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

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 LA FAMILIA GÉNICA hGH-hPL.

El grupo de genes de la familia de la hormona del crecimiento humano (HGH) se ubica en una región de aproximadamente 50 kpb localizada en el brazo largo del cromosoma 17 entre las bandas q22-q24 (George *y cols.*, 1981; Hirt *y cols.*,1987), y consiste de 5 genes de secuencia altamente conservada que se encuentran alineados en la misma orientación transcripcional. En la dirección 5'a 3', estos genes son: hGH-N (hormona normal del crecimiento humano), hPL-1 (lactógeno placentario 1), hPL-2 (lactógeno placentario 2), hGH-V (hormona variante del crecimiento humano) y hPL-3 (lactógeno placentario 3) (Seeburg *y cols.*, 1982; Chen *y cols.*,1989; Barrera-Saldaña, 1998). De éstos, solo hGH-N es expresado en la hipófisis, mientras que el resto lo hace en la placenta (Figura 1).

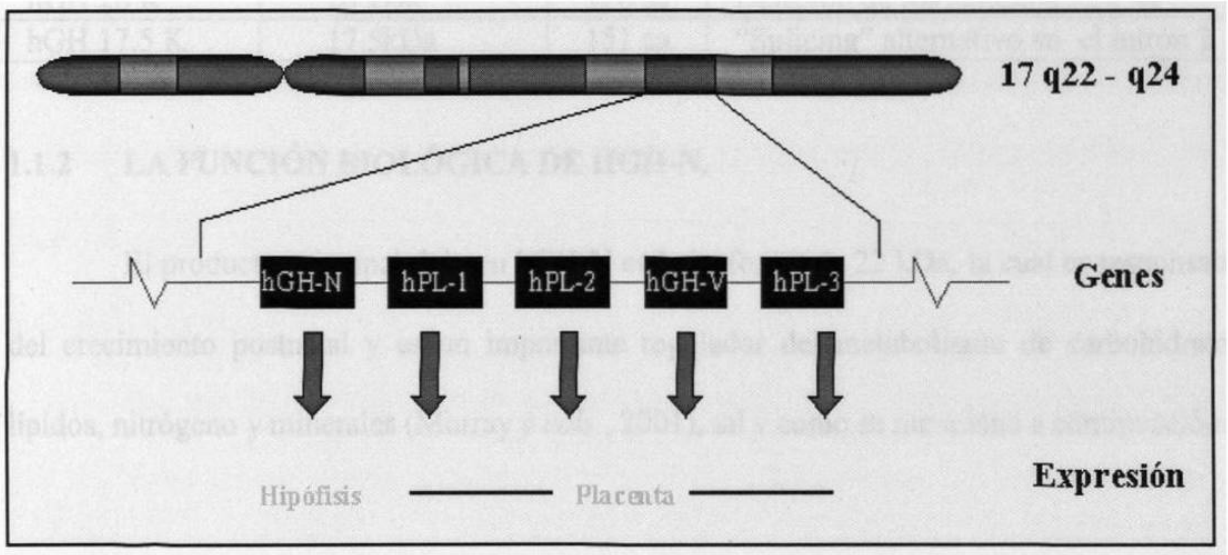

Figura 1. El locus hGH-hPL del genoma humano. Se muestran la localización del complejo multigénico hGH-hPL en el cromosoma 17 humano entre las bandas q22 – q24, los genes y su expresión tejido-específica.

1.1.1 PRODUCTOS DEL GEN hGH-N.

Del transcrito primario del gen hGH-N se derivan tres RNAms maduros que dan lugar a cuatro isoformas de HGH-N (Tabla 1). Del primero de estos últimos se deriva una isoforma de 22 kDa de 191 residuos aminoacídicos, de la cual recientemente se ha identificado una segunda isoforma glicosilada de 24 kDa (Haro *y cols.*, 1996); un segundo RNAm es responsable de la isoforma de 20 kDa, cuyo menor tamaño se debe a la carencia de los 25 residuos entre la posición 32 y la 46 de la isoforma de 22 kDa, (176 residuos aminoacídicos). Como resultado de la utilización de un sitio alternativo de "splicing" localizado en el segundo intrón del transcrito primario de este gen, se genera un tercer RNAm que se traduce en la cuarta isoforma de 17.5 kDa, descubierta en 1987 por Lecomte *y cols.*, y en la que se pierden 40 residuos aminoacídicos.

Tabla 1. Isoformas generadas por "splicing alternativo" del transcrito primario del gen hGH-N.

RNAm	PM de la proteína	Longitud	Características / Orígen
hGH 22 K	22 kDa	191 aa	Isoforma activa y más abundante
hGH 22K	24 kDa	191 aa	Glicosilación de la isoforma activa
hGH 20 K	20 kDa	176 aa	Deleción de los residuos 32 – 46
hGH 17.5 K	17.5kDa	151 aa	"Splicing" alternativo en el intrón 2

1.1.2 LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE HGH-N.

El producto principal del gen hGH-N es la isoforma de 22 kDa, la cual es responsable del crecimiento postnatal y es un importante regulador del metabolismo de carbohidratos, lípidos, nitrógeno y minerales (Murray *y cols.*, 2001), tal y como se menciona a continuación:

a) **Síntesis de proteínas:** La GH incrementa el transporte de aminoácidos hacia el interior de las células musculares. Los animales tratados con esta hormona muestran un equilibrio

positivo de nitrógeno y una disminución en los niveles plasmáticos de aminoácidos y urea, cambios que en algunos tejidos se acompañan de un aumento en la síntesis de RNA y DNA.

b) **Metabolismo de carbohidratos:** En el higado la GH incrementa el glucógeno, probablemente por la activación de la gluconeogénesis a partir de aminoácidos. La hiperglicemia que se presenta después de la administración de GH es el resultado combinado de una disminución en la utilización periférica de glucosa y de un aumento en su producción hepática por la vía de la gluconeogénesis.

c) **Metabolismo de lípidos:** La GH favorece la liberación de ácidos grasos y glicerol del tejido adiposo y aumenta la oxidación de éstos en el hepatocito.

d) **Metabolismo de minerales:** En combinación con IGF-I, la GH promueve un equilibrio positivo de calcio, magnesio y fosfato, y causa retención de sodio, potasio y cloro.

1.1.3 PRODUCTOS DEL GEN hGH-V.

El gen de interés para el presente trabajo, hGH-V, difiere del gen hGH-N en 35 posiciones nucleotídicas dispersas en la región codificante que resultan en 15 cambios aminoacídicos, de los cuales 13 se encuentran en la proteína madura (Seeburg *y cols.*,1982). Otra diferencia reportada respecto a la proteína HGH-N de 22 kDa, además de su expresión placentaria, es su punto isoeléctrico más básico (HGH-N pI = 5.1, HGH-V pI=8.2).

Del gen hGH-V también se derivan varias isoformas (Tabla 2). Aunque el RNAm más abundante de este gen en la placenta a término es el que codifica para una isoforma de 22 kDa, una especie menos abundante del RNAm retiene el intrón D y se predice que codifica para una proteína de 26 kDa (Cooke *y cols.*,1988). Ambos transcritos, conocidos como hGH-

V1 y hGH-V2, respectivamente, han sido sublocalizados en las vellosidades placentarias desde la 9ª semana de gestación (Cooke *y cols.*,1988; Liebhaber *y cols.*,1989). También, de la proteína de 22 kDa se genera una isoforma de 25 kDa por glicosilación en el residuo de asparagina de la posición 140 (Ray *y cols.*,1989; Frankenne *y cols.*,1990).

Recientemente han sido reportados dos nuevos RNAms del gen hGH-V: uno de ellos emplea un sitio aceptor de "splicing" alternativo localizado en el exón 3, del que se predice la producción de una proteína de 20 kDa. El otro, conocido como hGH-V3, es generado por el uso de un sitio donador de "splicing" alternativo localizado al final del exón 4, del cual se predice la producción de una proteína de 24 kDa (Boguszewski *y cols.*,1998).

Tabla 2. Isoformas generadas por "splicing" alternativo del transcrito primario del gen hGH-V.

RNAm	PM de la proteína	Longitud	Características / Origen
hGH-V1	22 KDa	191 aa	Isoforma activa y más abundante
hGH-V1	25 KDa	191 aa	Glicosilación de la isoforma activa
hGH-V2	26 KDa	230 aa	Retención del intrón D
hGH-V3	24 KDa *	219 aa	Deleción de 4 pb al final del exón 4
hGH-V4	20 KDa *	176 aa	Deleción de los residuos 32 a 46

* Las proteínas de 20 y 24 KDa aún no han sido identificadas en la placenta o en la circulación materna.

1.1.4 LA FUNCIÓN BIOLÓGICA DE HGH-V.

Durante el embarazo, la HGH de la pituitaria (HGH-N) desaparece progresivamente de la circulación materna hasta alcanzar valores indetectables a la 24ª-25ª semana, siendo reemplazada por la HGH placentaria (HGH-V). La concentración de esta última se incrementa sostenidamente hasta el final del embarazo y aproximadamente una hora después del parto, al faltar la placenta, sus niveles circulantes caen dramáticamente hasta valores indetectables (Frankenne *y cols.*,1988; Evain-Brion *y cols.*,1994; ver Figuras 2 y 3).

Interesantemente, se ha encontrado que en casos de retardo en el crecimiento intrauterino (IUGR), los niveles circulantes de HGH-V medidos entre la 31ª semana y la fecha del parto, son menores que los reportados para embarazos normales (Mirlesse *y cols.*,1993; Chowen *y cols.*,1996; Pardi *y cols.*,1997), (Tabla 3).

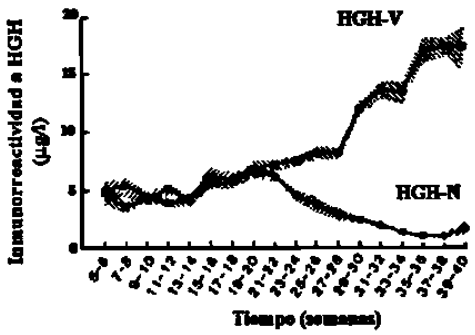

Figura 2. Valores séricos promedio (± DS) de HGH normal y variante en mujeres hasta la semana 40 del embarazo.[1]

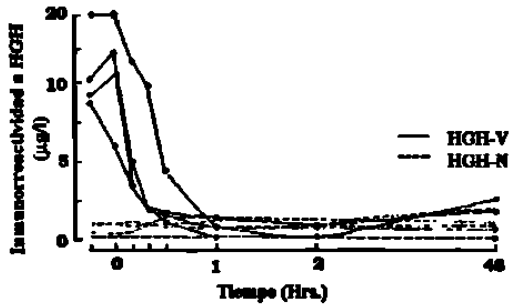

Figura 3. Valores séricos de HGH normal y variante medidos hasta las 48 horas después del parto.[1]

Recientemente, se ha demostrado por análisis de regresión múltiple que los niveles séricos maternos de HGH-V, IGF-I e IGFBP-3, dan cuenta del 40% de la variación de peso al nacimiento (McIntyre *y cols.*,2000), lo cual sugiere que la HGH-V lleva a cabo un papel clave durante la gestación humana.

Tabla 3. Valores séricos maternos de HGH-V en embarazos con y sin retardo en el crecimiento intrauterino (IUGR).[2]

Complicaciones en el embarazo	Número de sujetos	HGH-V (mU/L)
Ninguna	53	26.5 ± 1.2
IUGR	22	14.9 ± 1.6
IUGR (idiopática)	14	15.3 ± 2.3
IUGR (toxemia)	6	15.1 ± 3.8
IUGR (anormalidad cromosómica)	1	12.5
IUGR (infección materna)	1	12.4

1 Tomado de: Frankenne F; *J Clin Endocrinol Metab.* 66(6):1171-1180.

2 Mediciones realizadas desde la 33ª semana de gestación hasta el término del embarazo. Tomada de: Evain-Brion D; 1994. *Acta Pediatr Suppl* 399:49-51.

Sin embargo, aunque la función de la HGH-V no está claramente definida, su actividad biológica ya ha comenzado a ser estudiada, al igual que en el caso de otras hormonas relacionadas a GH, y se ha clasificado en dos categorías generales:

a) Actividad Somatogénica.

Está implicada en el crecimiento lineal de hueso y en el metabolismo de los carbohidratos; estos efectos son mediados en parte por la generación local y hepática de IGF-I.

La actividad somatogénica de la HGH-V ha sido estudiada por estimulación de la ganancia de peso corporal en ratas hipofisectomizadas, reportándose un incremento lineal comparable al estimulado por la HGH-N (Mc Leod *y cols.*,1991).

b) Actividad Lactogénica.

Incluye la estimulación de la lactación y las funciones reproductivas (Cooke *y cols.*,1989). La actividad lactogénica de esta misma hormona ha sido estudiada en cultivo celular, transfectándo vectores de expresión para células eucarióticas y determinándo la respuesta mitogénica de células Nb2 al medio de cultivo. Se reporta una respuesta paralela a la generada por HGH-N, pero significativamente menor (Nickel *y cols.*, 1990; Mc Leod *y cols.*, 1991).

1.2 SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS.

Cuando se quiere producir proteínas de organismos complejos utilizando organismos más simples, como bacterias o levaduras, (ej., hormona del crecimiento, insulina, factor VIII, etc.), se requiere de un sistema de expresión. Típicamente, dicho sistema está constituído por un vector de expresión y un hospedero. El vector de expresión porta el DNAc que codifica para la proteína de interés y tiene la capacidad de permanecer dentro del huesped, ya sea como elemento episomal (físicamente independiente del DNA cromosómico) o bien integrado establemente al genoma. En cualquier caso, el huesped puede ser inducido a expresar el DNAc portado por el vector para producir finalmente la proteína deseada.

Inicialmente surgieron los sistemas de expresión bacterianos, y *Escherichia coli* fue el modelo por elección para la gran mayoría de las aplicaciones, debido a que se conocía mucho de su biología y de su genética. Otras bacterias como *Bacillus subtilis* también han sido utilizadas como hospederos. Sin embargo, a medida que comenzaron a producirse proteínas cada vez más complejas, las capacidades de los sistemas de expresión basados en bacterias fueron sobrepasadas, principalmente debido a que éstas no pueden realizar los plegamientos correctos o llevar a cabo modificaciones postraduccionales como el procesamiento proteolítico, la glicosilación y la formación de puentes disulfuro requeridos para que dichas proteínas conserven su actividad biológica.

La necesidad de producir proteínas complejas biologicamente activas llevó al desarrollo de sistemas de expresión basados en líneas celulares de mamíferos, que si bien pueden llevar a cabo plegamientos correctos y modificaciones postraduccionales, han tenido el inconveniente de presentar bajos niveles de expresión, además de un alto costo por su cultivo y prolongado tiempo de generación.

En la búsqueda de sistemas de expresión alternativos que permitieran combinar, por un lado, el corto tiempo de generación característico de las bacterias (aproximadamente 20 minutos para *E. coli*), y por otro, la capacidad de poder llevar a cabo plegamientos correctos y modificaciones postraduccionales similares a los de las células eucarióticas, se ha optado por el uso de levaduras como sistemas de expresión de proteínas heterólogas.

Los primeros sistemas de este tipo estaban basados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*; sin embargo también se ha evaluado la utilidad de *Hansenula polymorpha* y más recientemente, de *Pichia pastoris*.

1.3 EL SISTEMA DE EXPRESIÓN BASADO EN *Pichia pastoris*.

El sistema de expresión de proteínas recombinantes basado en *Pichia pastoris* y comercializado por Invitrogen Co., fue desarrollado por el Salk Institute Biotechnology/Indutry Associates (SIBIA) y la compañía Phillips Petroleum.

1.3.1 Características generales del sistema.

Pichia pastoris es una levadura metilotrófica capaz de utilizar el metanol como fuente única de carbono. El primer paso de su metabolismo en los peroxisomas implica la oxidación a formaldehido, una reacción catalizada por la enzima alcohol oxidasa en la que participa el oxígeno molecular. Durante esta reacción también se genera peróxido de hidrógeno.

Hay dos genes en *Pichia pastoris* que codifican la alcohol oxidasa : AOX1 *y* AOX2. Estos exhiben un 97% de similitud, sin embargo AOX1 es el principal responsable de la actividad alcohol oxidasa de la célula y su expresión es altamente regulada e inducida a

muy altos niveles por el metanol (Ellis *y cols.*, 1985; Koutz *y cols.*, 1989). Aprovechando esta particularidad, el promotor de *AOX1* es empleado para dirigir la expresión del gen que codifica para la proteína deseada.

La expresión heteróloga en *Pichia pastoris* puede ser intracelular o extracelular; esta última requiriendo de la presencia de una secuencia señal (SS) que dirija a la proteína hacia la ruta secretoria. Una de las SS con que la se ha obtenido mayor éxito es el pre-propéptido del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* (Cregg *y cols.*, 1993; Scorer *y cols.*, 1993).

Pichia pastoris presenta muchas de las ventajas que tienen los sistemas de expresión eucarióticos más eficientes, tales como las modificaciones postraduccionales, el procesamiento proteolítico y el plegamiento adecuado de las proteínas; además es casi tan fácil de manipular como *E. coli* y tiene la ventaja adicional de presentar niveles de expresión de proteínas heterólogas de 10 a 100 veces más altos que *Saccharomyces cerevisiae.* Una lista parcial de ejemplos que documentan la expresión exitosa de proteínas en *Pichia pastoris* puede consultarse en el Anexo 1.

1.3.2 Características del vector de integración pPIC9.

El "orígen de replicación" es una secuencia relativamente corta que se encuentra en los vectores de clonación que les confiere la capacidad de ser reconocidos por la maquinaria de replicación de la célula hospedera, de manera que cuando el genoma es duplicado durante la división celular, el DNA del vector también se duplica. Un vector típico para introducir genes en *P. pastoris* es pPIC9. Éste, contiene un orígen de replicación del tipo ColE1, que le permite multiplicarse y permanecer como elemento episomal en *E. coli* . Sin embargo, pPIC9 no tiene elemento alguno que pueda llevar a cabo esta función en levaduras, por lo cual

requiere integrarse permanentemente en el genoma del hospedero, generalmente por medio de una recombinacón homóloga. Este vector se denomina "vector de integración".

pPIC9 cuenta con dos marcadores de selección: el elemento Amp^r que confiere resistencia a ampicilina cuando se propaga en *E. coli,* y el gen his 4, que permite el crecimiento de las levaduras auxotróficas para histidina en medios carentes de este aminoácido, cuando han sido transformadas exitosamente con el vector. Así, la expresión de estos marcadores del vector permiten seleccionar a las células hospedero que lo han captado.

pPIC9 también contiene un sitio de clonación múltiple (MCS), flanqueado antes por la región codificante para la SS y después por otra que es un terminador de la transcripción (TT).

La región conocida como 5' AOX1 es empleada como promotor para dirigir la expresión de la unidad transcripcional codificadora de la proteína de interés en *P. pastoris,* y junto con otra referida como 3' AOX1, constituyen secuencias que son empleadas para llevar a cabo la recombinación homóloga en el locus AOX1 de la levadura.

Una representación gráfica y detallada de los elementos que integran al vector pPIC9 puede consultarse en el Anexo 2.

1.3.3 Recombinación homóloga en el locus AOX1.

Al igual que en *S. cerevisiae*, el DNA lineal puede generar cepas transformadas de *Pichia pastoris* mediante recombinación homóloga entre el DNA transformante y regiones de homología localizadas dentro del genoma de la levadura. Los eventos de inserción en el locus AOX1 se originan a partir de un entrecruzamiento entre el locus y cualquiera de las tres

regiones AOX1 del vector: el promotor AOX1, la región TT de AOX1 o la secuencia 3' AOX1 (ver Figura 4).

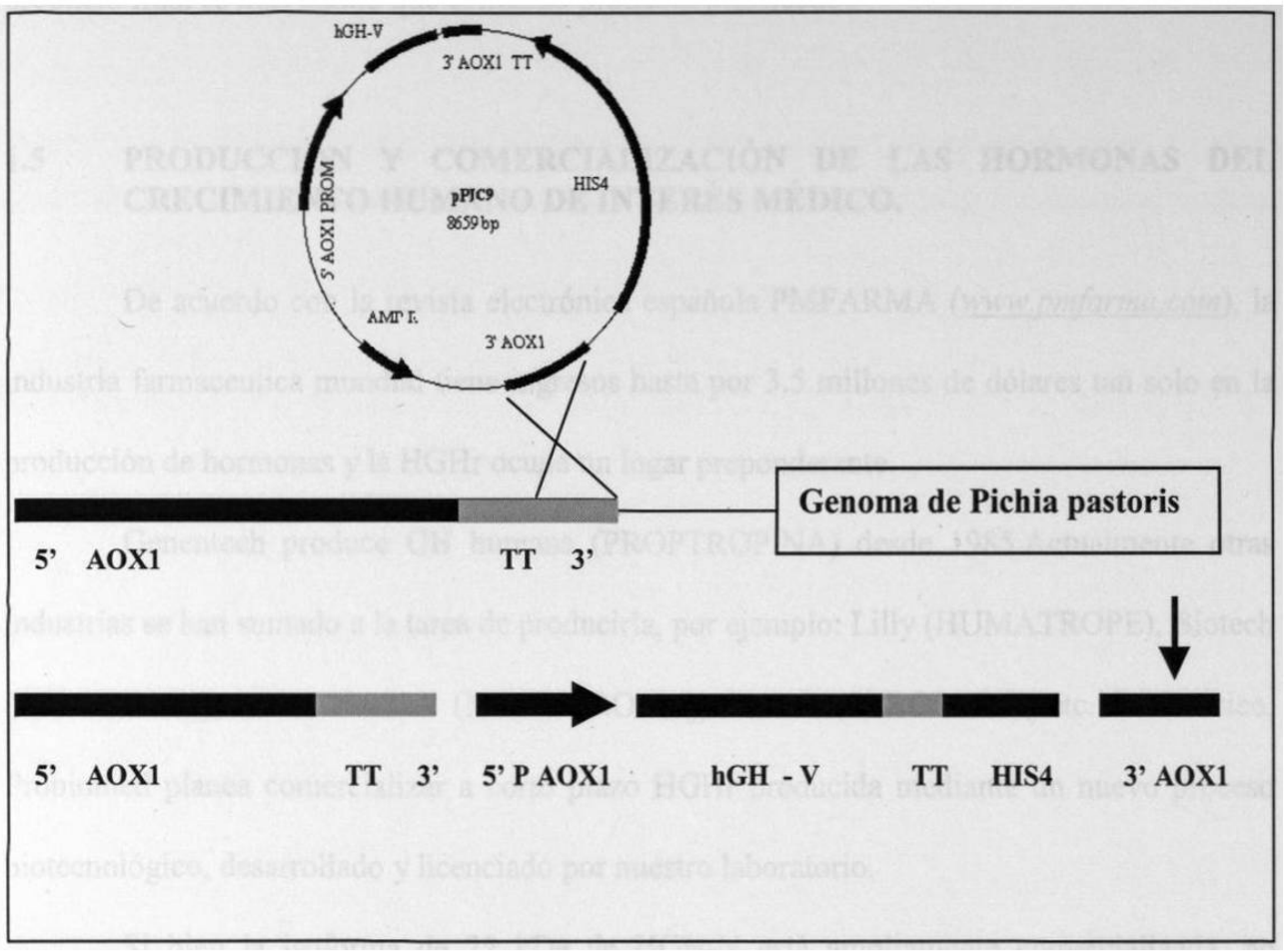

Figura 4. Recombinación homóloga en *Pichia pastoris*. Se muestra el resultado de la inserción génica del cassette de expresión para HGH-V en el locus AOX1 en el genoma de *Pichia pastoris*.

1.4 IMPORTANCIA DE LOS PRODUCTOS RECOMBINANTES GENERADOS POR LA BIOTECNOLOGÍA.

El uso de productos recombinantes presenta importantes ventajas si se le compara con el uso de material purificado a partir de sus fuentes naturales. Esto es particularmente claro en el caso de proteínas humanas, ya que generalmente no se dispone de grandes cantidades del tejido fuente del principio activo. Además, los productos de orígen recombinante están libres de contaminantes biológicos, como es el caso de los virus HCV y HIV, que años atrás infectaron a pacientes que recibieron insulina o factor VIII purificado de cadáveres.

Adicionalmente, una vez que se ha establecido un sistema de producción recombinante como proceso industrial, generalmente los costos de produccion se reducen y el producto final es más barato que el mismo producto purificado.

1.5 PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE LAS HORMONAS DEL CRECIMIENTO HUMANO DE INTERÉS MÉDICO.

De acuerdo con la revista electrónica española PMFARMA (*www.pmfarma.com*), la industria farmaceutica mundial tiene ingresos hasta por 3.5 millones de dólares tan solo en la producción de hormonas y la HGHr ocupa un lugar preponderante.

Genentech produce GH humana (PROPTROPINA) desde 1985.Actualmente otras industrias se han sumado a la tarea de producirla, por ejemplo: Lilly (HUMATROPE), Biotech (BIO-TROPIN), Novo Nordisk (NORDITROPIN), Serono (SEROSTIM), etc. En México, Probiomed planea comercializar a corto plazo HGHr producida mediante un nuevo proceso biotecnológico, desarrollado y licenciado por nuestro laboratorio.

Si bien la isoforma de 22 kDa de HGH-N está ampliamente comercializada, no sucede lo mismo con el resto de ellas (HGH-N 20 kDa, HGH-V 20 y 22 kDa). Por lo que respecta a la GH-N de 20 kDa, Adelman *y cols.* en 1983, usando mutagénesis mediada por oligonucleótidos, lograron generar la deleción de los aminoácidos 32 – 46 de un sistema de producción de HGHr, construído previamente para la producción microbiana de la isoforma de 22 kDa. Por otro lado, Uchida *y cols.* en 1997 construyeron un sistema de producción empleando a *E. coli* como hospedero y al gen de la proteasa neutra de *Bacillus amyloliquefaciens*, cuya señal de secreción fue modificada. El producto recombinante tenía puentes disulfuro y su PM fue de 20, 270.5 +/- 3.7 daltons.

En cuanto a HGH-V, la isoforma de 22 kDa ha sido producida en su forma activa (no glicosilada) en *E. coli* por Igout *y cols.*, en 1993, empleando el plásmido pIN-III-omp A3. Ellos reportan una producción menor que la de HGH-N a pesar de emplear el mismo sistema de expresión.

1.6 JUSTIFICACIÓN.

A pesar de que se ha acumulado evidencia de que los niveles bajos de la hormona del crecimiento de expresión placentaria durante el embarazo se han asociado con retardo del crecimiento intrauterino, aún se desconoce el papel específico que lleva a cabo la HGH-V durante la gestación humana.

Sin duda, el diseño de estrategias que permitan esclarecer los eventos biológicos en los que participa la HGH-V, asi como la comparación de sus propiedades biológicas (ej. adipogénesis en fibroblastos 3T3, mitogénesis en células Nb2, etc.,) con las de otras hormonas de la familia hGH-hPL, requiere de un sistema eficiente de producción de la proteína HGH-V. Aunque ésta ha sido exitosamente producida desde 1993 por Igout *y cols.*, no se encuentra disponible comercialmente.

Por lo anterior, se propuso el desarrollo de un sistema recombinante para producir la HGH-V. Este sistema está constituido por el DNAc de la hormona, el vector de expresión para levaduras pPIC9 y la cepa GS115 de *Pichia pastoris*.

CAPÍTULO II

2. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL: Clonar el DNAc de hGH-V en el vector pPIC9 y producir la proteína correspondiente en el sistema de *Pichia pastoris*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.1 Diseñar oligonucleótidos que permitan amplificar selectivamente la secuencia codificante completa del gen hGH-V.

2.2 Sintetizar a partir de RNA placentario humano, el DNAc de hGH-V por RT-PCR y clonarlo en el vector pBS II KS.

2.3 Subclonar el DNAc de hGH-V en el vector de expresión para levaduras pPIC9 y verificar la integridad y la fase de lectura del DNAc por secuenciación.

2.4 Insertar el vector pPIC9hGH-V en el genoma de la cepa GS115 de *Pichia pastoris* por recombinación homóloga.

2.5 Producir la HGH-V recombinante en cultivo de levaduras y verificar su secreción al medio de cultivo.

2.6 Evaluar la actividad biológica de la HGH-Vr mediante un bioensayo en cultivo celular.

CAPÍTULO III

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 MATERIAL.

Se requirió de los siguientes productos:

A) QUÍMICOS.

Los reactivos para la preparación de soluciones y medios de cultivo fueron adquiridos a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. EUA) y Merck de México (Monterrey, N.L.).

Las diferentes enzimas de restricción utilizadas, asi como la T4 DNA ligasa fueron adquiridas a New England Biolabs (Beverly, MA. EUA). La transcriptasa reversa (TR/MMLV) y los iniciadores para PCR provinieron de Gibco-BRL-Life Technologies, Inc.(Gaithersburg, MD. EUA). La Taq DNA polimerasa fue comprada a Perkin Elmer-Cetus (Alameda, CA. EUA) y los desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) se adquirieron a Promega Co. (Madison, WI. EUA).

B) BIOLÓGICOS.

La cepa Top 10 de *E. coli* y la GS115 de *Pichia pastoris*, asi como el vector de expresión pPIC9, fueron adquiridos a Invitrogen Co. (Gaithersburg, MD. EUA). La línea celular Nb2 empleada en los ensayos de actividad biológica, fue amablemente proporcionada por la Dra. Ma. del Cármen Clapp, del Centro de Neurobiología de la UNAM.

C) INFRAESTRUCTURA.

Además, se utilizó el equipo y la infraestructura disponible en la U.L.I.E.G. que se menciona a continuación:

Un sistema de purificación de agua por ósmosis reversa (RopureST) de la marca Barnstead que alimenta a una máquina de fabricación de hielo modelo Commercial Ice System marca Cornelius, dos ultracongeladores So-Low de Environmental Equipment (Cincinati, Ohio, EUA) que se mantienen a -70 °C, termocicladores PTC-100 (capacidad para 60 tubos) y minicycler (capacidad para 16 tubos) de la marca MJ Research (Waltham, MA. EUA), secuenciador automatizado modelo *IR* 4200 de la compañía LI-COR (Lincoln, NE. EUA), centrífugas y ultracentrífugas de la marca Beckman-Coulter (Fullerton, CA. EUA) modelos: Allegra 21R, Optima TLX, TJ-6, J2-MI y L5-5OE y de la marca Eppendorf (Barkhausenweg, Hamburgo, Alemania) modelos: 5414, 5415C y 5402, dos sistemas de esterilización por calor húmedo Market Forge (Sterilmatic), incubadoras Shel Lab SL (Sheldon Manufacturing Inc.) modelos: 1535 y 1330GX y agitador orbital (ORBIT) de Lab Line. Asimismo, se usó un sistema de digitalización y análisis de imágen GEL DOC 1000/PC de la marca BIORAD (Hercules, CA. EUA), espectrofotómetro de la marca Beckman-Coulter (Fullerton, CA. EUA) modelo Du-70, balanzas de la marca OHAUS modelos Analytical *Plus* y Precision *Standard*, potenciometro digital de la marca ORION modelo 420 A, concentrador al vacío CENTRIVAP de la marca LABCONCO (Kansas City, MO. EUA), fuentes de poder para electroforesis de la marca Gibco-BRL-Life Technologies Inc. (Carlsbad, CA. EUA) modelo 500 High Current, cámaras de electroforesis horizontal de la marca BIORAD (Hercules, CA. EUA), campana de extracción y gabinete de bioseguridad nivel II de la marca LABCONCO (Kansas City, MO. EUA). Para el procesamiento de datos se utilizó una microcomputadora Apple modelo Powerbook 1400cs/333. Los programas requeridos para el análisis y manipulación de

secuencias nucleotídicas fueron: Amplify versión 2.53 (Bill Engels, ©1992, Madison, WI. EUA), DNA Strider™ versión 1.3 (© Ch. Marck & C.E.A. Service de Biochimie Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), Oligo versión 4.0 (© 1992 Wojciech Rychlik, National Bioscience, Inc., Plymouth, MN. EUA), CLUSTAL X Multiple sequence Alignment program versión 1.8 (®Des Higgins & Toby Gibson), y para la captura de datos se utilizó Microsoft OFFICE 2001 en la edición para Macintosh (Microsoft Co.).

3.2 MÉTODOS.

En la Figura 5 se esquematiza la estrategia general que se siguió para llevar a cabo cada uno de los objetivos planteados en el presente trabajo.

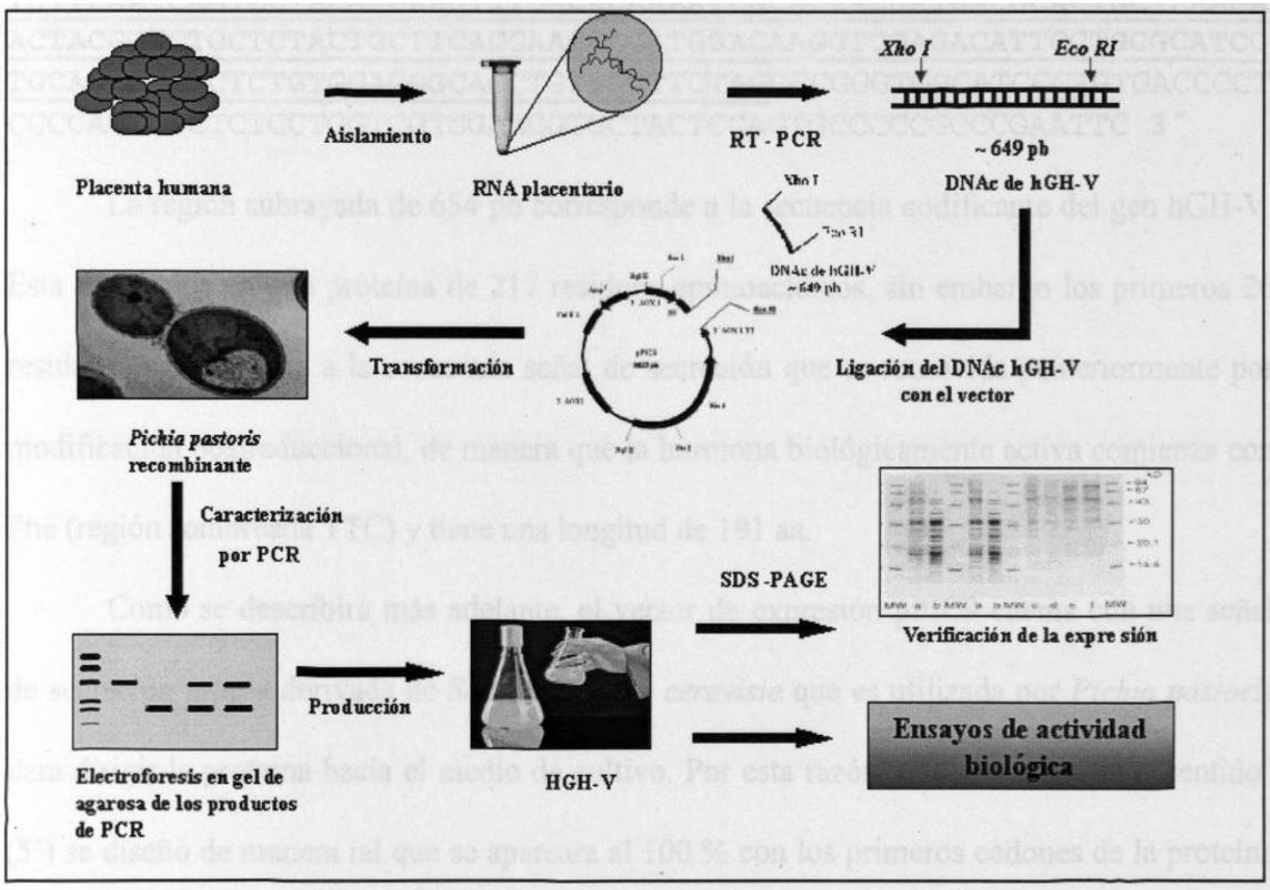

Figura 5. Estrategia general. Se muestran las diferentes etapas experimentales desarrolladas.

3.2.1 Diseño de oligonucleótidos para amplificar selectivamente la secuencia codificante completa del gen hGH-V.

Para el diseño de los iniciadores se tomó como base la secuencia de 747 pb reportada por Igout *y cols.*, en 1988, correspondiente al DNAc de hGH-V, cuyo número de acceso en el GenBank es M38451.

3.2.1.1 Características de diseño dependientes de la secuencia.

5' CACCTAGCGGCAATGGCTGCAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCT
GCCTGTCCTGGCTTCAAGAGGGCAGTGCCTTCCCAACCATTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACA
ACGCTATGCTCCGCGCCCGTCGCCTGTACCAGCTGGCATATGACACCTATCAGGAGTTTGAAG
AAGCCTATATCCTGAAGGAGCAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGCT
TCTCAGAGTCTATTCCAACACCTTCCAACAGGGTGAAAACGCAGCAGAAATCTAACCTAGAGC
TGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGAGCCCGTGCAGCTCCTCAGGAGCG
TCTTCGCCAACAGCCTGGTGTATGGCGCCTCGGACAGCAACGTCTATCGCCACCTGAAGGACC
TAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGTGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGA
TCTTCAATCAGTCCTACAGCAAGTTTGACACAAAATCGCACAACGATGACGCACTGCTCAAGA
ACTACGGGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCG
TGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCT
CCCCACTGCCTCTCCTGGTCGTGGAAGGTGCTACTCCAGTGCCCCCGCCCGAATTC 3'

La región subrayada de 654 pb corresponde a la secuencia codificante del gen hGH-V. Esta se traduce en una proteína de 217 residuos aminoacídicos, sin embargo los primeros 26 residuos corresponden a la secuencia señal de secreción que es removida posteriormente por modificación postraduccional, de manera que la hormona biológicamente activa comienza con Phe (región sombreada TTC) y tiene una longitud de 191 aa.

Como se describirá más adelante, el vector de expresión pPIC9 cuenta con una señal de secreción propia derivada de *Saccharomyces cerevisie* que es utilizada por *Pichia pastoris* para dirigir la proteína hacia el medio de cultivo. Por esta razón, el oligonucleótido "sentido" (5') se diseñó de manera tal que se apareara al 100 % con los primeros codones de la proteína madura. En tanto, el oligonucleótido "antisentido" (3') se ubicó en la región 3' no-traducible.

3.2.1.2 Características de diseño dependientes del vector de expresión.

La localización de las enzimas de restricción de corte único en el sitio de clonación múltiple en pPIC9 se muestran a continuación:

Xho I Señal de corte *Sna* BI *Eco* RI *Avr* II Not I

CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT TAC GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG AAT TAA

Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Tyr Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala Asn ***

Secuencia señal de secreción.

Los iniciadores fueron diseñados tomando en cuenta las características del vector de expresión pPIC9 y de la secuencia codificante de la proteína madura de HGH-V.

Para evaluar la formación de dúplex y de estructuras secundarias, asi como las características fisicoquímicas de los primers y el probable producto de amplificación, se empleó el programa *OLIGO 4.0* (© 1992 Wojciech Rychlik, National Bioscience, Inc., Plymouth, MN. EUA.) y *AMPLIFY 2.53* (Bill Engels, ©1992, Madison, WI. EUA).

3.2.2 Extracción y cuantificación de RNA total de placenta humana.

3.2.2.1 Extracción de RNA.

A partir de tejido placentario fresco, se hicieron múltiples cortes de los cotiledones en fragmentos pequeños, los cuales fueron colocados rápidamente en hielo y lavados varias veces con amortiguador SSC 1X [Na Cl 0.15 M, citrato de sodio 0.015 M, pH 7.4] para eliminar la sangre. Posteriormente se eliminó el exceso de líquido, se colocaron en tubos cónicos de 50 ml y se almacenaron a –70 °C.

10g de tejido placentario fresco se homogenizaron en una licuadora a velocidad alta durante 5 minutos en la solución de lísis [25 ml de fenol-Sevag 1:1 (v/v) + 25 ml de buffer de

extracción: Tris pH 8.0 0.2 M, EDTA 0.025 M, LiCl 0.1 M, SDS 1%]. El homogenizado se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y una vez recuperada la fase acuosa se le agregó proteinasa K a una concentración final de 50 μg/ml y se incubó durante 1 hora a 37 °C.

A continuación se realizó una extracción con un volúmen de fenol-Sevag [1:1 v/v], se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. Se realizaron dos extracciones adicionales con un volúmen de cloroformo-alcohol isoamilico (49:1). A la fase acuosa se le adicionaron 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se incubó durante 12 horas a -20 °C, para posteriormente centrifugar a 3000 rpm durante 25 minutos a 4°C y resuspender la pastilla en 5 ml de agua tratada previamente con DEPC. Se agregaron 2 volúmenes de acetato de sodio 2M pH 4.0 y se incubó a -20°C durante 2 horas.

Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 25 minutos a 4 °C y la pastilla se resuspendió en 5 ml de agua-DEPC. Se agregó acetato de sodio 2M pH 6.0 a una concentración final de 0.2 M y dos volúmenes de etanol al 100% y se incubó a -20 °C durante 12 horas. Se centrifugó a 3000 rpm durante 25 minutos a 4°C y se lavó la pastilla con etanol al 70%. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 100 μl de agua-DEPC.

3.2.2.2 Cuantificación del RNA.

La concentración del RNA se determinó por espectrofotometría leyendo la absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta que las lecturas deben ser mayores de 0.05 para asegurar la significancia. El RNA puro presenta una relación de absorbancia 260/280 nm cercana a 2.0, y para estimar la concentración de RNA se asume que una solución de RNA de 40 μg/ml tendrá una absorbancia de 1.0 a 260 nm.

Para la determinación de la cantidad del RNA extraído, se hizo una dilución 1:250 con agua-DEPC, se leyó la absorbancia a 260 nm y el valor obtenido en la lectura multiplicado por 10 se reportó como la concentración del RNA en la muestra, expresado en mg/ml. Para verificar la calidad del RNA obtenido se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (1%)-isotiocianato de guanidina y se tiñó con bromuro de etidio.

3.2.3 Síntesis del DNAc de hGH-V por RT-PCR y caracterización del producto amplificado con la enzima *Bgl* II.

La enzima TR/MMLV es una DNA polimerasa de origen viral capaz de catalizar *in vitro* la polimerización de desoxirribonucleósidos trifosfatados, empleándo RNA como templado para la retrotranscripción. De esta manera se obtuvo una copia de cadena sencilla de DNA a partir del RNAm de hGH-V. Posteriormente, la T4 DNA polimerasa se utilizó para sintetizar la cadena complementaria y amplificar la secuencia de interés obteniendo millones de copias de cadena doble.

Adicionalmente, se procedió a demostrar la existencia del sitio *Bgl* II para descartar posibles productos de amplificación derivados de los genes de lactógenos placentarios, los cuales guardan una alta similitud con hGH-V pero carecen de dicho sitio. Cabe mencionar que el gen hGH-N presenta el sitio de restricción para *Bgl* II en la misma posición, sin embargo su expresión está restringida a células de hipófisis.

3.2.3.1 Síntesis de la primera cadena de DNAc de hGH-V por retrotranscripción.

Se colocaron 4.5 μg de RNA total de placenta humana en un tubo eppendorf de 0.5 ml y se incubó a 65°C por 10 minutos, posteriormente se mantuvo en hielo por 10 minutos más y se agregó una mezcla de reacción de acuerdo con la Tabla 4. A continuación la reacción se

mantuvo a 42°C durante una hora en un termociclador y los productos de la reacción se almacenaron a – 20 °C hasta su uso.

Tabla 4. Condiciones de reacción para la síntesis de la primera cadena de DNAc de hGH-V.

REACTIVOS	VOLÚMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 5 X	6.0 µl	1 X
DTT 0.1 M	2.0 µl	6.6 mM
Primer 3′ 5 µM	2.5 µl	0.41 µM
dNTP′s 10 mM	1.5 µl	0.5 mM
RT/MMLV 200 U/µl	2.0 µl	~ 90 U/µg de RNA
Agua-DEPC	cbp 30 µl	

3.2.3.2 Amplificación del DNAc de hGH-V por PCR.

Se prepararó una mezcla de reacción de acuerdo con la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación del DNAc de hGH-V.

REACTIVOS	VOLÚMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10 X	2.5 µl	1 X
$MgCl_2$ 25 mM	1.5 µl	1.5 mM
dNTP′s 10 mM	0.75 µl	300 µM
Primer 5′ 5 µM	2.5 µl	0.5 µM
Primer 3′ 5 µM	2.5 µl	0.5 µM
DNAc	5 µl	
Agua-mQ	10 µl	cbp 25 µl

Se mezcló perfectamente y se agregó 0.25 µl de la preparación comercial de Taq DNA polimerasa que contiene 5 U/µl.

Finalmente se adicionó una gota de aceite mineral estéril para evitar la evaporación y el tubo se colocó en el termociclador.

Las condiciones de amplificación en el termociclador empleadas para sintetizar el DNAc de hGH-V se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa de amplificación empleado para sintetizar el DNAc de hGH-V.

PASO	TEMPERATURA °C	TIEMPO
1	94	5 min.
2	94	30 seg.
3	59	45 seg.
4	72	1 min.
5	30 ciclos	
6	72	5 min.
7	FIN	

3.2.3.3 Caracterización con la enzima *Bgl* II.

Los primers diseñados amplificaron *in silico* (*Amplify 2.53*) un fragmento de 649 pb del gen hGH-V, el cual al ser digerido con la enzima *Bgl* II (*DNA Strider 1.3*) generó dos fragmentos de 425 y 224 pb. Las condiciones de reacción se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de reacción para la digestión de los productos de PCR con *Bgl* II.

REACTIVOS	VOLÚMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Prod. PCR (20 ng/µl)	8.0 µl	16 ng/µl
Buffer NEB 3 10 X	1.0 µl	1 X
Bgl II 10 000 U/ml	1.0 µl	10 U/µg DNA
Agua mQ	-	cbp 10 µl

3.2.4 Clonación del DNAc de hGH-V en el vector pBS II KS (+) por "Vector T".

Durante la PCR, la Taq DNA polimerasa normalmente adiciona un solo nucleótido (generalmente una adenina) en el extremo 3′ de las cadenas dobles de DNA. Esta propiedad de la enzima es aprovechada en la técnica de clonación por Vector T, en la cual el vector es digerido con una enzima de restricción que deje los extremos "romos" y posteriormente se adiciona también un solo nucleótido (timina) en sus extremos 3′ para lograr la complementariedad con los productos de PCR. Posteriormente ambos fragmentos son ligados

y los vectores recombinantes son propagados en bacterias por transformación (Sambrook *y cols.*,1989).

La clonación se inició con la obtención de DNA plásmidico de PBS II KS(+) a partir de colonias de *E. coli* (cepa Top 10) portadoras del plásmido con el fin de disponer de suficiente material para comenzar con el proceso de clonación, de acuerdo con la siguiente técnica (Sambrook *y cols.*, 1989).

3.2.4.1 Preparación de DNA plasmídico a pequeña escala (MINIPREP).

Se propagó un cultivo a partir de una colonia de las bacterias portadoras del plásmido durante 16 horas a 37 °C y a 250 rpm en 3 ml de medio LB c/ampicilina. Se empastillaron las células mediante centrifugaciones susesivas a 6000 rpm durante 5 minutos y se eliminaron los sobrenadantes. La pastilla de células se resuspendió en 100 µl de la solución I fria [Glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 25 mM, EDTA pH 8.0 10 mM] y se incubó en hielo durante 5 minutos.

Se agregaron 200 µl de la solución II recien preparada [NaOH a 0.2 N, y SDS al 1%], se mezcló rapidamente por inversión y se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 150 µl de la solución III fria [Acetato de Amonio 7.5 M], se mezcló al vórtex y se incubó durante 5 minutos más en hielo.

A continuación se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se realizó una extracción con 1 volúmen de fenol:Sevag (1:1 v/v).

Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se precipitó el DNA plasmídico agregando 2.5 volúmenes de etanol al 100% e incubando a -20°C durante 2 horas.

Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos y se removió completamente el sobrenadante, además se dejó el tubo invertido sobre una toalla de papel para eliminar cualquier residuo de etanol. Se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 70% y se dejó secar completamente a 37°C. Finalmente la pastilla se resuspendió en 50-100 µl de TER [Tris-HCl pH 8.0 10mM, EDTA pH 8.0 1mM, RNAsa 20 µg/ml],y se almacenó a -20°C.

3.2.4.2 Digestión de pBS II KS(+) con *Eco* RV.

Se realizó una primera digestión de 10 µg de pBS II KS(+) con *Eco* RV , en un volúmen final de 40 µl, y se realizaron dos digestiones más de manera secuencial, tomando la mitad de la digestión previa hasta verificar la digestión total del plásmido por su incapacidad de generar colonias al transformar *E. coli* Top 10, garantizando de esta manera que el plásmido estuviese completamente digerido.

3.2.4.3 Preparación del Vector "T".

Se tomaron 10 µL (62.5 ng/µL) de plásmido digerido (3ª digestión) y se procedió como se describe en la Tabla 8 para la adición de "T" al vector linearizado.

Tabla 8. Condiciones de reacción para la adición de "T" al vector pBS linearizado con *Eco* RV.

REACTIVOS		VOLÚMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
DNA lin pBS II KS(+)	62.5 ng/µl	10 µl	25 ng/µl
Buffer PCR	10 X	2.5 µl	1 X
Mg Cl_2	25 mM	2.0 µl	2 mM
dTTPs	10 mM	2.5 µl	1 mM
DNA Polimerasa Taq	5 U/µl	0.25 µl	0.05 U/µl
Agua mQ		Cbp 25 µl	

La mezcla de reacción se incubó a 72 C durante 30 minutos y los productos de la reacción se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

3.2.4.4 Ligación del DNAc de hGH-V al vector pBS II KS(+).

La ligación de un fragmento de DNA a un vector linearizado involucra la formación de nuevos enlaces fosfodiester entre los residuos de fosfato localizados en los extremos 5′ de una doble cadena de DNA y los grupos hidroxilo de los extremos 3′ del vector. Esta reacción puede ser catalizada *in vitro* en presencia de ATP por enzimas llamadas DNA ligasas.

Para favorecer la generación de vectores recombinantes se empleó una relación molar 1:7 de vector:inserto;. otros detalles de la reacción de ligación se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de reacción para la ligación del DNAc de hGH-V al vector de clonación pBS II KS(+).

REACTIVOS		VOLÚMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua mQ		cbp 30 µl	
Buffer de ligación	5X	6 µl	1 X
Vector T	25 ng/µl	4 µl	3.33 ng/µl
DNAc hGH-V	25 ng/µl	6 µl	5.0 ng/µl
Ligasa	0.5 - 2 U/µl	3 µl	0.05 - 0.2 U/µl

La reacción de ligación fue incubada a 37 °C durante 2 horas y el producto fue almacenado a -20 °C hasta ser utilizado en la transformación.

3.2.4.5 Transformación con células calcio-competentes *E. coli* Top 10.

Durante la reacción de ligación se generan moléculas quiméricas formadas por el vector y el DNAc, sin embargo el número de éstas es muy reducido y pueden encontrarse mezcladas varias formas alternativas. Para facilitar el aislamiento y análisis de las quimeras, se llevó a cabo un proceso de propagación-amplificación durante el cual los productos de la

ligación fueron transformados en bacterias pre-tratadas con $CaCl_2$ mediante un choque térmico a 42 °C. Una vez dentro de las bacterias, los vectores recombinantes son duplicados a la par que el DNA genómico, y cada vez que la bacteria se divide se genera una producción clonal de los vectores recombinantes, los cuales pueden ser aislados y caracterizados individualmente.

A) Preparación de células calcio-competentes.

Se inoculó una colonia de *E. coli* Top 10 en 50 ml de medio LB y se incubó durante toda la noche a 37°C en agitación (250 rpm). Se tomaron 4 ml del cultivo para inocular 400 ml de medio LB y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una $DO_{600\ nm}$ de 0.375.

Se repartió el cultivo en alícuotas de 50 ml en tubos de polipropileno previamente enfriados y se mantuvieron en hielo por 5-10 minutos. Se centrifugaron las células a 4500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Cada pastilla se resuspendió en 10 ml de $CaCl_2$ 0.1 M previamente enfriado, y se mantuvieron las células resuspendidas durante 30 minutos sobre hielo. Posteriormente se centrifuguaron a 4500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, cada pastilla se resuspendió en 2 ml de $CaCl_2$ 0.1 M frio y se repartió en alícuotas de 250 µl en tubos de polipropileno previamente enfriados, los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados inmediatamente a -70 °C (Sambrook *y cols.*, 1989).

B) Transformación.

La transformación se llevó a cabo mezclando 1/3 del volúmen de ligación (~ 35 ng de DNA del vector) con 100 µl de células competentes, de la manera siguiente:

Se agregó la alícuota de la reacción de ligación a un tubo estéril de polipropileno y se colocó en hielo por 10-15 minutos. Se descongeló rapidamente un vial de células competentes

y se transfirieron 100 µl al tubo de la reacción de ligación y se incubó por 10 minutos más en hielo. Se dió un choque térmico a 42°C por 90 segundos y posteriormente se agregó 1 ml de medio LB estéril y se incubó a 37°C en agitación (250 rpm) durante una hora. Finalmente, se plaqueó en medio LB sólido conteniendo ampicilina (50 µg/ml) y X-gal (800 µg/ml) e IPTG (800 µg/ml) y se incubó a 37°C durante 12-16 horas. Adicionalmente se llevó a cabo una transformación en paralelo con 1 ng de pBS II KS (+) como testigo de transformación y para verificar la eficiencia del proceso.

3.2.4.6 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes.

El vector pBS II KS (+) lleva un segmento corto del DNA de *E. coli* que contiene las secuencias reguladoras y codificante de los primeros 146 aminoácidos de la enzima β-galactosidasa (lac Z), y embebido en esta región se encuentra el sitio de policlonación que no afecta el marco de lectura del extremo aminoterminal de la β-galactosidasa. Este tipo de vectores son utilizados en cepas de *E. coli* que codifican para el extremo carboxiterminal faltante de la enzima. Ninguno de los dos fragmentos de la β-galactosidasa son activos de manera independiente y solo se produce la enzima activa cuando se lleva a cabo la complementación (referida como α- complementación) entre las secuencias del vector y la bacteria. Las bacterias Lac^+ que resultan de la α-complementación son fácilmente reconocidas debido a que forman colonias azúles en precencia del sustrato cromogénico *X-gal* y del inductor *IPTG*. Sin embargo, la inserción de un fragmento de DNA en el sitio de policlonación impide la α-complementación. Por lo tanto, las bacterias portadoras de plásmidos recombinantes darán lugar a la formación de colonias blancas.

Para determinar cuales de las colonias blancas obtenidas por tamizaje en el medio de selección (Agar LB/Amp) eran portadoras de plásmidos recombinates, cada una de ellas se transfirió a medio LB/Amp (4 ml) y se incubaron por 16 horas a 37 °C. Posteriormente se llevó a cabo la extracción del DNA plasmídico por miniprep (3.2.4.1) y se efectuó una electroforesis en agarosa al 0.8% . Por comparación con la migración del plásmido pBS II KS (+) se determinó cuales de las clonas candidatas contenían plasmidos recombinantes (portadores del DNAc de hGH-V) que al tener un peso molecular más alto por contener un fragmento adicional de DNA, migraban de manera retrasada atraves del gel.

3.2.4.7 Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes.

Los plásmidos recombinantes seleccionados de acuerdo al criterio anterior se sometieron a una exaustiva caracterización con endonucleasas de restricción para determinar si el inserto que contenían correspondía en tamaño al DNAc de hGH-V, y para determinar su orientación dentro del plásmido, ya que la clonación de productos de PCR por Vector "T" genera recombinates en los cuales el inserto puede estar en cualquiera de las dos orientaciones posibles.

a) Verificación de la clonación del DNAc de hGH-V.

Para verificar la prescencia del inserto en los plásmidos recombinantes, 450 ng de cada uno de ellos se sometieron a una doble digestión con las enzimas *Xho* I y *Eco* RI, en un volúmen de reacción de 15 µl.

b) Demostración de la existencia del sitio *Bgl* II.

Para descartar posibles productos de amplificación derivados de los genes de lactógenos placentarios, los cuales debido a su alta similitud pudieron haber sido

coamplificados con hGH-V, se aprocedió a demostrar la existencia del sitio de corte para la enzima *Bgl* II, digiriendo 450 ng de cada vector recombinante con dicha enzima en un volúmen de reacción de 15 µl.

c) Determinación de la orientación del DNAc dentro del vector pBS II KS (+).

El vector pBS II KS (+) presenta sitios únicos de reconocimiento para las endonucleasas de restricción *Xho* I y *Eco* RI flanqueando al sitio *Eco* RV, el cual fue utilizado para generar extremos "romos" durante la generación del vector T. En consecuencia, cualquier fragmento de DNA que sea clonado por vector T, estará tambien flanqueado por los sitios de reconocimiento para dichas enzimas. Dado que los primers empleados para la síntesis del DNAc de hGH-V por RT-PCR presentan estos mismos sitios de reconocimiento, el producto de la PCR presenta también sitios de restricción *Xho* I *y Eco* RI en sus extremos, y por lo tanto, los recombinantes generados por vector T contienen ahora dos sitios de reconocimiento para cada enzima. La posición relativa de entre cualquiera de éstos dos sitios nos permitió inferir la orientación del DNAc en los vectores recombinantes.

Como puede observarse en la Figura 6, dependiendo de la orientación del DNAc dentro del vector, dos sitios de restricción *Xho* I puden quedar flanqueándo al DNAc (opción B) o bien pueden quedar hacia el mismo lado (opción A).

Debido a que se utilizaron los sitios *Xho* I y *Not* I para transferir el DNAc al vector de expresión pPIC9, la opción A resultó la correcta, ya que al cortar con estas enzimas se libera un fragmento de 685 pb que contiene al DNAc de hGH-V con los extremos adecuados para la ligación. En la opción B, el DNAc estaría contenido en un fragmento de 670 pb con sitios *Xho* I en ambos extremos. La reacción de digestión con *Xho* I se llevó a cabo bajo condiciones estándar con 450 ng de los vectores recombinantes, y en un volúmen de reacción de 15 µl.

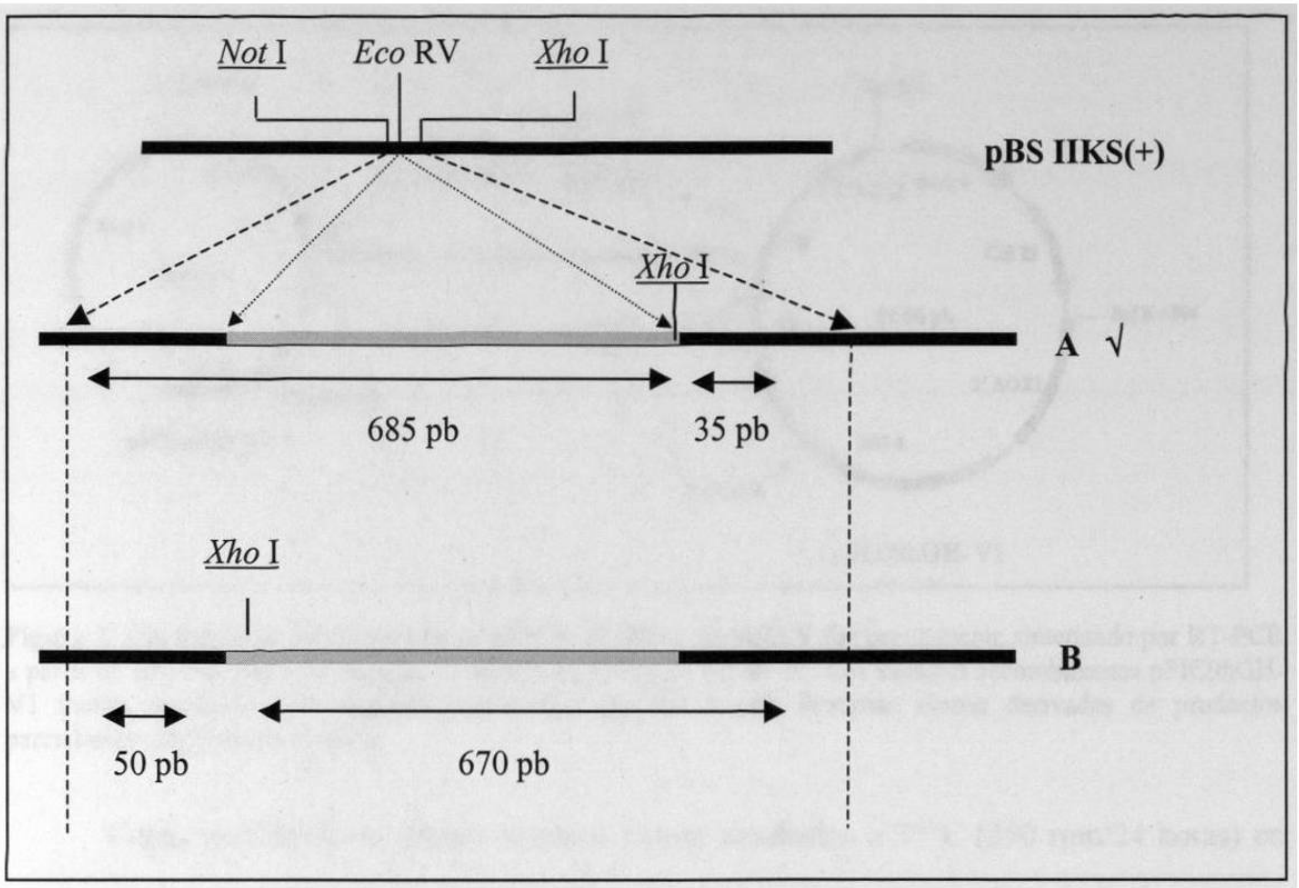

Figura 6. Orientación del DNAc de hGH-V en el vector pBS II KS(+). Se muestran las dos orientaciones posibles, A y B, que pueden resultar de la ligación del DNAc con el vector "T", asi como los fragmentos generados por la digestión de los plásmidos recombinantes con *Xho I*, de 35 y 670 pb, los cuales permitieron inferir la orientación del DNAc.

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.

3.2.5.1 Subclonación del DNAc de hGH-V al vector de expresión para levaduras pPIC9.

Para transferir el DNAc de hGH-V del plásmido pBS II KS(+) al vector pPIC9, el primero fue digerido con *Xho* I y *Not* I para liberar el cassette de expresión. Dicho cassette de expresión fue posteriormente ligado en el vector de expresión pPIC9 previamente cortado en los mismos sitios (ver la Figura 7).

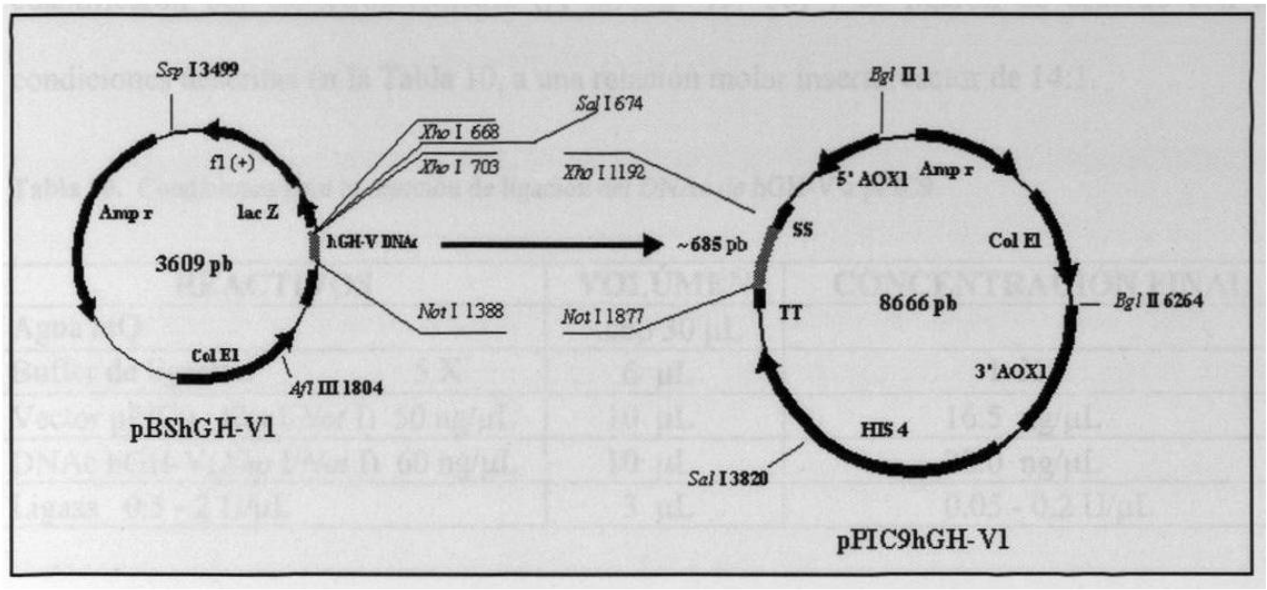

Figura 7. Estrategia de subclonación en pPIC9. El DNAc de hGH-V fué previamente sintetizado por RT-PCR a partir de RNA de placenta humana y clonado en pBS por "vector T". Los vectores recombinantes pPIC9hGH-V1 fueron analizados por digestión enzimática con *Sal* I para descartar clonas derivadas de productos parcialmente digeridos con *Xho* I.

Cepas portadoras de ambos vectores fueron incubadas a 37°C (250 rpm/24 horas) en medio LB (4 ml). Posteriormente se realizaron extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala, y la cantidad y calidad de éste se determinó por espectrofotometría ($A_{260\,nm}$ /$A_{280\,nm}$) y mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se realizaron digestiones preparativas con las enzimas *Xho* I y *Not* I, con 9 µg de los vectores pBShGH-V y pPIC 9, en un volúmen de reacción de 50 µl. Posteriormente, 1 µl de cada reacción de digestión (~180 ng de DNA) fueron resueltos por electroforésis en gel de agarosa al 0.8 % para verificar la eficiencia del corte de las endonucleasas. A continuación se realizó una electroforesis preparativa utilizándo el resto de la reacción de digestión, y una vez resueltas las bandas de interés (el DNAc de 685 pb y el vector de 7981 pb) se procedió a cortarlas del gel para su recuperación.

Ambos fragmentos fueron purificados (QIAEX II Gel extraction Kit) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por la compañía QIAGEN. Una vez purificados, se

cuantificaron por espectrofotometría ($A_{260\ nm}$ X 50) y se ligaron de acuerdo con las condiciones descritas en la Tabla 10, a una relación molar inserto:vector de 14:1.

Tabla 10. Condiciones para la reacción de ligación del DNAc de hGH-V a pPIC9.

REACTIVOS	VOLÚMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Agua mQ	cbp 30 µL	
Buffer de ligación 5 X	6 µL	1 X
Vector pPIC9 (*Xho I/Not I*) 50 ng/µL	10 µL	16.5 ng/µL
DNAc hGH-V(*Xho I/Not I*) 60 ng/µL	10 µL	20.0 ng/µL
Ligasa 0.5 - 2 U/µL	3 µL	0.05 - 0.2 U/µL

La ligación se llevó a cabo a 37 °C durante 2 horas. Se empleó DNA de pPIC9 digerido con *Acc* I como testigo de ligación y una vez verificada ésta por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, 1 y 3 µl de la reacción de ligación entre pPIC9 y el DNAc de hGH-V fueron utilizados para transformar células Ca^{++} competentes *E. coli* Top 10 (sección 3.2.5.5).

3.2.5.2 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes.

Para determinar cuales de las colonias obtenidas por tamizaje en el medio de selección (agar LB/Amp) eran portadoras de plásmidos recombinates, cada una de ellas se transfirió a medio líquido LB/Amp (4 ml) y se incubaron a 37 °C/250 rpm durante 16 horas. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de los DNAs plasmídicos por miniprep (3.2.4.1), y 1 µg de cada uno de ellos se linearizaron con la enzima *Sal* I, en un volúmen de reacción de 10 µl. A continuación se realizó una electroforesis en agarosa al 0.7% , y por comparación con la migración del plásmido pPIC 9, se determinó cuales de las clonas candidatas contenían plásmidos recombinantes (portadores del DNAc de hGH-V), que al tener un peso molecular más alto, por contener un fragmento adicional de DNA, migraban de manera retrasada atraves del gel.

3.2.5.3 Caracterización enzimática de los plásmidos recombinantes.

Los plásmidos recombinantes seleccionados de acuerdo al criterio anterior, se sometieron a una exaustiva caracterización con endonucleasas de restricción para verificar que el inserto que contenían correspondía en tamaño al DNAc de hGH-V, para verificar la presencia del sitio adicional *Bgl* II en los plásmidos portadores del DNAc de hGH-V, y para diferenciar la construcción de pPIC9hGH-V de la de pPIC9hGH22K, previamente construída (Escamilla *y cols.*, 1996) con la que guarda una alta similitud.

a) Estimación del tamaño del inserto en los plásmidos recombinantes.

Los plásmidos que presentaron migración retrasada por electroforesis en agarosa al 0.7% fueron sometidos a una doble digestión con las enzimas *Xho* I y *Not* I, empleando 1 μg del DNA plasmídico en un volúmen de digestión de 10 μl.

b) Demostración de la existencia de un sitio adicional *Bgl* II en los plásmidos recombinantes.

El plásmido pPIC9 posee dos sitios de restricción *Bgl* II, lo cual genera dos fragmentos (5620 y 2403 pb) al ser digerido con dicha enzima. Por otra parte, el DNAc de hGH-V cuenta con un sitio interno *Bgl* II, por lo tanto, los plásmidos portadores del DNAc ganaron un sitio *Bgl* II y generaron tres fragmentos de 4651, 2403 y 1612 pb (*Amplify 2.53*). Para demostrarlo experimentalmente, se digirió 1 μg de DNA de los plásmidos recombinantes en un volúmen de reacción de 10 μl.

c) Caracterización de los vectores de expresión pPIC9hGH-V y pPIC9hGH22K con *Xba* I.

Dada la alta similitud de las secuencias del DNAc de hGH-N y hGH-V, se hizo necesario establecer un mecanismo de difrenciación entre ambos vectores y se encontró que al digerir el vector pPIC9hGH-V con la enzima *Xba* I se generan 2 fragmentos de 7862 y 804 pb (*DNA Strider 1.3*), mientras que el vector pPIC9hGH-22K genera 2 fragmentos de 7212 y 1377 pb (Escamilla y *cols*., 1996). Esto permitió diferenciar ambas construcciones al resolver los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % . La digestión con *Xba* I se llevó a cabo bajo condiciones estándar empleando 1 μg de DNA de los vectores recombinantes en un volúmen de reacción de 10 μl.

3.2.5.4 Verificación de la fase de lectura del DNAc por secuenciación.

El vector recombinante pPIC9hGH-V construído fue proporcionado al servicio de secuenciación de la U.L.I.E.G., donde se amplificó por PCR todo el cassette de expresión utilizándo los primers AOX 1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3', y 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'). Dicho cassette de expresión consta del DNAc de hGH-V fusionado a la secuencia codificante para la señal de secreción. Este fue secuenciado en ambas cadenas (LICOR, DNA Sequencer Long Read IR 4200) y la secuencia obtenida fue comparada con las del GenBank (*BLASTN*) y con la secuencia del vector pPIC9 (*CLUSTAL X* 1.8), para verificar la integridad del DNAc de hGH-V y su marco de lectura abierto con la secuencia señal de secreción.

3.2.6 Integración del vector pPIC9hGH-V al genoma de *Pichia pastoris*.

3.2.6.1 Preparación del DNA para transfección.

El DNA plasmídico de pPIC9hGH-V fue linearizado con la enzima *Sac* I como paso previo a la transfección de levaduras Li^+-competentes de *Pichia pastoris*. La digestión se llevó a cabo con 10 μg del vector, en un volúmen de reacción de 50 μl.

3.2.6.2 Preparación de levaduras competentes con LiCl.

Levaduras de la cepa GS115 de *Pichia pastoris* fueron pretratadas con LiCl como paso previo a la transfección, de acuerdo con la siguiente técnica (Invitrogen Co.)

Se creció un cultivo de la cepa en 50 ml de YPD [extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%] a 30°C /250 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.8 – 1.0; posteriormente las células se cosecharon centrifugando a 4,500 rpm/10 minutos y se lavaron con 25 ml de agua destilada estéril. Después de eliminar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en un ml de LiCl 100 mM y transferidas a un tubo de microcentrífuga. Las células fueron empastilladas centrifugando a 14,000 rpm/10 segundos, se decantó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 400 μL de LiCl 100 mM. Finalmente, se prepararon alícuotas de 50 μL de la suspensión celular en tubos de microcentrifuga. Sin embargo, las alícuotas requeridas fueron utilizadas inmediatamente, ya que no se recomienda almacenarlas para su uso posterior.

3.2.6.3 Transfección de levaduras Li^+ competentes de *Pichia pastoris.*

Para cada proceso de transfección se tomó una alícuota de 50 µl de células Li^+-competentes, se centrifugó a 14,000 rpm/10 segundos, se eliminó el sobrenadante y se agregaron los siguientes reactivos en el orden mencionado: 240 µl de PEG al 40%, 36 µl de LiCl a 1M, 25 µl de DNA de cadena sencilla a 2 mg/ml (ebullido 5 minutos y mantenido en hielo) y 10 µg del DNA plasmídico linearizado de pPIC9hGH-V en un volúmen máximo de 50 µl. Se mezcló completamente en el vortex aproximadamente durante 1 minuto y los tubos se incubaron a 30 °C sin agitación. Posteriormente se llevó a cabo un choque térmico a 42 °C durante 25 minutos. En seguida, los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm/10 segundos y se eliminó la solución de transfección, las pastillas de células fueron inmediatamente resuspendidas en 1 ml de agua estéril y alícuotas de 100 µl fueron plaqueadas en medio selectivo RDB [sorbitol 1M, glucosa 1%, YNB 1.345 %, biotina 4 X 10^{-5} M, aminoácidos 0.005%] e incubadas a 30°C durante 5-7 días hasta observar la aparición de colonias de levaduras transfectadas.

3.2.6.4 Extracción de DNA genómico de las levaduras transfectadas.

Las colonias que se desarrollaron en el medio selectivo fueron transferidas a placas de agar YPD e incubadas a 30 °C/24 horas. Posteriormente se realizó la extracción de DNA genómico de cada una de ellas para efectuar un análisis por PCR para determinar la presencia del casette de expresión en el genoma de la levadura y asi comprobar la inserción del "cassette" de expresión del DNAc de hGH-V.

Para la obtención del DNA genómico de las levaduras se realizó lo siguiente: cada colonia que creció en el medio selectivo fue transferida a placas de agar YPD y posteriormente

inoculada en medio YPD (2 ml), incubándo a 30 °C/250 rpm por 24 horas. Posteriormente las células fueron cosechadas centrifugando a 14,000 rpm/10 segundos y la pastilla fue lavada con 500 µl de agua ultrapura estéril. Las levaduras se resuspendieron en 300 µl de amortiguador de lísis TSNT por agitación leve en vórtex. A continuación, se agregaron 650 µl de fenol y los tubos se mantuvieron en agitación suave durante 5 minutos. Posteriormente se realizó una extracción con 150 µl de Sevag y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 300 µl de amortiguador TE pH 8.0, se mezcló por inversión durante 10 segundos y se centrifugó a 14,000 rpm/5 minutos. Luego se separó la fase acuosa y se agregaron 1.5 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA. Se centrifugó a 14,000 rpm/5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% . La pastilla fue secada al vacio durante 5 minutos, resuspendida en 500 µl de amortiguador TE pH 8.0 y almacenada a –20°C.

La integridad del DNA genómico fue verificada por electroforesis en gel de agarosa (0.8%) y la cantidad y pureza por espectrofotometría, leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm (el valor del primero suele ser de casi el doble del segundo).

3.2.6.5 Verificación de la inserción del gen hGH-V en el genoma de *Pichia pastoris* mediante PCR.

Para evidenciar la presencia del casette de expresión en las levaduras transformadas se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa utilizando DNA genómico de dichas levaduras y los iniciadores *AOX1* proporcionados por Invitrogen Co.

Los detalles de la reacción de PCR se muestran en la Tabla 11 y el programa utilizado para la amplificación en la Tabla 12.

Tabla 11. Condiciones de la reacción de PCR para evidenciar la inserción del cassette de expresión de hGH-V en el genoma de *P. pastoris*.

REACTIVOS	VOLÚMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10 X	2.5 µl	1 X
$MgCl_2$ 25 mM	1.5 µl	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.75 µl	300 µM
Primer 5′ 5 µM	2.5 µl	0.5 µM
Primer 3′ 5 µM	2.5 µl	0.5 µM
DNA 200 ng/µl	1 µl	8.0 ng/µl
Agua-mQ	14 µl	cbp 25 µl

Se mezcló perfectamente y se agregó 0.25 µl de la preparación comercial de Taq DNA polimerasa que contiene 5 U/µl.

Finalmente, se adicionó una gota de aceite mineral estéril para evitar la evaporación y el tubo se colocó en el termociclador.

Tabla 12. Programa de amplificación para los iniciadores *AOX1*.

CICLOS	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO
1	94	5 min
2	94	59 seg
3	60	1 min
4	72	2 min
5	26 ciclos	
6	72	7 min
7	FIN	

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research Inc., modelo PTC-100. Una vez terminada la reacción, se retiró el aceite mineral y se tomó una alícuota de 5 µl y los fragmentos amplificados fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % .

3.2.7 Producción de la HGH-V recombinante en cultivo de levaduras.

3.2.7.1 Cinéticas de crecimiento con glicerol y metanol como única fuente de carbono.

Las cepas de *Pichia pastoris* portadoras del DNAc de hGH-V fueron incubadas a 30 °C/250 rpm en 10 ml de medio BMGY [buffer de fosfato de potasio 100 mM, YNB 1.34%, biotina 4 X 10^{-5} M, glicerol 1%, extracto de levadura 1%, peptona 2%] en tubos cónicos de 50 ml, y se siguió la cinética de crecimiento leyendo la $DO_{600\ nm}$ durante 48 horas. Adicionalmente, se realizó el mismo experimento en medio BMMY [buffer de fosfato de potasio 100 mM, YNB 1.34%, biotina 4 X 10^{-5} M, metanol 1%, extracto de levadura 1%, peptona 2%]. En ambos casos las cepas fueron crecidas previamente en YPD, empastilladas y resuspendidas a una DO inicial de 1.0.

3.2.7.2 Inducción de la expresión con 1% de metanol.

Para inducir la expresión de las cepas GS115HGHV-22K, cultivos crecidos en BMGY durante 48 horas fueron empastillados y resuspendidos a una $DO_{600\ nm}$ = 10 en 10 ml de medio BMMY. Posteriormente fueron incubados a 30 °C/250 rpm durante 96 horas, alimentando el cultivo con metanol cada 24 horas (1% v/v) para compensar las pérdidas por evaporación.

Para determinar el efecto del pH sobre la estabilidad del la hormona en el medio de cultivo, se realizaron inducciones similares en BMMY a pH 4.0 y 5.0, preparados con buffer de citrato de sodio 0.1 M y a pH 6.0, 7.0 y 8.0 con buffer de fosfato de sodio 0.1 M.

3.2.7.3 Diálisis y cuantificación de las proteínas totales del medio de cultivo.

Al finalizar el periodo de inducción de 96 horas, los cultivos fueron centrifugados a 4,000 rpm/15 minutos para eliminar la biomasa. El medio de cultivo fue dializado a 4 °C contra agua ultrapura (400:1) con 4 cambios de agua cada 6 horas.

Una vez concluída la diálisis, los medios de cultivo fueron llevados a un volúmen de 15 ml con agua ultrapura y se determinaron las proteínas totales por el método de Bradford, construyendo una curva de calibración con BSA de 1-10 μg/ml en volúmenes finales de reacción de 2 ml. Para cada caso se emplearon 10 μL del dializado (*Bradford*, 1976).

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

Para evidenciar la producción de HGH-V, el volúmen equivalente a 1 ml del medio de cultivo fue precipitado y resuspendido en buffer de muestra para SDS-PAGE, como se describe a continuación:

Se agregaron 1.5 volúmenes de metanol absoluto al volúmen equivalente a 1 ml del medio de cultivo y se mezcló por inversión. A continuación se adicionó un volúmen de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente. Se descartó el mayor volúmen posible de la fase orgánica dejándo las proteínas precipitadas en la interfase y se agregó un volúmen de metanol absoluto. Se centrifugó a 12,000 rpm/ 2 minutos, se decantó el sobrendante y la pastilla se secó durante 5 - 10 minutos en un evaporador al vacio (adaptado de Wessel *y cols.*, 1984)

La pastilla fue resuspendida en 20 μl de buffer de muestra para SDS-PAGE y posteriormente fue sometida a desnaturalización a 100 °C durante 5-10 minutos.

A continuación cada una de las muestras se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles discontinuos (5/15%) de poliacrilamida. Una vez concluída ésta, los geles fueron fijados durante 20 minutos [metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v, en agua ultrapura] y teñidos con azúl de Coomasie durante una hora [Azúl de Coomasie 0.5% m/v, metanol 50%, ácido acético 10%, en agua ultrapura] y posteriormente desteñidos hasta alcanzar el contraste deseado [metanol 5% v/v, ácido acético 7% v/v, en agua ultrapura].

Para hacer una estimación de la pureza de la proteína, la imágen del gel se digitalizó mediante el sistema GELDOC 1000 (Biorad) y se sometió a densitometría utilizando el programa *Molecular Analyst* de la misma compañía. Una vez determinada la abundancia relativa de HGH-V, se estimó la producción total en mg/l, empleando el valor de las proteínas totales determinado por el método de Bradford.

3.2.8 Evaluación de la actividad biológica de la HGHVr.

Una gran cantidad de bioensayos para determinar actividad biológica de hormonas del crecimiento y proteínas estrechamente relacionadas (PLs y PRLs) han sido descritos en la literatura biomédica. En general pueden dividirse en dos grandes grupos: los que emplean el receptor de hormona del crecimiento, para medir la actividad somatogénica, y los que emplean el receptor de la prolactina, en cuyo caso se determina la actividad lactogénica.

En el presente trabajo se propuso evaluar la actividad lactogénica de la HGH-V producida en *Pichia pastoris* frente al receptor de la prolactina de rata en las células Nb2, midiendo la proliferación celular inducida por dicha hormona (adaptado de Tanaka *y cols.*, 1980).

3.2.8.1 Propagación de los cultivos.

Los cultivos de células Nb2 se expandieron clonalmente en medio de Fischer suplementado con suero de caballo (10%), suero bovino fetal (10%), 2-mercaptoetanol (10^{-4} M), penicilina (50 U/ml) y estreptomicina (50 μg/ml).

La incubación se llevó a 37 °C en atmósfera de 5% CO_2-95% aire; el tiempo de duplicación bajo estas condiciones fue de 24 horas.

3.2.8.2 Determinación de la curva de proliferación de células Nb2 con HGH (*Humatrope*, de *Eli Lilly & Co.*).

Aproximadamente 24 horas antes del ensayo, las células Nb2 se transfirieron a medio de Fischer suplementado,como el anteriormente descrito, pero con 1% de suero bovino fetal.

Posteriormente, las células se colectaron por centrifugación (3000 rpm/3 minutos) y se resuspendieron a una densidad de 0.5 – 1.0 X 10^5 células/ml en el medio de Fischer anteriormente descrito (sin suero bovino fetal), suplementado con HGH, en cajas de cultivo de 24 pozos.Se ensayaron diluciones logarítmicas de HGH desde 10^3 hasta 10^{-8} ng/ml en PBS (0.01M) y a pH 7.4.

Los cultivos fueron incubados a 37 °C en atmósfera de 5% CO_2-95% aire durante 48 horas y posteriormente se determinó la proliferación celular por conteo directo en cámara de Neubauer.

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).

Para disponer de una metodología que permitiera determinar la proliferación celular de forma más rápida, se procedió a estandarizar el ensayo de reducción del MTT (*Mosmann*, 1983).

Las células Nb2 se resuspendieron a una densidad de 6 X 10^5, 3 X 10^5, 1.5 X 10^5 y 7.5 X 10^4 por ml en medio de Fischer bajo las condiciones anteriormente descritas para el ensayo. Se adicionó MTT a una concentración final de 0.5 mg/ml y los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO_2-95% aire durante 4 horas. Al término de la incubación, los cristales de formazán derivados de la reducción del MTT por la succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas fueron disueltos con 1 volúmen de alcohol-ácido (HCl 0.04 N en isopropanol) y se determinó la absorbancia a 570 nm. Adicionalmente, el medio de cultivo libre de células fue incluído como control negativo para descartar la presencia de agentes reductores extracelulares.

3.2.8.4 Evaluación de la actividad lactogénica de la HGH-Vr producida en *Pichia pastoris.*

Para evaluar la actividad lactogénica de la HGH-V producida en *Pichia pastoris*, el medio de cultivo libre de células fue dializado y la hormona cuantificada por densitometría en gel, como se describe en la secciones 3.2.7.3 y 3.2.7.4. Se ensayaron diluciones logarítmicas seriadas del medio de cultivo desde 1000 ng/ml hasta 0.1 ng/ml de HGH como se describe en la sección 3.2.8.2.

La medición de la proliferación celular determinada mediante el ensayo de reducción del MTT fue expresada como el promedio de tres repeticiones y graficada en términos del porcentaje de proliferación respecto del control negativo. En el ensayo se incluyeron, como controles positivos: suero fetal bovino (10%), HGH-N (Humatrope, 2 mg/ml), y HGH-N producida en *Pichia pastoris*; y como controles negativos, el medio de Fischer libre de suero y medio de cultivo dializado estéril libre de HGH.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS.

4.1 Diseño de oligonucleótidos para amplificar selectivamente la secuencia codificante completa del gen hGH-V.

La estrategia de clonación en el vector de expresión consisitió en usar los sitios de restricción *Xho* I y *Eco* RI, para lo cual éstos se incluyeron en las secuencias de los primers sentido y antisentido, respectivamente. Sin embargo, el sitio *Xho* I se encuentra inmerso en la parte final de la secuencia señal de secreción y su utilización implicaba perder dicha secuencia, de manera que fue necesario incluír en el "primer" los codones existentes desde *Xho* I hasta el sitio de corte (Leu-Glu-Lys-Arg).

4.1.1 Características de los primers diseñados.

Los primers empleados presentaron las siguientes características:

a) Primer sentido. (v5)

Longitud: 37 – bases = 5'-AACACTCGAGAAAAGATTCCCAACCATTCCCTTATCC-3'

Tm (50 mM Na^+) = 59 °C

% GC = 43 %

b) Primer antisentido. (v3)

Longitud: 26 – bases = 5'-AGCGAATTCCACGAGCAGCAGACGCA-3'

Tm (50 mM Na^+) = 58 °C

%GC = 57 %

4.1.2. Análisis de la formación de estructuras secundarias.

Con el programa *Oligo 4.0,* se verificó que en todos los casos el valor de ΔG para la formación de las estructuras secundarias se encontrara por encima de – 10 kcal/mol para limitar la estabilidad de los dúplex y plegamientos.

4.1.3 Localización de los sitios de apareamiento de los primers en la secuencia del DNAc.

Como puede verse en la Figura 8, el "primer" sentido se alinea a la mitad del segundo exón del gen hGH-V y contiene un sitio de corte para la enzima *Xho* I, mientras que el "primer" antisentido se alinea más allá del sitio de terminación de la transcripción y contiene un sitio de corte para la enzima *Eco* RI.

Xho I
5' AACACTCGAGAAAAGA[redacted]CCAACCATTCCCTTATCC 3'

CACCTAGCGGCAATGGCTGCAGGCTCCCGGACGTCCCTGCTCCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGTCCTGGC
TTCAAGAGGGCAGTGCC[redacted]CCAACCATTCCCTTATCCAGGCTTTTTGACAACGCTATGCTCCGCGCCCGTCG
CCTGTACCAGCTGGCATATGACACCTATCAGGAGTTTGAAGAAGCCTATATCCTGAAGGAGCAGAAGTATTCA
TTCCTGCAGAACCCCCAGACCTCCCTCTGCTTCTCAGAGTCTATTCCAACACCTTCCAACAGGGTGAAAACGC
AGCAGAAATCTAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATCCAGTCATGGCTGGAGCCCGTGCAGCT
CCTCAGGAGCGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTATGGCGCCTCGGACAGCAACGTCTATCGCCACCTGAAGGAC
CTAGAGGAAGGCATCCAAACGCTGATGTGGAGGCTGGAAGATGGCAGCCCCCGGACTGGGCAGATCTTCAATC
AGTCCTACAGCAAGTTTGACACAAAATCGCACAACGATGACGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTACTG
CTTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGCTCTGTGGAGGGCAGCTGT
GGCTTCTAGCCCGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCACTGCCTCTCCTGGTCGTGGAAGGTGCTACTCCAG
TGCCCCCGCCCGAATTC 3'

5' AGCGAATTCCACGAGCAGCAGACGCA 3'
Eco RI

Gen Bank: M38451

Figura 8. Alineamiento de los primers v3 –v5 en la secuencia de hGH-V. Se muestran en colores verde y rojo cada uno de los exones que forman el gen hGH-V. En la parte superior e inferior izq., se muestran los primers diseñados y se ha subrayado la zona en la cual se alinean durante la PCR.

De acuerdo con el análisis computacional, estos primers amplifican de manera selectiva la secuencia codificante del gen hGH-V corespondiente a la proteína madura; con el programa *Amplify* 2.53 se predice que el producto de PCR tendrá una longitud de 649 pb.

4.2 Extracción y cuantificación de RNA total de placenta humana.

Las alícuotas de RNA extraído se diluyeron y se cuantificaron por espectrofotometría leyendo la absorbancia a 260 nm. Adicionalmente, se evaluó la calidad de la muestra por electroforesis en gel de agarosa-tiocianato de guanidina al 1% (Figura 9). Se obtuvieron aproximadamente 2 mg de RNA total a partir de 10 g de tejido placentario fresco.

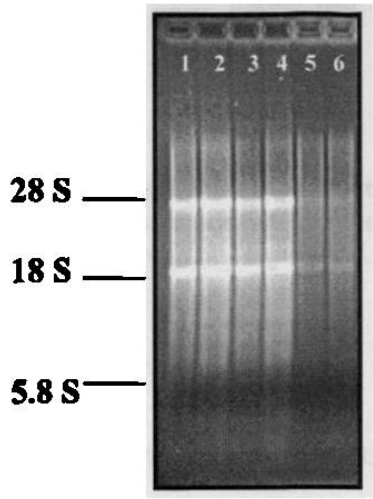

Figura 9. Electroforesis del RNA en gel de agarosa-isotiocianato de guanidina teñido con bromuro de etidio. Los primeros 4 carriles de izq-der. corresponden a 1µl (~ 1 µg) de diluciones 1:20 de las 4 alícuotas mantenidas a -70°C; los carriles restantes corresponden a una muestra de RNA de placenta de concentración conocida (250 ng/carril).

4.3 Síntesis del DNAc de hGH-V por RT-PCR y caracterización del producto de amplificación con *Bgl* II.

Los RNAs extraídos de la placenta sirvieron como templados para sintetizar la primera cadena del DNAc de hGH-V, utilizando para ello el primer 3', previamente diseñado.

4.3.1 Síntesis y amplificación de cadenas dobles de DNAc de hGH-V por PCR.

Después de llevar a cabo la reacción de PCR, se analizó el producto amplificado por electroforesis en gel de agarosa, y como puede observarse en la Figura 10, se obtuvo una banda única del tamaño esperado.

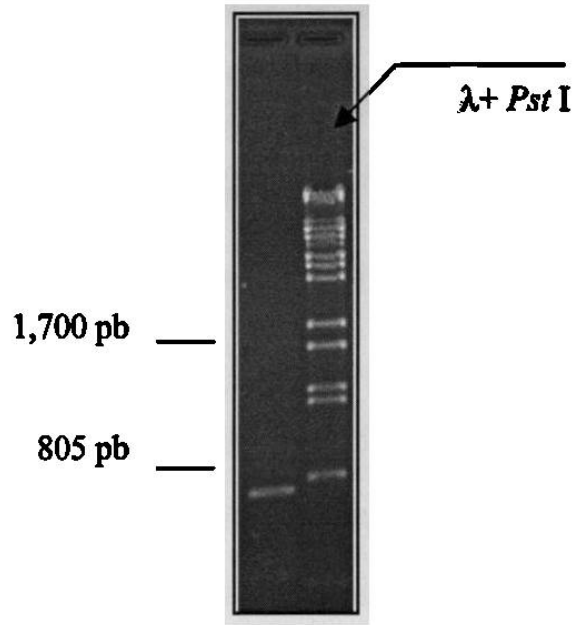

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de PCR generado con v3 y v5. A la izquierda del marcador de peso molecular se muestra la banda de 649 pb obtenida por PCR correspondiente al DNAc de hGH-V; su tamaño coincide con el estimado por el programa *Amplify 2.5.3*.

4.3.2 Caracterización con la enzima *Bgl* II.

En la Figura 11 puede observarse que el producto amplificado de 649 pb, generado con los iniciadores diseñados, es digerido con la enzima *Bgl* II en dos fragmentos, uno de 425 y el otro de 224 pb, lo que aporta evidencia de su identidad.

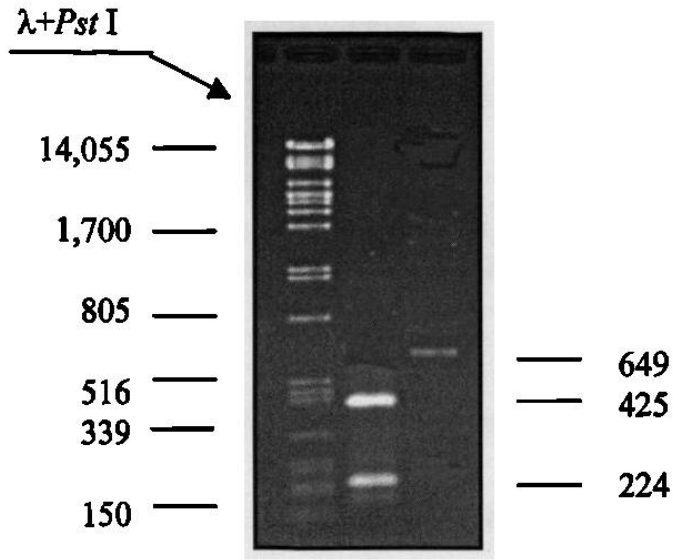

Figura 11. Digestión con *Bgl* II. A la derecha del marcador de peso molecular se muestran los productos de 425 y 224 pb, que evidencian la presencia del sitio *Bgl* II en la posición esperada en el producto de PCR (de 649 pb).

4.4 Clonación del DNAc de hGH-V en el vector pBS II KS (+) por la técnica vector T.

Se realizaron extracciones de DNA plasmídico de pBS II KS(+) a pequeña escala, se determinó su concentración espectrofotométricamente (95 ng/μL) y posteriormente se verificó su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y linearizándolo con la enzima *Eco RV* (Figura 12).

Se llevó a cabo la preparación del vector T con el plásmido anteriormente mencionado, su ligación con el DNAc de hGH-V y la transformación de células *E. coli* Top 10 con el producto de la ligación tal y como se describe en la sección de materiales y métodos.

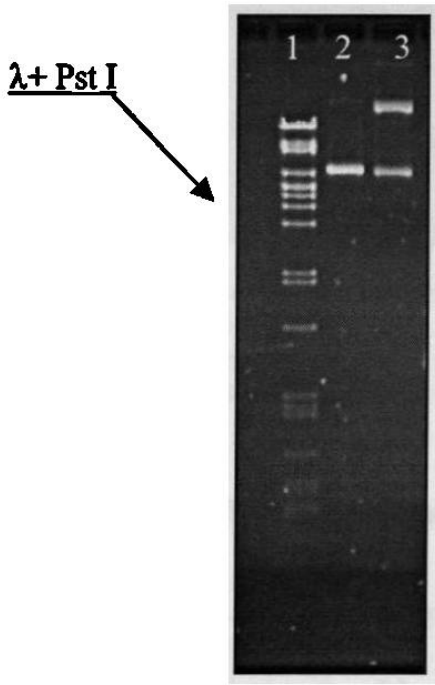

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de DNA del plásmido pBS II KS (+). A la derecha del marcador de PM (λ + *Pst* I) se muestra DNA del plásmido cortado con la enzima *Eco RV* (carril 2) y sin cortar (carril 3), a la misma concentración (95 ng/μL).

4.4.1 Selección de colonias portadoras de plásmidos recombinantes.

Se obtuvieron 30 colonias blancas de *E. coli* Top 10 capaces de crecer en medio selectivo (agar LB/Amp). Se extrajo el DNA plasmídico de cada una de ellas y se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, empleándo DNA plasmídico de pBS II KS(+) como testigo. De las 30

clonas candidatas obtenidas, 14 presentaron migración retardada durante la electroforesis, lo cual evidencia en éstas, la presencia de un fragmento adicional de DNA (Figura 13). Las 16 clonas restantes fueron descartadas de la caracterización subsecuente, debido a que migraron de forma similar al plásmido pBS II KS(+) sin inserto.

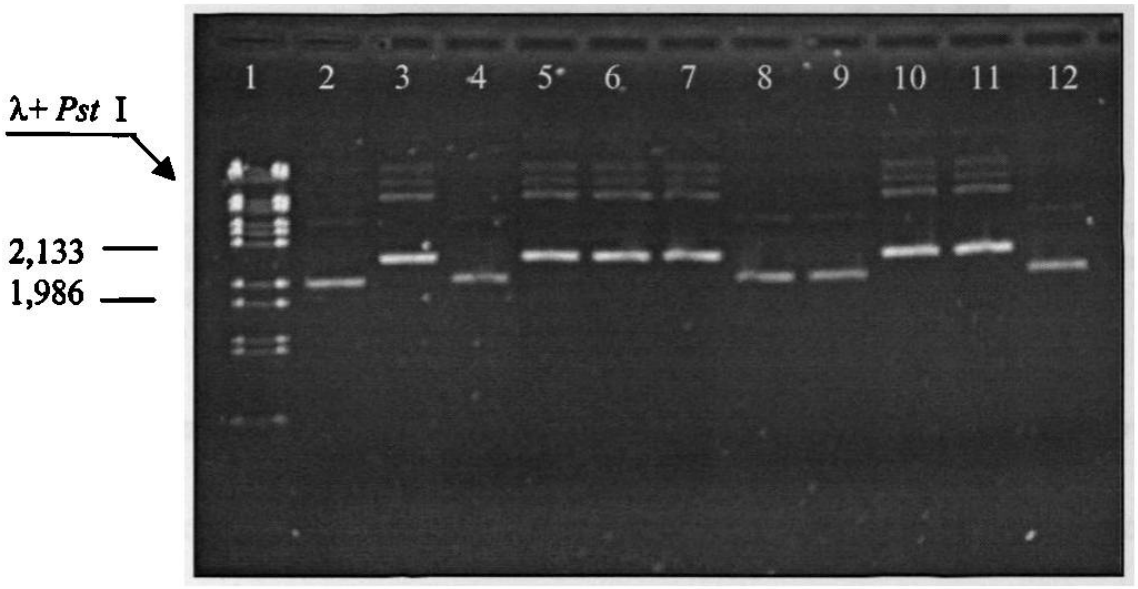

Figura 13. Tamizaje de clonas candidatas a portadoras del DNAc de hGH-V. Los DNA plasmídicos de las clonas se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Se observa la migración retrasada de las clonas de los carriles 3,5,6,7,10 y 11, respecto al testigo pBS II KS(+) en los carriles 2 y 12. Las clonas de los carriles 4, 8 y 9 migran de manera similar al testigo, lo cual evidencia que estas últimas no son portadoras del DNAc.

4.4.2 Caracterización de los plásmidos recombinantes.

a) **Estimación del tamaño de inserto.** Los 14 plásmidos recombinantes obtenidos fueron sometidos a una doble digestión con *Xho* I y *Eco* RI, con el fin de estimar el tamaño del inserto. En la Figura 14 se observa que el fragmento liberado correspondió en tamaño al DNAc de interés (~ 636 pb).

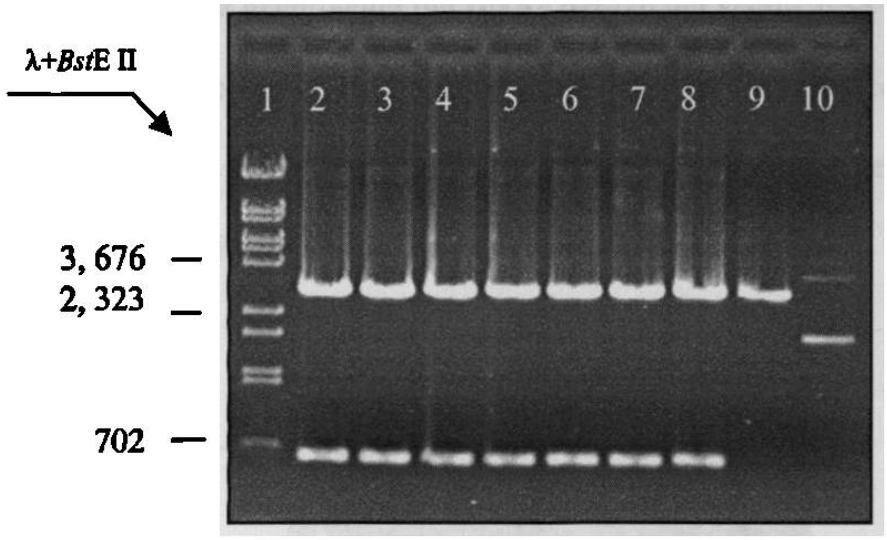

Figura 14. Estimación del tamaño del inserto en los vectores pBShGH-V. Se muestran siete clonas (carriles 2 al 8) cuyos DNAs liberan un fragmento del tamaño esperado (~636 pb) al digerirlos con las enzimas que se encuentran flanqueando al DNAc (*Xho* I y *Eco* RI). En el carril 9 se observa el plásmido pBS II KS(+) cortado en los mismos sitios y en el carril 10 se muestra el mismo plásmido sin digerir.

b) Demostración de la existencia del sitio de restricción *Bgl* II en los recombinantes.

Las 14 clonas seleccionadas que liberaban el fragmento de 636 pb con las enzimas *Xho* I y *Eco* RI fueron sometidas a digestión con *Bgl* II para descartar posibles productos de amplificación de los genes de lactógenos placentarios, en los cuales no se encuentra el sitio *Bgl* II. En todos los casos se demostró que los insertos de los vectores recombinantes contenían dicho sitio (ausente en el pBS II KS (+), como puede observarse en la Figura 15.

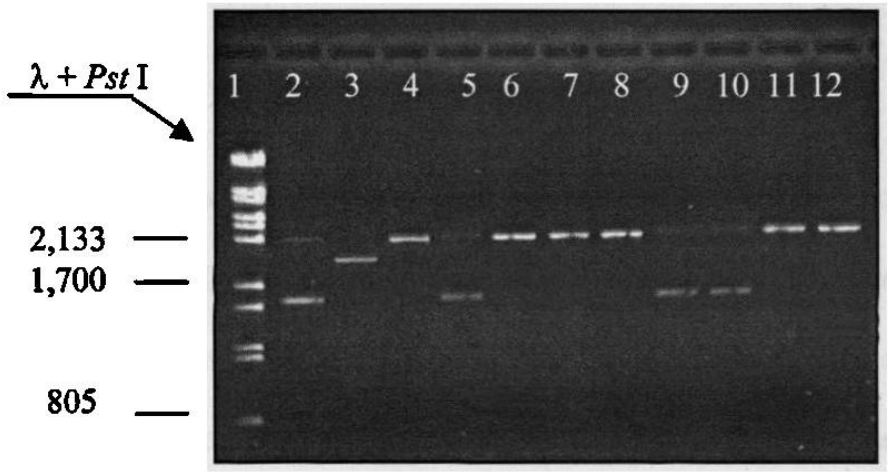

Figura 15. Caracterización de los recombinantes con *Bgl* II. En los carriles 4, 6, 7, 8, 11 y 12 se observan los vectores recombinantes linearizados con la enzima *Bgl* II . Se aprecia que migran más retrasados que el testigo pBS II KS(+) linearizado con *Eco RV* (carril 3); adicionalmente se muestra la migración del plásmido testigo sin digerir (carriles 2,5,9 y 10).

c) Determinación de la orientación del DNAc dentro del vector pBS II KS (+).

Los 14 vectores recombinantes fueron digeridos con *Xho* I (sección 5.3.4.7c) para determinar la orientación del DNAc dentro de cada uno de ellos. Dependiendo de dicha orientación, se liberaría un fragmento de 670 pb o bien uno de 35 pb.

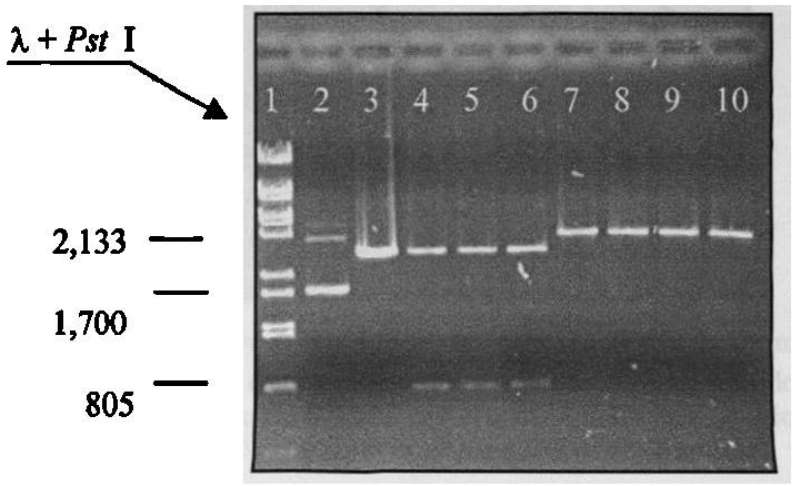

Figura 16. Determinación de orientaciones con *Xho* I. En los carriles 4, 5 y 6 se observa la presencia de un fragmento de 670 pb (opción A) y en los carriles 7 al 10, su ausencia (opción B). En los carriles 2 y 3 se muestra DNA de pBS II KS(+) sin digerir y linearizado con *Eco* RV, respectivamente.

De las 14 clonas analizadas, 7 correspondían a cada una de las dos posibles orientaciones dentro del plásmido pBS II KS(+), (Figura 16).

4.5 Construcción del vector de expresión pPIC9hGH-V.

4.5.1 Subclonación del DNAc de hGH-V en PIC9.

Se realizaron preparaciones de DNA a pequeña escala de los vectores pBShGH-V y pPIC9. Para subclonar el DNAc de hGH-V en pPIC9 se realizaron digestiones preparativas de ambos vectores con las enzimas de restricción *Xho* I y *Not* I. Posteriormente, los fragmentos fueron resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (Figura 17), separados del gel con ayuda de un bisturí y purificados mediante el estuche QIAEX II Gel extraction Kit.

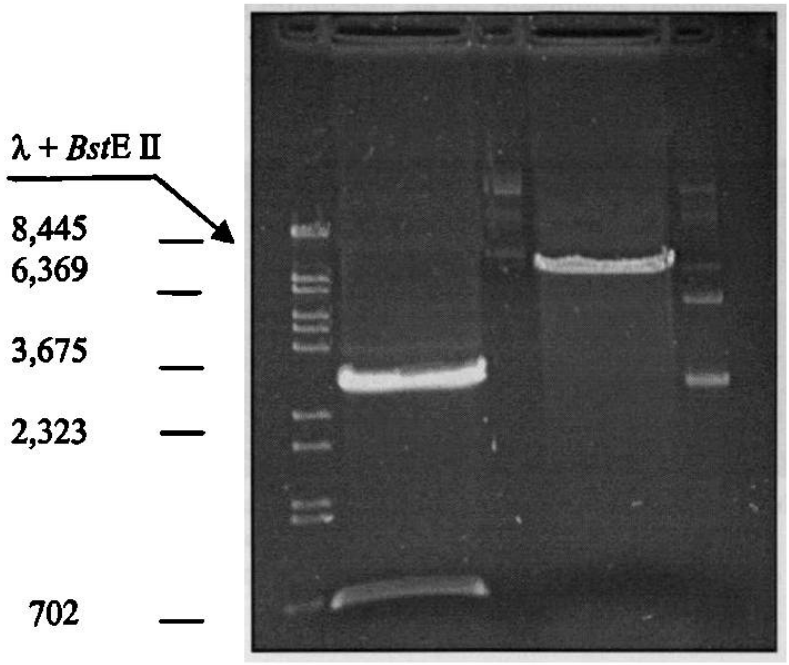

Figura 17. Electroforesis preparativa previa a la subclonación en pPIC9. El fragmento liberado de 685 pb (*Xho* I/*Not* I*) que se muestra en el carril 2 correspondiente al DNAc de hGH-V fue cortado del gel y purificado (QIAEX II Gel extraction Kit), como también lo fue el vector pPIC9 cortado en los mismos sitios (carril 4). En los carriles 3 y 5 se observa DNA sin digerir, de pPIC9 y pBShGH-V (clona # 24), respectivamente.

* Se optó por utilizar el sitio *Not* I para la subclonación debido a inconsistencias en el corte de pPIC9 con *Eco* RI.

Una vez que se llevó a cabo la purificación de los fragmentos de 685 pb (DNAc) y 7981 pb (pPIC9), se procedió a ligarlos. Posteriormente, la reacción de ligación se utilizó para transformar células *E. coli* Top 10 calcio-competentes (1 x 10^5 transformantes/μg de DNA), tal y como se describe en la sección 3.2.4.5. Las placas de agar LB/Amp utilizadas como medio de selección para los recombinantes fueron evaluadas en busca de colonias bacterianas resistentes al antibiótico.

13 colonias crecieron en el agar selectivo y cada una fue transferida a medio de cultivo líquido (LB/Amp) para realizar la extracción del DNA plasmídico a pequeña escala, y analizarlo. Previamente a la electroforesis, el DNA plasmídico fue digerido con *Sal* I. En la Figura 18 se