UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

"Clonación Molecular del DNAc de la Hormona Variante del Crecimiento Humano y su Expresión en *Pichia pastoris*"

Tesis realizada por:

Bioq. José Prisco Palma Nicolás

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

Febrero de 2002

Bioq. José Prisco Palma Nicolás

TM
QH445
.P3
c.1

1080113108

0095-80960

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

"Clonación Molecular del DNAc de la Hormona Variante del Crecimiento Humano y su Expresión en *Pichia pastoris*"

Tesis realizada por:

Bioq. José Prisco Palma Nicolás

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

Febrero de 2002

TM
QH445
.P3

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

CLONACION MOLECULAR DEL DNAc DE LA HORMONA VARIANTE DEL CRECIMIENTO HUMANO Y SU EXPRESION EN *Pichia pastoris*

Aprobación de la Tesis:

DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis

DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Co-Director de Tesis

DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Comisión de Tesis

DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
SubDirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica, en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, y la co-asesoría de la Dra. Agnès Revol de Mendoza.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres (Prisco Palma y Amalia Nicolás), a mis hermanas (Ángeles, Aida y Rosario) y a mis abuelos (Higinio y Consuelo), por el apoyo incondicional que en todos los aspectos de ellos he recibido en los últimos 26 años.

----o----

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por darme la oportunidad de formar parte del Departamento de Bioquímica como estudiante del posgrado, por su asesoría en el presente trabajo, y por su ejemplo de constancia y disciplina.

A los Dres.: Herminia G. Martínez Rodríguez, Agnès Revol de Mendoza, Rocio Ortíz López y Augusto Rojas Martínez, por contribuír a mi formación académica atravéz de sus conocimientos impartidos.

A las M.C.: Celia Nohemí Sánchez Domínguez, Dolores Esquivel Escobedo, Edy Luz Cab Barrera y Norma E. Guerra Rodríguez por el apoyo técnico recibido.

----o----

A cada uno de mis compañeros de la Generación 1998-2000 (Aurelio Álvarez, Virgilio Bocanegra, Itzel Calleja, Polo Castillo, Lety Corrales, Lulú Garza, Nancy Guzmán, Malena Márquez, Clarisa Ortíz, Sergio Salazar, y Mauricio Reyes), por los momentos compartidos.

----o----

A quienes hacen posible la existencia y permanencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), organismo del cual he sido becario.

ÍNDICE GENERAL

pp.

1. **INTRODUCCIÓN.** 1

1.1 La familia génica hGH-hPL. 1
1.1.1 Productos del gen hGH-N. 2
1.1.2 La función biológica de HGH-N. 2
1.1.3 Productos del gen hGH-V. 3
1.1.4 La función biológica de HGH-V. 4
a) Actividad somatogénica. 6
b) Actividad lactogénica. 6

1.2 Sistemas de expresión de proteínas heterólogas. 7

1.3 El sistema de expresión basado en *Pichia pastoris*. 8
1.3.1 Características generales del sistema. 8
1.3.2 Características del vector de integración pPIC9. 9
1.3.3 Recombinación homóloga en el locus AOX1. 10

1.4 Importancia de los productos recombinantes generados por la Biotecnología. 11

1.5 Producción y comercialización de las hormonas del crecimiento humano de interés médico. 12

1.6 Justificación. 14

2. **OBJETIVOS.** 15

3. **MATERIAL Y MÉTODOS.** 16

3.1 **MATERIAL** 16

3.2 **MÉTODOS** 18

3.2.1 Diseño de oligonucleótidos para amplificar selectivamente la secuencia codificante completa del gen hGH-V. 19
3.2.1.1 Características de diseño dependientes de la secuencia. 19
3.2.1.2 Características de diseño dependientes del vector de expresión. 20

3.2.2 Extracción y cuantificación de RNA total de placenta humana. 20
3.2.2.1 Extracción de RNA. 20
3.2.2.2 Cuantificación del RNA. 21

3.2.3 Síntesis del DNAc de hGH-V por RT-PCR y caracterización del producto amplificado con la enzima *Bgl* II. 22
3.2.3.1 Síntesis de la primera cadena de DNAc de hGH-V por retrotranscripción. 22
3.2.3.2 Amplificación del DNAc de hGH-V por PCR. 23
3.2.3.3 Caracterización con la enzima *Bgl* II. 24

3.2.4 Clonación del DNAc de hGH-V en el vector pBS II KS (+) por "Vector T". 24
3.2.4.1 Preparación de DNA plasmídico a pequeña escala. 25
3.2.4.2 Digestión de pBS II KS(+) con *Eco* RV. 26
3.2.4.3 Preparación del Vector "T". 26
3.2.4.4 Ligación del DNAc de hGH-V al vector pBS II KS (+). 27
3.2.4.5 Transformación con células calcio-competentes *E. coli* Top 10. 27
3.2.4.6 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes. 29
3.2.4.7 Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes. 30

3.2.5 Subclonación del DNAc de hGH-V al vector de expresión para levaduras pPIC9 y verificación de la fase de lectura del DNAc por secuenciación. 32
3.2.5.1 Subclonación del DNAc de hGH-V al vector de expresión para levaduras pPIC9. 32
3.2.5.2 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes. 34
3.2.5.3 Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes. 35
3.2.5.4 Verificación de la fase de lectura del DNAc por secuenciación. 36

3.2.6 Integración del vector pPIC9hGH-V al genoma de *Pichia pastoris* por recombinación homóloga y verificación de la integración por PCR. 37
3.2.6.1 Preparación del DNA para transfección. 37
3.2.6.2 Preparación de levaduras competentes con LiCl. 37
3.2.6.3 Transfección de levaduras Li^+ competentes de *Pichia pastoris*. 38
3.2.6.4 Extracción de DNA genómico de las levaduras transformadas. 38
3.2.6.5 Verificación de la inserción del gen hGH-V en el genoma de *Pichia pastoris* mediante PCR. 39

3.2.7 Producción de la HGH-V recombinante en cultivo de levaduras. 41
3.2.7.1 Cinéticas de crecimiento con glicerol y metanol como única fuente de carbono. 41
3.2.7.2 Inducción de la expresión con 1% de metanol. 41
3.2.7.3 Diálisis y cuantificación de las proteínas totales del medio de cultivo. 42

3.2.7.4 Verificación de la expresión por SDS-PAGE y estimación de pureza por densitometría. 42

3.2.8 Evaluación de la actividad lactogénica de HGHVr en cultivo de células Nb2. 43
3.2.8.1 Propagación de los cultivos. 44
3.2.8.2 Determinación de la curva de proliferación de células Nb2 con HGH (*Humatrope, Eli Lilly & Co.*). 44
3.2.8.3 Medición de la proliferación de células Nb2 por reducción del MTT (Bromuro de 3 - [4 , 5 – Dimetiltiazol – 2 – ilo] – 2 , 5 - difeniltetrazolio). 44
3.2.8.4 Evaluación de la actividad lactogénica de la HGH-Vr producida en *Pichia pastoris*. 45

4. RESULTADOS. 46

4.1 Diseño de oligonucleótidos para amplificar selectivamente la secuencia codificante completa del gen hGH-V. 46
4.1.1 Características fisicoquímicas de los primers diseñados. 46
4.1.2 Análisis de la formación de estructuras secundarias. 47
4.1.3 Localización de los sitios de apareamiento de los primers en la secuencia del DNAc. 47

4.2 Extracción y cuantificación de RNA total de placenta humana. 48

4.3 Síntesis del DNAc de hGH-V por RT-PCR y caracterización del producto de amplificación con *Bgl* II. 48
4.3.1 Síntesis y amplificación de cadenas dobles de DNAc de hGH-V por PCR. 48
4.3.2 Caracterización con la enzima *Bgl* II. 49

4.4 Clonación del DNAc de hGH-V en el vector pBS II KS (+) por la técnica del vector T. 50
4.4.1 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes. 50
4.4.2 Caracterización de los plásmidos recombinantes. 51

4.5 Construcción del vector de expresión pPIC9hGH-V. 53
4.5.1 Subclonación del DNAc de hGH-V en pPIC9. 53
4.5.2 Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes. 55
4.5.3 Secuenciación del vector pPIC9hGH-V. 57

4.6 Integración del vector pPIC9hGH-V al genoma de *Pichia pastoris* por recombinación homóloga y verificación de la integración por PCR. 58

4.6.1 Preparación del DNA para transfección. 58
4.6.2 Transfección y selección de recombinantes. 58
4.6.3 Análisis por PCR de las levaduras transfectadas. 59

4.7 Producción de la HGH-V recombinante en cultivo de levaduras. 60
4.7.1 Cinéticas de crecimiento con glicerol y metanol como única fuente de carbono. 60
4.7.2 Inducción de la expresión con 1% de metanol. 61
4.7.3 Cuantificación de la HGH-V producida en *Pichia pastoris*. 63

4.8 Evaluación de la actividad lactogénica de HGHVr en cultivo de células Nb2. 65
4.8.1 Determinación de la curva de proliferación de células Nb2 con HGH (*Humatrope, Eli Lilly & Co.*). 65
4.8.2 Medición de la proliferación de células Nb2 por reducción del MTT. 65
4.8.3 Evaluación de la actividad lactogénica de la HGH-V producida en *Pichia pastoris*. 66

5. DISCUSIÓN. 69

5.1 Clonación molecular. 69
5.2 Producción de la proteína recombinante. 70
5.3 Actividad biológica de la HGH-Vr. 71

6. CONCLUSIONES y APORTACIONES. 74

7. ANEXOS. 75

8. BIBLIOGRAFÍA. 81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	El locus hGH-hPL del genoma humano.	**1**
Figura 2.	Valores séricos promedio (± DS) de HGH normal y variante en mujeres hasta la semana 40 del embarazo.	**5**
Figura 3.	Valores séricos de HGH normal y variante medidos hasta las 48 horas después del parto.	**5**
Figura 4.	Recombinación homóloga en *Pichia pastoris.*	**11**
Figura 5.	Estrategia general.	**18**
Figura 6.	Orientación del DNAc de hGH-V en el vector pBS II KS(+).	**32**
Figura 7.	Estrategia de subcloación en pPIC9.	**33**
Figura 8.	Alineamiento de los primers v3 –v5 en la secuencia de hGH-V.	**47**
Figura 9.	Electroforesis del RNA en gel de agarosa-isotiocianato de guanidina teñido con bromuro de etidio.	**48**
Figura 10.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR generado con v3 y v5.	**49**
Figura 11.	Digestión con *Bgl* II.	**49**
Figura 12.	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de DNA del plásmido pBS II KS (+).	**50**
Figura 13.	Tamizaje de clonas candidatas a portadoras del DNAc de hGH-V.	**51**
Figura 14.	Estimación del tamaño del inserto en los vectores pBShGH-V.	**52**
Figura 15.	Caracterización de los recombinantes con *Bgl* II.	**52**
Figura 16.	Determinación de orientaciones con *Xho* I.	**53**
Figura 17.	Electroforesis preparativa previa a la subclonación en pPIC9.	**54**
Figura 18.	Selección de recombinantes pPIC9hGH-V por electroforesis en gel de agarosa 0.7%.	**55**

Figura 19. Estimación del tamaño de inserto en los recombinantes pPIC9hGH-V. **55**

Figura 20. Demostración de la ganancia de un sitio *Bgl* II en los recombinantes pPIC9hGH-V. **56**

Figura 21. Diferenciación entre pPIC9hGH-V y pPIC9hGH22K con *Xba* I. **57**

Figura 22. Linearización del vector pPIC9hGH-V con *Sac* I. **58**

Figura 23. DNA genómico de *Pichia pastoris*. **60**

Figura 24. Análisis por PCR de las cepas transformadas. **60**

Figura 25. Cinéticas de crecimiento con glicerol o metanol como fuente de carbono. **61**

Figura 26. Producción de HGH-Vr en *Pichia pastoris*. **62**

Figura 27. Evaluación del efecto del pH sobre la estabilidad de HGH-V en el medio de cultivo. **63**

Figura 28. Evaluación del efecto del pH sobre la estabilidad de HGH-N en el medio de cultivo. **63**

Figura 29. Cuantificación por densitometría. **64**

Figura 30. Curva de proliferación celular por inducción con HGH (*Humatrope*). **65**

Figura 31. Correlación entre número de células y el formazán producido por reducción del MTT. **66**

Figura 32. Evaluación de la actividad lactogénica de hGH-V. **67**

Figura 33. Curva de proliferación de HGH-N, HGH-V y *Humatrope*. **68**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Isoformas generadas por "splicing alternativo" del transcrito primario del gen hGH-N.	**2**
Tabla 2.	Isoformas generadas por "splicing alternativo" del transcrito primario del gen hGH-V.	**4**
Tabla 3.	Valores séricos maternos de hGH-V en embarazos con y sin retardo en el crecimiento intrauterino (IUGR).	**5**
Tabla 4.	Condiciones de reacción para la síntesis de la primera cadena de DNAc de hGH-V.	**23**
Tabla 5.	Condiciones de la reacción de PCR para la síntesis y amplificación de cadenas dobles del DNAc de hGH-V.	**23**
Tabla 6.	Programa de amplificación empleado para sintetizar el DNAc de hGH-V.	**24**
Tabla 7.	Condiciones de reacción para la digestión de los productos de PCR con *Bgl* II.	**24**
Tabla 8.	Condiciones de reacción para la adición de "T" al vector pBS linearizado con *Eco* RV.	**26**
Tabla 9.	Condiciones de reacción para la ligación del DNAc de hGH-V al vector de clonación pBS II KS(+).	**27**
Tabla 10.	Condiciones para la reacción de ligación del DNAc de hGH-V a pPIC9.	**34**
Tabla 11.	Condiciones de la reacción de PCR para evidenciar la inserción de hGH-V en el genoma de *P. pastoris.*	**40**
Tabla 12.	Programa de amplificación empleado utilizándo los iniciadores AOX1.	**40**

ABREVIATURAS

aa.	Residuos aminoacídicos
AOX1	Gen de la alcohol oxidasa 1
AOX2	Gen de la alcohol oxidasa 2
Amp^r	Gen de resistencia a ampicilina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMGY	Medio enriquecido amortiguado + glicerol
BMMY	Medio enriquecido amortiguado + metanol
BSA	Albúmina sérica bovina
Col E1	Orígen de replicación del ADN en *E.coli*
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNAc	DNA complementario
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfatados
$DO_{600\ nm}$	Densidad óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiamino tetraacético
HGH-N	Hormona normal del crecimiento humano
HGH-V	Hormona variante del crecimiento humano
His4	Gen de la histidinol deshidrogenasa
HPL-1	Lactógeno placentario humano 1
IGF-I	Factor de crecimiento similar a insulina I
IPTG	Isopropil β-tiogalactósido
IUGR	Retraso intrauterino del crecimiento
kDa	Kilodalton
kpb	Kilo par de bases
LB	Medio de Luria-Bertani
MCS	Sitio múltiple de clonación
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazolio
Mut^+	Mutante que posee el gen AOX1
nm	Nanómetros
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
RNAm	RNA mensajero
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
RT/MMLV	Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de moloney
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SBF	Suero bovino fetal
SC	Suero de caballo
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido
YNB	Base nitrogenada de levadura

RESUMEN

Bioq. José Prisco Palma Nicolás.

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

Clonación Molecular del DNAc de la Hormona Variante del Crecimiento Humano y su Expresión en *Pichia pastoris.*

Área de estudio: Biotecnología biomédica.

La hormona variante del crecimiento humano (HGH-V) es producida por la placenta durante el embarazo. Sus niveles séricos se incrementan sostenidamente desde la 24ª semana hasta el término, y aproximadamente una hora después del parto caen drásticamente hasta ser indetectables. En los últimos años se ha acumulado evidencia de que los niveles séricos bajos de esta hormona están asociados con una patología poco frecuente conocida como retardo del crecimiento intrauterino (IUGR), sin embargo poco se sabe acerca de la función biológica que lleva a cabo dicha hormona y de la importancia de ésta durante la gestación humana.

En el presente trabajo se propuso clonar el DNAc del gen hGH-V para producir la proteína recombinante biológicamente activa en *Pichia pastoris*. Para ello se diseñaron oligonucleotidos específicos, con los cuales se obtuvo por RT-PCR una banda única de 649 pb. Esta fue clonada primero en pBS II KS(+), y luego de la clona resultante se recuperó la región codificante para la proteína HGH-V, misma que fue subclonada en el vector de expresión para levaduras pPIC9. Una vez en este vector, el DNAc y las regiones reguladoras que lo flanquean fueron secuenciadas, lo cual confirmó su identidad como el transcrito V1 del gen hGH-V; así mismo, se verificó su enfasamiento correcto en el marco de lectura abierto para la adecuada expresión del transgen.

El vector de integración así construido, pPIC9hGH-V, fue utilizado para transfectar establemente, mediante recombinación homóloga, levaduras de la cepa GS115 *Pichia pastoris*, obteniéndose 8 clonas recombinantes productoras de la isoforma de 22 kDa de HGH-V. Bajo las condiciones de expresión ensayadas en tubos con 10 ml de medio de cultivo, se obtuvo una producción de 0.42 mg/l, y una pureza del 20 %; esta última expresada en términos del porcentaje correspondiente a la banda de 22 kDa, respecto del total de las proteínas resueltas por SDS-PAGE. El medio de cultivo de las fermentaciones fue ensayado en busca de actividad biológica de la hormona, empleando células Nb2. Estas células proliferan clonalmente cuando son estimuladas con HGH. El resultado obtenido reveló que la HGH-V producida en *Pichia pastoris* es biológicamente activa.

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
ASESOR

Dra. Agnès Revol de Mendoza
CO-ASESOR