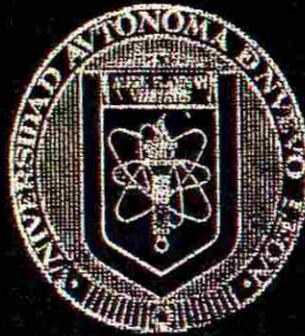


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



HORMONA DEL CRECIMIENTO CAPRINO:
CONSTRUCCION DE UN DNA QUE LA CODIFICA
Y SU EXPRESION EN *Pichia pastoris*

POR

M.V.Z. JORGE MAURICIO REYES RUIZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

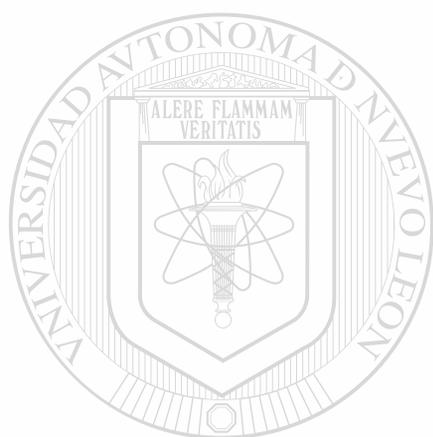
Noviembre, 2000

C. R. QUINN
1945

M. V. Z. JORGE MAURICIO REYES RUIZ



1080111915



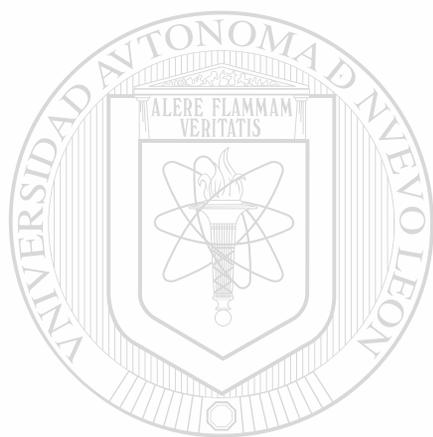
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

24487
Ej.2



UANL

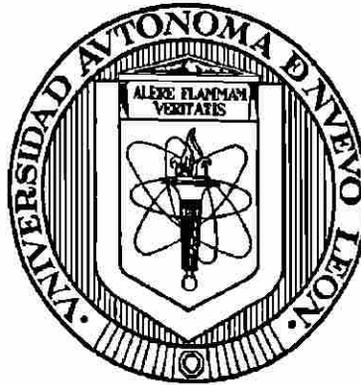
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**HORMONA DEL CRECIMIENTO CAPRINO:
CONSTRUCCIÓN DE UN DNA QUE LA CODIFICA Y
SU EXPRESIÓN EN *Pichia pastoris***

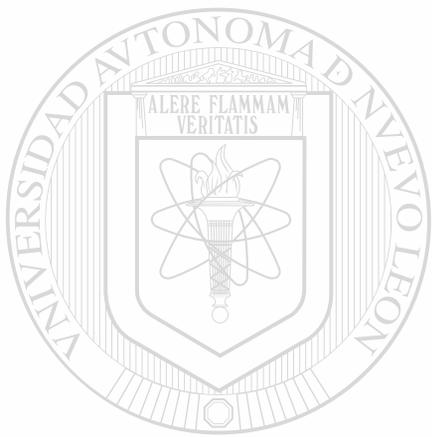
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POR:
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M.V.Z. Jorge Mauricio Reyes Ruiz

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética**

Noviembre, 2000

QH445
.R4
c.1



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

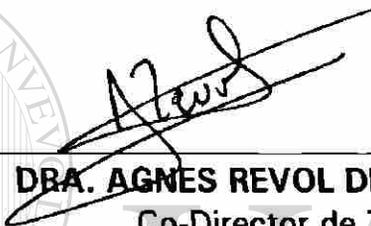
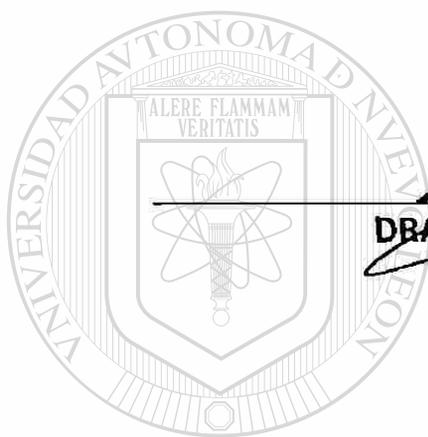


**HORMONA DEL CRECIMIENTO CAPRINO: CONSTRUCCION DE UN DNA QUE
LA CODIFICA Y SU EXPRESION EN *Pichia pastoris***

Aprobación de la Tesis:



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis

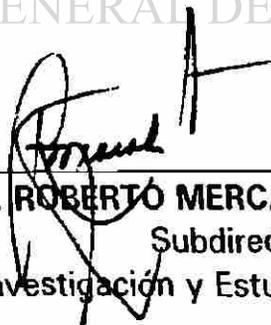


DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Co-Director de Tesis



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



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

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a **Dios** por permitirme alcanzar una nueva meta.

Al **Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña** y a la **Dra. Agnès Revol de Mendoza** por su valiosa asesoría y por jalarme las orejas cada vez que era necesario.

A la **Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez** por sus consejos que enriquecieron esta tesis, además de molestarse en ir hasta la Ciudad de México el Jueves 31 de Agosto del 2000.

A mi familia (**Papá, Mamá, Rene, Mayela, Marianita, Diana, Vicente, Pato, (?), Checo**) por seguir siendo un apoyo moral, además de ser mis mejores amigos.

A mi familia Jalapeña (**Doña Evelia, Sra Laura, Tía Lidia, Wendy, Lyrsa y Alberto**) que me ha hecho sentir que los conozco de toda la vida.

A esos amigos (**Tony, Noé, los Checos, Félix** y a todos los **Grizzlies** en general) que a pesar de que los abandoné por 2 años por estudiar ésta "cosa rara" me siguieron buscando y brindando su invaluable amistad.

Al personal del laboratorio de **Biología**, en especial a **Celia** y a **Hugo** por compartir su experiencia conmigo.

A otros **ULIEGólogos** que me ayudaron en diversas etapas de mi tesis.

A la generación de "**Los 12**", pero de manera especial a **Itzel, Sergio, Virgilio, Lourdes, Gloria L y Clarisa** porque los momentos que pasé junto a ellos no los olvidaré nunca y porque aprendí de ellos más que de los libros que estudiamos.

No podía dejar de mencionar la gran cooperación del personal de **Bioquímica y Postgrado** que me ayudaron enormemente, pero de manera especial a **Raquel, Normita y Paty** quienes aguantaron todas mis molestias.

Pero sobre todas las cosas, a **Itzel**, porque estos 2 años tuvieron otro matiz gracias a su presencia.

An expert is a person who has made all the mistakes which can be made in a very narrow field.
Niels Bohr

DEDICATORIA

A Itzel, porque para terminar una maestría hace falta más que estudiar, trabajar, salud física y mental, vocación, talento y disposición para desvelarse varios días a la semana. Hace falta la motivación de saber que lo haces por y para alguien.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Love does not consist in gazing at each other, but in looking together in the same direction.

Antoine de Saint-Exupéry

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES.....	1
1.1. Definición de Biotecnología.....	1
1.2. Historia de la Biotecnología.....	2
1.3. Hormona del crecimiento.....	5
1.4. Aplicación de la GH en la ganadería.....	6
1.5. Situación ganadera en Nuevo León.....	9
1.6. Ventajas de la leche de cabra.....	11
1.7. Antecedentes del la bGH en la ULIEG.....	14
1.8. Sistema de expresión con <i>Pichia pastoris</i>	15
1.8.1. Características generales de <i>Pichia pastoris</i>	15
1.8.2. <i>Pichia pastoris</i> como levadura metilotrófica.....	15
1.8.3. Expresión.....	16
1.8.4. Vector de transformación e integración.....	16
1.9. Similitudes de las GHs caprina (CHGH) y la bovina..	17
1.10. Mutagénesis Sitio - Dirigida.....	20
1.11. Justificación.....	21
1.12. Objetivo general.....	21
1.13. Objetivos específicos.....	21
<hr/>	
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 Área de trabajo, reactivos y equipo.....	23
2.2. Estrategia general.....	24
2.3. Metodología.....	27
2.3.1. Diseño del oligonucleótido mutagénico.....	27
2.3.2. PCR mutagénica.....	30
2.3.3. Clonación del producto amplificado por medio de la técnica Vector T.....	32
2.3.4. Ligación del vector T y del inserto mutagenizado y transformación en <i>E. coli</i>	36
2.3.4.1. Ligación.....	36
2.3.4.2. Transformación en <i>E. coli</i>	37
2.3.5. Caracterización de las clonas candidatas.....	38
2.3.6. Subclonación en el vector de expresión pPIC9bGH.	40
2.3.7. Transformación de levaduras.....	45

2.3.8. Caracterización de las clonas recombinantes.....	47
2.3.9. Fermentación con clonas recombinantes.....	49
2.3.10. Semipurificación de la proteína recombinante...	50
2.3.11. Semicuantificación de la proteína recombinante.	52
2.3.12. Ensayos de actividad biológica.....	52
2.3.12.1. Propagación de los pre-adipocitos.....	53
2.3.12.2. Tinción con Rojo Oleoso.....	54
2.3.12.3. Cuantificación de lípidos.....	54
2.3.12.4. Obtención de los extractos celulares para cuantificar la actividad de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPDH).....	55
2.3.12.4.1. Obtención de extractos celulares y cuantificación de proteínas.....	55
2.3.12.4.2. Cinética enzimática para calcular actividad específica de GPDH.....	56
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	59
3.1. Diseño del oligonucleótido mutagénico.....	59
3.2. PCR mutagénica.....	62
3.3. Clonación del producto amplificado por medio de la técnica de Vector T.....	63
3.4. Subclonación en el vector de expresión pPIC9bGH....	66
3.5. Transformación de levaduras.....	70
3.6. Caracterización de las clonas recombinantes.....	71
3.7. Fermentación con clonas recombinantes.....	71
3.8. Semipurificación de la proteína recombinante.....	73
3.9. Semicuantificación de la proteína recombinante.....	75
3.10. Ensayos de actividad biológica.....	76
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	79
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	82
CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA.....	84

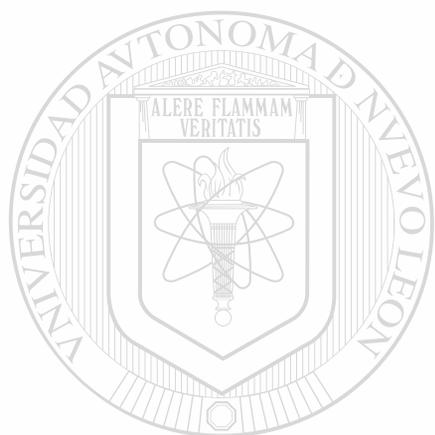
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Incremento en la producción de leche de vaca en respuesta a BGHr.....	7
Tabla 2.-	Comparación entre la población caprina y la bovina en el país en 1999.....	10
Tabla 3.-	Comparación de la composición de la leche de vaca, cabra y humana / 100 g.....	13
Tabla 4.-	Principal diferencia entre la CHGH y la BGH.	19
Tabla 5.-	Condiciones usadas en la PCR mutagénica.....	31
Tabla 6.-	Concentración de los reactivos usados en la PCR mutagénica.....	31
Tabla 7.-	Condiciones de digestión del vector de clonación.....	34
Tabla 8.-	Síntesis del Vector T.....	35
Tabla 9.-	Condiciones de las ligaciones.....	37
Tabla 10.-	Tamaño de los fragmentos liberados al digerir los productos del vector T con la enzima de restricción <i>Pvu</i> II.....	39
Tabla 11.-	Condiciones de ligación de pPIC9bGH digerido y la banda 133 mutagenizada purificada.....	43
Tabla 12.-	Digestión de los plásmidos pPIC9bGH y pPIC9chGH con la endonucleasa de restricción <i>Ban</i> I.....	44
Tabla 13.-	Condiciones de la digestión analítica con la endonucleasa de restricción <i>Ban</i> I.....	44
Tabla 14.-	Concentración de los reactivos usados en la PCR.....	48
Tabla 15.-	Resultado de la transformación del fragmento con el vector T y controles.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Uso de la BGH en cabras.....	8
Figura 2.-	Vector de expresión y secreción pPIC9.....	18
Figura 3.-	Estrategia general.....	26
Figura 4.-	pPIC9bGH.....	27
Figura 5.-	Esquema representativo de los eventos que ocurren durante una mutagénesis sitio-dirigida por PCR.....	28
Figura 6.-	Esquematzación del cDNA de bGH.....	30
Figura 7.-	Vector de clonación pBS SK.....	33
Figura 8.-	Posibles vectores derivados de la clonación por vector T.....	40
Figura 9.-	Doble digestión de la clona pBS 5'-3'.....	41
Figura 10.-	Datos sobre los oligonucleótidos usados en la PCR mutagénica.....	60
Figura 11.-	Simulación de la PCR.....	60
Figura 12.-	PCR mutagénica.....	62
Figura 13.-	Identificación de clonas recombinantes.....	64
Figura 14.-	Caracterización de plásmidos recombinantes..	65
Figura 15.-	Confirmación de la mutagénesis.....	65
Figura 16.-	Purificación de la banda mutagenizada.....	66
Figura 17.-	Banda de 133 pb purificada.....	67
Figura 18.-	Digestión preparativa del vector de expresión pPIC9bGH.....	68
Figura 19.-	Búsqueda de pPIC9chGH.....	69
Figura 20.-	Caracterización exhaustiva.....	70
Figura 21.-	Caracterización de las clonas de <i>P. pastoris</i>	71
Figura 22.-	Comparación de cinética de fermentación.....	72
Figura 23.-	Fermentación de BGH, HGH y CHGH recombinantes.....	72
Figura 24.-	Producción de CHGhr.....	73
Figura 25.-	Precipitación con sulfato de amonio.....	73

Figura 26.-	Comparación de los perfiles del medio fermentado antes y después del tratamiento con sulfato de amonio.....	74
Figura 27.-	Perfil de elución de la columna de Sephacryl HR-100.....	75
Figura 28.-	Ŝemicuantificación de la CHGhr.....	76
Figura 29.-	Ensayo comparativo de actividad biológica...	77
Figura 30.-	Actividad específica de la GPDH.....	78



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
BGH	Hormona del crecimiento bovino
BGHr	Hormona del crecimiento bovino recombinante
BSA	Albúmina sérica bovina
CHGH	Hormona del crecimiento caprino
CHGHr	Hormona del crecimiento caprino recombinante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNAm
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
g	gramos
GH	Hormona del crecimiento
h	Horas
HGH	Hormona del crecimiento humano
HGHr	Hormona del crecimiento humano recombinante
IPTG	Isopropil-β-D-tio-galactosido
kD	Kilodaltones
kg	Kilogramos
L	Litros
lbs	Libras
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nuc	Nucleótidos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
pH	-log[H ⁺]
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
poli-A	Ácido poliadenílico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
sem	Semana
SEVAG	Cloroformo - Alcohol isoamílico 24:1
U	Unidades
UV	Ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosido
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrómetros
°C	Grados Celsius

RESUMEN

Jorge Mauricio Reyes Ruiz

Fecha de Graduación: Noviembre de 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: "HORMONA DEL CRECIMIENTO CAPRINO: CONSTRUCCIÓN DE UN DNA QUE LA CODIFICA Y SU EXPRESIÓN EN *Pichia pastoris*"

Número de Páginas: 88

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Área de Estudio: Biotecnología

Propósito y Método de Estudio: La hormona recombinante del crecimiento bovino (BGHr) ha sido usada desde hace ya varios años para aumentar la producción lechera en ganado bovino y caprino. Sin embargo nunca se ha inducido la lactopoyésis en esta última especie usando la hormona caprina (CHGH) pues ésta no está aún disponible en el mercado. Ya que la secuencia nucleotídica de la BGH y la CHGH difieren en un aminoácido en la posición 129 y ya que en nuestro laboratorio se cuenta con una cepa de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* que expresa BGHr abundantemente, en este trabajo nos propusimos construir una nueva cepa de esta levadura que produzca CHGHr biológicamente activa. Para lograr ésto se realizó una mutagénesis sitio-dirigida por PCR para cambiar el citado codón 129. Este producto fue clonado por Vector-T en pBS para verificar su identidad e integridad por secuenciación nucleotídica. Confirmadas ambas características, se utilizó para substituir la región correspondiente (cassette de expresión) del plásmido pPIC9bGH. El plásmido pPIC9chGH se caracterizó y se utilizó para transformar levaduras mediante la técnica de cloruro de litio. La inserción génica se confirmó por PCR. Se realizaron fermentaciones con las clonas candidatas y se indujo la expresión con metanol. Las proteínas secretadas al medio fueron visualizadas en geles de poliacrilamida teñidos con Coomassie. El medio fue precipitado con 40% de sulfato de amonio y eluido a través de una columna de cromatografía de filtración en gel para posteriormente ensayar su actividad biológica induciendo adipogénesis en fibroblastos de ratón.

Contribuciones y Conclusiones: La mutagénesis permitió obtener un vector de integración y que expresa la CHGHr. La fermentación reveló en el medio la presencia de una proteína de 22Kda, la cual es secretada únicamente en las levaduras inducidas con metanol, alcanzando producciones de hasta 3.6 mg/L a nivel matraz. Precipitando con 40% de sulfato de amonio se logró aumentar la pureza en un 30% y con la cromatografía de filtración en gel se pudo visualizar que la mayor parte de las GHs se encontraban en su forma monomérica. La diferenciación adipocítica de los fibroblastos de ratón confirmó la actividad biológica de la proteína heteróloga producida. En conclusión, se logró la producción de CHGHr biológicamente activa en *Pichia pastoris*. Este resultado abre nuevas perspectivas para utilizar CHGHr en la industria del ganado caprino.



Dr. Hugo Alberto Barrea Saldaña
Asesor



Dra. Agnès Revol de Mendoza
Co-Asesor

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES.

1.1. Definición de Biotecnología.

La Biotecnología se puede definir como la manipulación genética de microorganismos, plantas y animales para hacer productos que beneficien al hombre. La Biotecnología contribuye a áreas tan diversas como la producción de alimentos, la degradación de desperdicios, la minería y la medicina. Los logros recientes incluyen a las plantas y animales transgénicos (aquellos que en el laboratorio se les introdujo un nuevo gen) y la producción de medicamentos por cultivos de células de plantas y de animales, genéticamente uniformes (<http://encarta.msn.com>).

Es en las universidades de Stanford y California en los Estados Unidos donde se desarrollaron las técnicas para introducir genes de origen humano a bacterias para producir así proteínas de gran valor médico. Esto resultó en el establecimiento de firmas comerciales (entre ellas Genentech, Biogen, New England BioLabs, Cetus, y Genex) que producen una gran cantidad de sustancias obtenidas a partir de genes para una variedad de propósitos, principalmente médicos y ecológicos. Luego, la Biotecnología experimentó

otro auge a raíz de la decisión tomada por la Suprema Corte de los Estados Unidos en 1980 de que "un organismo vivo hecho por el hombre es un asunto patentable."(<http://www.britannica.com/>)

1.2. Historia de la Biotecnología.

La biotecnología no es algo nuevo. Los microorganismos han sido utilizados para producir pan, cerveza, vinagre, yogurt y queso por más de cuatro mil años. Los romanos ya conocían la cerveza y el vino también era popular entre ellos (referencias al vino y al vinagre están incluso en la Biblia).

Por lo general, la contaminación del alimento con microbios resulta en putrefacción. Sin embargo, ocasionalmente el crecimiento microbiano resulta en cambios benéficos tales como sabor y textura mejorada y lo que es más importante, en una preservación mejor y prolongada.

El etanol fue el primer producto químico producido con la ayuda de la biotecnología. Hasta hace un siglo no se sabía que los microorganismos estaban involucrados en la producción del alcohol y del vinagre. El descubrimiento se hizo cuando unos comerciantes franceses buscaban un método para prevenir que el vino y la cerveza se agriaran cuando se transportaban a grandes distancias. Le pidieron a Louis Pasteur ayuda. Pasteur encontró que las levaduras convierten azúcares en alcohol en

condiciones anaeróbicas. Tal proceso se conoce como fermentación. La descomposición ocurre después cuando un grupo de bacterias convierte el alcohol en vinagre. La solución fue calentar el alcohol lo suficiente para matar a la mayoría de los microorganismos presentes, un proceso que no afecta el sabor del vino ni la cerveza y que se conoce como pasteurización (Primerose, 1993).

En el siglo XX, durante la segunda guerra mundial, los alemanes producían glicerol para explosivos utilizando levaduras. Eran capaces de manufacturar mil toneladas por mes. Mientras que los británicos desarrollaron, también a mediados del siglo XX, la fermentación acetona-butanol utilizando el *Clostridium acetobutylicum*. Hoy en día el ácido cítrico es producido utilizando al *Aspergillus niger*, un microorganismo aeróbico. En 1940 se tuvieron disponibles por primera vez las preparaciones purificadas de la penicilina y sus fenomenales propiedades curativas, utilizando al *Penicillium notatum*, mientras que a partir de *Streptomyces griseus* se produjo otro antibiótico útil, la estreptomina (Jacobs, 1985).

La era moderna de la biotecnología tiene su origen en 1953 cuando el bioquímico norteamericano James Watson y el biofísico inglés Francis Crick presentaron su modelo de doble hélice del DNA. Desarrollos posteriores permitieron al genetista norteamericano Stanley Cohen y al bioquímico también norteamericano Herbert Boyer, remover un gen específico de una

especie bacteriana e insertarlo en otra, marcando el inicio de la ingeniería genética. (Cohen, 1973)

A la habilidad de unir moléculas de DNA *in vitro* a partir de diferentes fuentes se le conoce como ingeniería genética o tecnología del DNA recombinante. Esta tecnología no está confinada a los microorganismos, sino que células vegetales y animales o incluso plantas o animales completos (referidos como transgénicos) pueden ser modificados (Primerose, 1993).

Esta nueva tecnología ha puesto a disposición de los investigadores, herramientas para producir moléculas tales como proteínas de utilidad terapéutica, vacunas de subunidades o proteínas con funciones hormonales (Watson, 1992). El resultado de la investigación biotecnológica encausada a la salud ha tenido un profundo impacto en la medicina, mejorando las estrategias de diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades.

Entre las proteínas mas estudiadas por su repercusión terapéutica y biotecnológica, se encuentran las hormonas del crecimiento (GHs). El tratamiento con GH en humanos con enanismo hipofisiario y en niños con síndrome de Down, son sólo un ejemplo de los usos médicos de esta hormona (Castells, 1992).

1.3. Hormona del crecimiento.

En los mamíferos, la GH es una proteína compuesta de aproximadamente 190 residuos aminoacídicos. Es sintetizada en los somatropos de la hipófisis anterior, interviniendo como un factor endocrino importante en el crecimiento somático posnatal y durante la lactación. Participa en el metabolismo del nitrógeno, minerales y carbohidratos, favorece la lipólisis y tiene efectos hiperglucémicos, actuando como antagonista de la insulina. Pertenece a la superfamilia de las hematopoyetinas y está relacionada con la prolactina y lactógenos placentarios (Bauman, 1985).

En su forma inmadura, la GH posee un péptido señal que la dirige a través de la membrana del retículo endoplásmico hacia una cisterna, donde el péptido señal es removido y la proteína funcional es finalmente secretada hacia el exterior, dentro del torrente sanguíneo. En su forma madura tiene un peso molecular aproximado de 21,000 daltons. Cuatro residuos de cisteína de la GH interactúan para establecer dos puentes disulfuro que estabilizan su estructura tridimensional biológicamente activa (Bauman, 1985).

1.4. Aplicación de la GH en la ganadería.

En animales de producción, como ganado porcino, bovino, caprino, etc., el tratamiento con GH exógena ha mejorado la producción significativamente, al aumentar la eficiencia de conversión alimenticia, la tasa de crecimiento, la ganancia de peso y la producción de leche y carne.

Los efectos galactopoiéticos de la GH bovina (BGH) están bien establecidos y se han estudiado ampliamente gracias a su producción por la tecnología del DNA recombinante. Numerosos estudios en ganado lechero han encontrado incrementos en la producción de leche, y en el aprovechamiento del alimento, dando lugar a un mejor y mas eficiente uso de los recursos (McBride, 1988). Animales que se encuentran en el período de lactancia y que son tratados con la BGHr, obtienen los nutrientes

adicionales requeridos para producir más leche y soportar el incremento en la demanda de nutrientes por parte de la glándula mamaria gracias al metabolismo coordinado por la hormona en varios órganos y tejidos del cuerpo (Bauman 1985). La GH incrementa el uso de la glucosa para la síntesis de leche en la glándula mamaria. Esta disponibilidad aumentada de la glucosa para sintetizar la leche resulta de ajustes en todo el cuerpo e incluye el aumento en la neoglucogénesis hepática y la reducción del uso de glucosa en otros tejidos. Parte de estos efectos son debidos a la propiedad de la GH de alterar la respuesta tisular a señales específicas como la insulina, destinando la glucosa para la síntesis de leche (Chalupa, 1989). Por

lo tanto, los efectos galactopoiéticos de la BGH no se ejercen directamente sobre la glándula mamaria (la glándula no posee receptores), sino más bien son el resultado de una repartición homeorética de los nutrientes a la glándula. Una respuesta mamogénica a BGH ha sido observada en vaquillas pre-pubertas (Sejrsen, 1986); sin embargo, cuando es administrada en cabras en lactación tardía, la BGH no estimuló la síntesis de DNA (Lee, 1989), incluso aunque el factor de crecimiento asociado, el factor de crecimiento I parecido a la insulina (IGF-I), es un potente mitógeno mamario *in vitro* (Winder, 1989). Estos efectos no están restringidos al ganado bovino; la BGH derivada de pituitaria ha mostrado ser galactopoiética en borregas (Fleet, 1988), y GH ovina ha mostrado ser galactopoiética en cabras (*Capra hircus*). (Mephan, 1984). Por las cualidades antes mencionadas de la GH, se ha estudiado extensamente para su uso en ganado bovino productor de leche y carne (tabla 1).

Tabla 1. Incremento en la producción de leche de vaca en respuesta a BGHr.

Región	Raza	lbs/vaca/día
Estados Unidos	Holsteins	5-15
Europa	Holsteins, Friesians, Jerseys	5-14
Sud Africa	Friesians, Jerseys	5-14
México	Holsteins	4-12
Brasil	Holsteins, Cruzas	4-10
Argentina	Holsteins	5-8
Zimbabwe	Holsteins, Cruzas	4-10
Rusia	Black and White	2-10
Jamaica	Jamaican Hope	4-6
Gambia	N'Dame	1

(Phipps, 1991)

Para ganado caprino, Knight en 1990 reportó incrementos en la producción láctea de hasta el 23%. En dicho trabajo, cabras en la semana 19 de lactación fueron tratadas diariamente con 0.15 mg/kg de BGH inyectadas subcutáneamente, además una glándula mamaria fue ordeñada 2 veces al días y la otra 3 veces para comparar la producción estimulada por la ordeña (figura 1).

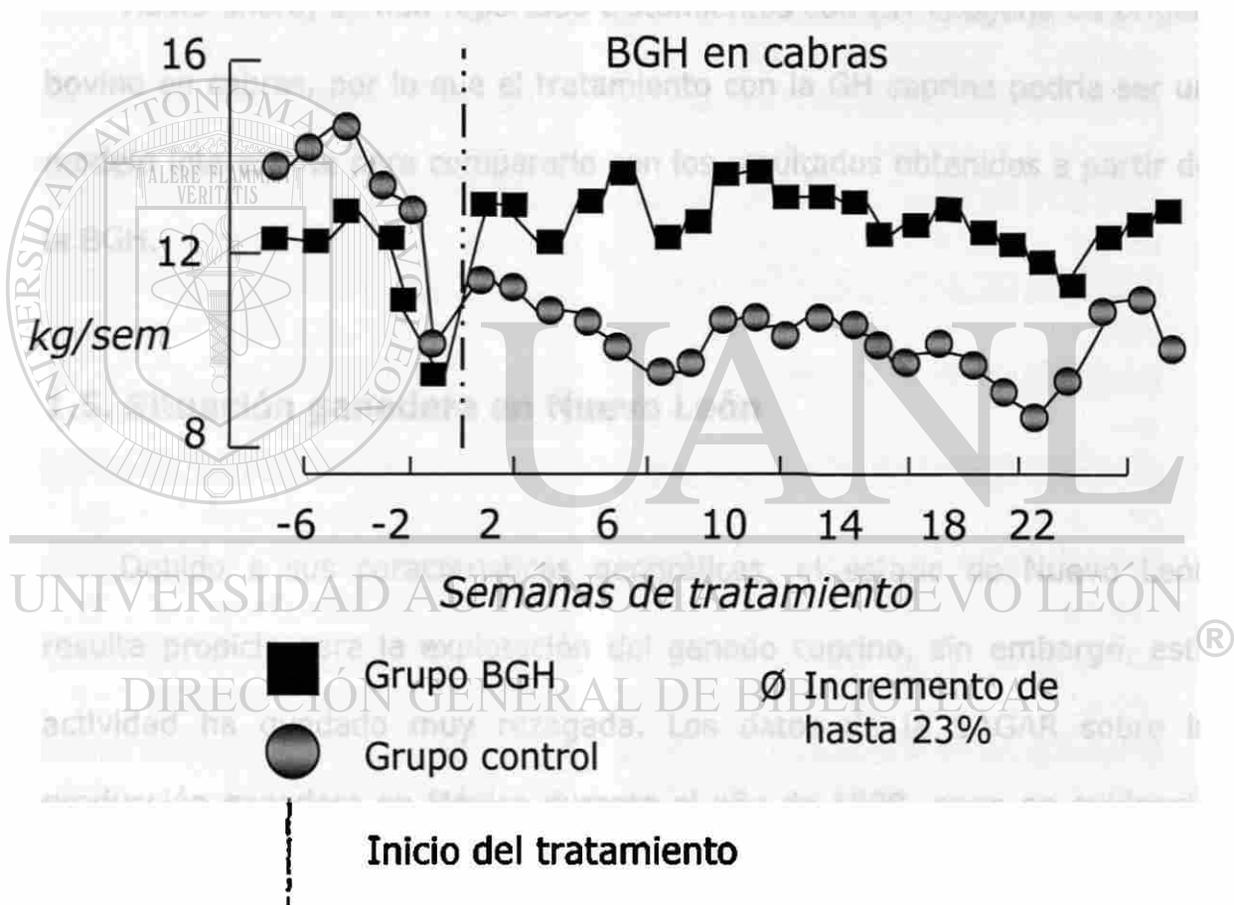


Figura 1.- Uso de la BGH en cabras. Se ha reportado un incremento de hasta el 23% en la producción de kg de leche por semana usando la BGH.

La aplicación de BGH provocó un incremento inmediato y sostenido de aproximadamente 23%, mientras que las glándulas ordeñadas 3 veces al día produjeron aproximadamente 14% más que las glándulas ordeñadas 2 veces representando una cantidad considerable que puede verse reflejada en ganancia económica, lo que hace rentable un tratamiento de esta naturaleza.

Hasta ahora, se han reportado tratamientos con GH exógena de origen bovino en cabras, por lo que el tratamiento con la GH caprina podría ser un modelo interesante para compararlo con los resultados obtenidos a partir de la BGH.

1.5. Situación ganadera en Nuevo León

Debido a sus características geográficas, el estado de Nuevo León resulta propicio para la explotación del ganado caprino, sin embargo, esta actividad ha quedado muy rezagada. Los datos de la SAGAR sobre la producción ganadera en México durante el año de 1999, pone en evidencia que la producción lechera de ganado bovino en Nuevo León dista mucho de ser de las más importantes del país, colocando a este estado en el lugar 28 a nivel nacional. Por otro lado, el ganado caprino en Nuevo León figura entre los primeros de la nación, aunque lejos de ser el líder (Tabla 2).

Tabla 2.- Comparación entre la población caprina y la bovina en el país en 1999.

Lugar	Estado	Cabras	Lugar	Estado	Vacas lecheras
1	PUEBLA	1,404,718	1	DURANGO	217,585
2	OAXACA	1,085,705	2	COAHUILA	200,991
3	SAN LUIS POTOSÍ	958,364	3	PUEBLA	183,176
4	GUERRERO	712,913	4	HIDALGO	169,631
5	ZACATECAS	554,900	5	JALISCO	165,892
6	NUEVO LEÓN	506,845	6	CHIHUAHUA	143,506
7	GUANAJUATO	496,654	7	GUANAJUATO	142,146
8	COAHUILA	492,946	8	VERACRUZ	107,642
9	MICHOACÁN	455,346	9	AGUASCALIENTES	73,000
10	JALISCO	417,417	10	MÉXICO	64,389
11	HIDALGO	296,188	11	BAJA CALIFORNIA N	47,880
12	DURANGO	291,479	12	GUERRERO	40,409
13	TAMAULIPAS	242,863	13	SAN LUIS POTOSÍ	36,188
14	CHIHUAHUA	206,520	14	MICHOACÁN	32,270
15	MÉXICO	173,158	15	QUERÉTARO	32,164
16	SINALOA	147,141	16	CHIAPAS	29,180
17	VERACRUZ	123,870	17	YUCATÁN	21,405
18	BAJA CALIFORNIA S	117,182	18	DISTRITO FEDERAL	20,180
19	QUERÉTARO	102,731	19	OAXACA	17,690
20	NAYARIT	83,413	20	ZACATECAS	17,520
21	TLAXCALA	68,585	21	COLIMA	15,911
22	AGUASCALIENTES	36,634	22	SINALOA	15,100
23	BAJA CALIFORNIA N	31,081	23	TABASCO	14,467
24	MORELOS	26,937	24	NAYARIT	13,648
25	SONORA	16,859	25	SONORA	11,315
26	COLIMA	10,992	26	TLAXCALA	8,517
27	CAMPECHE	2,566	27	CAMPECHE	7,692
28	QUINTANA ROO	1,945	28	NUEVO LEÓN	4,716
29	YUCATÁN	1,553	29	TAMAULIPAS	4,234
30	DISTRITO FEDERAL	930	30	BAJA CALIFORNIA S	3,428
31	CHIAPAS	0	31	QUINTANA ROO	1,565
32	TABASCO	0	32	MORELOS	540

Fuente: Centro de Estadística Agropecuaria (CEA), con Información de las Delegaciones, SAGAR 2000.

1.6. Ventajas de la leche de cabra.

La leche de cabra tiene muchas ventajas sobre la de vaca, resaltando la composición y estructura de su grasa. El tamaño promedio de los glóbulos de grasa de la leche de cabra es de $2 \mu\text{m}$, a diferencia de las $2 \frac{1}{2} - 3 \frac{1}{2} \mu\text{m}$ de los glóbulos de grasa de la leche de vaca. Estos glóbulos de grasa más pequeños proporcionan una dispersión mejor, y una mezcla más homogénea de la grasa en la leche. La capacidad de hacer crema a partir de leche va más allá del simple tamaño físico de los glóbulos grasos. El agrupamiento de los glóbulos es favorecido por la presencia de una aglutinina en la leche de vaca ausente en la leche de cabra, por lo tanto creando una capacidad cremosa pobre, especialmente a temperaturas más bajas (National Goat Handbook).

La homogeneización natural de la leche de la cabra es, desde un punto de vista de salud humana, mucho mejor que el producto lácteo mecánicamente homogeneizado de la vaca. Parece ser que cuando los glóbulos grasos son rotos mediante procesos mecánicos, permite que una enzima asociada a la grasa de la leche, conocida como xantina oxidasa se libere y pase a través de la pared intestinal. Una vez en la circulación sanguínea, esta enzima es capaz de crear daño al corazón y a las arterias, favoreciendo a la aterosclerosis. Debe hacerse notar que este efecto no es un problema con leche sin homogeneizar natural de la vaca. En la leche sin

homogeneizar esta enzima se excreta normalmente del cuerpo sin mucha absorción (USDA Handbook #8).

Otra diferencia significativa con la leche de vaca es la más alta cantidad de ácidos grasos de cadena corta en la leche de cabra. La leche de cabra también tiene un contenido más bajo del ácido orótico, lo que puede ser significativo en la prevención del síndrome del hígado graso (National Goat Handbook).

La composición de proteína de la leche de vaca y de cabra es bastante similar, aunque la típica alfa-s-1- caseína de la leche de vaca está ausente en la leche de cabra y la formación de caseína cuajada bajo la acción de la renina es diferente. La leche de cabra forma escamas más finas más rápidamente que la leche de vaca, la cual tiende a formar terrones grandes y más lentamente. Esto mismo sucede en el estómago, y demuestra por qué la leche de la cabra es más fácil y rápidamente digerida (National Goat Handbook).

La leche de cabra tiene mayores cantidades de vitamina A que la leche de vaca. Además, las cabras convierten todos los carotenos en vitamina A, dando lugar a una leche más blanca. Los niveles de vitamina B son resultado de la síntesis en el rumen de cabras y vacas, y son independientes de la dieta. La leche de la cabra es alta en riboflavina, pero los niveles de vitamina B12 son mayores en la leche de vaca. Los niveles del niacina son

más altos en la leche de cabra. Los niveles de vitamina C y D de la leche son bajos y prácticamente iguales para las vacas y las cabras. En cuanto a la lactosa, los niveles en la leche de vaca son mayores, aunque no muy significativamente (Nutritive Value of Foods, National Goat Handbook).

Referente a la composición mineral, los porcentajes del calcio y fósforo, y más importante, potasio y magnesio, en leche de cabra son más altos que en la leche de vaca. Es también una fuente importante de zinc, iodo y selenio. Esta riqueza en elementos minerales convierte esta leche en una mejor opción para la alimentación de niños recién nacidos. También es rica en vitaminas del grupo B (Nutritive Value of Foods). En la tabla 3 se muestra una comparación entre las leches de vaca, cabra y humana.

Tabla 3.- Comparación de la composición de la leche de vaca, cabra y humana / 100 g.

NUTRIENTE	VACA	CABRA	HUMANO
Proteína (g)	3.3	3.6	1.0
Grasa (g)	3.3	4.2	4.4
Carbohidratos (g)	4.7	4.5	6.9
Calorías	61	69	70
Fósforo (g)	93	111	14
Calcio (g)	119	134	32
Magnesio (mg)	13	14	3
Hierro (mg)	.05	.05	.03
Zinc (mg)	.38	.30	.17
Sodio (mg)	49	50	17
Potasio (mg)	152	204	51
Vitamina A (UI)	126	185	241
Tiamina (mg)	.04	.05	.014
Riboflavina (mg)	.16	.14	.04
Niacina (mg)	.36	.71	.71
Vitamina B-6 (mg)	.04	.05	.01

Fuente: "Composition of Foods; Dairy and Egg Products", Agricultural Handbook No. 8-1, Agricultural Research Service, Washington, D.C.; USDA, 1976.

Cuando un niño recién nacido no es alimentado por su madre, se utiliza leche de reemplazo (por lo general leche de vaca). Incluso aunque esta leche resulta satisfactoria, del 2 al 7% de los niños que la consumen demuestran una alergia a la leche de vaca. Esta intolerancia puede ser digestiva, cutánea, respiratoria (asma) e incluso síntomas neurológicos (trastornos del sueño). La solución es sustituir esta leche por los productos sustitutos compuestos de proteína hidrolizada. Puesto que el costo de tales productos es alto, algunos especialistas utilizan con éxito la leche de cabra (Nutritive Value of Foods, National Goat Handbook).

Una cabra bien alimentada y ordeñada correctamente puede producir hasta un galón de leche por día. Aunque no puede reemplazar por completo a la leche de vaca, es una excelente opción natural para aquellos que son intolerantes a la leche de vaca, aunado a la calidad de sus subproductos tales como quesos y dulces.

1.7. Antecedentes del la bGH en la ULIEG.

Trabajos previos en nuestro laboratorio se dieron a la tarea de clonar el DNAC del gen de la BGH (Amaya, 1988). Actualmente se cuenta con el DNAC de la BGH insertado en un vector de expresión para ser producido en levaduras, específicamente en el vector pPIC9, en la levadura *Pichia pastoris* (Gallardo, 1999).

1.8. Sistema de expresión con *Pichia pastoris*.

1.8.1. Características generales de *Pichia pastoris*.

Como un eucariote, *P. pastoris* tiene muchas ventajas tales como el procesamiento, plegamiento y modificación postraducciona de las proteínas, mientras que es tan fácil de manejar como *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*. Es mas fácil, mas sencillo y menos costoso de usar que otros sistemas de expresión eucariotes tales como baculovirus o cultivos de tejido de mamífero, y generalmente proporciona mayores niveles de expresión. Como levadura, comparte las ventajas de las manipulaciones genéticas y moleculares con *Saccharomyces* y tiene la ventaja agregada de niveles de expresión de proteínas heterólogas de 10 a 100 veces mayores que ésta. Estas características hacen de *Pichia* un sistema de expresión muy útil (Cregg, 1993).

1.8.2. *Pichia pastoris* como levadura metilotrónica.

Pichia pastoris es una levadura metilotrónica capaz de metabolizar metanol como única fuente de carbono. El primer paso en el metabolismo del metanol es la oxidación del metanol a formaldehído usando el oxígeno molecular y la catálisis de la enzima alcohol oxidasa. Además del formaldehído, esta reacción genera peróxido de hidrógeno. Para evitar la intoxicación con este último, el metabolismo del metanol se lleva a cabo en

un organelo especializado llamado peroxisoma, el cual secuestra productos tóxicos para la célula. La enzima alcohol oxidasa tiene una pobre afinidad por el O_2 , y *Pichia pastoris* compensa esto produciendo una gran cantidad de esta enzima. El promotor que regula la expresión de esta enzima es el que se usa para conducir la expresión de la proteína heteróloga (Ellis, 1985).

1.8.3. Expresión.

La expresión del gen *AOX1* está controlada al nivel de la transcripción. En células que crecen en presencia de metanol, aproximadamente el 5% de los RNAs que tienen señal de poliA provienen del gen *AOX1*. La regulación del gen *AOX1* es un proceso de dos pasos: un mecanismo de represión/desrepresión, mas uno de inducción (Johnston, 1987). Brevemente, el crecimiento en glucosa reprime la transcripción, incluso en la presencia de metanol. Por esta razón, se recomienda crecer en presencia de glicerol para una inducción óptima con metanol. Debe hacerse notar que el crecimiento en glicerol (desrepresión) no es suficiente para generar incluso niveles mínimos de expresión del gen *AOX1*; el inductor, el metanol, es necesario para producir niveles de expresión de *AOX1* detectables.

1.8.4. Vector de transformación e integración.

Existen varios vectores de expresión para el sistema inducible por el promotor *AOX1*, unos para la producción intracelular de la proteína de

interés y otros para lograr que ésta sea secretada al ambiente extracelular. En este trabajo se usó el plásmido de expresión-secreción pPIC9, cuyo mapa se ilustra en la figura 2. Este vector tiene la secuencia señal de secreción de *Saccharomyces cerevisiae* (factor α) que dirige las proteínas producidas hacia el medio extracelular (Cregg, 1993).

Al igual que en *Saccharomyces cerevisiae*, el DNA lineal puede generar transformantes estables de *Pichia pastoris*, vía recombinación homóloga entre el DNA transformante y regiones de homología con éste, presentes en el genoma. Las clonas resultantes muestran una gran estabilidad del material integrado. Los vectores de expresión más comúnmente usados llevan el gen *HIS4* para selección por auxotrofismo y están diseñados para ser linealizados con una enzima de restricción tal que las recombinantes sean generadas por recombinación en el locus *AOX1* o en el *HIS4*. Sin embargo, los eventos de entrecruzamientos sencillos (que resultan en inserciones) son mucho más probables que los eventos de entrecruzamiento doble (que resultan en reemplazamientos). Los eventos de múltiples inserciones ocurren espontáneamente de 10 a 100 veces menos frecuentemente que los eventos de inserción sencilla (Romanos, 1992).

1.9. Similitudes de las GHs caprina (CHGH) y la bovina.

La GH caprina tiene una gran similitud con la del bovino, difiriendo solo en un aminoácido en la posición 129, donde hay un cambio de una glicina

(en BGH) por una valina (en CHGH). El DNAC de la BGH contiene el codón GGC que codifica para el aminoácido glicina, mientras que el DNAC de CHGH contiene el codón GTT, que codifica para el aminoácido valina (Tabla 4).

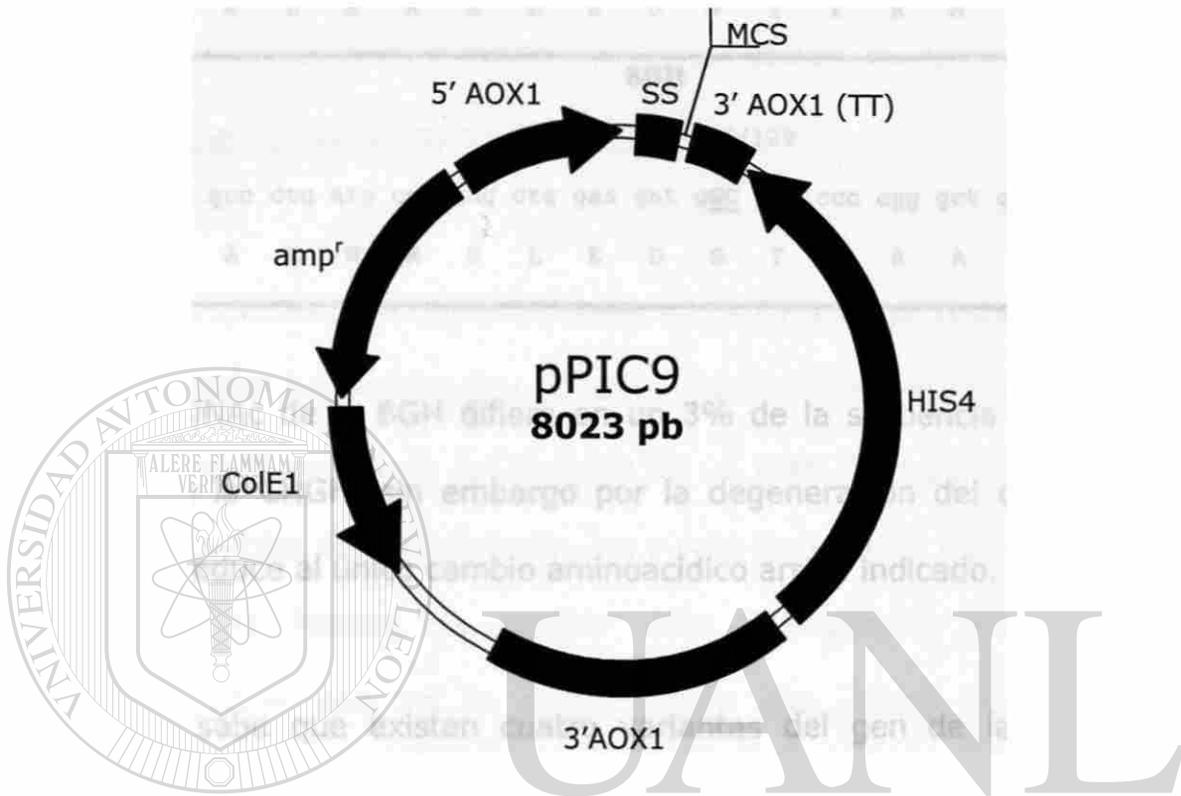


Figura 2.- Vector de expresión y secreción pPIC9. 5' AOX1.- fragmento del promotor de la alcohol oxidasa y sitio donde se asienta el primer AOX1 5'; SS.- Secuencia señal de secreción del factor α ; MCS.- Sitio de clonación múltiple; 3' AOX1 (TT).- fragmento de terminación de la transcripción 3' y sitio donde se asienta el primer AOX1 3'; HIS4.- marco de lectura del gen que codifica para la histidinol deshidrogenasa; 3' AOX1.- fragmento 3' de AOX1; ColE1.- origen de replicación para *E. coli*; Amp^r.- gen de resistencia a ampicilina.

Tabla 4. Principal diferencia entre la CHGH y la BGH.

nuc/aa	CHGH
436/119	466/129
atc ctg gcg ctg atg cgg gag ctg gaa gat <u>gTT</u> acc ccc cgg gct ggg cag atc ctc	
I L A L M R E L E D V T P R A G Q I L	
BGH	
436/119	466/129
atc ctg gcc ctg atg cgg gag ctg gaa gat <u>gGC</u> acc ccc cgg gct ggg cag atc ctc	
I L A L M R E L E D G T P R A G Q I L	

El DNAc de la BGH difiere en un 3% de la secuencia nucleotídica del DNAc de la CHGH, sin embargo por la degeneración del código genético, esto se reduce al único cambio aminoacídico arriba indicado.

Se sabe que existen cuatro variantes del gen de la somatotropina bovina. (Wood, 1989). Estas variantes se presentan por la combinación de dos posibles aminoácidos N terminales, los cuales pueden ser alanina o fenilalanina (Lingappa, 1977). No se sabe si hay elementos genéticos responsables de este acontecimiento. Además existen dos variantes alélicas debido a dos aminoácidos posibles en la posición 126: leucina o valina (Seavey, 1971). Cuando el ganado lechero Holstein es inyectado con la forma recombinante de BGH para aumentar la producción de leche, una mayor respuesta ocurre en las vacas inyectadas con la variante de valina 126 con respecto a la variante del leucina 126 (Eppard, 1992). Esto es importante, puesto que si un sólo aminoácido puede significar un cambio en la respuesta de animales de la misma especie que son tratados, entonces un

cambio aminoacídico entre especies también pudiera ser significativo. Finalmente, la cercanía que existe entre los aminoácidos 126 y 129 aportan un argumento más para este trabajo, ya que sugiere que ese dominio pudiera estar involucrado en la respuesta del organismo.

1.10. Mutagénesis Sitio - Dirigida.

Una de las herramientas que ha aportado la tecnología del DNA recombinante es la mutagénesis sitio - dirigida. En esta técnica el objetivo es cambiar la secuencia nucleotídica de un DNA dado por otra deseada. Es posible cambiar específicamente uno o mas nucleótidos con diferentes fines. Una de las formas de realizar esta mutagénesis es utilizando un oligonucleótido que en la parte interior del mismo lleve los cambios deseados (Wallace, 1981). Este se apareará en el DNA blanco a pesar de las ambigüedades debido a la similitud en el resto de su secuencia. Si a este fragmento de DNA blanco en el que se le ha apareado este iniciador mutagénico se le aparea otro en el extremo opuesto y es sometido a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el producto amplificado llevará la mutación deseada. Al clonar el producto amplificado, se obtendrán finalmente los cambios propuestos inicialmente.

Tomando en cuenta que solo un cambio aminoacídico distingue a la BGH de la CHGH, debiéndose esto a dos nucleótidos en el codón 129, se

propuso realizar una mutagénesis sitio - dirigida del DNAC de BGH para dar lugar a una secuencia que codifique para la CHGH.

1.11. Justificación.

Ya que hasta ahora se ha tratado al ganado caprino solo con BGH para aumentar su producción lechera, se espera que la producción de CHGH redunde en mejores resultados, evitándose posibles rechazos inmunes al ser la nueva hormona una proteína idéntica a la endógena.

1.12. Objetivo general.

Obtener la secuencia nucleotídica que codifique para la GH caprina por medio de mutagénesis sitio - dirigida del DNAC de la bovina, producirla en el sistema de expresión de *Pichia pastoris* y verificar su actividad adipogénica.

1.13. Objetivos específicos.

- 1) Diseñar un oligonucleótido iniciador de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que contenga los cambios nucleotídicos necesarios para convertir el codón de glicina de la posición 129 en uno para valina.

- 2) Realizar PCR y clonar el producto amplificado en el plásmido pBS SK para secuenciar y comprobar que la mutación fue introducida.
- 3) Transferir por subclonación el producto mutagenizado clonado en pBS a pPIC9bGH por substitución.
- 4) Introducir éste al genoma de *Pichia pastoris* e inducir su expresión para producir la nueva proteína.
- 5) Verificar su actividad biológica por ensayos de diferenciación de adipocitos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de trabajo, reactivos y equipo.

El trabajo experimental se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL.

Los reactivos usados proceden de Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo, EUA), Merck de México (Monterrey, NL). Las enzimas de restricción y modificación fueron adquiridas en New England Biolabs (NEB) y Bethesda Research Laboratories (BRL). La DNA Taq Polimerasa procede de Promega.

Las cepas XL-1Blue de *E. coli*, GS115 de *P. pastoris* y los marcadores de peso molecular proceden del cepario y genoteca de la ULIEG

Se utilizaron durante el desarrollo de este trabajo de tesis: un horno de microondas GoldStar MA-857M, microcentrífugas Eppendorf 5402 y 5415, fuente de poder BioRad 200/2.0, placa agitadora Corning PC320, congelador So-Low Enviromental Equipment, campana clase II Labconco Co, báscula

digital Sartorius 1206MP, balanza analítica Mettler modelo AE 163, block de calentamiento Thermoline 16600 modelo OB17615, cámara de electroforesis horizontal FotoDyne, Centrífugas Beckman Modelos Allegra y L5-50E, un termociclador PTC-100 de MJ Research, cámara de electroforesis vertical Miniprotean II de BioRad, incubadora con agitación Orbit Line catálogo no. 3526 y un espectrofotómetro UV/Vis DU70, un cromatógrafo de baja presión BioLogic LP Low Pressure System de BioRad, la resina Sephacryl HR 100 de Sigma, un documentador de imágenes *GelDoc 1000* de BioRad con el software *Molecular Analyst 1.5*.

El procesamiento de los datos fue realizado en una computadora IBM Personal Computer 300GL, el software Office 1997, Adobe Photoshop 5.0 y el programa usado para la conexión a Internet fue el Explorer 5.0. Los programas computacionales de biología molecular empleados fueron:

Amplify 1.2, DNA Strider 1.3, Oligo 4.0 en una computadora Power Macintosh 6100/66.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los programas utilizados vía Internet fueron *Entrez y Blast 2.0* (National Center for Biotechnology Information).

2.2. Estrategia general.

Con la finalidad de alcanzar los objetivos propuestos, se procedió conforme a la siguiente metodología: se localizó el sitio exacto en el DNAC

de la BGH para ubicar el codón que codifica para la glicina en la posición 129, usando el programa computacional *DNA Strider 1.3*. Una vez obtenida la secuencia involucrada, se usó al programa *Oligo 4.0* para diseñar el cebador mutagénico. Con éste programa se calculó su temperatura óptima teórica de apareamiento para la PCR. Como cebador antisentido se utilizó uno ya en uso en el laboratorio para esa área del gen de la BGH. Se introdujo la secuencia de estos cebadores y del plásmido pPIC9bGH en el programa *Amplify 1.2*, el cual es un simulador de PCR que predice el comportamiento de los cebadores en una secuencia dada. La secuencia del producto amplificado teórico se introdujo nuevamente en el programa *DNA Strider 1.3* para elaborar un mapa de restricción, seleccionando las enzimas de restricción útiles para la clonación en el vector de expresión.

El oligonucleótido mutagénico se mandó a sintetizar y junto con su pareja se utilizaron para llevar a cabo la PCR. El producto amplificado fue clonado por sustitución en el vector pPIC9bGH. Se encontró una enzima de restricción capaz de distinguir la presencia del producto de PCR mutagenizado, del de tipo silvestre (por pérdida de un sitio) en las clonas de *E. coli* obtenidas después de la ligación. El DNA de las clonas que mostraron el patrón de digestión esperado fue introducido por recombinación homóloga al genoma de *Pichia pastoris* y para fermentar el medio con las cepas resultantes se usaron las condiciones optimizadas para la producción de BGHr usadas en nuestro laboratorio. Obtenida la hormona tras la fermentación se procedió a su recuperación del medio para semipurificarla y

a ensayar su actividad adipogénica por medio de la capacidad de estimular diferenciación adipocítica de fibroblastos de ratón. En la figura 3 se muestra un esquema de la estrategia seguida.

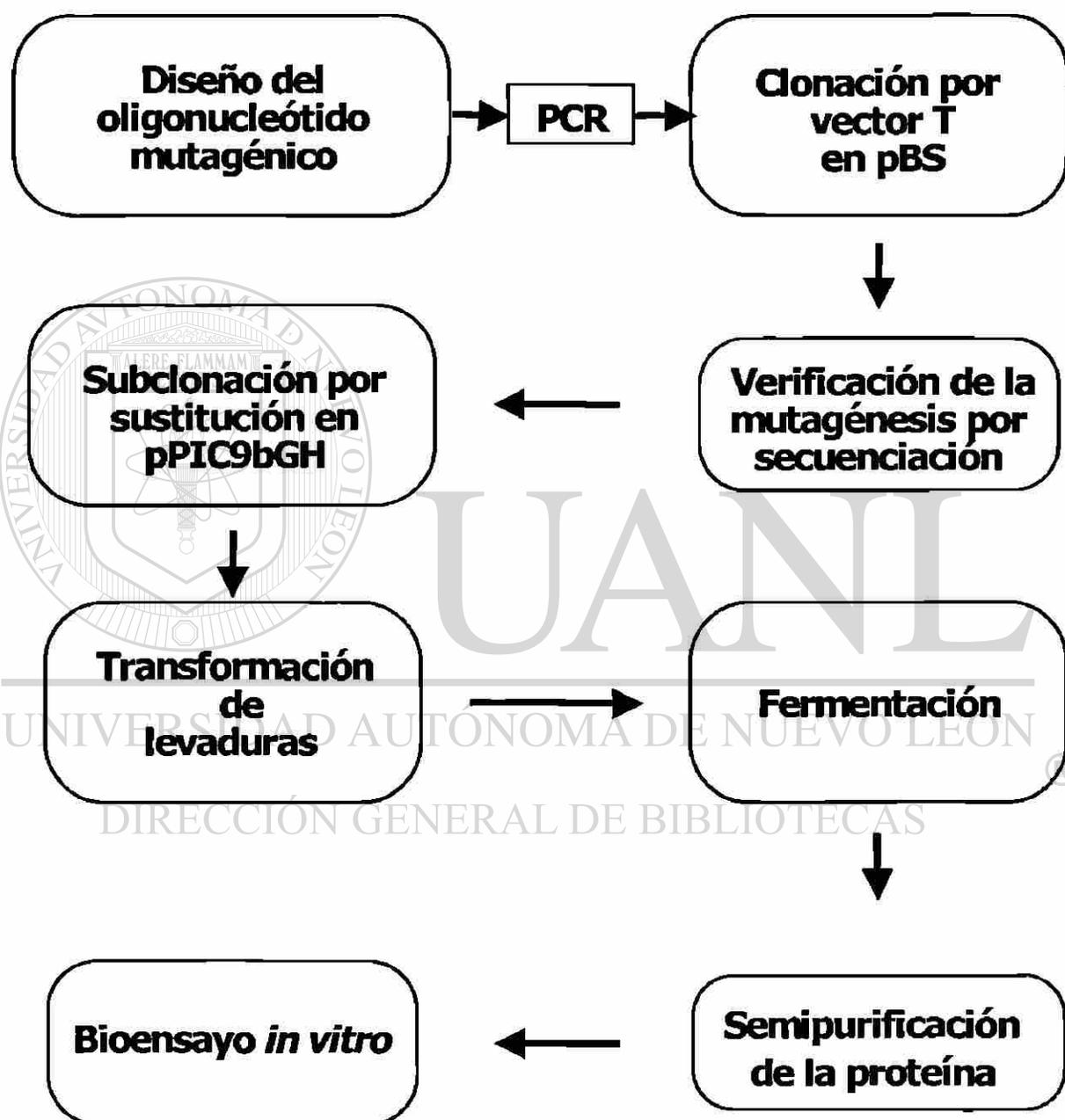


Figura 3.- Estrategia general. Se señalan los pasos desde el diseño del oligonucleótido mutagénico, hasta el bioensayo de la hormona.

2.3. Metodología.

2.3.1. Diseño del oligonucleótido mutagénico.

Para llevar a cabo la PCR mutagénica, fue necesario diseñar un oligonucleótido que introdujera el cambio para modificar la secuencia aminoacídica. La PCR se llevó a cabo usando el vector de expresión pPIC9bGH como templado construido en este laboratorio en 1999 por Gallardo y cols. Un mapa de este vector es mostrado en la Figura 4.

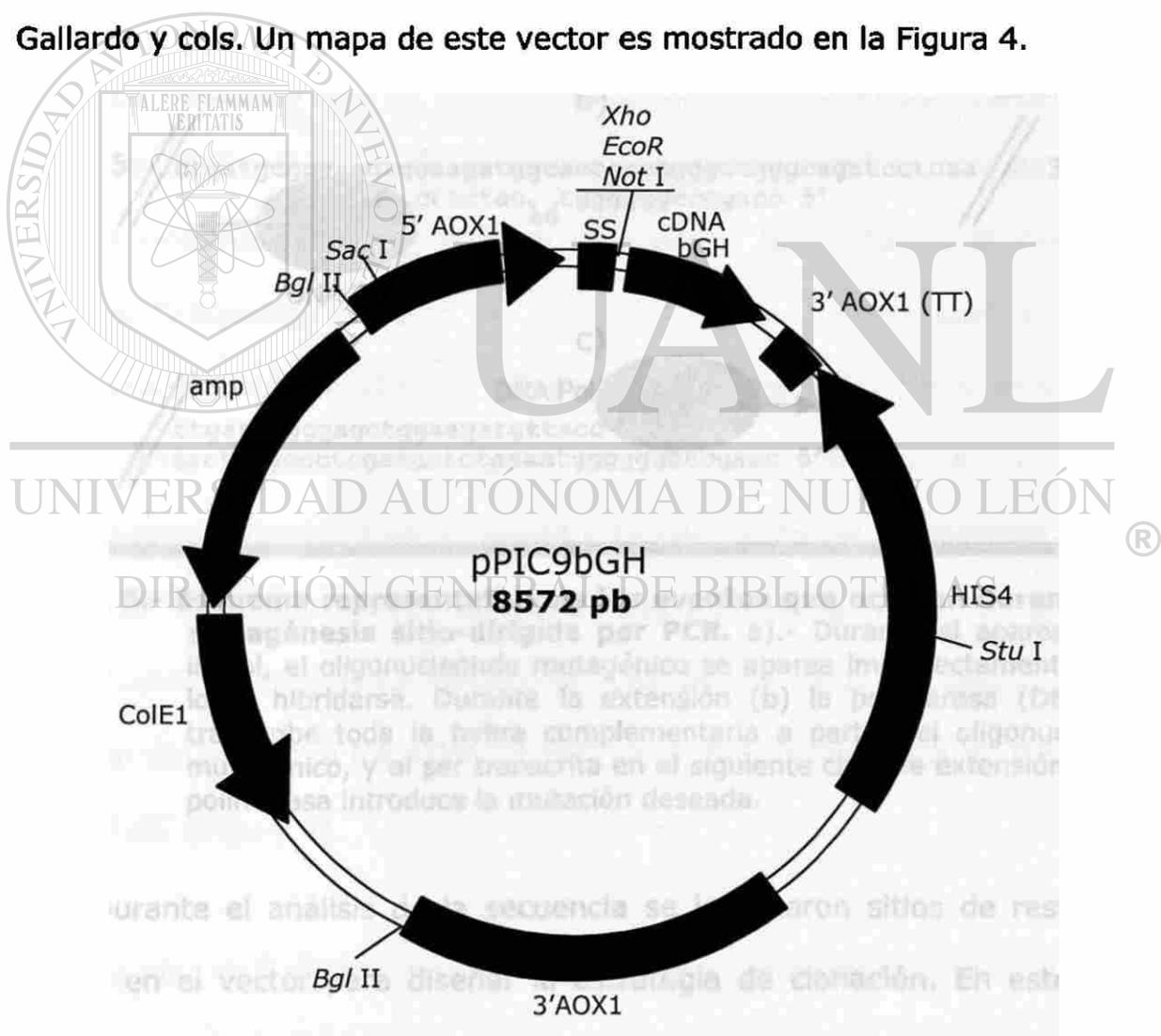


Figura 4.- pPIC9bGH. Plásmido de expresión y secreción al medio extracelular conteniendo el DNac de la BGH (Gallardo, 1998).

Revisando las secuencias en los programas computacionales se arrojaron los resultados que fueron la pauta para diseñar el oligonucleótido. El iniciador se diseñó sobre la zona de interés dejando los nucleótidos a cambiar en la zona central del mismo para evitar que afecte su función al momento de la PCR (Figura 5).

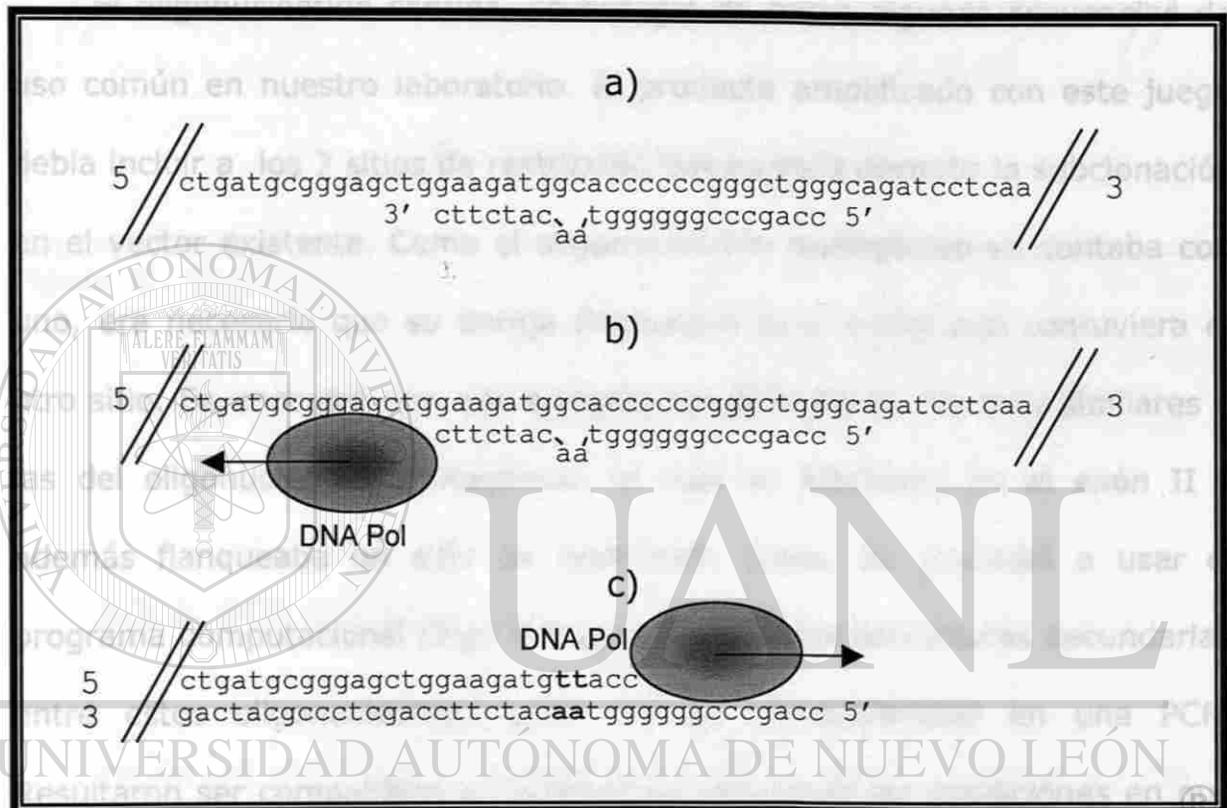


Figura 5.- Esquema representativo de los eventos que ocurren durante una mutagénesis sitio-dirigida por PCR. a).- Durante el apareamiento inicial, el oligonucleótido mutagénico se aparea imperfectamente, pero logra hibridarse. Durante la extensión (b) la polimerasa (DNA Pol) transcribe toda la hebra complementaria a partir del oligonucleótido mutagénico, y al ser transcrita en el siguiente ciclo de extensión (c), la polimerasa introduce la mutación deseada.

Durante el análisis de la secuencia se localizaron sitios de restricción únicos en el vector para diseñar la estrategia de clonación. En este caso, resultó que a una distancia de 10 pb del sitio del codón 129, se encontró un sitio de restricción único en el vector de expresión. Dicho sitio se incluyó en

el oligonucleótido, y se revisaron las características y condiciones de la enzima en el manual de la casa comercial para encontrar el número mínimo de bases para cortar en un extremo. Fue necesaria la presencia de 4 bases para que la enzima cortara de manera óptima.

El oligonucleótido sentido, se escogió de entre algunas secuencias de uso común en nuestro laboratorio. El producto amplificado con este juego debía incluir a los 2 sitios de restricción únicos para permitir la subclonación en el vector existente. Como el oligonucleótido mutagénico ya contaba con uno, era necesario que su pareja flanqueara una región que contuviera el otro sitio. Se encontró uno que arrojaba condiciones de T_m muy similares a las del oligonucleótido mutagénico, el cual se hibridaba en el exón II y además flanqueaba un sitio de restricción único. Se procedió a usar el programa computacional *Oligo 4.0* para analizar las estructuras secundarias entre estos oligonucleótidos para ver su compatibilidad en una PCR. Resultaron ser compatibles en teoría y se calcularon las condiciones en que este par de oligonucleótidos fueran capaces de generar un producto amplificado. Teóricamente generarían una banda de amplificación de una longitud de 345 pb, y los sitios de restricción únicos liberaban un fragmento de 133 pb. (Figura 6).

Se hizo una revisión final en el programa computacional Blast 2.0 para verificar su especificidad. Una vez confirmado que los oligonucleótidos eran

apropiados en teoría en todos los requisitos, se procedió a mandar sintetizar el oligonucleótido mutagénico.

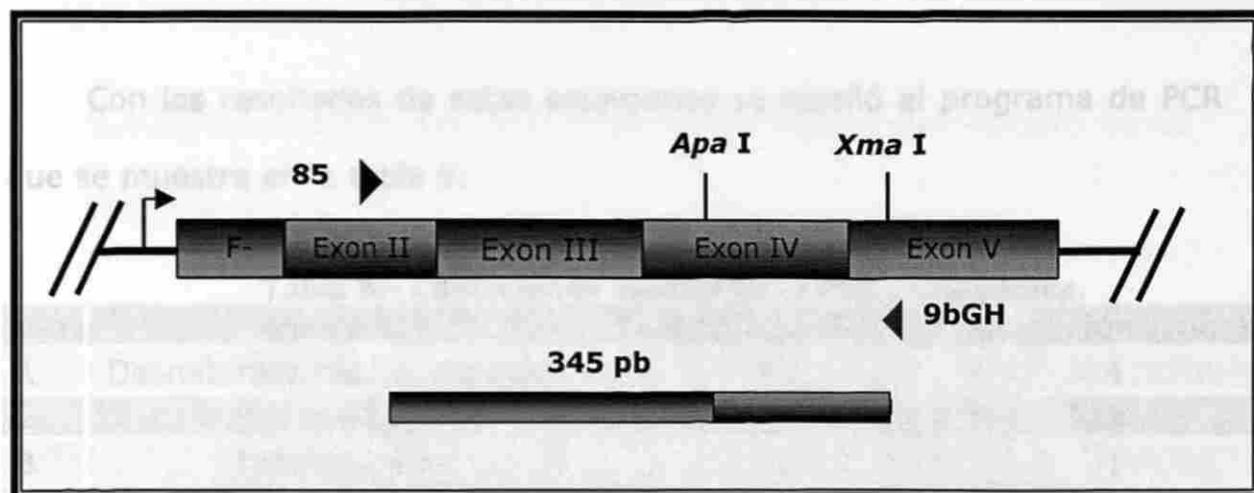


Figura 6.- Esquematización del cDNA de bGH. El primer 85 se aparea en el exón II mientras que el primer 9bGH se aparea en el exón V, dando lugar a un producto amplificado de 345 pb. Se esquematizan también los sitios donde las enzimas de restricción liberan el fragmento de 133 pb que se usó para subclonar. Antes del exón II se encuentra la secuencia que codifica para el factor α .

2.3.2. PCR mutagénica.

Ya con el oligonucleótido mutagénico, se procedió a llevar a cabo la PCR. Se calcularon las temperaturas de apareamiento teóricas óptimas con las siguientes fórmulas: $T_{ap} = 0.3 T_{mp} + 0.7 T_{mf} - 14.9$ donde T_{mp} es la temperatura de fusión mas baja de los oligonucleótidos y T_{mf} es la temperatura de fusión del fragmento amplificado.

Para calcular la temperatura de fusión del fragmento amplificado se usó la siguiente ecuación (Eeles, 1993): $T_{mf} = 16.6 \log(X^+) + 0.41\%GC - 675/L + 81.5$ donde (X^+) es la concentración molar del K^+ en el ensayo de PCR,

%GC es el porcentaje de guaninas-citocinas en el fragmento amplificado y L es la longitud del fragmento amplificado.

Con los resultados de estas ecuaciones se diseñó el programa de PCR que se muestra en la tabla 5:

Tabla 5.- Condiciones usadas en la PCR mutagénica.

Paso	Proceso	Temperatura (°C)	Duración (min)
1	Desnaturalización prolongada	94	4
2	Desnaturalización	94	1
3	Apareamiento	64	1
4	Extensión	72	1
5	30 veces al paso 2 - 4		
6	Extensión prolongada	72	7
7	Fin		

La reacción de PCR se preparó de acuerdo a las condiciones mostradas en la tabla 6.

Tabla 6.- Concentración de los reactivos usados en la PCR mutagénica.

Reactivo	Concentración stock	Cantidad (μL) ^a	Concentración final
Agua MiliQ	-	12.95	-
Buffer ^b	10X	2.5	1X
MgCl ₂	25mM	1.5	1.5mM
dNTPs	10mM	0.5	200μM
Cebador 5'	5μM	2.5	0.5μM
Cebador 3'	5μM	2.5	0.5μM
DMSO	100%	1.25	5%
Taq Polimerasa ^c	5U/μL	0.25	0.05U/μL
DNA	100 ng/μL	1.0	4 ng/μL

^a Volumen final de reacción 25 μL.

^b Buffer 10X: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.0 y Tritón X-100 al 1.0% (Promega)

^c Buffer de almacenamiento A: Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 100mM, EDTA 0.1 mM, DTT 5mM, glicerol 50% y Tritón X-100 1.0% (Promega)

El siguiente paso fue la técnica de clonación del fragmento amplificado.

2.3.3. Clonación del producto amplificado por medio de la técnica Vector T.

El producto amplificado se clonó en un vector para revisar su integridad, determinar su secuenciación, verificar que el marco de lectura se haya conservado, ya que este producto se utilizaría para expresión y debería seguir codificando los aminoácidos de interés, excepto el codón 129. Para lograr la clonación, se utilizó la técnica de vector T, la cual tiene su fundamento en la propiedad de la DNA Taq polimerasa de agregar en los extremos de DNA de cadena doble una base en el extremo 3'. En los extremos de los productos amplificados, se ha encontrado que la polimerasa incorpora preferentemente una Adenina (Bhat, 1991), por lo que al vector de clonación se le agregan con ayuda de la DNA Taq polimerasa timinas, después de linearizarlo con una enzima que genere extremos romos, haciendo compatibles los extremos del vector y del producto amplificado. El protocolo de esta técnica se describe a continuación:

El vector de clonación para el producto de la PCR mutagénica que se seleccionó fue el plásmido pBS SK (Figura 7). Este plásmido fue propagado en la cepa de *E. coli* XL 1-Blue, y después de realizar la extracción del DNA plasmídico se verificó su calidad y cantidad en un gel de agarosa al 0.7%. La

enzima que se escogió para linearizar el plásmido y generar extremos romos fue *Eco* RV. Se sometió a digestión en las condiciones que se describen en la tabla 7.

La reacción se dejó a 37°C por toda la noche (entre 12 y 16 h) con el fin de que se lleve a cabo una digestión total para evitar que quedaran vectores sin digerir, pues estos serían un ruido importante al transformar en pasos posteriores. Al concluir este tiempo, se realizó un gel de agarosa al 0.7% para verificar que el plásmido hubiera sido digerido completamente.

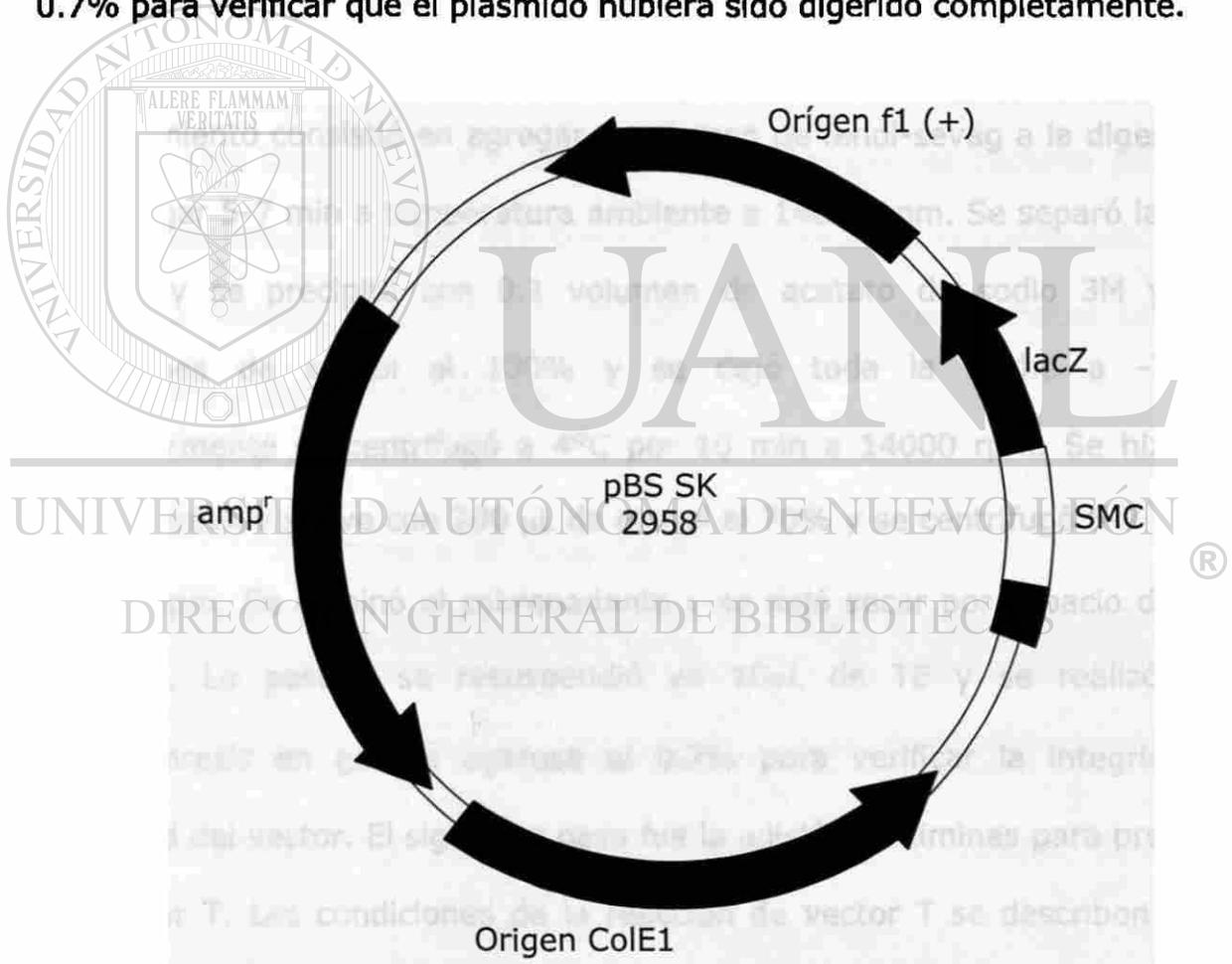


Figura 7.- Vector de clonación pBS SK. Origen f1(+).- Origen del fago filamentoso f1; lacZ.- provee la α -complementación para la selección de colonias azul/blanco; SMC.- sitio de multiclonación; Origen ColE1.- origen de replicación plasmídico; amp^r.- gen de resistencia a ampicilina.

Tabla 7.- Condiciones de digestión del vector de clonación.

Reactivo	Concentración stock	Cantidad (μL) ^a	Concentración final
Agua MiliQ	-	48.5	-
Buffer 2 ^b	10X	7	1X
BSA ^c	10X	7	1X
<i>Eco</i> RV ^d	20U/ μL	0.5	0.14U/ μL
DNA	0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	7.0	0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

^a Volumen final de reacción 70 μL .

^b Buffer 10X NEB 2: NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM, pH 7.9 @ 25°C (New England BioLabs).

^c A partir de un stock 100X (10 mg/mL) provisto en la compra de la enzima.

^d New England BioLabs.

Una vez comprobada la digestión se realizó una extracción fenol-sevag para eliminar algún inhibidor de la DNA polimerasa. Dicho procedimiento consistió en agregar 1 volumen de fenol-sevag a la digestión, centrifugar 5-7 min a temperatura ambiente a 14000 rpm. Se separó la fase acuosa y se precipitó con 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol al 100% y se dejó toda la noche a -70°C. Posteriormente se centrifugó a 4°C por 10 min a 14000 rpm. Se hizo un lavado breve y suave con 200 μL de etanol al 70% y se centrifugó 5-7 min a 14000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar por espacio de 20-30 min. La pastilla se resuspendió en 10 μL de TE y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% para verificar la integridad y cantidad del vector. El siguiente paso fue la adición de timinas para preparar el vector T. Las condiciones de la reacción de vector T se describen en la tabla 8. Se agregó una gota de aceite mineral para evitar evaporación y se usó el termociclador para dejar la reacción a 72°C por 2 h.

Una vez concluida la reacción se procedió a repetir la extracción fenol-sevag como se describió antes, pero esta vez se hizo a la par la extracción al producto amplificado para que ambas partes llevaran el mismo tratamiento. Además se realizó esto mismo a un tubo con vector linearizado sin el tratamiento de la adición de timinas que sirvió como control de transformación en pasos posteriores. Al final del tratamiento se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar la calidad y cantidad de DNA recuperado por medio de una semicuantificación por medio del programa computacional *Molecular Analyst 1.5* y el *Gel Doc 1000* de BioRad usando como control DNA plasmídico de concentración conocida. Este último contiene una lámpara de luz ultravioleta y la imagen es captada por una cámara de circuito cerrado que transfiriere la imagen a la computadora, al programa *Molecular Analyst 1.5*. En este último, se pueden hacer cálculos cualitativos y semicuantificativos.

Tabla 8. Síntesis del Vector T.

Reactivo	Concentración stock	Cantidad (μL) ^a	Concentración final
Agua	-	15.1	-
Plásmido	402 ng/ μL	4.9	80 ng/ μL
Buffer ^b	10X	2.5	1X
dTTP's	100mM	0.5	2mM
MgCl ₂	25mM	1.5	1.5mM
Taq Polimerasa ^c	5U/ μL	0.5	0.1U/ μL

^a Volumen final de reacción 25 μL .

^b Buffer 10X: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.0 y Triton X-100 al 1.0% (Promega).

^c Buffer de almacenamiento A: Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 100mM, EDTA 0.1 mM, DTT 5mM, glicerol 50% y Tritón X-100 1.0% (Promega).

2.3.4. Ligación del vector T y del inserto mutagenizado y transformación en *E. coli*.

2.3.4.1. Ligación.

Una vez semicuantificado el DNA se procedió a realizar la ligación de los productos purificados. Se realizaron cálculos para ajustar la reacción de manera que se tuvieran 3 moléculas de inserto por 1 de vector. Ya que el tamaño del producto amplificado es de 345 pb y el vector pBS es de 2985 pb siendo aproximadamente 8.7 veces mas grande ($2985 / 345$), se necesita menos cantidad de inserto para que la cantidad de moléculas sea igual. 100 ng de vector contiene la misma cantidad de moléculas que 11.5 ng de inserto ($100 / 8.7$). Se escogió la relación molar 1:3 Vector:Inserto, por lo que para 100 ng de vector se necesitaron 34.5 ng de inserto.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Se calcularon las reacciones de ligación como se describe en la tabla 9 y se agregaron controles al experimento para comparar los resultados en la transformación. Dichos controles consistieron en ligar el vector romo, es decir sin el tratamiento con Ts, para ver la eficiencia de la incorporación de Ts en el vector tratado con timinas. Otra forma en que también se evaluó la incorporación de Ts en el vector fue ligar el vector T sin inserto. Y un tercer control que se usó fue ligar el vector romo con inserto, para verificar la incorporación de As en el inserto.

Tabla 9.- Condiciones de las ligaciones.

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

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

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

2.3.4.2. Transformación en *E. coli*.

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

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

2.3.5. Caracterización de las clonas candidatas.

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

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

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

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

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

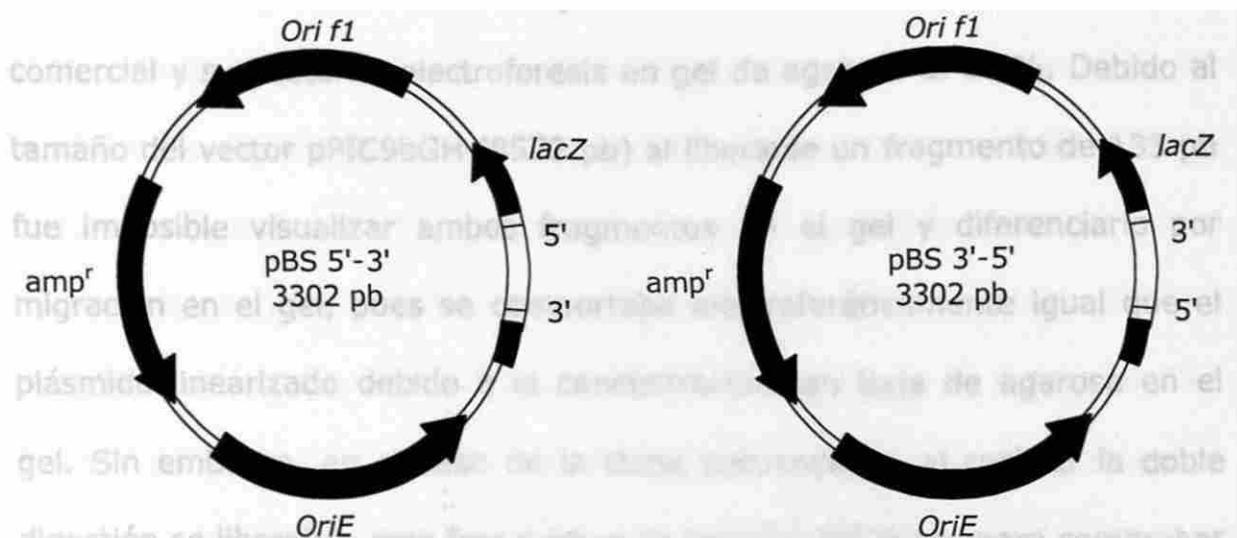


Figura 8.- Posibles vectores derivados de la clonación por vector T. En esta figura se muestran los dos vectores resultantes dependiendo de la inserción del producto amplificado. La orientación del producto de PCR se indica de 5' a 3' en referencia al DNAC de bGH.

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
2.3.6. Subclonación en el vector de expresión pPIC9bGH.®
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

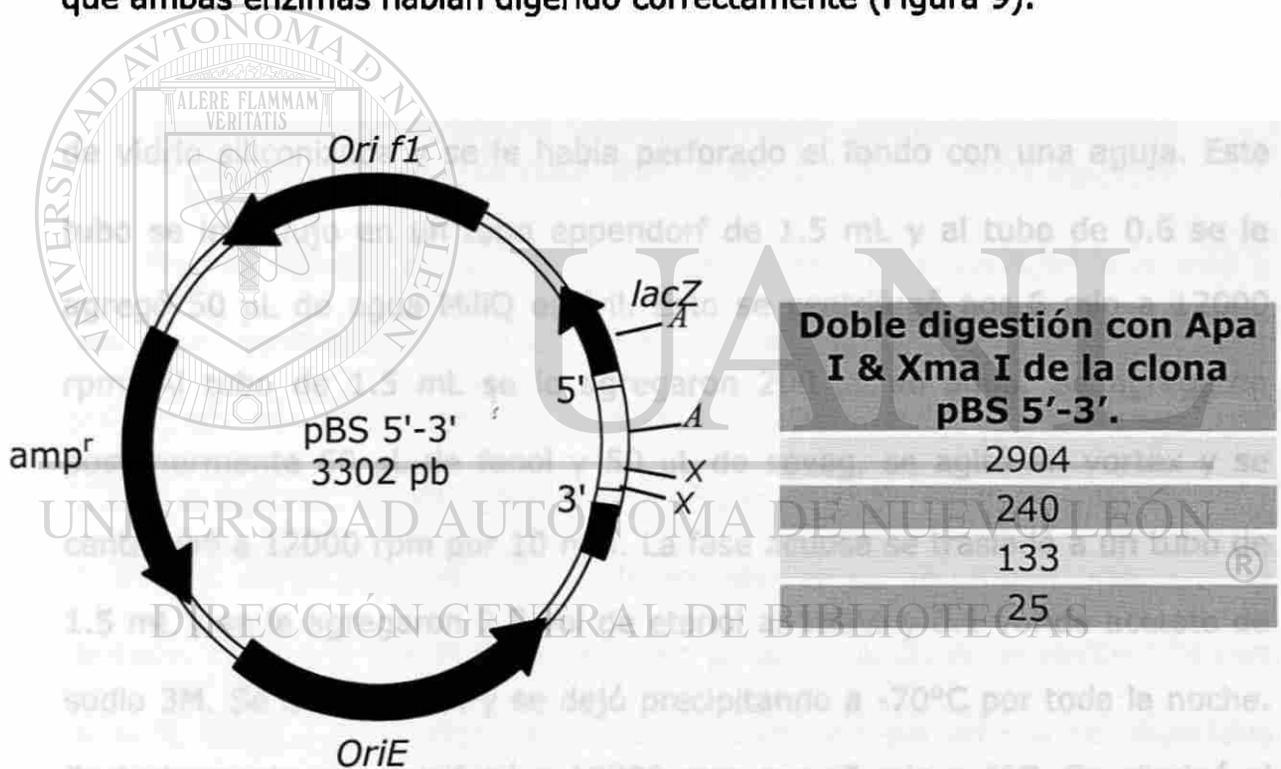


Figura 9.- Doble digestión de la clona pBS 5'-3'. A indica los sitios *Apa* I en el vector, mientras que X se refiere a los sitios de restricción para la endonucleasa *Xma* I. En la tabla adjunta se muestran los tamaños liberados en pares de bases (pb).

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

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

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

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

pPIC9bGH doble digestión	3 μ L	Equivalente a 1050 ng
Banda 133 purificada	0.5 μ L	Equivalente a 50 ng
Agua	3.5 μ L	-
Buff 5X	2 μ L	1 X
Ligasa	1 μ L	3 unidades
Ligación a 37°C por 4 h.		
Volumen final de 10 μ L.		

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

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

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

El patrón electroforético sigue siendo muy similar, pero específicamente las bandas de 601 y 679 son distinguibles en un gel de agarosa al 1.5% esto fue lo que nos diferenció clonas positivas a la inserción

del fragmento de interés con las que no lo eran. Las condiciones que se realizó la digestión analítica se describen en la tabla 13.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

^a15 μL volumen final.

^bBuffer 4 de New England Biolabs (Acetato de potasio 50mM, tris-acetato 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 1mM, pH 7.9 @25°C).

^cEnzima *Ban* I, New England Biolabs.

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

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

2.3.7. Transformación de levaduras.

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

se describe a continuación: se prepararon levaduras competentes incapaces de crecer en un medio carente de histidina, en este caso se usó la cepa GS115. Primeramente, se creció un cultivo de *P. pastoris* en 50 ml de YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa) a 30°C con agitación de 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 - 1.0. se cosecharon las células por medio de una centrifugación a temperatura ambiente. (1500 rpm por 10 min) y se lavaron con 25 ml de H₂O estéril. Se repitió la centrifugación. Se decantó el agua y se resuspendieron las células en 1 ml de LiCl 100 mM. Se transfirió la suspensión celular a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se empastilló a máxima velocidad por 15 seg y se removió el LiCl. Finalmente, las células se resuspendieron en 400 µl de LiCl 100 mM. Esto debe usarse inmediatamente para transformar, de otra manera, se reduce la capacidad de transformación considerablemente. De esto se tomaron 50µL de células para cada transformación. Se hirvió DNA de cadena sencilla por 5 min y se colocó en hielo inmediatamente. Se centrifugaron los 50µl de la solución de células-cloruro de litio y se eliminó el sobrenadante con una pipeta. Se agregaron los siguientes reactivos en el siguiente orden: 240 µL de Polietilenglicol 50% (PM 3350), 36 µL de LiCl 1M, 25 µL de DNA cadena sencilla a 2 µg/µL, 5-10 µg de DNA plasmídico linearizado en 50 µL de agua estéril. Se agitó en vortex cada tubo vigorosamente hasta que la pastilla celular se mezcló completamente, se incubó el tubo a 30°C por 30 min sin agitación. Se le aplicó un choque térmico en un baño de agua a 42°C por 20-25 min. Se centrifugaron los tubos a 6000 rpm por 3 min y se removió la solución transformante con una

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

2.3.8. Caracterización de las clonas recombinantes.

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

Reactivo	Concentración stock	Cantidad (µL) ^a	Concentración final
Agua MiliQ	-	9	-
Buffer ^b	10X	2.5	1X
MgCl ₂	25mM	1.5	1.5mM
dNTP's	10mM	0.5	200µM
AOX1 5'	5µM	2.5	0.5µM
AOX1 3'	5µM	2.5	0.5µM
DMSO	100%	1.25	5%
Taq Polimerasa ^c	5U/µL	0.25	0.05U/µL
DNA	-	5.0	-

^a Volumen final de reacción 25 µL.

^b Buffer 10X: KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 9.0 y Tritón X-100 al 1.0% (Promega)

^c Buffer de almacenamiento A: Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 100mM, EDTA 0.1 mM, DTT 5mM, glicerol 50% y Tritón X-100 1.0% (Promega)

Otro procedimiento para comprobar la identidad de las clonas mutagenizadas, fue realizar una PCR con oligonucleótidos que amplifican el

DNA_c de bGH a partir de DNA genómico de la levadura candidata. Esta PCR da lugar a un producto que al digerirlo con la enzima diagnóstica hace evidente la diferencia nucleotídica al liberar fragmento de diferentes tamaños. La secuencia de los oligonucleótidos usados es la siguiente (Gallardo en 1999): 97: 5' ccgctcgagaaaagattcccagccatgtccttgtc 3' y 98: 5' ggccttaggctagaaggcgcagc 3'.

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

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

2.3.9. Fermentación con clonas recombinantes.

Una vez que las clonas fueron caracterizadas para la inserción génica, se procedió a hacer una fermentación para confirmar la expresión de la proteína de interés. Se utilizaron las condiciones óptimas determinadas previamente en el laboratorio para BGHr. Se utilizó el buffer BMGY o BMMY, el cual está compuesto de 1% Extracto de levadura, 2% Peptona, 100mM del buffer, 1.34% YNB (base nitrogenada de levadura), 4×10^{-5} Biotina, 1% Glicerol/0.875% Metanol. El buffer que se usó fue el de citratos pH 5.15. BMGY se refiere a que la fuente de carbono será el Glicerol, mientras que BMMY su fuente de carbono será el Metanol.

El experimento se realizó como a continuación se describe:

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

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

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

2.3.10. Semipurificación de la proteína recombinante.

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

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

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

2.3.11. Semicuantificación de la proteína recombinante.

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

2.3.12. Ensayos de actividad biológica.

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

2.3.12.1. Propagación de los pre-adipocitos.

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

Las células 3T3-F442a se propagaron en Medio Eagle modificado por Dulbecco-Vögt [DMEM, glucosa 4 g/l, suplementado con 5% (v/v) de suero de ternera] hasta que se alcanzó la confluencia, en botellas de cultivo celular de 25 cm². Se cosecharon las células por tripsinización, para lo cual se agregaron 3-4 ml de solución de tripsina a la botella y se incubó a 37°C por 5 min. Se desprendieron completamente las células y se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min. Se retiró el líquido con micropipeta, teniendo cuidado de no eliminar las células empastilladas. Se resuspendieron éstas en 1-3 ml de DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera. Se sembraron las células en las placas, colocando 500µl por pozo. Se incubaron las células por 4 días a 37°C y en una atmósfera con 5 % de CO₂. Al cumplirse el cuarto día de incubación (96 h), se hizo el cambio de medio a DMEM suplementado con 1.75% (v/v) de suero de gato, 0.25% (v/v) de suero de ternera, insulina a 5 µg/ml, transferrina a 5 µg/ml, EGF a 0.01 ng/ml, biotina a 1.0 µM, triyodotironina a 1x10⁻⁹ M y β-mercaptoetanol a 40 µM (500-1000 µl de medio por pozo) y 200 ng de CHGH. El testigo positivo de diferenciación es el mismo medio pero adicionado 200 ng de HGH. El control negativo fue el cultivo sin suplementar la hormona. Se incubaron las células por 7 días y

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

2.3.12.2. Tinción con Rojo Oleoso.

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

2.3.12.3. Cuantificación de lípidos.

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

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

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

2.3.12.4.1. Obtención de extractos celulares y cuantificación de proteínas.

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

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

2.3.12.4.2. Cinética enzimática para calcular actividad específica de GPDH.

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

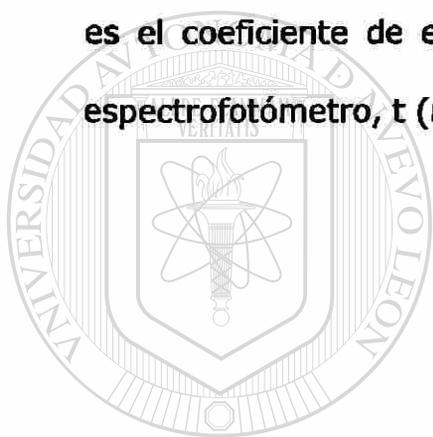
absorción a 340 nm; el decremento en la absorción indica la oxidación del NADH a NAD (Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado). Para cuantificar la actividad específica de cada extracto (degradación de NADH/mg de proteína/min) y determinar el efecto de la GH, es necesario hacer una curva de calibración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

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

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

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{Abs } 340 \text{ nm}}{t \text{ (min)}} \times \frac{1}{6.22 \times 10^{-3} \frac{\text{cm}^2}{\text{nmol}}} \times \frac{1}{l \text{ (cm)}} \times \frac{1}{\mu\text{g de proteína}}$$

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Diseño del oligonucleótido mutagénico.

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

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

Oligonucleótido: 85	
5'	CTGCACCAGCTGGCTGCTGACAC 3'
Longitud	23-mer
T _m	75.6 °C
ΔG(25°C)	-45.4 kcal/mol
1/E	4.91 nmol/A260
	34.7 μg/A260
Oligonucleótido: 9bGH	
5'	CCAGCCCGGGGGTAAACATCTTC 3'
Longitud	23-mer
T _m	75.4 °C
ΔG(25°C)	-50.6 kcal/mol
1/E	4.70 nmol/A260
	33.4 μg/A260

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

Posteriormente, con del programa computacional *Amplify 1.2* se simuló una PCR para estimar el tamaño del producto y para obtener parámetros tales como la T_m del fragmento y el contenido de guaninas - citocinas, útiles en el

cálculo de la temperatura de apareamiento teórica. En la figura 11 se muestran los resultados arrojados por este programa.

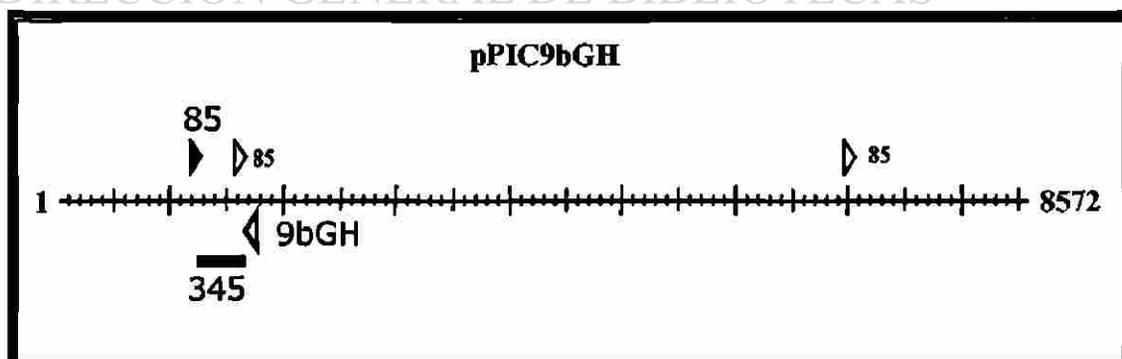


Figura 11.- Simulación de la PCR. Mapa del plásmido pPIC9bGH y los sitios donde teóricamente los oligonucleótidos seleccionados para la PCR mutagénica se aparearían. Las líneas pequeñas indican 100 pb, las medianas 500 pb y las grandes 1000 pb. El DNac de bGH se encuentra entre el 1150 y el 1750.

Tap	Tmp	Tmf	L	%GC
64.93	75.4	81.73	345	58

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

3.2. PCR mutagénica.

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

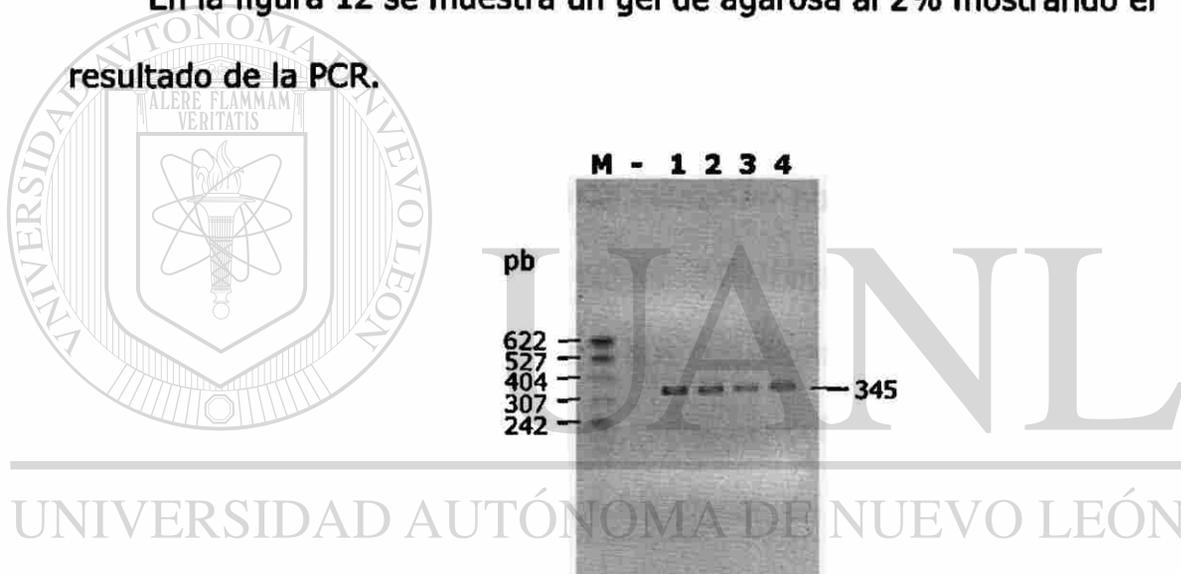


Figura 12.- PCR mutagénica. Gel de agarosa al 2% mostrando los productos de amplificación a partir del plásmido pPIC9bGH. En el primer carril se muestra al marcador de peso molecular, en el siguiente el control negativo y los siguientes son productos de amplificación.

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

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

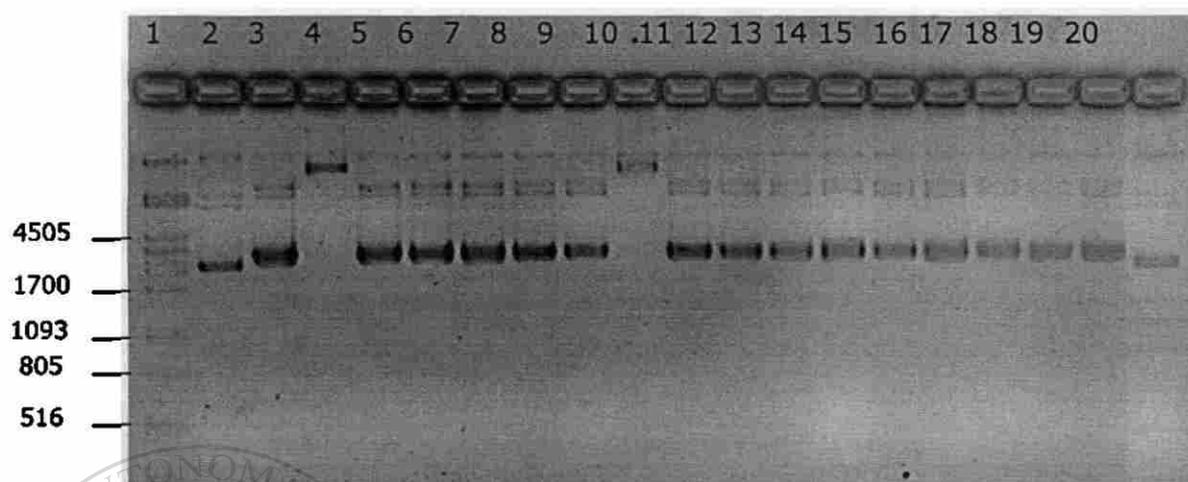


Figura 13.- Identificación de clonas recombinantes. Gel de agarosa al 0.8% donde se muestra la migración retardada de las clonas positivas a la inserción. 1: λ + *Pst* I; carriles 2 y 20: pBS sin inserto; carriles 4 y 10: clonas descartadas por migración aberrante. El resto de las clonas fueron positivas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

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

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

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

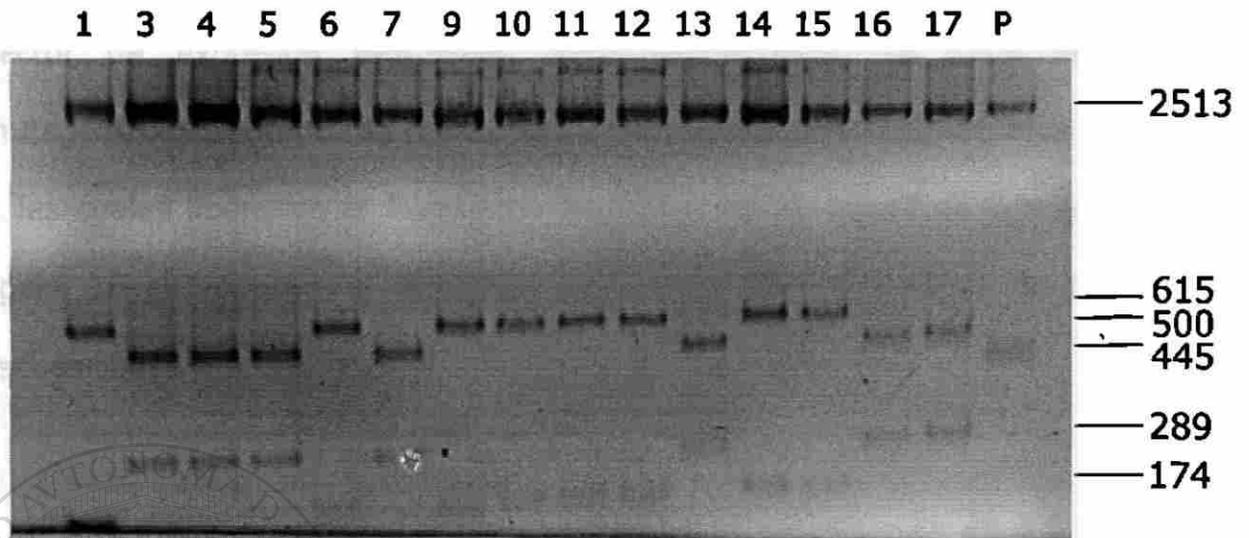


Figura 14.- Caracterización de plásmidos recombinantes. Gel de agarosa al 1.5%. Carriles 1-15: clonas digeridas con *Pvu* II mostrando patrones de digestión diferente. Clonas 1, 6, 9, 10, 11, 12, 14 y 15: orientación 5'-3'. Clonas 3, 4, 5, 7, 13, 16 y 17: orientación 3'-5'. Carril (P): pBS sin inserto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

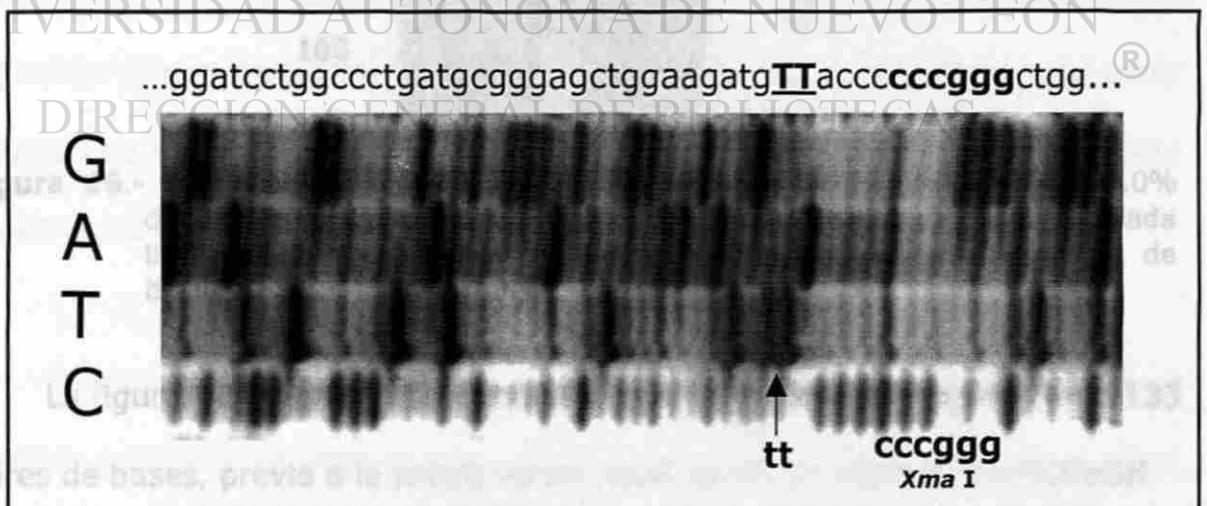


Figura 15.- Confirmación de la mutagénesis. Secuenciación donde se muestra la inserción de los nucleótidos deseados. A solo 5 bases de la mutación se puede apreciar el sitio de restricción *Xma* I (c/ccggg).

3.4. Subclonación en el vector de expresión pPIC9bGH.

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

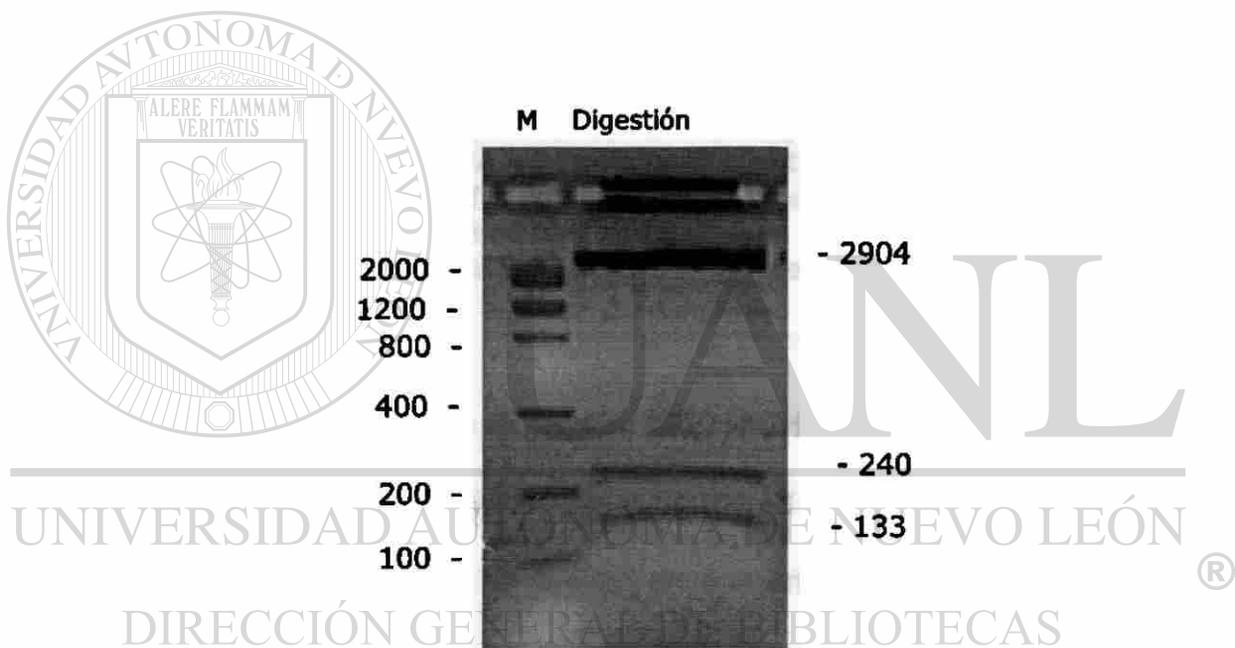


Figura 16.- Purificación de la banda mutagenizada. Gel de agarosa al 2.0% donde se muestra la digestión preparativa de la clona secuenciada liberando los fragmentos esperados y entre ellos, el de 133 pares de bases.

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

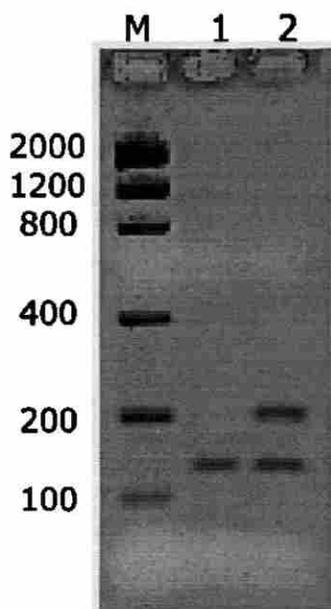


Figura 17.- Banda de 133 pb purificada. Gel de agarosa al 2.0% mostrando el resultado de la purificación de la banda mutagenizada. En el carril 1 se puede apreciar la banda de tamaño esperado, además de estar libre de cualquier otro DNA contaminante, mientras que en el carril 2 se muestra el producto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

En cuanto al vector de expresión pPIC9bGH, sólo se le realizó la digestión

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

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

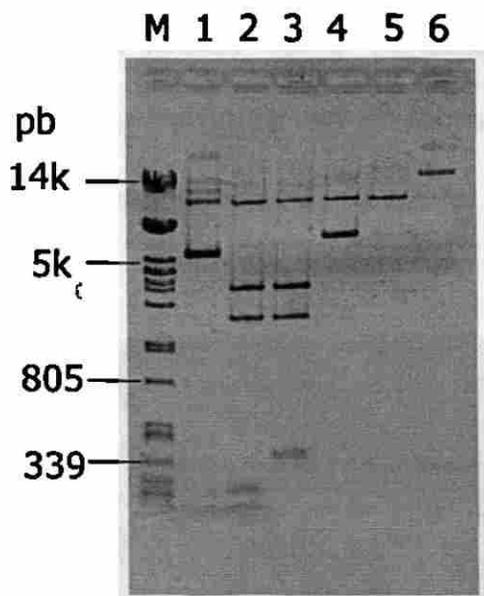


Figura 18.- Digestión preparativa del vector de expresión pPIC9bGH. En el carril 6 se muestra el vector sin digerir y en el carril 5 se muestra con la doble digestión. Los carriles del 1 al 4 son otros vectores que bajo las mismas condiciones con las mismas enzimas revelaron actividad de las dos endonucleasas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

Transcurridas 16 h después de la transformación, la placa mostró crecimiento de una gran cantidad de colonias. Ya que en este caso no estaba

disponible la selección azul-blanco, se procedió a escoger al azar colonias para realizar extracción plasmídica. Después de crecer las colonias en tubo de ensayo y realizar la minipreparación plasmídica como antes descrito, se procedió a realizar una digestión analítica con la enzima diagnóstica *Ban I*, cuyo patrón de digestión libera fragmentos que permiten diferenciar pPIC9bGH de pPIC9chGH, ya que debido a que ambos plásmidos son de tamaño idéntico, la diferenciación por migración retardada es imposible.

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

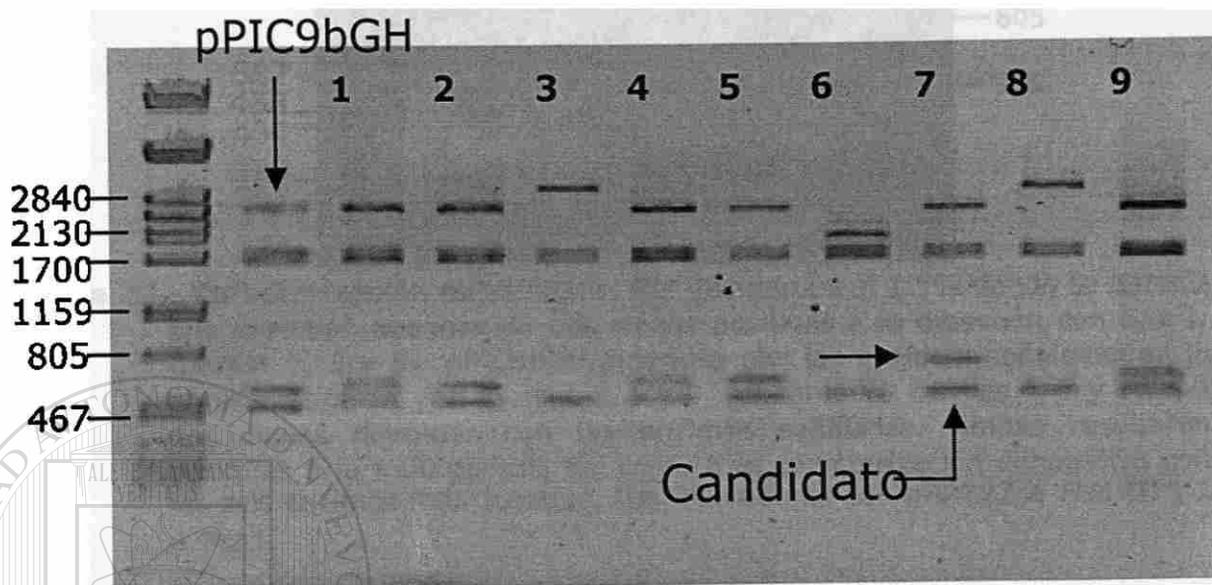


Figura 19.- Búsqueda de pPIC9chGH. Gel de agarosa al 1.5% donde se muestra la digestión analítica de un juego de colonias con la endonucleasa de restricción *Ban I*. Es evidente que la clona 7 muestra los patrones de digestión esperados para la clona mutagenizada. El resto de las clonas muestran el patrón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

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

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

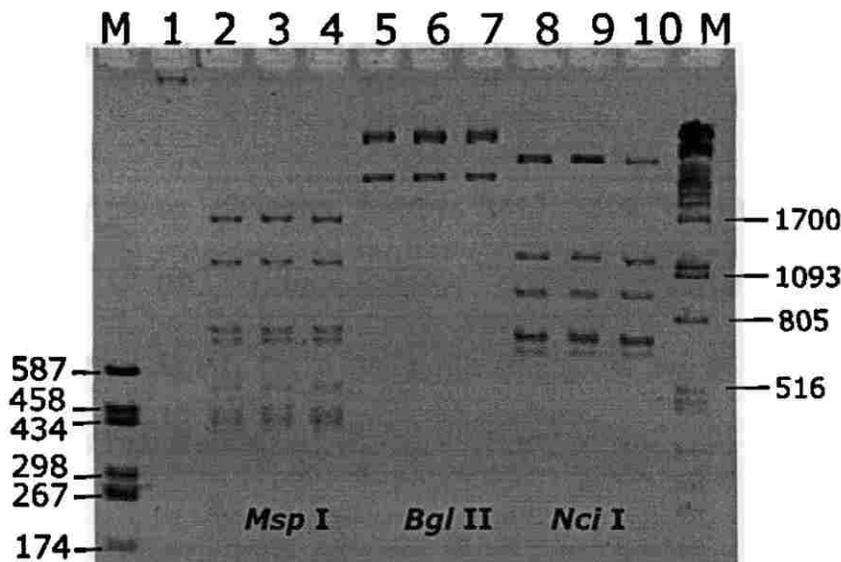


Figura 20.- Caracterización exhaustiva. Gel de agarosa al 1.5% donde se aprecia una digestión analítica de dos clones positivos a la digestión con *Ban I*. Carriles 2, 5 y 8= pPIC9bGH digeridas con las enzimas señaladas en la parte inferior del gel; carriles 3, 6 y 9, así como los carriles 4, 7 y 10 son dos clones digeridas con las enzimas señaladas. Ambas resultaron positivas a la mutagénesis así como a la caracterización exhaustiva con las seis enzimas mencionadas. Los marcadores son pBR322 + *Hae III* y λ + *Pst I*.

Finalmente, al menos tres clones resultaron positivas a la caracterización con las enzimas de restricción y estas fueron denominadas pPIC9chGH. A estas clones se les realizó una mediana escala para obtener suficiente cantidad del plásmido para almacenar y para transformar a las levaduras.

3.5. Transformación de levaduras.

La transformación de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9chGH, se llevó a cabo como se describió en el punto 2.3.7, y dio lugar a 68 colonias que crecieron en medio carente de histidina. De estas colonias se levantaron 14 al azar y se les realizó la extracción de DNA genómico para proceder con la caracterización.

3.6. Caracterización de las clonas recombinantes.

Los DNAs genómicos aislados fueron sometidos a una PCR con los oligonucleótidos 97 y 98, realizándoseles posteriormente una digestión analítica con la enzima *Ban I*, tal y como se describió en el punto 2.3.8. La figura 21 muestra los resultados.

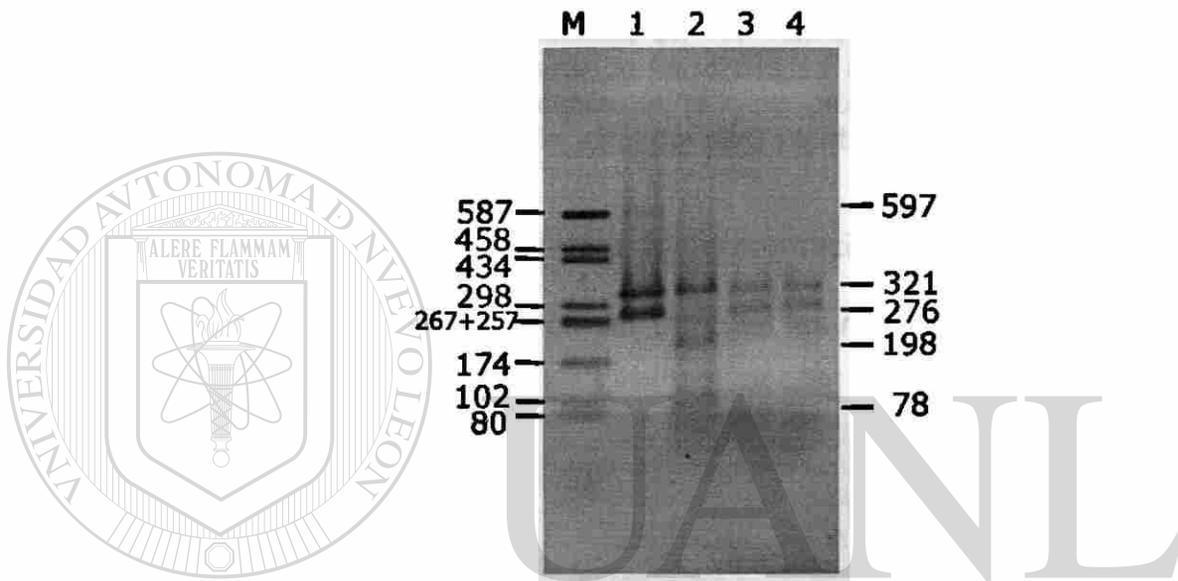


Figura 21.- Caracterización de las clonas de *P. pastoris*. El carril 1 muestra el plásmido mutagenizado después de ser digerido con la enzima *Ban I*. El carril 2 muestra DNA genómico de levadura que contiene en su genoma el DNac de la BGH. Carriles 3 y 4 muestran DNA genómico de clonas de levaduras transformadas con el plásmido mutagenizado y puede verse que se comportan igual que éste, confirmando así la mutagénesis. Marcador: pUC19 + *Hae III*.

3.7. Fermentación con clonas recombinantes.

Se realizaron fermentaciones con clonas recombinantes productoras de HGhr, de BGhr y de CHGhr para llevar a cabo una comparación. En la figura 22 se muestra una gráfica comparando el crecimiento de las clonas de HGhr, BGhr y CHGhr, el cual fue relativamente similar entre las tres.

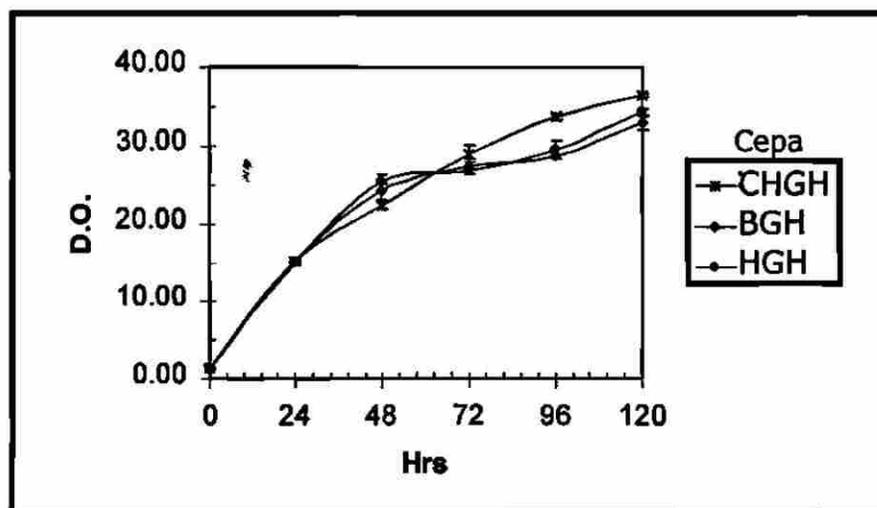


Figura 22.- Comparación de cinética de fermentación. Gráfica donde se puede comparar el comportamiento de las cepas en el medio que mostró ser mas apropiado para el crecimiento de la cepa productora de CHGHr (194). La gráfica incluye la desviación estándar de 3 repeticiones de cada experimento.

En la figura 23 se muestra la fermentación usando las condiciones óptimas para BGH, que resultaron ser también las mejores para CHGH.

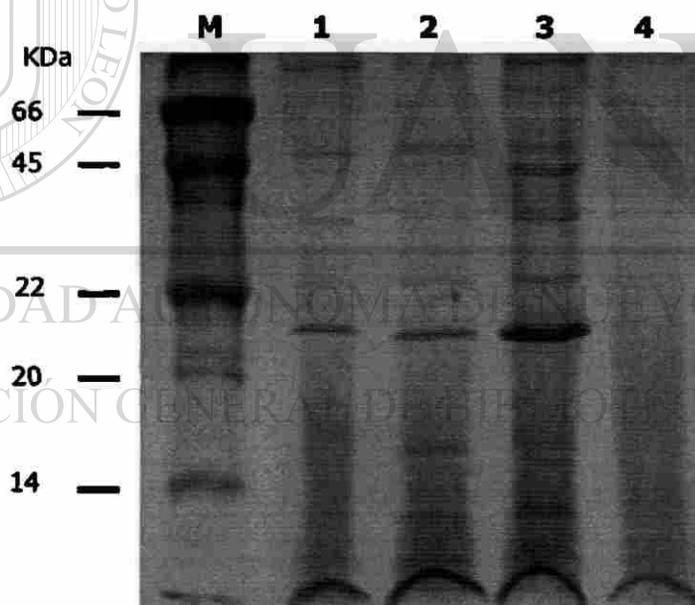


Figura 23.- Fermentación de BGH, HGH y CHGH recombinantes. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% donde se observa una comparación entre las clonas fermentadas. Carril 1: BGH, carril 2: HGH, carril 3: clona 194 de CHGH, carril 4: control negativo.

En la figura 24 se muestra un gel en el que se aprecia el resultado de un experimento de fermentación-inducción, donde se obtuvieron los mejores niveles de producción de CHGHr (de hasta 3.6 mg/L).

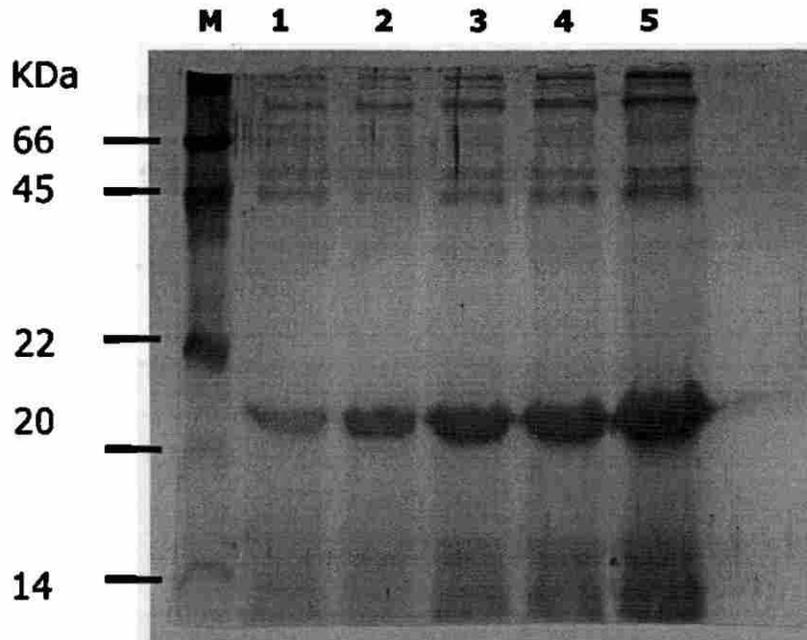


Figura 24.-Producción de CHGhr. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% mostrando la producción de la CHGhr. Los carriles del 1 al 5 son alícuotas de los medios de la misma cepa, tomadas a 24, 48, 72, 96 y 120 h, respectivamente.

3.8. Semipurificación de la proteína recombinante.

En la figura 25 se muestra un gel donde se puede comparar el medio antes y después de precipitar con sulfato de amonio al 40%.

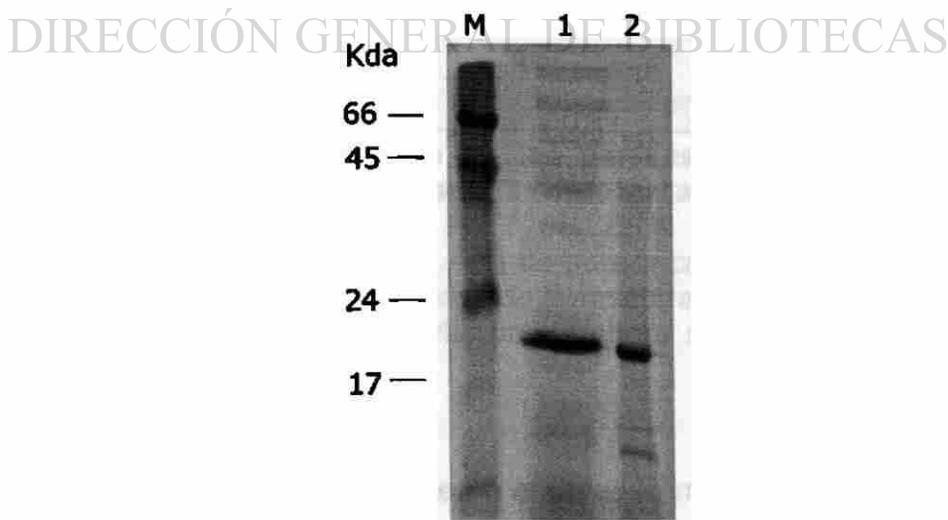


Figura 25.- Precipitación con sulfato de amonio. Gel de poliacrilamida al 15%. En el carril 1 se muestra el medio antes de precipitar con sulfato de amonio y en el carril 2 el mismo medio después de la precipitación.

En la figura 26 se muestran los perfiles de los carriles con y sin precipitación. Se logró mejorar en un 42% la pureza de la proteína en el medio (59.1/41.4 = 1.42. Hay 42% más CHGhr con respecto al total que en el medio sin precipitar).

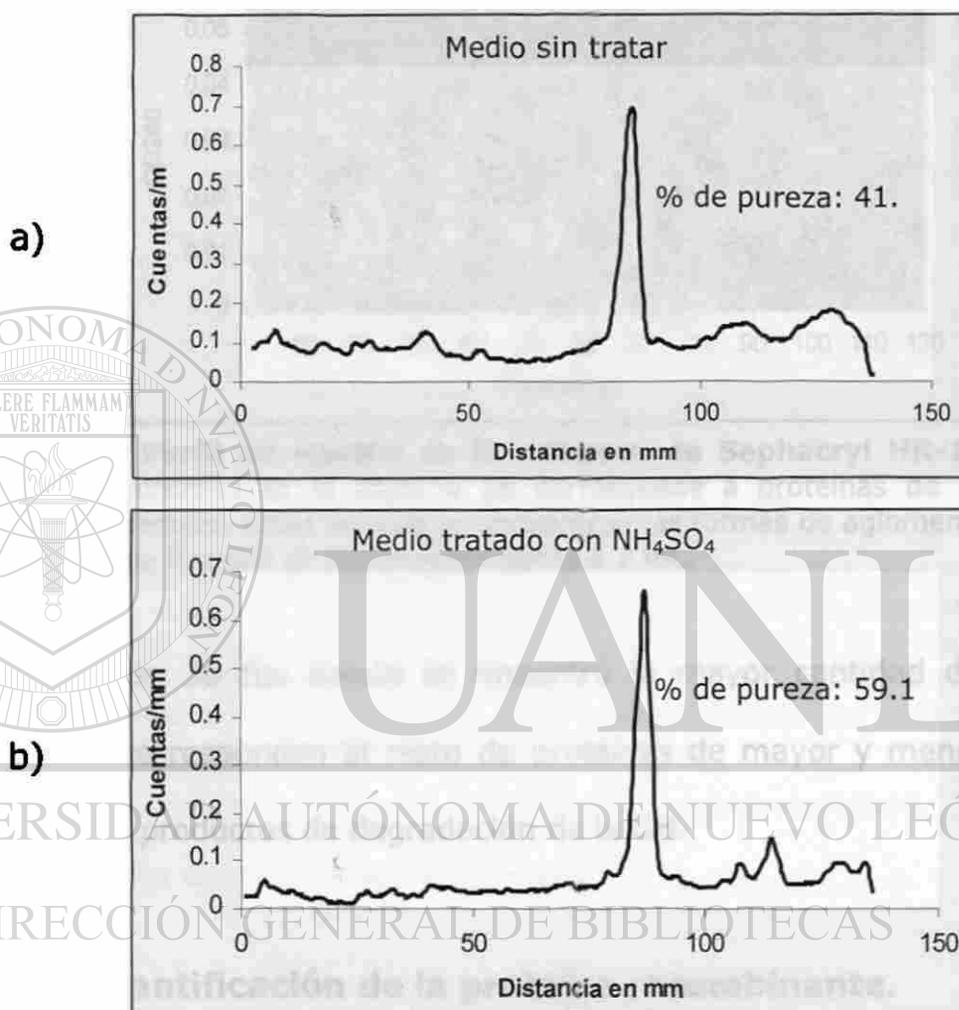


Figura 26.- Comparación de los perfiles del medio fermentado antes y después del tratamiento con sulfato de amonio. a) Perfil del carril del medio sin precipitar mostrando 41.4 % de pureza correspondiente a la CHGhr. b) Perfil del carril de la muestra precipitada con sulfato de amonio al 40%, donde ahora se muestra una pureza de 59.1%.

Después de ésto, se procedió a pasar la muestra por una columna de filtración en gel.

En la figura 26 se muestran los perfiles de los carriles con y sin precipitación. Se logró mejorar en un 42% la pureza de la proteína en el medio ($59.1/41.4 = 1.42$. Hay 42% más CHGHR con respecto al total que en el medio sin precipitar).

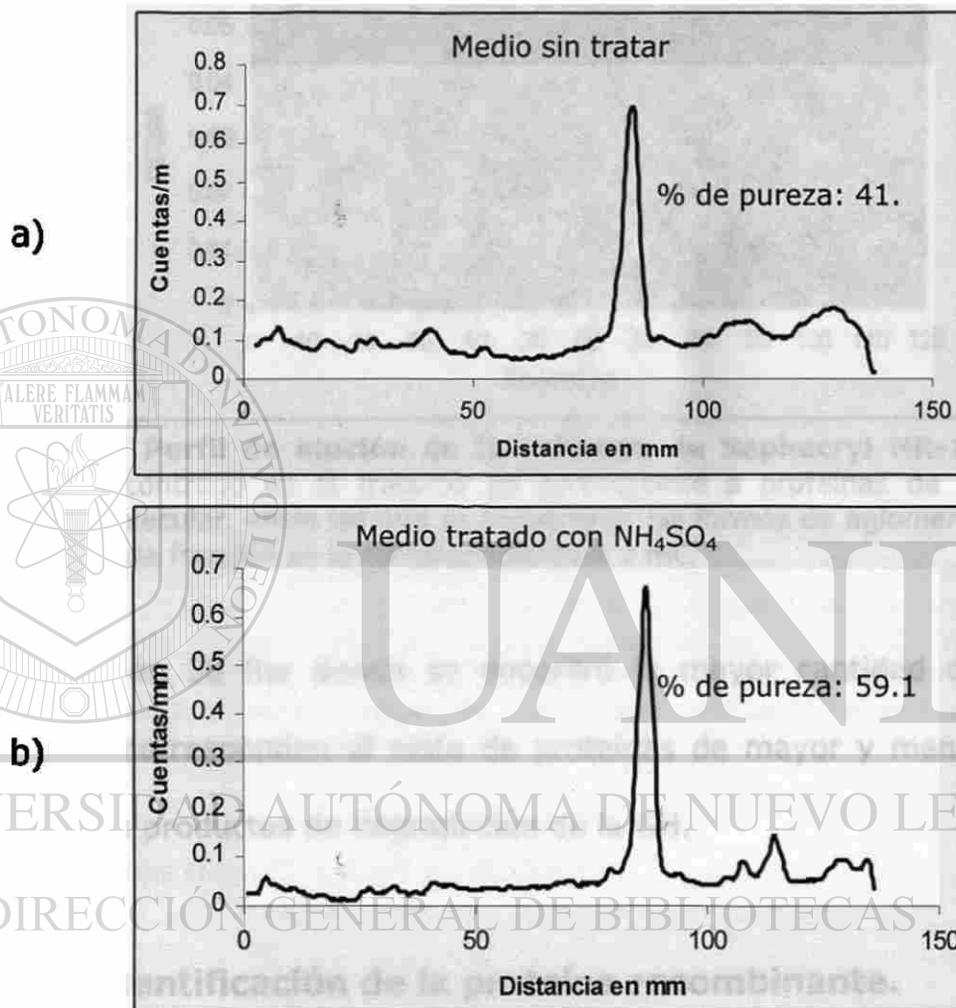


Figura 26.- Comparación de los perfiles del medio fermentado antes y después del tratamiento con sulfato de amonio. a) Perfil del carril del medio sin precipitar mostrando 41.4 % de pureza correspondiente a la CHGHR. b) Perfil del carril de la muestra precipitada con sulfato de amonio al 40%, donde ahora se muestra una pureza de 59.1%.

Después de esto, se procedió a pasar la muestra por una columna de filtración en gel.

En la siguiente figura se muestra un perfil de la cromatografía por filtración en gel donde se evidencian los picos correspondientes a las proteínas.

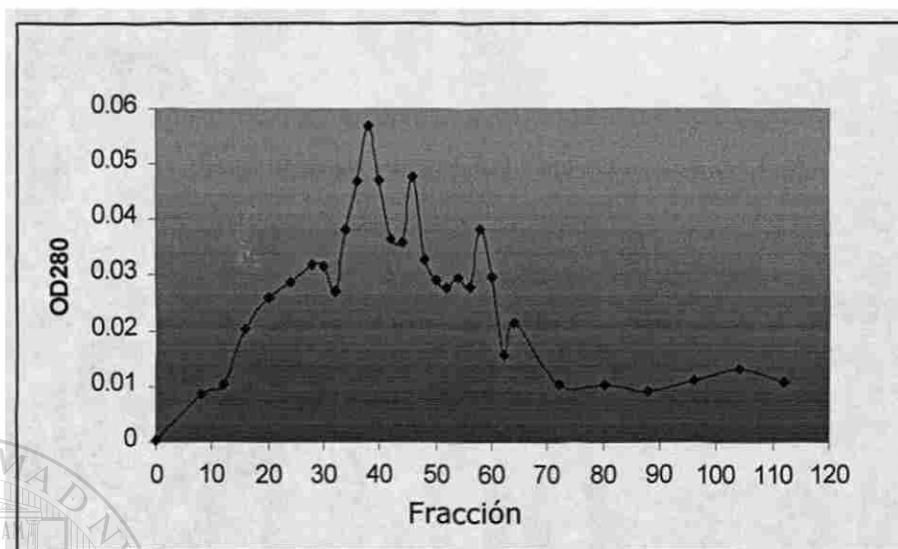


Figura 27.- Perfil de elución de la columna de Sephacryl HR-100. El pico encontrado en la fracción 28 corresponde a proteínas de mayor peso molecular, entre las que se encuentran las formas de aglomerados de GH. Cada fracción es lo correspondiente a 2 mL.

La fracción 38 fue donde se encontró la mayor cantidad de GH. Los demás picos corresponden al resto de proteínas de mayor y menor tamaño, así como a los productos de degradación de la GH.

3.9. Semicuantificación de la proteína recombinante.

Se realizó un gel de poliacrilamida de estas fracciones y se procedió a semicuantificar la proteína como se describió en el punto 2.3.10.1. En la figura 28 se muestra este gel. Con los datos derivados de estos ensayos se logró obtener un estimado de la cantidad de proteína y se pudo entonces diseñar el experimento de diferenciación adipocítica.

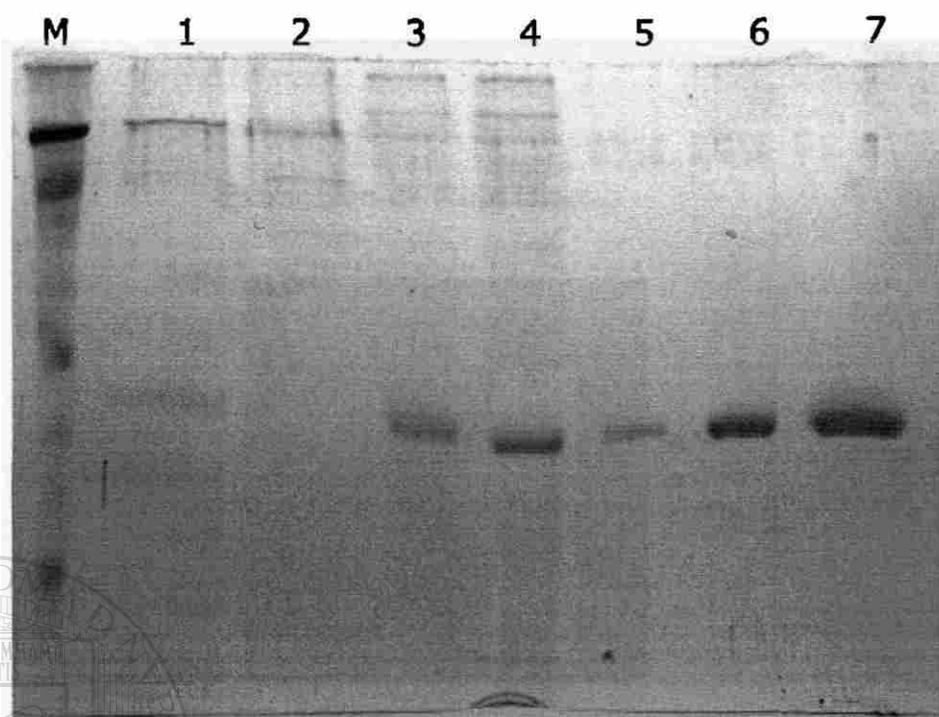


Figura 28.- Semicuantificación de la CHGhr. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% mostrando la semicuantificación de la proteína recombinante. En los carriles 5, 6 y 7 se muestran 100, 500 y 1000 ng de HGH comercial cuantificada. El carril 1 muestra la fracción donde se alcanzó el mayor pico después de la cromatografía y el 2 corresponde al control negativo (medio sin inducir), mientras que en los carriles 3 y 4 se muestra el medio después de haber sido precipitado con sulfato de amonio al 40% y antes de pasarlo por la columna.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
3.10. Ensayos de actividad biológica. ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como ya se describió, se realizaron los experimentos de diferenciación adipocítica usando la HGH como testigo positivo, CHGhr como muestra problema y el medio de la cepa productora de CHGhr sin inducir pasado por los mismos procesos a los que se sometió CHGhr, como testigo negativo. En cuanto a lo referente a la tinción con rojo oleoso, tanto las células que fueron expuestas a CHGhr como a HGH mostraron mayor diferenciación cuando se comparan con el control del medio sin inducir. En la figura 29 se muestra la

gráfica correspondiente a 3 repeticiones del experimento con la desviación estándar.

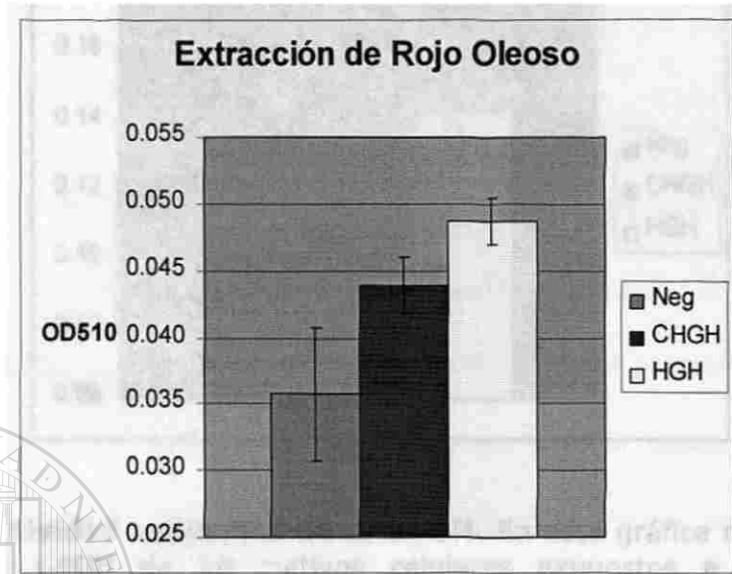


Figura 29.- Ensayo comparativo de actividad biológica. En esta gráfica se muestra la cantidad de rojo oleoso que retuvieron las células expuestas a las hormonas del crecimiento por 7 días comparadas con el control negativo. Se incluyen 3 repeticiones y su desviación estándar

En lo referente a la actividad de la GPDH, también los extractos celulares provenientes de los experimentos en los que se suplementó el medio de cultivo con CHGHr y HGH mostraron mayor actividad que el medio sin inducir y en la gráfica de la figura 30 se muestran estos resultados provenientes de 3 repeticiones y su desviación estándar.

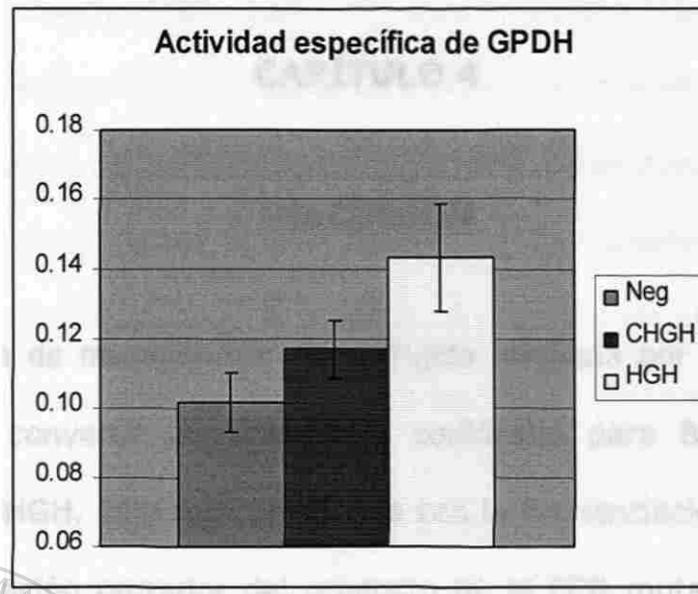
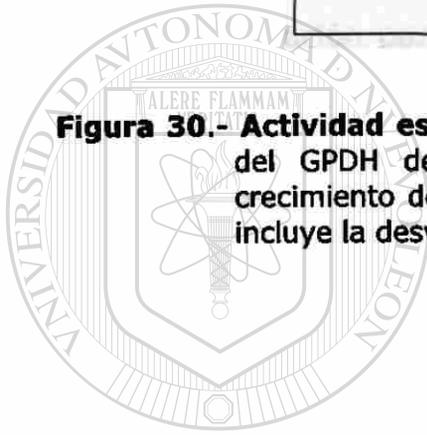


Figura 30.- Actividad específica de la GPDH. En esta gráfica muestra la actividad del GPDH de los cultivos celulares expuestos a las hormonas del crecimiento de la cabra y la humana. Corresponde a 3 repeticiones y se incluye la desviación estándar.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La técnica de mutagénesis sitio-dirigida mediada por PCR resultó muy efectiva para convertir la región que codificaba para BGH en una que codifica para CHGH. Esto fue confirmado con la secuenciación del inserto del vector de clonación portador del producto de la PCR mutagénica. Además, mostró que el empleo de la enzima *Taq* DNA polimerasa es adecuado para estos propósitos siempre y cuando se trate de fragmentos de tamaño pequeño, pues se sabe que la *Taq* es propensa a introducir errores en la secuencia debido a su baja fidelidad durante la síntesis (Gallardo, 1999). Ya que el fragmento que nosotros generamos durante este experimento se reduce a 133 pares de bases, la baja fidelidad de la *Taq* no fue de tanta trascendencia, ya que esta polimerasa tiene un índice de error de 285×10^{-6} (Tindall, 1988). La caracterización con endonucleasas de restricción confirmó que la subclonación en el vector de expresión también se llevó a cabo como se esperaba, ya que los sitios *Xma* I y *Apa* I se conservaron después de la ligación, demostrando que no hubo degradación de los extremos 5', ni en el inserto ni en el vector. La PCR con los iniciadores 97 y 98, y la posterior digestión con la enzima diagnóstica, corroboró que no se insertó más de un fragmento, ya que las bandas que liberó esta digestión fueron del tamaño esperado.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La técnica de mutagénesis sitio-dirigida mediada por PCR resultó muy efectiva para convertir la región que codificaba para BGH en una que codifica para CHGH. Esto fue confirmado con la secuenciación del inserto del vector de clonación portador del producto de la PCR mutagénica. Además, mostró que el empleo de la enzima *Taq* DNA polimerasa es adecuado para estos propósitos siempre y cuando se trate de fragmentos de tamaño pequeño, pues se sabe que la *Taq* es propensa a introducir errores en la secuencia debido a su baja fidelidad durante la síntesis (Gallardo, 1999). Ya que el fragmento que nosotros generamos durante este experimento se reduce a 133 pares de bases, la baja fidelidad de la *Taq* no fue de tanta trascendencia, ya que esta polimerasa tiene un índice de error de 285×10^{-6} (Tindall, 1988). La caracterización con endonucleasas de restricción confirmó que la subclonación en el vector de expresión también se llevó a cabo como se esperaba, ya que los sitios *Xma* I y *Apa* I se conservaron después de la ligación, demostrando que no hubo degradación de los extremos 5', ni en el inserto ni en el vector. La PCR con los iniciadores 97 y 98, y la posterior digestión con la enzima diagnóstica, corroboró que no se insertó mas de un fragmento, ya que las bandas que liberó esta digestión fueron del tamaño esperado.

La transformación de levaduras por el método de esferoplastos o por electroporación se reportan como las más eficientes (Cregg, 1985); sin embargo, la técnica de esferoplastos requiere al menos de 5 días para preparar las células además de un número alto de reactivos, lo que la hace una técnica costosa, además de laboriosa. La electroporación requiere contar con el electroporador. En cambio, la técnica de cloruro de litio se realiza en un día, no requiere la preparación de reactivos costosos y es sencilla de ejecutar.

Las condiciones de fermentación óptimas para esta proteína se acercaron más a las óptimas para BGHr que a las de HGHR, ambas ensayadas en nuestro laboratorio por Gallardo (1999) y Sánchez (1998), respectivamente, lo que era de esperarse por la similitud entre las dos GHs de rumiantes.

La cantidad de proteína heteróloga obtenida en el mejor de los ensayos fue aparentemente mayor a la cantidad de proteína obtenida de la fermentación de la cepa productora de BGHr, aunque no mayor a la de HGHR. No está claro si esto puede ser efecto del cambio aminoacídico, el cual le pudiera conferir mayor estabilidad en el medio de cultivo, o si es debido únicamente a que la cepa de la levadura aquí construida y seleccionada contiene un mayor número de copias del cassette de expresión en comparación con la de BGH.

La semipurificación de la proteína tras precipitación selectiva con sulfato de amonio al 40% y su paso por la columna cromatográfica de filtración en gel fue una opción, aunque aparentemente no la mejor, resultando útil para separar las formas monoméricas de los aglomerados de GH, así como otros productos de degradación. En la literatura se reporta la purificación de GHs con columnas de intercambio aniónico o con columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales. Ya que nuestro laboratorio no contaba en esos momentos con dichas columnas, se optó por usar estas opciones, sin embargo, queda mucho por hacer para estandarizar en el laboratorio este tipo de purificación.

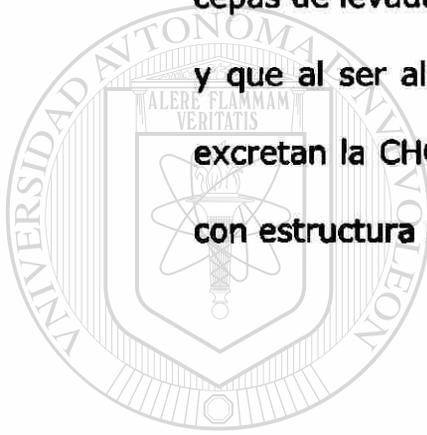
Algo similar sucede con los bioensayos. La cuantificación de la diferenciación adipocítica, por medio de la extracción del rojo oleoso fijado en el cultivo y por la medición de la actividad de la GPDH, arrojó resultados preliminares que deben ser confirmados con más repeticiones. Queda pendiente también ensayar la CHGhr, una vez que se produzca en cantidades suficientes y se logre una purificación que permita elaborar un inyectable, en animales de laboratorio, tales como roedores carentes de pituitaria y cuantificar los efectos que resulten de la aplicación de la hormona; así como realizar pruebas de comportamiento en cabras productoras de leche para probar si la CHGhr tiene la capacidad lactopoyética ampliamente demostrada para el caso de la BGH.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- ◆ Se logró construir un iniciador mutagénico capaz de convertir la glicina en el codón 129 de la BGH en valina, para dar así lugar a la CHGH.
- ◆ La DNA polimerasa *Taq* pudo ser usada para la construcción del cassette de expresión mutagenizado sin problema alguno, seguramente debido al tamaño pequeño de la región de DNA involucrado, menester corroborar la integridad por secuenciación.
- ◆ La técnica de transformación de levaduras por medio del uso de cloruro de litio es una metodología sencilla y económica, que arrojó resultados favorables en un menor tiempo en comparación con otras técnicas descritas.
- ◆ Las condiciones de fermentación que resultaron más adecuadas para la producción de CHGHr en *Pichia pastoris* fueron: medio BMMY buffer de citratos pH 5.15, % de metanol de 0.875, iniciando con una biomasa de 1.4 OD₆₀₀ por 5 días de inducción en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio con una agitación de 250 rpm, mismas que fueron optimizadas en nuestro laboratorio para BGHr.

- ⊕ **La técnica de bioensayo para corroborar la actividad biológica de la CHGhr arrojó resultados que sugieren que ésta tiene la actividad esperada, sin embargo, hacen falta otros ensayos en animales de laboratorio y posteriormente en cabras para que los resultados sean contundentes.**
- ⊕ **Por último, este trabajo aportó el vector de expresión pPIC9chGH, que contiene la secuencia que codifica para la CHGH con su expresión regulada por un promotor inducible por metanol, así como cepas de levadura que contienen insertado en su genoma este vector y que al ser alimentadas con un medio suplementado con metanol, excretan la CHGhr al medio de cultivo en forma abundante, activa y con estructura muy seguramente idéntica a la natural.**



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Walter P., Roberts K. y Raff M. 1998. Essential cell biology. Garland Publishing Inc. pp 63.
2. Amaya F. 1988. Obtención del DNA complementario al RNAm de la hormona del crecimiento bovina. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UANL.
3. Bauman D.E.; Eppard P.J.; DeGeeter M.J. y Lanza G.M. 1985. Responses of High-producing Dairy Cows to Long-Term Treatment with Pituitary Somatotropin and Recombinant Somatotropin. *J. Dairy Sci*; 68(6):1352-1360.
4. Bauman D.E.; McCutcheon S.N.; Steinhour W.D.; Eppard P.J. y Sechen S.J. February 1985. Sources of Variation and Prospects for Improvement of Productive Efficiency in the Dairy Cow: A Review. *J. Dairy Sci*; 60(2):583-592.
5. Bhat G.J., Lodes M.J., Myler P.J. y Stuart K.D. 1991. A simple method for cloning blunt ended DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 25; 19(2):398.
6. Bielefeldt - Ohmann H. y Fitzpatrick D.R. 1997. High Efficiency T-Vector Cloning Of PCR Products By Forced A Tagging And Post-Ligation Restriction Enzyme Digestion. *Biotechniques* 23:822-826.
7. Castells S., Torrado C., Bastian W. y Wisniewski K.E. 1992. Growth hormone deficiency in Down syndrome children. *J Intellect Disabil Res*, 36(1), 29-43.
8. Chalupa W. y Galligan D.T. 1989. Nutritional implications of somatotropin for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2510-2524.
9. Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y. y Madden K.R. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol.* 5(12):3376-85.

10. Cregg J.M., Vedvick T.S. y Raschke W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *BioTechnology(NY)* 11, 905-910.
11. Cohen S., Chang A., Boyer H. y Helling R. 1973. Construction of biological functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 70:3240-3244.
12. Composition of Foods; Dairy and Egg Products. 1976. Agricultural Handbook No. 8-1, Agricultural Research Service, Washington, D.C.; USDA.
13. Eeles R.A. y Stamps A.C. 1993. Polymerase Chain Reaction (PCR): The Technique and Its Application. Landes Bioscience pp13-14.
14. Ellis S.B., Brust P.F., Koutz P.J., Waters A.F., Harpold M.M. y Gingeras T.R. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* 5(5):1111-21.
15. Eppard P.J., Bentle L.A., Violand B.N., Ganguli S., Hintz R.L., Kung L. Jr, Krivi G.G. y Lanza G.M. 1992. Comparison of the galactopoietic response to pituitary-derived and recombinant-derived variants of bovine growth hormone. *J Endocrinol* 132(1):47-56
16. Fleet I.R., Fullerton F.M., Heap R.B., Mephram T.B., Gluckman P.D. y Hart I.C. 1988. Cardiovascular and metabolic responses during growth hormone treatment of lactating sheep. *J. Dairy Res* 55, 479-485.
17. Gallardo-Blanco H.L. 1999. Construcción de cepas de *Pichia pastoris* portadoras del DNAc de la hormona del crecimiento bovino. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL.
18. Gamou S., Shimizu Y. y Shimizu N. 1990. Adipocytes en *Methods in Molecular Biology, Animal Cell Culture*. Polard J.W. y Walker J.M, Editores. Human Press Vol. 5 Cap 18; 197-207.

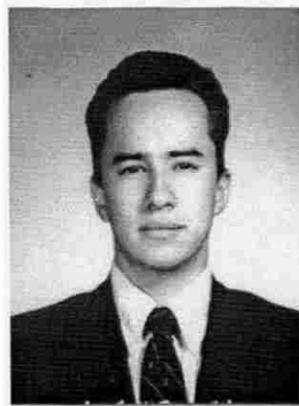
19. Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R. y Woods R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. Apr 15;11(4):355-60.
20. <http://encarta.msn.com>
21. <http://www.britannica.com>
22. Jacobs F. 1985. *Breakthrough: The True Story of Penicillin*. New York: Dodd, Mead & Company.
23. Johnston M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 51(4):458-76.
24. Juárez-Aguilar E. y Castro- Muñozledo F. 1995. 22-kDa isoforms show differential effects when assayed in 3T3-F44a4 and 3T3-F442A/CA adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 1;28-33.
25. Knight C.H., Fowler P.A. y Wilde C.J.. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J Endocrinol* 127, 129-133.
26. Lee K.B. y Burrill G.S.. 1994. *Biotech 95 Reform, Restructure, Renewal: The Industry Annual Report*. Palo Alto, CA: Ernst & Young.
27. Lee P.D. y Forsyth I.A. 1988. The effects of raising growth hormone concentration pre-partum on milk yield in goats. *J Endocrinol* 177, (Suppl.), abstract no 37.
28. Lingappa V.R., Devillers-Thierry A. y Blobel G. 1977. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jun;74(6):2432-6.
29. McBride B.W., Burton J.L. y Burton J.H. 1988. The influence of bovine growth hormone (somatotropin) on animals and their products. *Res. Dev. Agric.* 5:1-21.

19. Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R. y Woods R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. Apr 15;11(4):355-60.
20. <http://encarta.msn.com>
21. <http://www.britannica.com>
22. Jacobs F. 1985. Breakthrough: The True Story of Penicillin. New York: Dodd, Mead & Company.
23. Johnston M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 51(4):458-76.
24. Juárez-Aguilar E. y Castro- Muñozledo F. 1995. 22-kDa isoforms show differential effects when assayed in 3T3-F44a4 and 3T3-F442A/CA adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 1;28-33.
25. Knight C.H., Fowler P.A. y Wilde C.J.. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J Endocrinol* 127, 129-133.
26. Lee K.B. y Burrill G.S.. 1994. Biotech 95 Reform, Restructure, Renewal: The Industry Annual Report. Palo Alto, CA: Ernst & Young. ®
27. Lee P.D. y Forsyth I.A. 1988. The effects of raising growth hormone concentration pre-partum on milk yield in goats. *J Endocrinol* 177, (Suppl.), abstract no 37.
28. Lingappa V.R., Devillers-Thierry A. y Blobel G. 1977. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jun;74(6):2432-6.
29. McBride B.W., Burton J.L. y Burton J.H. 1988. The influence of bovine growth hormone (somatotropin) on animals and their products. *Res. Dev. Agric.* 5:1-21.

30. Mephan T.B., Lawrence S.E., Peters A.R. y Hart I.C. 1984. Effects of exogenous growth hormone on mammary function in lactating goats. *Horm Metab Res* 16, 248-253.
31. National Goat Handbook, University of Maryland.
<http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/goat/>
32. Nutritive Value of Foods. 1981. Home And Garden Bulletin Number 72, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C., U. S. Government Printing Office.
33. Phipps R.H., Madakadze C., Mutsvangwa T., Hard D.L. y Kerchove G. 1991. Use of bovine somatotropin in the tropics; the effect of sometribove on milk production of *Bos indicus*, dairy cross-bred and *Bos taurus* cows in Zimbabwe. *J Agri Sci*;117:257.
34. Primrose S.B. 1993. Molecular biotechnology. Editorial Blackwell scientific publications, 2ª Edición.
35. Romanos M.A., Scorer C.A. y Clare J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*. 8(6):423-88.
36. Sánchez C.N. 1998. Producción de hormona del crecimiento humano recombinante biológicamente activa en *Pichia pastoris*. Tesis de maestría. Facultad de Medicina. UANL.
37. Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminators Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74: 5463-5467.
38. Seavey B.K., Singh R.N., Lewis U.J. y Geschwind I.I. 1971. Bovine growth hormone: evidence for two allelic forms. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 2;43(1):189-95.

39. Sejrsen K., Foldager J., Sorensen M.T., Akers R.M. y Bauman D.E. 1986. Effect of exogenous bovine somatotropin on pubertal mammary development in heifers. *J. Dairy Sci* 69, 1528-1533.
40. Tindall K.R. y Kunkel T.A. 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27, 6008-6013.
41. USDA Handbook #8, 1989
42. Wallace R.B., Schold M., Johnson M.J., Dembek P. y Itakura K. 1981. Oligonucleotide directed mutagenesis of the human beta-globin gene: a general method for producing specific point mutations in cloned DNA. *Nucleic Acids Res.* Aug 11;9(15):3647-56.
43. Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. (Contributor), Witkowski G. (Contributor) 1992. Recombinant DNA. Scientific American Books. Second Edition. pp 192, 193.
44. Winder S.J., Turvey A. y Forsyth I.A. 1989. Stimulation of DNA synthesis in cultures of ovine mammary epithelial cells by insulin and insulin-like growth factors. *J Endocrinol* 123, 319-326.
45. Wood D.C., Salsgiver W.J., Kasser T.R., Lange G.W., Rowold E., Violand B.N., Johnson A., Leimgruber R.M., Parr G.R. y Siegel N.R. 1989. Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin *J Biol Chem* Sep 5;264(25):14741-7

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Jorge Mauricio Reyes Ruiz

Candidato para el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Tesis: Hormona del Crecimiento Caprino: Construcción de un DNA que la Codifica y su Expresión en *Pichia pastoris*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

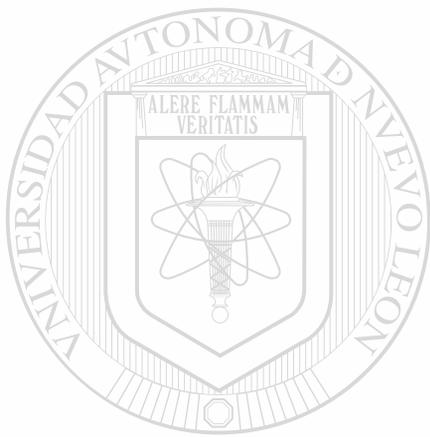
Campo de Estudio: Biotecnología

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Datos Personales:

Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 18 de Junio de 1974, hijo de Oscar Reyes Robles y Diana Ruiz de Reyes.

Egresado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, obteniendo el grado el día 22 de Junio de 1998, 3^{er} lugar de su generación.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



