acid. Res.* 15:6331-6348.

LeRoith, D., Roberts, C.T., Wilson, G.L., Delahunty, G. and Roth, J. 1989. Evolutionary origins of intercellular communication: implications for mammalian endocrinology. *Cell to cell communication in Endocrinology* (Riva, E., Forti, G., Bordin, C.W. and Motta, M., eds.) Serono Symposia Publ. Raven Press. vol. 49. Pp. 1-9.

Leung, F.C., Taylor, J.E., Steelman, S.L., Benett, C.D., Rodney, J.A., Long, R.A., Serio, R., Meppelman, P.M. and Olson, G. 1984. Purification and properties of chicken growth hormone and the development of homologous radioimmunoassay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56:389-400.

Leung, F.C., Taylor, J.E., Wien, S. and Van Iderstine, A. 1986. Purified chicken growth hormone (GH) and a human pancreatic GH-releasing hormone increase body weight gain in chickens. *Endocrinology* 118(5):1961-1965.

Levine, L.S., Sonenberg, M. and Yamasaki, N. 1973. Metabolic effects in children of a 37 amino acid fragment of bovine growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37:607-615.

Lewis, U.J. 1962. Enzymatic transformations of the growth hormone and prolactin. *J. Biol. Chem.* 237(10):3141-3145.

Lewis, U.J. 1963. Factors that affect the fragmentation of growth hormone and prolactin by hypophysial proteinases. *J. Biol. Chem.* 238(10):3330-3335.

Lewis, U.J., Pence, S.J., Singh, R.N.P. and VanderLaan, W.P. 1975. Enhancement of the growth promoting activity of human growth hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67:617-630.

Lewis, U.J., Peterson, S.M., Ronewald, L.F., Seavey, B.K. and VanderLaan, W.P. 1977. A interchain disulfide dimer of human growth hormone. *J. Biol. Chem.* 252:3697-3702.

Lewis, U.J., Singh, R.N.P., VanderLaan, W.P. and Tutwiler, G.F. 1977. Enhancement of the hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymic modification. *Endocrinology* 101:1587-1603.

Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Tutwiler, G.F., Sigel, M.B., VanderLaan, E.F. and VanderLaan, W.P. 1980. Human growth hormone: a complex of proteins. *Rec. Prog. Horm. Res.* 36:477-508.

Lewis, U.J. 1984. Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Annu. Rev. Physiol.* 46:33-42.

- Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Lewis, L.J., Seavey, B.K. and Sinha, Y.N. 1984. Glycosylated ovine prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:385-389.
- Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Sinha, Y.N. and VanderLaan, W.P. 1985. Glycosylated human prolactin. *Endocrinology* 116:359-363.
- Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Lewis, L.J. and Abadi, N. 1988. Multiple forms of growth hormone. *Basic and clinical aspects of growth hormone (Bercu, B.B. ed.)* Serona symposia, Plenum Press, USA. Pp. 43-56.
- Lewis, U.J., Lewis, L.J., Salem, M.A.M., Staten, N.R., Galosy, S.S. and Krivi, G.G. 1991. A recombinant DNA-derived modification of human growth hormone (hGH44-191) with enhanced diabetogenic activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 78:45-54.
- Li, Ch.H., Evans, H.M. and Simpson, M.E. 1945. Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. *J. Biol. Chem.* 159:353-366.
- Li, C. H. and Evans, H. M. 1948. The biochemistry of pituitary growth hormone. *Rec. Prog. Horm. Res.* 3:3-44.
- Li, C.H. and Graf, L. 1974. Human pituitary growth hormone: isolation and properties of two biologically active fragments from plasmin digest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1197-1201.
- Liberti, J.P., Antoni, B.A. and Chlebowski, J.F. 1985. Naturally-occurring pituitary growth hormone is phosphosylated. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:713-720.
- Liberti, J.P. and Joshi, G.S. 1986. Secretion of phosphorylated growth hormone by rat pituitary glands in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:806-812.
- Markoff, E., Sigel, M.B., Lacour, N., Seavey, B.K., Friesen, H.G. and Lewis, U.J. 1988. Glycosylated selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* 123:1303-1306.
- Mena, F., Clapp, C., Aguayo, D., Lorenzo, M.Y. and Martinez-Escalera, G. 1986. Thiol regulation of depletion-transformation and release of prolactin by the pituitary of the lactating rat. *Endocrinology* 118:1795-1802.
- Miller, W.L. and Eberhardt, N.L. 1983. Structure and evolution of growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* 4:97-130.
- Mills, J.B., Kostyo, J.L., Reagan, C.R., Wagner, S.A., Moseley, M.H. and Willhelmi, A.E. 1980. Fragments of human growth hormone produced by digestion with trombin: chemistry and biological properties. *Endocrinology* 107:391-399.
- Mondon, C.E., Reaven, G.M., Ling, N., Lewis, U.J. and Frigeri, L.G. 1988. Amino-terminal peptide of growth hormone enhances insulin action in normal rats. *Endocrinology* 123:827-833.
- Ng, F.M. and Bornsteins, J. 1978. Hyperglycemic action of synthetic C-terminal fragments of human growth hormone. *Am. J. Physiol.* 234:E521-E526.
- Murphy, M.I., Brown, P.S. and Brown, S.C. 1986. Osmoregulatory effects of prolactin and growth hormone in embryonic chicks. *Gen. Comp. Endocrinol.* 62:485-492.
- Nicoll, C.S. and Licht, R. 1971. Evolutionary biology of prolactin and somatotrophins II. Electrophoretic comparison of tetrapod somatotrophins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 17:490-507.
- Nicoll, C.S. 1974. Physiological actions of prolactin. *Handbook of Physiology. (S.R. Geiger ed.)* sec. 7 vol. IV. American Physiological Soc., Washington. Pp. 253-292.

- Nicoll, C.S., Mayer, G.L. and Russell, S.M. 1986. Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocrin. Rev.* 7:169-203.
- Nomura, K., Ohmura, K., Nakamura, Y., Horiba, S.M., Shirakura, Y., sato, Y., Uyihara, H., Ohki, K. and Shizume, K. 1989. Porcine luteinizing hormone isoforms(s): relationship between their molecular structures and renotropic versus gonadotropic activities. *Endocrinology* 124:712-719.
- O'Connell, P.B. and Brady, C.J. 1977. Polyacrylamide gels with modified cross-linkages. *Anal. Biochem.* 76:63-73.
- Oetting, W.S., Tuazon, P.T., Traugh, J.A. and Walker, A.M. 1986. Phosphorylation of prolactin. *J. Biol. Chem.* 261:1649-1652.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- O'Neill, I.E., Houston, B. and Goddard, J.C. 1990. Stimulation of insulin-like growth factor I production in primary cultures of chicken hepatocytes by chicken growth hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 70:40-47.
- Ornstein, L. 1964. Disc electrophoresis-I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121:321-349.
- Paladini, A.C., Pe<sup>ra</sup>, C. and Retegui, L.A. 1979. The intriguing nature of the multiple actions of growth hormone. *Trends Biochem. Sci.* 4: 256-260.
- Papkoff, H., Licht, P., Bona-Gallo, A., MacKenzie, D.S., Oelofsen, W. and Oosthuizen, M. M. J. 1982. Biochemical and immunological characterization of pituitary hormones from the ostrich (*Struthio camelus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 48:181-195.
- Pellegrini, I., Gunz, G., Grisoli, F. and Jaquet, P. 1990. Different pathways of secretion for glycosylated and nonglycosylated human prolactin. *Endocrinology* 126(2):1087-1095.
- Perez, F.M., Malamed, S. and Scanes, C.G. 1989. Growth hormone release from chicken anterior pituitary cells in primary culture: TRH and hpGRF synergy, protein synthesis, cyclic adenosine 3'5' monophosphate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73:12-20.
- Picaper, G., Leclercq, B., Saadoun, A. and Mongin, P. 1986. A radioimmunoassay of chicken growth hormone using growth hormone produced by recombinant DNA biotechnology: validation and observations of plasma hormone variations in genetically fat and lean chicken. *Reprod. Nutr. Dev.* 26(5a): 1105-1114.
- Pierce, J.G. 1974. Chemistry of thyroid-stimulated hormone. *Handbook of Physiology*. (S.R. Geiger ed.) sec. 7 vol. IV. American Physiological Soc., Washington. Pp. 79-101.
- Postel-Vinay, M.C. 1989. R<sub>1</sub>cepteurs de l'hormone de croissance. *Annales d'Endocrinologie* 50:404-408.
- Reagan, C.R., Mills, J.B., Kostyo, J.L. and Willhelmi, A.E. 1975. Isolation and characterization of fragments of human growth hormone produced by digestion with plasmin. *Endocrinology* 96:625-631.
- Retegui, L.A., Scaramal, L.O. and Paladini, A.C. 1987. Proteolytic modification of growth hormone by a rat kidney lysosomal protease. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 37:521-532.



Rosebrough, R.W., McMurtry, E.D. and Vasilatos-Younken, R. 1991. Effect of pulsatile or continuous administration of pituitary-derived chicken growth hormone (p-cGH) on lipid metabolism in broiler-pullets. *Comp. Biochem. Physiol.* 99A(12): 207-214.

Rothman, J.E. and Orci, L. 1990. Movement of proteins through the Golgi stack: a molecular dissection of vesicular transport. *EASEB J.* 4:1460-1468.

Roupas, P. and Herington, A.C. 1987. Receptor-mediated endocytosis and degradative processing of growth hormone by rat adipocyte in primary culture. *Endocrinology* 120:2158-2165.

Roupas, P. and Herington, A.C. 1989. Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61:1-12.

Ryan, R.J., Keutmann, H.T., Charlesworth, M.C., McCromick, D.J., Milius, R.P., Calvo, F.O. and Vutyavanich, T. 1987. Structure-function relationships of gonadotropins. *Rec. Prog. Horm. Res.* 43:383-429.

Sairam, C.G. and Papkoff, H. 1974. Chemistry of pituitary gonadotropins. *Handbook of Physiology*. (S.R. Geiger ed.) sec. 7 vol. IV. American Physiological Soc., Washington. Pp. 111-131.

Sasaki, A., Sato, S., Yumita, S., Hanew, K., Miura, Y. and Yoshinaga, K. 1989. Multiple forms of immunoreactive growth hormone releasing hormone in human plasma, hypothalamus, and tumor tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68(1):180-185.

Scanes, C. G., Hall, T. R. and Harvey, S. 1984. The physiology of growth hormone in poultry. *Domest. Anim. Endocrinol.* 1:201-215.

Scanes, C. G., Harvey, S., and Bolaffi, J. L. 1985. TRH stimulation of in vivo release in the domestic fowl. *Neuroendocrinology* 40:33-38.

Scanes, C.G. 1986. Pituitary gland. *Avian Physiol. 4th. edition* (P.D. Sturkie, ed.). Springer-Verlag, USA. Pp. 383-402.

Scanes, C.G., Harvey, S., Rivier, J. and Vale, W. 1986. Stimulation of in vivo growth hormone secretion in young chickens by rat hypothalamic growth hormone-releasing factor and synthetic analogues. *J. Endocrinol.* 108:413-416.

Seeburg, P.H. 1982. The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA* 1:239-249.

Shah, G.N. and Hymer, W.C. 1989. Prolactin variants in rat adenohypophysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61:97-107.

Singh, R.N.P., Seavey, B.K., Rice, V.P., Lindsey, T.T. and Lewis, U.J. 1974. Modified forms of human growth hormone with increased biological activities. *Endocrinology* 94:883-891.

Sinha, Y.N. and Lewis, U.J. 1986. A lectin-binding immunoassay indicates a possible glycosylated growth hormone in the human pituitary gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145:1368-1375.

Skibeli, V., Andersen, O. and Gautvik, K. 1990. Purification and characterization of atlantic salmon growth hormone and evidence for charge heterogeneity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100:264-270.

Slootweg, H.C., van Buul-Offers, S.C., Hermann, -Erlée, M.P.M. and Duursma, S.A. 1988. Direct stimulatory effect of growth hormone on DNA synthesis of fetal chicken osteoblasts in culture. *Acta Endocrinol.* 118:294-300.

- Sluyer, M. 1963. Possible cause of electrophoretic and chromatographic heterogeneity of pituitary hormones. *Nature* 204:574-575.
- Smith, W.C. and Talamantes, F. 1987. Identification and characterization of a heterogeneous population of growth hormone receptors in mouse hepatic membranes. *J. Biol. Chem.* 262:2213-2219.
- Souza, L.M., Boone, T.C., Murdock, D., Langley, K., Wyupych, J., Fenton, D., Johnson, S., Lai, P.H., Everett, R., Hsu, R. Y. and Bosselman, R.J. 1984. Application of recombinant DNA technologies to studies on chicken growth hormone. *J. Exp. Zool.* 232:465-473.
- Stolar, M.W. and Baumann, G. 1986. Big growth hormone forms in human plasma: immunochemical evidence for their pituitary origin. *Metabolism* 35:75-77.
- Talamantes, F., Lopez, J., Lewis, U.J. and Wilson, C.B. 1981. Multiple forms of growth hormone: detection in medium from cultured pituitary adenoma explants. *Acta Endocr.* 98:8-13.
- Tas, J., de Vries, A.C.I. and Berndsen, R.G. 1979. A method for the quantitative determination of protein incorporated in solubilizable polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 100:264-270.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. and Yonemoto, W. 1990. cAMP-dependent protein kinase framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 971-1005.
- Thomas, H., Gree, J., Wallis, M. and Aston, R. 1987. Heterogeneity of growth hormone receptors detected with monoclonal antibodies to human growth hormone. *Biochem. J.* 243:365-372.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Vanderpooten, A., Huybrechts, L.M., Decuyper, E. and Kuhn, E.R. 1991. Differences in hepatic growth hormone receptor binding during development of normal and dwarf chicken. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:47-55.
- Vasilatos-Younken, R., Cravener, T.L., Cogburn, L.A., Mast, M.G. and Wellenreiters, R.H. 1988. Effect of pattern of administration on the response to exogenous-pituitary-derived chicken growth hormone by broiler-strain pullets. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70:268-283.
- Wagner, G.F., Fargher, R.C., Brown, J.C. and McKeown, B.A. 1985. Further characterization of growth hormone from the chum salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 60:27-34.
- Weigent, D.A. and Blalock, J.E. 1987. Interactions between the neuroendocrine and immune system: common hormones and receptors. *Immunol. Rev.* 100:79-108.
- Weigent, D.A., Baxter, J.B., Wear, W.E., Smith, L.R., Bost, K.L. and Blalock, J.C. 1988. Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *FASEB J.* 2:2812-2818.
- Weigent, D.A. and Blalock, J.E. 1991. The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cell. Immunol.* 135:55-65.

Wieser, D.A., Malgieri, J.A., Ward, W.F., Painter, R.H. and Pain, J.N. 1974. Effects of bovine growth hormone preparation fragments of growth hormone and pituitary anti-insulin peptide on lipolysis and glucose metabolism of isolated fat cells and adipose tissue. *Endocrinology* 95:206-212.

Wilhelmi, A.E. 1974. Chemistry of growth hormone. *Handbook of Physiology* (S.R. Geiger ed.) sec. 7, vol. IV American Physiological Society, USA. Pp. 59-78.

Wroblewski, V.J., Masnyk, M. and Becker, G.W. 1991. Proteolytic cleavage of human growth hormone (hGH) by rat tissues in vitro: Influence on the kinetics of exogenously administered hGH. *Endocrinology* 129(1):465-474.

Yasuda, A., Yamaguchi, K., Papkoff, H., Hirata, T. and Kawauchi, H. 1989. The completed amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia mydas*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 73:242-251.

Yokoya, S. and Friesen, H.G. 1986. Human growth hormone (GH)-releasing factor stimulates and somatostatin inhibits the release of rat GH variants. *Endocrinology* 119:2097-2105.

Young, R.D., Orcutt, M. and Blauwiekel, F.B. 1980. Quantitative measurement of the protein mass and radioactivity in N,N'-diallyltartardiamide crosslinked polyacrylamide slab gels. *Anal. Biochem.* 108:202-206.