Tabla 9.- Condiciones de las ligaciones.

Vector T + Ins		Vector R + Ins		Vector T - Ins		Vector R - Ins	
Desc	µL	Desc	µL	Desc	µL	Desc	µL
VT	2.5	VR	2.5	VT	2.5	VR	2.5
Ins	0.5	Ins	0.5	Ins	-	Ins	-
H_2O	4	H_2O	4	H_2O	4	H_2O	4
B5X	2	B5X	2	B5X	2	B5X	2
Lig	1	Lig	1	Lig	1	Lig	1

Desc: Descripción del reactivo; VT: Vector T; VR: Vector Romo; Ins: Inserto; B5X: Buffer de ligación 5X; Lig: Ligasa

El volumen de reacción fue de 10µL y se llevó a cabo por toda la noche a 16°C. Bajo estas condiciones se pusieron a ligar aproximadamente 450 ng de Vector T con 140 ng de inserto y 400 ng de Vector Romo con 140 ng de inserto guardando aproximadamente la relación de 3:1. Al realizarse en un volumen de 10 µL, la concentración total de DNA era de aproximadamente 50 ng/µL. Una vez completadas las 12 a 16 h, se procedió a realizar la transformación.

2.3.4.2. Transformación en *E. coli.*

Se utilizaron células competentes recién preparadas con una eficacia de 6 X 10^8 cel/pg de DNA superenrrollado. Se procedió a transformar a las bacterias con el producto de la ligación, usando 1/3 de la ligación, siendo esto aproximadamente 200 ng de DNA ligado. La transformación consistió en agregar el DNA a transformar a 100-120 µL de bacterias competentes en un tubo eppendorf de 1.5 mL en hielo. Se incubó por 30 min en hielo y se procedió a aplicarle un choque térmico a 42°C por 90 segundos.

Inmediatamente después se les agregó 1 mL de medio LB (sin antibiótico) y se dejaron crecer por 1 hr a 37°C con agitación suave. Una vez concluido este tiempo, se centrifugó por 3 min a 14000 rpm, se eliminó la mayor parte del sobrenadante (dejando solo aproximadamente 100 μL) y el resto se resuspendió y se sembró en una placa conteniendo el antibiótico (marcador de selección) adecuado. De las colonias resultantes se escogieron las clonas que potencialmente podían haber insertado el fragmento de interés. El vector pBS lleva un segmento de DNA derivado del operon *lac* de *Escherichia coli* que codifica para el fragmento amino terminal de β-galactosidasa. Este fragmento, cuya síntesis puede ser inducida por isopropil-tio-β-D-galactosido (IPTG), es capaz de complementarse de manera intra-alelica (α) con una forma defectuosa de β-galactosidasa codificada por el hospedero. Bacterias expuestas al inductor (IPTG) sintetizan ambos fragmentos de la enzima y forman colonias azules cuando son plaqueadas en medio que contiene el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosido (X-gal). La inserción de un DNA extraño en el sitio de policlonación del plásmido inactiva el fragmento amino-terminal de β-galactosidasa evitando la α-complementación. Bacterias llevando plásmidos recombinantes, por lo tanto, dan lugar a colonias blancas.

2.3.5. Caracterización de las clonas candidatas.

Todas las colonias blancas fueron levantadas y crecidas en medio LB toda la noche y posteriormente se les realizó una extracción del DNA

plasmídico. La primer caracterización consistió en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, donde se hace evidente una migración retrasada en comparación con el vector solo, ya que las clonas llevan 345 pb más. Las clonas que migraron de manera retrasada fueron sometidas a digestiones analíticas con una enzima que liberó fragmentos de tamaño conocido y permitieron diferenciar positivamente la inserción del fragmento deseado. Además con esta enzima se dedujo la dirección en la que se introdujo el fragmento, ya que al ser una ligación por Vector T, el fragmento pudo insertarse en ambas direcciones. La enzima que se usó para confirmar la inserción y para deducir la orientación fue *Pvu* II, cuyos patrones de digestión se muestran en la tabla 10.

Tabla 10.- Tamaño de los fragmentos liberados al digerir los productos del vector T con la enzima de restricción *Pvu* II.

pBS SK	VT 5'-3'	VT 3'-5'
2513	2513	2513
445	615	500
	174	289

El término 5'-3' o 3'-5' se refiere a en que orientación quedaron dichos extremos del DNAc de bGH con respecto a la orientación del vector. En la figura 8 se muestran mapas de dichos plásmidos.

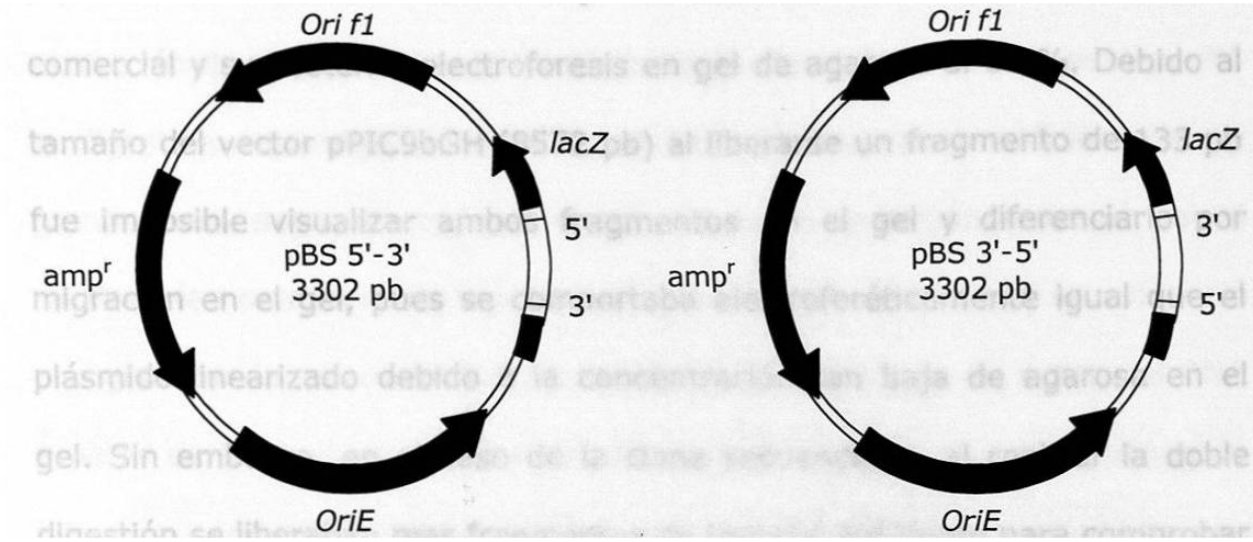


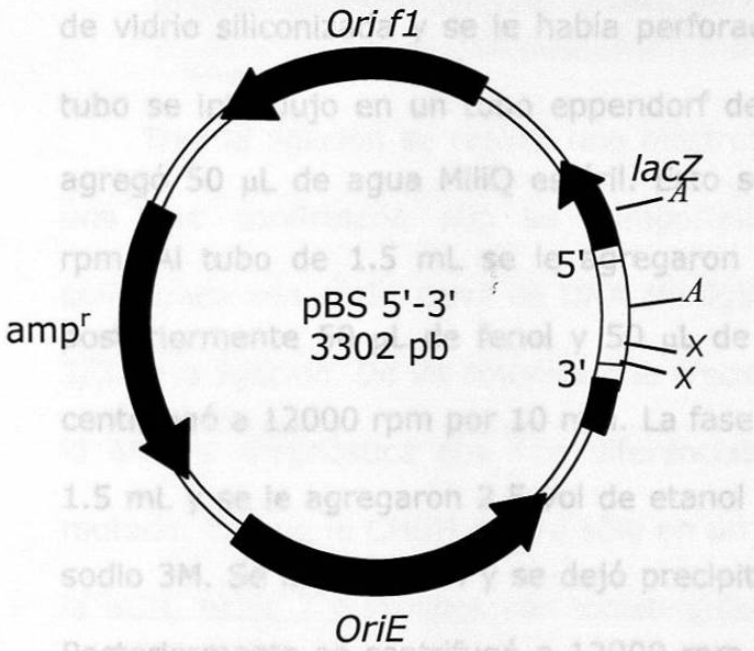
Figura 8.- Posibles vectores derivados de la clonación por vector T. En esta figura se muestran los dos vectores resultantes dependiendo de la inserción del producto amplificado. La orientación del producto de PCR se indica de 5' a 3' en referencia al DNAc de bGH.

Confirmada la inserción del fragmento y deducida la dirección, se procedió a secuenciar por el método de Sanger modificado para comprobar que el marco de lectura se mantuvo íntegro a excepción de las bases a mutagenizar.

2.3.6. Subclonación en el vector de expresión pPIC9bGH.

Realizada la secuenciación y confirmada la integridad del marco de lectura se procedió a subclonar el inserto en el vector de expresión pPIC9bGH. Se usaron las enzimas *Apa* I y *Xma* I para liberar el fragmento que contenía la zona del codón 129 y de igual manera al digerir la clona secuenciada con estas enzimas se liberó el mismo fragmento, pero mutagenizado. Dicho fragmento liberado resultó tener una longitud de 133 pb. Lo primero que se llevó a cabo fue una digestión preparativa del

pPIC9bGH con ambas enzimas bajo las condiciones descritas por la casa comercial y su posterior electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Debido al tamaño del vector pPIC9bGH (8572 pb) al liberarse un fragmento de 133 pb fue imposible visualizar ambos fragmentos en el gel y diferenciarlo por migración en el gel, pues se comportaba electroforéticamente igual que el plásmido linearizado debido a la concentración tan baja de agarosa en el gel. Sin embargo, en el caso de la clona secuenciada, al realizar la doble digestión se liberaban mas fragmentos de tamaño suficiente para comprobar que ambas enzimas habían digerido correctamente (Figura 9).



Doble digestión con Apa I & Xma I de la clona pBS 5'-3'.
2904
240
133
25

Figura 9.- Doble digestión de la clona pBS 5'-3'. *A* indica los sitios *Apa* I en el vector, mientras que *X* se refiere a los sitios de restricción para la endonucleasa *Xma* I. En la tabla adjunta se muestran los tamaños liberados en pares de bases (pb).

Ya que ambos DNAs se digirieron bajo las mismas condiciones y en la clona secuenciada fue obvio que la doble digestión se llevó a cabo, se dedujo que pPIC9bGH también había sido digerido. Una vez obtenidas las

digestiones se procedió a purificar el fragmento de 133 pb a partir de extracción de la banda en gel. Después de la digestión analítica, se depositó la digestión en un gel de agarosa al 2.0% con un pozo suficientemente grande para depositar todo el contenido de la digestión y en el gel al revelarlo en presencia de bromuro de etidio y luz ultravioleta se evidenció una gran banda que concordaba con el tamaño de 133 pb. Se extrajo el DNA a partir de la banda como a continuación se describe: Se cortó la banda de interés, usando una hoja de bisturí nueva en un transiluminador con una longitud de onda alta, para que no dañe el DNA. La banda se depositó en un tubo eppendorf de 0.6 mL al que previamente se la había introducido fibra de vidrio siliconizada y se le había perforado el fondo con una aguja. Este tubo se introdujo en un tubo eppendorf de 1.5 mL y al tubo de 0.6 se le agregó 50 μL de agua MiliQ estéril. Esto se centrifugó por 6 min a 12000 rpm. Al tubo de 1.5 mL se le agregaron 200 μL de agua. Se agregaron posteriormente 50 μL de fenol y 50 μL de sevag, se agitó en vortex y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. La fase acuosa se trasladó a un tubo de 1.5 mL y se le agregaron 2.5 vol de etanol al 100% y 0.1 vol de acetato de sodio 3M. Se mezcló bien y se dejó precipitando a -70°C por toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y después de evaporar los restos de etanol, se resuspendió en TE. Finalmente se realizó una electroforesis para verificar la calidad y cantidad de DNA recuperado.

Una vez semicuantificados el vector y el fragmento se procedió a realizar la ligación de éstos. Ahora el vector (64.5 veces mas grande que el inserto) requeriría una menor cantidad de el fragmento de 133 pb para guardar la relación molar de 1:3 Vector:Inserto. Las condiciones de ligación se describen en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones de ligación de pPIC9bGH digerido y la banda 133 mutagenizada purificada.

pPIC9bGH doble digestión	3 µL	Equivalente a 1050 ng
Banda 133 purificada	0.5 µL	Equivalente a 50 ng
Agua	3.5 µL	-
Buff 5X	2 µL	1 X
Ligasa	1 µL	3 unidades
Ligación a 37°C por 4 h.		

Volumen final de 10 µL.

Tras la ligación se realizó una electroforesis para verificar la misma y una vez confirmada por su comportamiento electroforético diferente comparado con el del carril de DNA sin ligar, se procedió a transformar con 1/3 de la ligación. De las colonias que crecieron se procedió a tamizarlas con la enzima diagnóstica que nos diferenciaba entre pPIC9bGH intacto y el mutado. Ya que la CHGH difiere sólo en un aminoácido en el codón 129 con la bGH, estos 2 plásmidos son indistinguibles uno del otro al ser digeridos con endonucleasas de restricción, excepto por algunas enzimas cuyo sitio se ve afectado en la mutagénesis. Ejemplos de estas enzimas son *Nla* IV, *Mae* III y *Ban* I. Esta última es la que se usó para caracterizar y produjo un patrón de bandas apropiado para distinguir entre pPIC9bGH y pPIC9chGH (Tabla 12).

Tabla 12.- Digestión de los plásmidos pPIC9bGH y pPIC9chGH con la endonucleasa de restricción *Ban* I. Tamaño de los fragmentos liberados en pares de bases.

pPIC9bGH	pPIC9chGH
2659	2659
1831	1831
1738	1738
601	***679***
504	504
504	504
371	371
114	114
78	69
69	43
43	39
39	21
21	

El patrón electroforético sigue siendo muy similar, pero específicamente las bandas de 601 y 679 son distinguibles en un gel de agarosa al 1.5% esto fue lo que nos diferenció clonas positivas a la inserción del fragmento de interés con las que no lo eran. Las condiciones en que se realizó la digestión analítica se describen en la tabla 13.

Tabla 13.- Condiciones de la digestión analítica con la endonucleasa de restricción *Ban* I.

Reactivo	µL en la reacción[a]	Concentración final
Buffer NEB4[b] 10X	1.5	1X
Agua	11	-
DNA 1µg/µL	2	133 ng/µL
Enzima[c] 10U/µL	0.5	0.3U/µL

[a]15 µL volumen final.
[b]Buffer 4 de New England Biolabs (Acetato de potasio 50mM, tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 1mM, pH 7.9 @25°C).
[c]Enzima *Ban* I, New England Biolabs.

Lo último que se realizó para caracterizar las clonas candidato positivas a la digestión con *Ban* I, fue una digestión con 6 enzimas que contienen múltiples cortes para verificar la integridad del vector, principalmente las enzimas *Apa* I y *Xma* I que fueron las que abrieron el camino para la introducción del fragmento. Dichas enzimas fueron además de las ya mencionadas: *Pvu* II, *Msp* I, *Bgl* II y *Nci* I. Las condiciones de digestión se realizaron según las indicaciones de cada enzima. Todas estas enzimas generarían un patrón electroforético idéntico al de pPIC9bGH, por lo que las digestiones se hicieron a la par con este último plásmido, para eliminar cualquier clona con patrón electroforético aberrante.

Las clonas que resultaron positivas a la digestión con las enzimas se consideraron para realizar la transformación de las levaduras. A estos plásmidos se les asignó el nombre pPIC9chGH.

2.3.7. Transformación de levaduras.

Lo primero que se hizo fue digerir el DNA de pPIC9chGH con la enzima *Sac* I para linearizar el plásmido y prepararlo para que se llevara a cabo la inserción génica en el genoma de *P. pastoris* y semicuantificarlo. Para insertar el DNA que ahora codifica para la hormona del crecimiento caprino, se usó el método de transformación de levaduras con cloruro de litio, el cual es una versión modificada del procedimiento descrito para *S. cerevisiae* (Gietz, 1995). El acetato de litio no funciona con *Pichia pastoris* por lo que debe usarse exclusivamente cloruro de litio. El procedimiento que se siguió

se describe a continuación: se prepararon levaduras competentes incapaces de crecer en un medio carente de histidina, en este caso se usó la cepa GS115. Primeramente, se creció un cultivo de *P. pastoris* en 50 ml de YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa) a 30°C con agitación de 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 - 1.0. se cosecharon las células por medio de una centrifugación a temperatura ambiente. (1500 rpm por 10 min) y se lavaron con 25 ml de H_2O estéril. Se repitió la centrifugación. Se decantó el agua y se resuspendieron las células en 1 ml de LiCl 100 mM. Se transfirió la suspensión celular a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se empastilló a máxima velocidad por 15 seg y se removió el LiCl. Finalmente, las células se resuspendieron en 400 µl de LiCl 100 mM. Esto debe usarse inmediatamente para transformar, de otra manera, se reduce la capacidad de transformación considerablemente. De esto se tomaron 50µL de células para cada transformación. Se hirvió DNA de cadena sencilla por 5 min y se colocó en hielo inmediatamente. Se centrifugaron los 50µl de la solución de células-cloruro de litio y se eliminó el sobrenadante con una pipeta. Se agregaron los siguientes reactivos en el siguiente orden: 240 µL de Polietilenglicol 50% (PM 3350), 36 µL de LiCl 1M, 25 µL de DNA cadena sencilla a 2 µg/µL, 5-10 µg de DNA plasmídico linearizado en 50 µL de agua estéril. Se agitó en vortex cada tubo vigorosamente hasta que la pastilla celular se mezcló completamente, se incubó el tubo a 30°C por 30 min sin agitación. Se le aplicó un choque térmico en un baño de agua a 42°C por 20-25 min. Se centrifugaron los tubos a 6000 rpm por 3 min y se removió la solución transformante con una

pipeta y la pastilla se resuspendió suavemente en 1 mL de agua estéril. Se usaron de 25 a 100 μL de esta solución para plaquear. En 3-5 días crecieron las colonias transformadas.

2.3.8. Caracterización de las clonas recombinantes.

Para caracterizar las clonas que crecieron en las placas carentes de histidina, fue necesario realizar una PCR con unos iniciadores que flanquean al gen *AOX1*, y que al llevarse a cabo la inserción génica, el gen insertado queda flanqueado por estas mismas secuencias, ya la PCR da lugar a dos productos amplificados, uno del gen *AOX1* intrínseco de la levadura y otro del gen de interés que está flanqueado por estas regiones. Es importante llevar a cabo esta PCR porque algunas veces puede haber reversión espontánea de His^- a His^+ y crecer en ausencia de histidina o puede ser que el fenómeno de recombinación incorporó el gen de histidina, pero no el gen de interés.

Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 14. Para el DNA a usar como templado se usó la técnica de PCR directo descrito por Linder *et al.* en 1996 usando liticasa para liberar el DNA de las clonas. A continuación se describe el protocolo de esta técnica: se tomó con un palillo de dientes estéril una colonia de una placa y se resuspendió en 10 μL de agua estéril. Se le agregaron 5 μL de una solución de 5U/μL de liticasa (Sigma), se

mezcló y se incubó a 30°C por 30 min. La muestra se colocó a -80°C por 15 min y se tomaron 5 μL para la reacción de PCR.

Tabla 14.- Concentración de los reactivos usados en la PCR.

Reactivo	Concentración stock	Cantidad (μL)[a]	Concentración final
Agua MiliQ	-	9	-
Buffer[b]	10X	2.5	1X
$MgCl_2$	25mM	1.5	1.5mM
dNTP's	10mM	0.5	200μM
AOX1 5'	5μM	2.5	0.5μM
AOX1 3'	5μM	2.5	0.5μM
DMSO	100%	1.25	5%
Taq Polimerasa[c]	5U/μL	0.25	0.05U/μL
DNA	-	5.0	-

[a] Volumen final de reacción 25 μL.
[b] Buffer 10X: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.0 y Tritón X-100 al 1.0% (Promega)
[c] Buffer de almacenamiento A: Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 100mM, EDTA 0.1 mM, DTT 5mM, glicerol 50% y Tritón X-100 1.0% (Promega)

Otro procedimiento para comprobar la identidad de las clonas mutagenizadas, fue realizar una PCR con oligonucleótidos que amplifican el DNAc de bGH a partir de DNA genómico de la levadura candidata. Esta PCR da lugar a un producto que al digerirlo con la enzima diagnóstica hace evidente la diferencia nucleotídica al liberar fragmento de diferentes tamaños. La secuencia de los oligonucleótidos usados es la siguiente (Gallardo en 1999): 97: 5' ccgctcgagaaaagattcccagccatgtccttgtc 3' y 98: 5' ggccctaggctagaaggcgcagc 3'.

La PCR da a lugar un fragmento de 597 pares de bases, correspondientes al DNAc de bGH, el cual, al ser digerido por *Ban* I libera el siguiente patrón de bandas, dependiendo si se trata de bGH o de la

mutagénesis que da origen a chGH: pPIC9bGH: 321, 198 y 78. pPIC9chGH: 321 y 276. La diferencia en los tamaños es debida a la pérdida de un sitio de restricción originada por la mutagénesis. Esta diferencia en tamaños es evidente en un gel de agarosa al 1.0%. Las clonas que resultaron positivas para los experimentos de PCR se tomaron para el siguiente paso, que es lo correspondiente a la frementación.

2.3.9. Fermentación con clonas recombinantes.

Una vez que las clonas fueron caracterizadas para la inserción génica, se procedió a hacer una fermentación para confirmar la expresión de la proteína de interés. Se utilizaron las condiciones óptimas determinadas previamente en el laboratorio para BGHr. Se utilizó el buffer BMGY o BMMY, el cual está compuesto de 1% Extracto de levadura, 2% Peptona, 100mM del buffer, 1.34% YNB (base nitrogenada de levadura), $4x10^{-5}$ Biotina, 1% Glicerol/0.875% Metanol. El buffer que se usó fue el de citratos pH 5.15. BMGY se refiere a que la fuente de carbono será el Glicerol, mientras que BMMY su fuente de carbono será el Metanol.

El experimento se realizó como a continuación se describe:

Primeramente se estrió en una placa de medio YPD la cepa de levadura y se dejó creciendo a 30°C. Se inoculó una colonia en 2 ml de BMGY y se dejó crecer toda la noche con agitación de 250 rpm a 30°C. A partir de este tubo se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de medio BMGY. Se

monitoreó en espectrofotómetro hasta que alcanzó una OD_{600} de 4 - 5 y de ahí se tomó el volumen necesario para iniciar la fermentación a una OD_{600} aproximada de 1.4. El volumen necesario se depositó en un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó a 6500 rpm por 7 min. Se decantó el medio y la pastilla se resuspendió en 50 mL del medio BMMY. El medio con la pastilla resuspendida se transfirió a un matraz de 250 mL y se dejó agitando a 250 rpm a 30°C. El experimento consistió de 3 matraces para cada clona: inducción y un duplicado y un control sin inducir. Este último matraz fue con medio BMGY. Se alimentaron las levaduras cada 24 h por 120 h, con metanol a las inducidas y con glicerol al control sin inducir. Al momento de alimentar, también se tomaron muestras de cada matraz para monitorear la OD_{600}. A un tubo eppendorf de 1.5 mL con 990 μL de medio, se le agregaron 10 μL del matraz y así se repitió para cada uno de los matraces.

Todas la muestras fueron leídas en el espectrofotómetro y se registraron sus densidades a lo largo del experimento. Concluidas las 120 h, se empastilló y recuperaron los medios. Los medios se almacenaron a -20°C y se procedió a recuperar la proteína recombinante.

2.3.10. Semipurificación de la proteína recombinante.

Para recuperar la proteína recombinante del medio de cultivo se siguió la siguiente estrategia:

El medio fue precipitado usando 40% de sulfato de amonio a 4°C en un vaso de precipitado usando agitación suave. El sulfato de amonio correspondiente para precipitar el medio no fue agregado todo de una vez, sino que se fraccionó en 5 partes y se iba agregando poco a poco. Una vez disuelta la primera fracción se agregó la siguiente y así sucesivamente. Una vez agregado el sulfato de amonio en su totalidad, se dejó el precipitado por 2-4 h extra sin agitación a 4°C. Cumplido este tiempo, el medio precipitado fue transferido a tubos de policarbonato para ser centrifugado en una ultracentrífuga a 30,000 rpm por 30 min. El sobrenadante se eliminó por decantación y la pastilla resultante fue resuspendida de 500 μL de PBS pH 7.1 por cada 50 mL de medio inicial.

Para la purificación se escogió el método de Filtración en Gel o Cromatografía de Exclusión por Tamaño (Size Exclusion Chromatography). Se usó la resina Sephacryl HR S-100 y se empacó en una columna de vidrio. Usando un sistema de cromatografía de baja presión, se eluyó después de depositar 250 μL de la proteína precipitada. La columna que se usó tenía un tamaño de 1.4/45 cm, el eluente fue PBS pH 7.1 con un flujo de 0.4 mL/min y se contaba con un sistema de detección de absorbancia a 280 nm. Las fracciones se recolectaron y fueron visualizadas en geles de policarilamida en condiciones desnaturalizantes.

2.3.11. Semicuantificación de la proteína recombinante.

Para tener un estimado de la cuantificación de la proteína recombinante se procedió a realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida usando un control cuantificado y con las herramientas del programa computacional *Molecular Analyst 1.5* se comparó la densidad óptica registrada.

2.3.12. Ensayos de actividad biológica.

Para confirmar la actividad biológica de la hormona producida se realizaron una serie de ensayos descritos a continuación. Está demostrado que las GHs de varias especies promueven la conversión adipocítica de preadipocitos de ratón (fibroblastos 3T3 de la línea celular F442A). Estas células poseen receptores para GH y cultivadas en un medio con mínima actividad adipogénica (bajo contenido de suero), al añadír alguna GH de interés, se puede determinar la actividad biológica de ésta, mediante su capacidad de diferenciar preadipocitos a adipocitos. Este proceso involucra cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos. Los fibroblastos acumulan triglicéridos en el citoplasma, los cuales pueden ser detectados con Rojo Oleoso. La diferenciación es acompañada por un gran incremento en la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, entre ellas la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH).

2.3.12.1. Propagación de los pre-adipocitos.

Para determinar el efecto adipogénico de una GH, se midió la actividad de la GPDH en los extractos proteicos de las células expuestas a la hormona (Morikawa, 1982; Morikawa, 1984) se usó como base el protocolo descrito por Juárez-Aguilar y cols (1999):

Las células 3T3-F442a se propagaron en Medio Eagle modificado por Dulbecco-Vögt [DMEM, glucosa 4 g/l, suplementado con 5% (v/v) de suero de ternera] hasta que se alcanzó la confluencia, en botellas de cultivo celular de 25 cm^2. Se cosecharon las células por tripsinización, para lo cual se agregaron 3-4 ml de solución de tripsina a la botella y se incubó a 37°C por 5 min. Se desprendieron completamente las células y se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min. Se retiró el líquido con micropipeta, teniendo cuidado de no eliminar las células empastilladas. Se resuspendieron éstas en 1-3 ml de DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera. Se sembraron las células en las placas, colocando 500µl por pozo. Se incubaron las células por 4 días a 37°C y en una atmósfera con 5 % de CO_2. Al cumplirse el cuarto día de incubación (96 h), se hizo el cambio de medio a DMEM suplementado con 1.75% (v/v) de suero de gato, 0.25% (v/v) de suero de ternera, insulina a 5 µg/ml, transferrina a 5 µg/ml, EGF a 0.01 ng/ml, biotina a 1.0 µM, triyodotironina a $1x10^{-9}$ M y β-mercaptoetanol a 40 µM (500-1000 µl de medio por pozo) y 200 ng de CHGH. El testigo positivo de diferenciación es el mismo medio pero adicionado 200 ng de HGH. El control negativo fue el cultivo sin suplementar la hormona. Se incubaron las células por 7 días y

con los cultivos se practicaron dos tipos de determinaciones: la actividad específica de GPDH en extractos celulares y la tinción con Rojo Oleoso de las células adipocíticas.

2.3.12.2. Tinción con Rojo Oleoso.

Las células fueron lavadas con PBS y fueron fijadas con formalina al 10% por 30 min. Fijadas las células, se procedió a teñirlas con la solución de Rojo Oleoso durante 30 min. Las células teñidas fueron lavadas con PBS tres veces y se procedió a observarlas en el microscopio.

2.3.12.3. Cuantificación de lípidos.

Se cuantificaron los lípidos por la metodología descrita por Juárez-Aguilar en 1995. Al cultivo celular teñido se le extrajo el rojo oleoso con 1000 μL de isopropanol. Primero se agregaron 500 μL a la placa, se recuperaron en un tubo eppendorf y después se agregaron otros 500 μL que se sumaron a los recuperados previamente. El espectrofotómetro se ajustó a 510 nm y se calibró a cero con isopropanol. Posteriormente se determinaron las absorbancias de los extractos.

2.3.12.4. Obtención de los extractos celulares para cuantificar la actividad de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH).

El grado de diferenciación alcanzado por los cultivos, se evaluó mediante la determinación de la actividad de la GPDH de los extractos celulares, de acuerdo al procedimiento de laboratorio que se describe a continuación.

2.3.12.4.1. Obtención de extractos celulares y cuantificación de proteínas.

A continuación se describe la metodología descrita por Gamou y cols en 1990 para la obtención de extractos celulares y cuantificación de proteínas: una vez alcanzados los 7 días, se eliminó totalmente el medio de cultivo de cada pozo. Se agregaron 400 µl de tripsina (0.025%) a cada pozo, se agitó en círculos suavemente y se incubó a 37ºC por 5 min, se agitó nuevamente, y se revisó en el microscopio que las células estuvieran totalmente desprendidas. Se agregaron a cada pozo 600 µl de PBS 1X frío y la suspensión celular se transfirió en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. Se centrifugó a 5000 rpm en microcentrífuga por 5 min a 4ºC y se descartó el sobrenadante con cuidado. Se agregó 1 ml de PBS 1X frío a cada tubo y se mezcló una vez por inversión, se centrifugó y se descartó el sobrenadante

procurando eliminar el líquido en su totalidad. Se añadieron 100 µl de buffer de extracción (Triton X-100 0.5 %, Tris-Cl 10 mM, $MgCl_2$ 1 mM, KCl 20 mM, DTT 0.2 mM y glicerol 10 %) helado por tubo y se resuspendió por pipeteo suave (puntillas de 200 µl). Se congeló a -70ºC por 10 min, se descongeló a temperatura ambiente por 5 min, y se colocaron los extractos en hielo. Se mezclaron suavemente y se repitió la congelación a -70ºC por 10 min. Después de centrifugar a 12,000 rpm por 30 min, se conservó el sobrenadante a -70ºC. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford, realizando una curva de calibración con un estándar de BSA (albúmina sérica bovina) a 2 µg/µl, preparada en buffer de extracción. Se determinó la concentración de cada extracto, se mezclaron 10 µl de extracto con 1990 µl de reactivo de Coomassie, se mezcló la solución, se incubó por 5 min. y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. En base a las absorbancias de las muestras y de los estándares, se calculó la concentración proteica en cada extracto.

2.3.12.4.2. Cinética enzimática para calcular actividad específica de GPDH.

La GPDH es una enzima clave en la lipogénesis. La unidad enzimática para la GPDH está definida como la conversión de 1 µmol de DHAP (Dihidroxiacetona Fosfato) a GP (glicerol fosfato) por min a pH 7.4 y a 25ºC. Para esto se oxida el NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido reducido). La presencia de NADH en la reacción puede ser medida por la

absorción a 340 nm; el decremento en la absorción indica la oxidación del NADH a NAD (Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado). Para cuantificar la actividad específica de cada extracto (degradación de NADH/mg de proteína/min) y determinar el efecto de la GH, es necesario hacer una curva de calibración con GPDH purificada, pero bajo las condiciones de reacción en las cuales se evalúa la actividad enzimática de los extractos. Para cada reacción se mezclaron: 800 µl de mezcla de reacción + GPDH diluída en buffer de extracción (1 miliunidad/µl) + buffer de extracción para completar 1000 µl. Las reacciones fueron incubadas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml a 25°C por 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron 100µl de la reacción a otro tubo previamente cargado con 11 µl de SDS al 20%, y se mezcló el contenido. Los 900 µl restantes se incubaron otros 40 min. Transcurrido el segundo tiempo de incubación, se detuvo la reacción con 100µl de SDS 20% y se ajustó a cero la absorbancia a 340 nm con 800 µl de mezcla de reacción (sin NADH ni DHAP) + 200 µl buffer de reacción (en celda de cuarzo de 1 cm de longitud). Las reacciones detenidas a los 5 min se consideraron como el tiempo cero o inicial, y las reacciones detenidas a los 40 min como el tiempo final. Para los extractos celulares se procedió igual, pero las reacciones se hicieron con 20 µg de proteína (menos de 100 µl), y se completó con buffer de reacción a 1 ml. Se determinó de igual manera el cambio de abs/min , dividiendo el resultado entre 6.22×10^{-3} l x cm/nmol y después entre la cantidad de proteína en microgramos y finalmente multiplicado por 1000 para sacar la actividad específica por mg

de proteína en nanomoles de NADH/min/mg de proteína y así se determinó el equivalente en miliunidades de GPDH.

Fórmula para determinar nm de NADH por minuto por μg de proteína:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{Abs 340 nm}}{\text{t (min)}} \times \frac{1}{6.22 \times 10^{-3} \frac{\partial * \text{cm}}{\text{nmol}}} \times \frac{1}{\text{l (cm)}} \times \frac{1}{\mu\text{g de proteína}}$$

donde ΔAbs 340 nm es la diferencia de absorbancia (t_0-t_{final}), 6.22 X 10^{-3} es el coeficiente de extinción molar, l (cm) es la longitud de la celda del espectrofotómetro, t (min) es el tiempo de incubación en min.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Diseño del oligonucleótido mutagénico.

Una vez analizadas las secuencias de los DNAcs de la BGH y de la CHGH y que se encontró el área exacta donde los cambios nucleotídicos generan el cambio aminoacídico, se estableció la secuencia a usar en el oligonucleótido mutagénico, la cual resultó ser la siguiente: 5' ccagcccgggggt**aa**catcttc 3'. Dentro de este oligonucleótido se indican en negritas los cambios en nucleótidos que dieron lugar al cambio aminoacídico deseado.

Para el diseño del cebador mutagénico se emplearon los programas computacionales *Oligo* 4.0 y *Amplify* 1.2. Con el primero se calcularon la temperaturas medias de fusión teóricas (en la figura 10 se muestran las características del iniciador mutagénico y del que se usó como su pareja). Las temperaturas de fusión medias (Tm) son muy parecidas, lo que resultó ser muy útil al momento de calcular la temperatura de apareamiento de la PCR, porque se empleó una temperatura alta que redundó en una mayor especificidad.

Oligonucleótido: 85	
5' CTGCACCAGCTGGCTGCTGACAC 3'	
Longitud	23-mer
T_m	75.6 °C
$\Delta G(25°C)$	-45.4 kcal/mol
1/E	4.91 nmol/A260 34.7 µg/A260
Oligonucleótido: 9bGH	
5' CCAGCCCGGGGGGTAACATCTTC 3'	
Longitud	23-mer
T_m	75.4 °C
$\Delta G(25°C)$	-50.6 kcal/mol
1/E	4.70 nmol/A260 33.4 µg/A260

Figura 10.- Datos sobre los oligonucleótidos usados en la PCR mutagénica. Se incluyen los datos más relevantes sobre los oligonucleótidos, arrojados por el programa computacional *Oligo* 4.0.

Posteriormente, con del programa computacional *Amplify* 1.2 se simuló una PCR para estimar el tamaño del producto y para obtener parámetros tales como la Tm del fragmento y el contenido de guaninas – citocinas, útiles en el cálculo de la temperatura de apareamiento teórica. En la figura 11 se muestran los resultados arrojados por este programa.

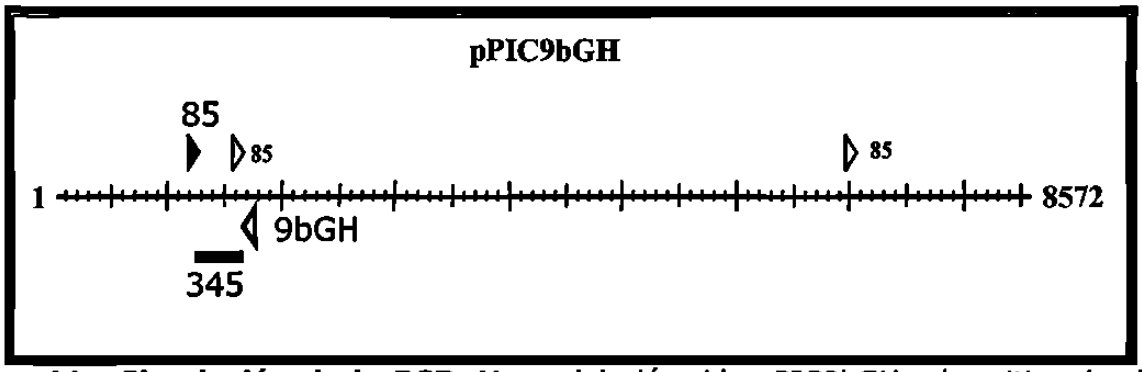


Figura 11.- Simulación de la PCR. Mapa del plásmido pPIC9bGH y los sitios donde teóricamente los oligonucleótidos seleccionados para la PCR mutagénica se aparearían. Las líneas pequeñas indican 100 pb, las medianas 500 pb y las grandes 1000 pb. El DNAc de bGH se encuentra entre el 1150 y el 1750.

Los triángulos representados en la figura 11 indican que el cebador 85 presenta una buena capacidad de servir como iniciador (primabilidad) y una buena estabilidad comparado con el cebador mutagénico, pero a pesar de este último, el producto de amplificación se predice con una buena intensidad, indicada por el grosor de la banda.

A continuación se muestran los resultados provenientes también del programa *Amplify* 1.2 sobre la primabilidad y estabilidad, así como una tabla donde se muestran los resultados de los cálculos realizados con la fórmula descrita en el apartado 2.3.2.

Resultados del programa Amplify 1.2

```
Cebador: 85
--------------------
Primabilidad =  99%
Estabilidad de apareamiento =  78%

                      5´                        3´
                       CTGCACCAGCTGGCTGCTGACAC
                       |||| |||||||||||||||||
acgctgtgctccgggctcagcacctgcatcagctggctgctgacaccttcaaagagtttgagcgcaccta
                       |                        |
                      1261                     1283

Cebador: 9bGH
--------------------
Primabilidad =  89%
Estabilidad de apareamiento =  78%

                      1582                     1604
                       |                        |
tcctggccctgatgcgggagctggaagatggcacccccgggctgggcagatcctcaagcagacctatga
                       |||||||  |||||||||||||||
                       GAAGATGTTACCCCCCGGGCTGG
                      3´                        5´

Longitud del fragmento 345 (incluyendo cebadores)

Cebador izquierdo: 85      Cebador derecho: 9bGH
Secuencia blanco de 1283 a 1582     contenido de GC = 58.0%
```

Tap	Tmp	Tmf	L	%GC
64.93	75.4	81.73	345	58

Con estos parámetros se programó el termociclador con las condiciones descritas en el apartado 2.3.2.

3.2. PCR mutagénica.

En la figura 12 se muestra un gel de agarosa al 2% mostrando el resultado de la PCR.

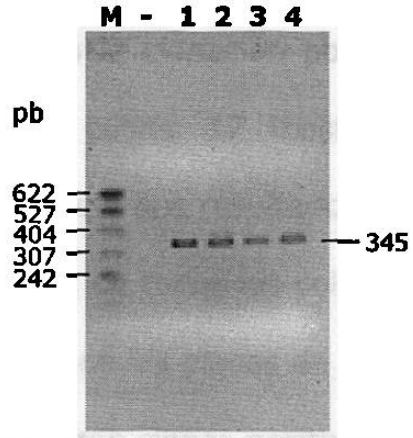


Figura 12.- PCR mutagénica. Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de amplificación a partir del plásmido pPIC9bGH. En el primer carril se muestra al marcador de peso molecular, en el siguiente el control negativo y los siguientes son productos de amplificación.

Es importante notar que el producto amplificado se muestra en el gel como una banda única, indicando que las condiciones usadas fueron muy apropiadas. Esto es importante porque reduce las probabilidades de que al hacer la clonación en al Vector T se incorpore algún producto no deseado.

En la figura 13 se muestra el gel de las minipreparaciones que sirvieron para identificar las clonas que habían insertado el fragmento de interés.

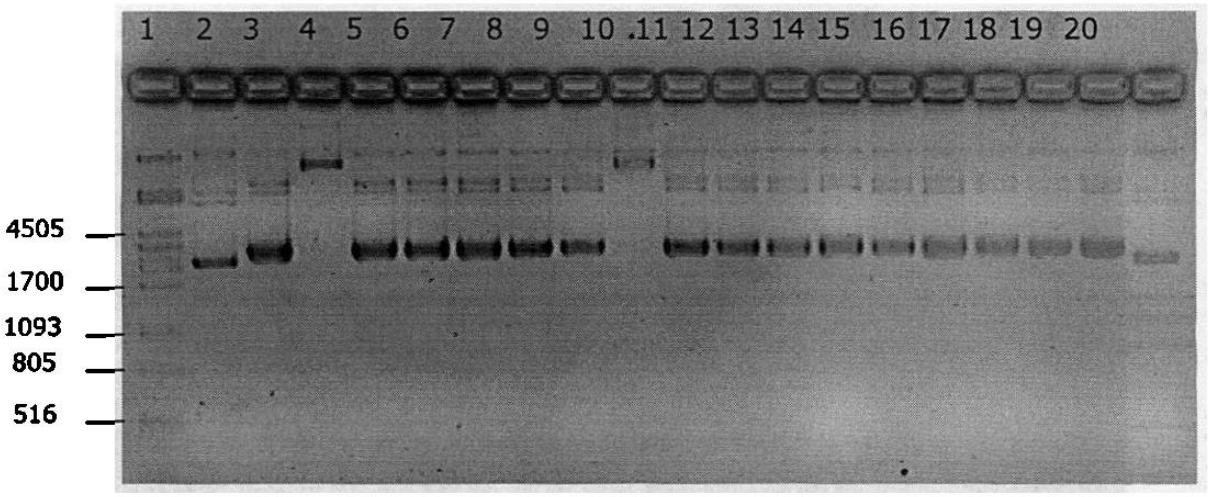


Figura 13.- Identificación de clonas recombinantes. Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra la migración retardada de las clonas positivas a la inserción. 1: λ + *Pst* I; carriles 2 y 20: pBS sin inserto; carriles 4 y 10: clonas descartadas por migración aberrante. El resto de las clonas fueron positivas a la inserción del fragmento de 345 pb (pBS+PCR85-bGH).

Las 15 clonas que resultaron positivas a la inserción del fragmento fueron sometidas a una digestión analítica con la enzima *Pvu* II, cuyo patrón de digestión nos ayudó a conocer la dirección en que se insertó el fragmento de interés. 8 tuvieron el inserto en la orientación 5'-3' y 7 tuvieron el inserto en la orientación 3'-5' (figura 14).

Una vez confirmada la orientación se escogió una de las clonas que tenía la dirección 5'-3' (clona 9) y se le determinó su secuencia. Esta resultó ser como se esperaba, conservando su secuencia nucleotídica y la aminoacídica codificada íntegra, excepto, por supuesto, en la posición correspondiente a los nucleótidos mutagenizados. En la figura 15 se muestra una foto de la

autorradiografía de la secuenciación donde se muestran los cambios nucleotídicos introducidos por la mutagénesis.

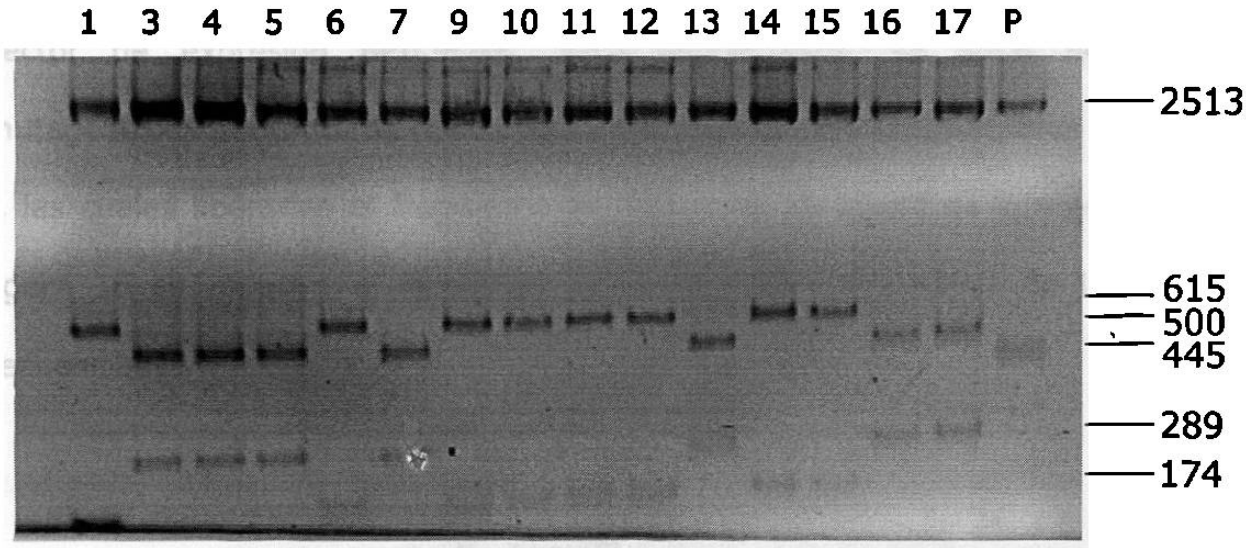


Figura 14.- Caracterización de plásmidos recombinantes. Gel de agarosa al 1.5%. Carriles 1-15: clonas digeridas con *Pvu* II mostrando patrones de digestión diferente. Clonas 1, 6, 9, 10, 11, 12, 14 y 15: orientación 5'-3'. Clonas 3, 4, 5, 7, 13, 16 y 17: orientación 3'-5'. Carril (P): pBS sin inserto digerido con *Pvu* II. El marcador es λ + *Pst* I y a la derecha se muestran los tamaños en pares de bases.

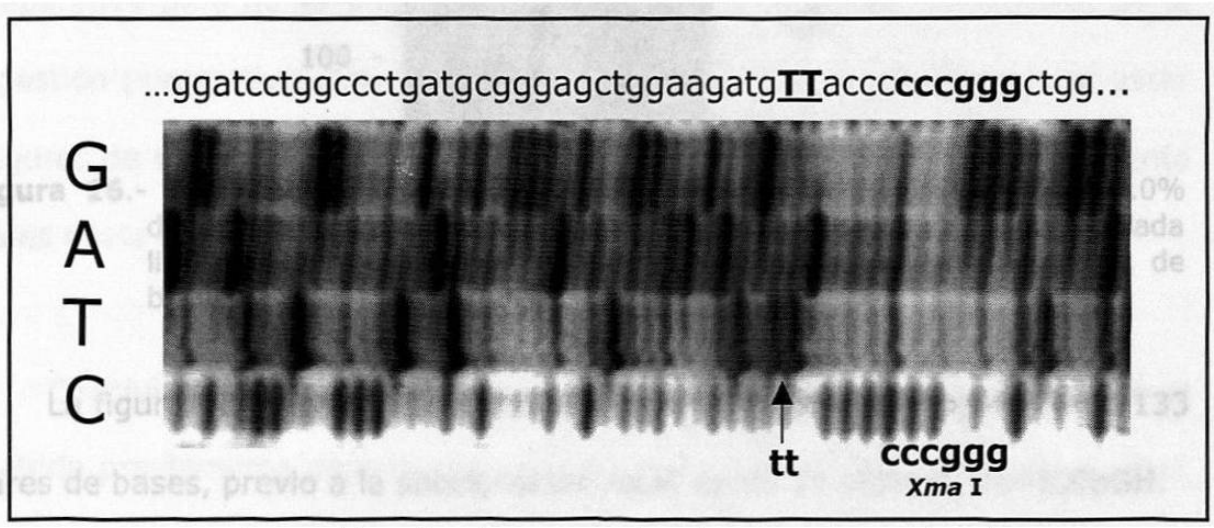


Figura 15.- Confirmación de la mutagénesis. Secuenciación donde se muestra la inserción de los nucleótidos deseados. A solo 5 bases de la mutación se puede apreciar el sitio de restricción *Xma* I (c/ccggg).

3.4. Subclonación en el vector de expresión pPIC9bGH.

Una vez comprobada la mutagénesis, se procedió a la subclonación en el vector de expresión pPIC9bGH. Para lograr ésto, se tomó la clona mutagenizada secuenciada (clona 9) y se digirió con las enzimas *Xma* I y *Apa* I, las cuales liberarían el fragmento de 133 pares de bases de interés. En la figura 16 se muestra el resultado de la digestión preparativa de la clona secuenciada.

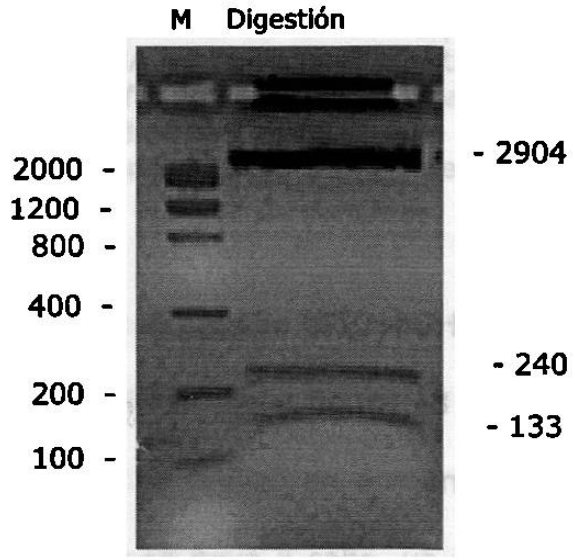


Figura 16.- Purificación de la banda mutagenizada. Gel de agarosa al 2.0% donde se muestra la digestión preparativa de la clona secuenciada liberando los fragmentos esperados y entre ellos, el de 133 pares de bases.

La figura 17 muestra el resultado de la purificación del fragmento de 133 pares de bases, previo a la subclonación en el vector de expresión pPIC9bGH.

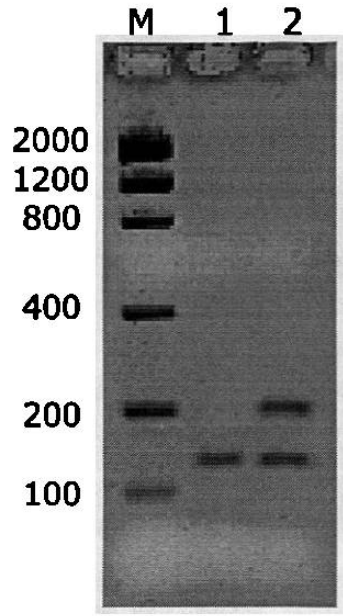


Figura 17.- Banda de 133 pb purificada. Gel de agarosa al 2.0% mostrando el resultado de la purificación de la banda mutagenizada. En el carril 1 se puede apreciar la banda de tamaño esperado, además de estar libre de cualquier otro DNA contaminante, mientras que en el carril 2 se muestra el producto amplificado digerido con *Xma* I y *Apa* I, mismas que liberan el fragmento de 133 pb, así como otro de 240 pb. El marcador usado es el Low DNA Mass Ladder de Gibco BRL y se indican los tamaños en pares de bases.

En cuanto al vector de expresión pPIC9bGH, sólo se le realizó la digestión preparativa pero no se purificó. En la figura 18 se muestra el resultado de la digestión preparativa. Esta se realizó en conjunto con otros DNAs para estar seguros de que la digestión se llevó a cabo, ya que la liberación de fragmento no es obvia en esta situación.

Concluidas las 4 de ligación se procedió con la transformación usando el método previamente descrito. El volumen final de la ligación fue igual a 10 μL y para la transformación se usaron 3 μL de la ligación diluidos con 7 μL de agua para dar un total de 10 μL.

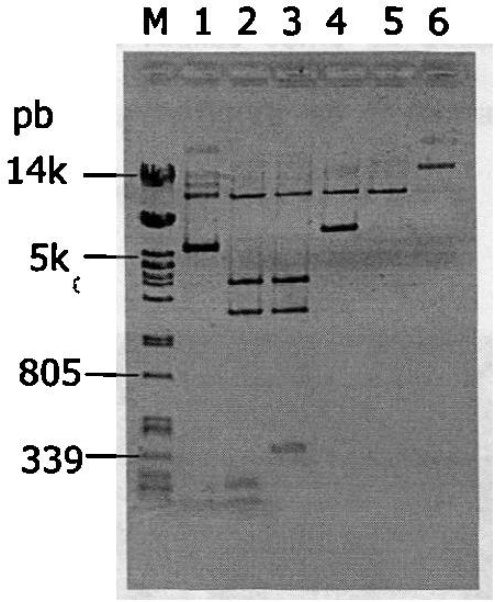


Figura 18.- Digestión preparativa del vector de expresión pPIC9bGH. En el carril 6 se muestra el vector sin digerir y en el carril 5 se muestra con la doble digestión. Los carriles del 1 al 4 son otros vectores que bajo las mismas condiciones con las mismas enzimas revelaron actividad de las dos endonucleasas (*Xma* I y *Apa* I) al ser evidentes los fragmentos que liberan, lo que indicó que en el vector de nuestro interés también se había llevado a cabo la doble digestión, aunque no fueran evidentes los fragmentos pequeños liberados.

Transcurridas 16 h después de la transformación, la placa mostró crecimiento de una gran cantidad de colonias. Ya que en este caso no estaba disponible la selección azul-blanco, se procedió a escoger al azar colonias para realizar extracción plasmídica. Después de crecer las colonias en tubo de ensayo y realizarl la minipreparación plasmídica como antes descrito, se procedió a realizar una digestión analítica con la enzima diagnóstica *Ban* I, cuyo patrón de digestión libera fragmentos que permiten diferenciar pPIC9bGH de pPIC9chGH, ya que debido a que ambos plásmidos son de tamaño idéntico, la diferenciación por migración retardada es imposible.

La digestión analítica se realizó como se describió previamente en la sección 3.6., y en la siguiente figura se muestran los resultados de la caracterización de las clonas recuperadas de la placa.

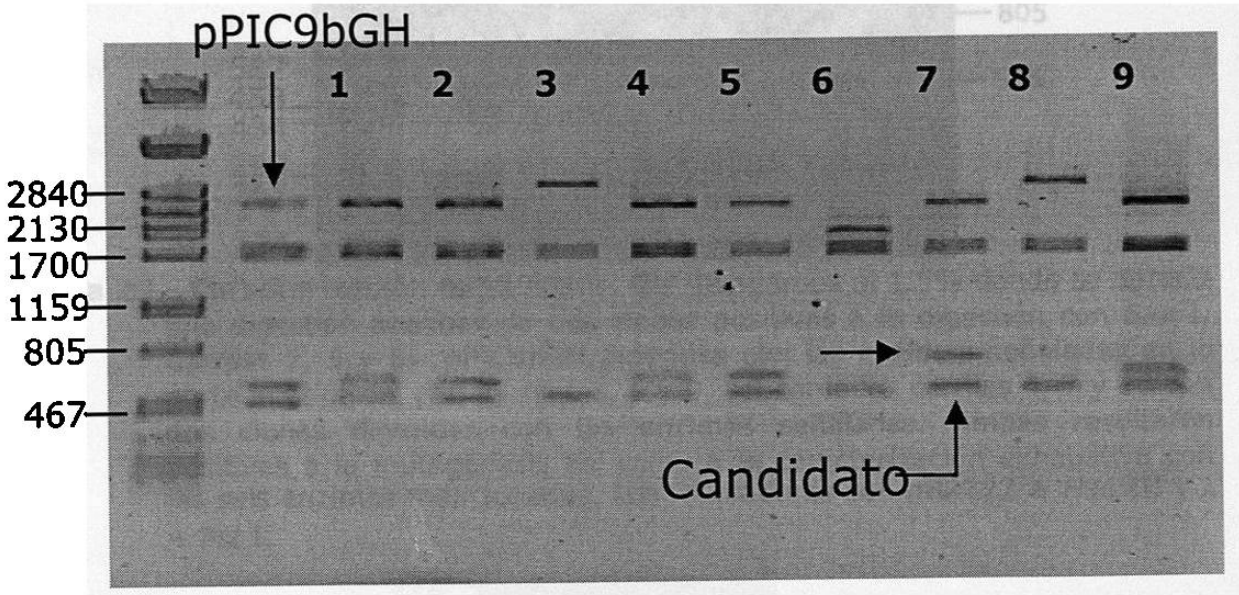


Figura 19.- Búsqueda de pPIC9chGH. Gel de agarosa al 1.5% donde se muestra la digestión analítica de un juego de colonias con la endonucleasa de restricción *Ban* I. Es evidente que la clona 7 muestra los patrones de digestión esperados para la clona mutagenizada. El resto de las clonas muestran el patrón idéntico a pPIC9bGH, excepto por las clonas 3, 6 y 8 que muestran un patrón aberrante incompatible con pPIC9bGH o pPIC9chGH.

De este tamizaje con la enzima diagnóstica se obtuvieron al menos 4 clonas que resultaron positivas a la digestión con *Ban* I.

El siguiente paso fue la digestión analítica con seis endonucleasas mas para corroborar la integridad del vector, así como para comprobar que los sitios de clonación (*Xma* I y *Apa* I) no se hubieran perdido por el proceso de clonación. En la figura 20 se muestra el gel de algunas de estas digestiones.