

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



CONSTRUCCION DE CEPAS DE *Pichia pastoris*
PRODUCTORAS DE HORMONA DEL
CRECIMIENTO HUMANA
RECOMBINANTE Y EVALUACION DE ESQUEMAS
DE PURIFICACION

POR

Q.C.B. CELIA NOHEMI SANCHEZ DOMINGUEZ

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

Noviembre, 1998

TM

QH445

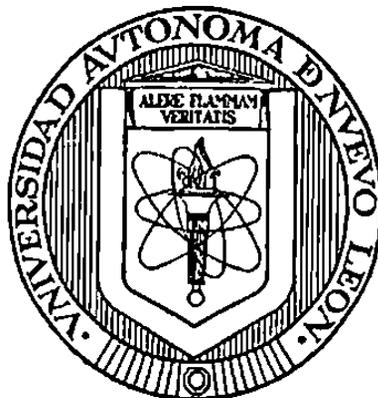
S2

c.1



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pichia pastoris*
PRODUCTORAS DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA
RECOMBINANTE Y EVALUACIÓN DE ESQUEMAS DE
PURIFICACIÓN**

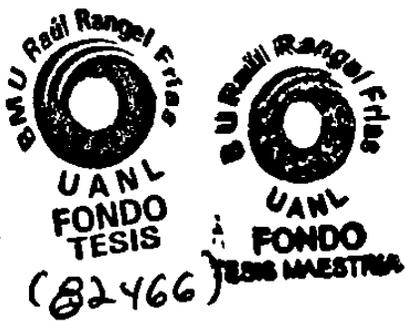
Por

Q. C. B. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

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

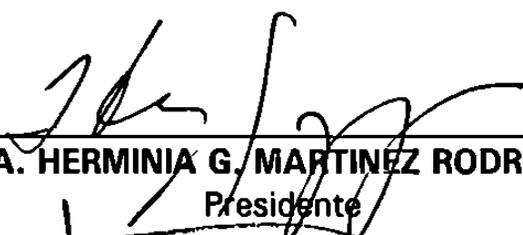
Noviembre, 1998

TM
Q11445
52

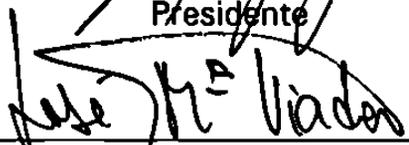


CONSTRUCCION DE CEPAS DE *Pichia pastoris* PRODUCTORAS DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE Y EVALUACION DE ESQUEMAS DE PURIFICACION.

Aprobación de la Tesis:



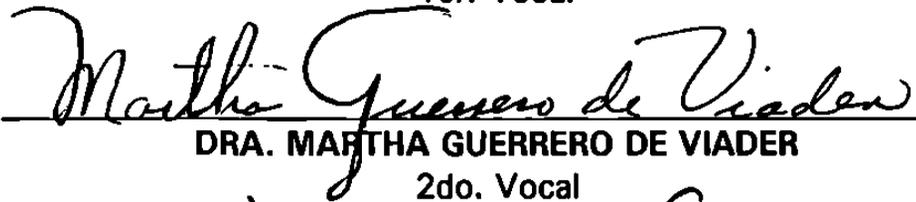
DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Presidente



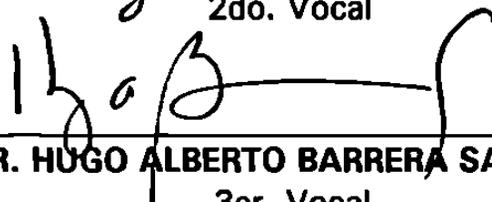
DR. JOSE MA. VIADER SALVADO
Secretario



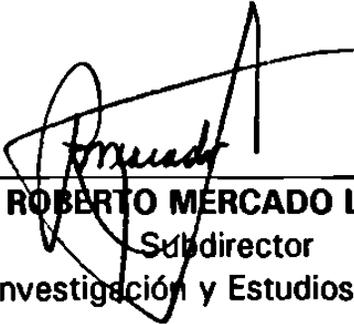
DR. LUIS GALAN WONG
1er. Vocal



DRA. MARTHA GUERRERO DE VIADER
2do. Vocal



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
3er. Vocal



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

AGRADECIMIENTOS

A la generación Six Monkeys: Carmen, Ana Laura, Claudio, Mario-pollo y Hugo. Gracias por hacer de la maestría algo más que estudio y trabajo.

A todos los Doctores de la ULIEG que contribuyeron en mi formación, especialmente a los Doctores Viader, quienes me inspiraron a seguir superándome. Al Dr. Barrera, gracias por brindarme la oportunidad de realizar la maestría.

A todos los ulieguitos, especialmente a Normita, a las secretarias y en general a los trabajadores de la ULIEG.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza para salir adelante en mi vida.

Con cariño a mis padres Juan Manuel y Margarita. A mis hermanos Lily, Maggie y Juan Carlos. Gracias por su apoyo, su amor y su confianza. Dios los bendiga.

Especialmente a Hugo Leonid. Te conocí realmente durante nuestro paso por la maestría, me apoyaste en los momentos más difíciles y tristes, compartiste conmigo tu experiencia desinteresadamente, y conquistaste mi corazón. Ahora eres mi esposo y contigo quiero compartir el haber alcanzado mi meta.



Y a la clonita

La biotecnología promete la revolución más grande de la historia humana. Para fines de esta década habrá dejado muy atrás la energía atómica y las computadoras en cuanto al efecto que habrá de ejercer sobre nuestra vida cotidiana. Tal como lo expresó un observador "la biotecnología va a transformar todos los aspectos de la vida humana: nuestros servicios médicos, nuestra alimentación, nuestra salud, nuestras diversiones, nuestro mismo cuerpo. Nada volverá a ser lo mismo. Literalmente, va a cambiar la faz del planeta".

(Michael Crichton, El Parque Jurásico. 1990. Ed. Reverté).

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN		1
1.1	Características de la Hormona del Crecimiento Humana (HGH)	1
1.1.1	Generalidades de la HGH	1
1.1.2	Usos de la HGH	2
1.1.3	Producción de HGH	5
1.2	Características de <i>Pichia pastoris</i>	5
1.2.1	Generalidades	5
1.2.2	El metabolismo del metanol	7
1.2.3	Ventajas de <i>Pichia pastoris</i>	8
1.2.4	Vectores de expresión	9
1.2.5	La cepa GS115 de <i>Pichia pastoris</i>	10
1.2.6	Dosis génica	10
1.3	Justificación del trabajo	12
1.4	Objetivos del trabajo	13

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS		14
2.1	Area de trabajo, reactivos y equipo	14
2.2	Estrategia general experimental	17
2.3.	Métodos	19
2.3.1	Construcción del vector pPIC9KhGH22K	19
2.3.1.1	Propagación y caracterización de los plásmidos pPIC9K y pPIC9hGH22K	19
2.3.1.2	Cortes preparativos de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K	21
2.3.1.3	Purificación del fragmento de 1567 pb	22
2.3.1.4	Reacción de ligación	22
2.3.1.5	Transformación de bacterias calcio-competentes con la reacción de ligación, obtención del ADN y caracterización.	23
2.3.2	Construcción de la cepa recombinante de <i>Pichia pastoris</i>	24
2.3.2.1	Preparación del plásmido pPIC9KhGH22K para la transformación en <i>Pichia pastoris</i>	24
2.3.2.2	Transformación de <i>Pichia pastoris</i> mediante la técnica de esferoplastos	24

2.3.2.3	Verificación de la integración por PCR	27
2.3.3	Selección de la cepa sobreproductora	29
2.3.3.1	Tamizaje con G418	29
2.3.3.2	Estimación semicuantitativa del número de copias por PCR	30
2.3.3.3	Ensayos de fermentación	33
2.3.3.4	Análisis de las proteínas del medio de cultivo por Bradford y SDS-PAGE	34
2.4	Sistemas de purificación	36
2.4.1	Precipitación con sulfato de amonio	36
2.4.2	Cromatografía de intercambio iónico	37

CAPÍTULO 3

RESULTADOS		39
3.1	Construcción del vector pPIC9KhGH22K	39
3.1.1	Caracterización de los vectores pPIC9K y pPIC9hGH22K	39
3.1.2	Transformación de bacterias calcio-competentes con la reacción de ligación, obtención del ADN y caracterización	39
3.2	Construcción de la cepa recombinante de <i>Pichia pastoris</i>	45
3.2.1	Transformantes de <i>Pichia pastoris</i> obtenidas mediante la técnica de esferoplastos	45
3.2.2	Verificación de la integración por PCR	46
3.3	Selección de la cepa sobreproductora	47
3.3.1	Tamizaje con G418.	47
3.3.2	Estimación semicuantitativa del número de copias por PCR	47
3.3.3	Evaluación de la producción de HGhr	48
3.3.4	Correlación del PCR y la producción de HGhr	50
3.4	Sistemas de purificación	52
3.4.1	Precipitación con sulfato de amonio	52
3.4.2	Cromatografía de intercambio iónico	54
3.4.2.1	Ensayo A	54
3.4.2.2	Ensayo B	56
3.4.2.3	Ensayo C	58

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE RESULTADOS		60
-------------------------	--	----

CAPÍTULO 5	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
CAPÍTULO 6	
REFERENCIAS	66
APÉNDICE A	
REACTIVOS	76
APÉNDICE B	
GRÁFICAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	84
APÉNDICE C	
RESULTADOS DEL TAMIZAJE CON G418	87
APÉNDICE D	
DATOS CROMATOGRÁFICOS	89
APÉNDICE E	
SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS	90
APÉNDICE F	
SECUENCIA AMINOACÍDICA DE HGH MADURA	96

TABLA 1	ALGUNAS PROTEÍNAS PRODUCIDAS EN <i>Pichia pastoris</i>	7
TABLA 2	REFERENCIAS SOBRE LA PRODUCCIÓN CON MULTICOPIAS EN <i>Pichia pastoris</i>	11
TABLA 3	RESULTADOS DE LA TRANSFORMACIÓN DE LAS BACTERIAS CALCIO-COMPETENTES, ASÍ COMO EL NÚMERO DE COLONIAS OBTENIDAS EN CADA EXPERIMENTO.	39
TABLA 4	PATRONES DE DIGESTIÓN EMPLEADOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pPIC9K, pPIC9KhGH22K Y pPIC9hGH22K.....	40
TABLA 5	ANÁLISIS LA PRODUCCIÓN DE HGHr EN LAS CEPAS GS115hGH22KG418-1, GS115hGH22KG418-19, GS115hGH22KG418-76 y GS115hGH22K-UNICOPIA DE <i>Pichia pastoris</i> , ASÍ COMO EL ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO POR PCR.....	48
TABLA 6	RESULTADOS DE LA PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO.	52

Figura 1.	Modelo tridimensional de la hormona del crecimiento porcino.....	1
Figura 2.	Esquema del metabolismo del metanol.....	8
Figura 3.	Plásmido pPIC9K.....	12
Figura 4.	Representación de la estrategia general planteada para cumplir con los objetivos del presente trabajo.....	18
Figura 5.	Estrategia efectuada para la construcción del vector pPIC9KhGH22K.....	21
Figura 6.	Proceso seguido para obtener un 70 % de formación de esferoplastos, empleando la cepa GS115 de <i>Pichia pastoris</i>	25
Figura 7.	Verificación de genotipos de las transformantes de <i>Pichia pastoris</i> mediante PCR.....	28
Figura 8.	Tamizaje con G418 de la cepas de <i>Pichia pastoris</i> obtenidas.....	30
Figura 9.	Secuencia de pasos requeridos para el análisis de los geles en el sistema Gel Doc de Bio Rad.	33
Figura 10.	Secuencia que se sigue para el análisis de los geles en el sistema Gel Doc de Bio Rad.	35
Figura 11.	Esquema general de la purificación de HGhr.....	36
Figura 12.	Gel de agarosa al 0.6 % de los ADNs plasmídicos de las 36 colonias de <i>Escherichia coli</i> XL1- Blue, provenientes de la transformación con la reacción de ligación.....	41
Figura 13.	Gel de agarosa al 1 % de la caracterización enzimática con <i>Bgl II</i> de los ADN plasmídicos.	42
Figura 14.	Gel de agarosa al 1 % de la caracterización de los plásmidos pPIC9K, pPIC9KhGH22K y pPIC9hGH22K.....	43
Figura 15.	Gel de agarosa al 1 % de la caracterización de los plásmidos pPIC9K, pPIC9KhGH22K y pPIC9hGH22K.....	44
Figura 16.	Gráfica de la cinética de formación de esferoplastos.....	45

Figura 17.	Gel de agarosa al 1 % para la verificación de la integración del cassette de expresión por PCR de cepas transformantes de <i>Pichia pastoris</i>	46
Figura 18.	Gel de agarosa al 1 % del PCR semicuantitativo.	48
Figura 19.	Gel SDS-PAGE de los medios de cultivo dializados y concentrados al vacío provenientes de las cepas unicopia, 1, 19 y 76.....	49
Figura 20.	Densitograma del perfil de pureza de HGHR correspondiente a la cepa GS115hGH22KG418-1	50
Figura 21.	Gráfica del incremento en la producción de HGHR vs el cociente de las intensidades de las bandas 1060/2200 del PCR.....	51
Figura 22.	Gráfica del porcentaje relativo de HGHR de las cepas construidas (1, 19 y 76) respecto a la cepa unicopia (u).	51
Figura 23.	Gel SDS-PAGE en el que se evaluó la precipitación con sulfato de amonio.	53
Figura 24.	Gráfica de los resultados de la evaluación de la precipitación con sulfato de amonio por SDS-PAGE.	53
Figura 25.	Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico A, así como las fracciones recolectadas.	54
Figura 26.	Gel SDS-PAGE de las 5 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico A.....	55
Figura 27.	Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm ² para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico A.....	55
Figura 28.	Representación del porcentaje de HGHR presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico A.....	55
Figura 29.	Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico B, así como las fracciones recolectadas.	56
Figura 30.	Gel SDS-PAGE de las 10 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico B.....	57
Figura 31.	Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm ² para cada fracción recolectada en el	

	ensayo cromatográfico B, en las que se detecta HGhr mediante SDS-PAGE.....	57
Figura 32.	Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico B.....	57
Figura 33.	Gráfica que representa los cromatogramas registrados a 215 y 280 nm, el gradiente de NaCl empleado en el ensayo cromatográfico C, la velocidad del flujo de fase móvil, así como las fracciones recolectadas.	58
Figura 34.	Gel SDS-PAGE de las 12 fracciones recolectadas en el ensayo cromatográfico C.	59
Figura 35.	Gráfica de las intensidades de las bandas del SDS-PAGE en cuentas X mm ² para cada fracción recolectada en el ensayo cromatográfico C, en las que se detecta HGhr mediante SDS-PAGE.....	59
Figura 36.	Representación del porcentaje de HGhr presente en cada fracción así como el % de recuperación en el ensayo cromatográfico C.....	59

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucléico
ADNc	ADN complementario
AOX 1	Alcohol Oxidasa 1
BMG	Medio mínimo amortiguado con glicerol
BMM	Medio mínimo amortiguado con metanol
°C	Grados centígrados
C.I.A.	Cromatografía de Intercambio Aniónico
CaS	CaCl-Sorbitol
CaT	Tris-HCl-CaCl ₂
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad óptica
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
G418	Geneticina
h	horas
HGHr	Hormona del crecimiento humana recombinante (la proteína)
hGH	Gen de la Hormona del crecimiento humana recombinante
His ⁺	Histidina ⁺ . Capaz de crecer en medio deficiente de histidina
<i>HIS4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
<i>His4</i>	Deficiente del gen <i>HIS4</i>
Kan	Kanamicina
kDa	Kilodaltones
LB	Luria-Bertani, medio líquido
M	Molar
μl	Microlitros
min	min
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEG	Polietilenglicol
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RDB	Medio de regeneración dextrosa

RDBH	Medio de regeneración dextrosa-histidina
SCE	Sorbitol-Citrato de sodio-EDTA
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida denaturalizante
SE	Sorbitol-EDTA
SED	Sorbitol-EDTA-Ditiotreitol
Seg	Segundos
SOS	Sorbitol-YPD-CaCl ₂
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-HCl
TT	Terminador de la transcripción
UV	Ultravioleta
V	Volts
Vis	Visible
X g	No. de veces la fuerza gravitacional
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de extracto de levadura y peptona

RESUMEN

Celia Nohemí Sánchez Domínguez
1998

Fecha de Graduación: Noviembre,

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: Construcción de cepas de *Pichia pastoris* productoras de Hormona del Crecimiento Humana Recombinante y evaluación de esquemas de purificación.

Número de páginas: 96

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

Area de Estudio: Biotecnología

Propósito y Método del Estudio: La hormona del crecimiento humana (HGH) es un péptido globular de cadena única de 191 aminoácidos unidos por dos puentes disulfuro, su masa molecular aproximada es de 22 kDa y no posee residuos de azúcares. La HGH es necesaria para el crecimiento postnatal y para el metabolismo normal de carbohidratos, lípidos, nitrógeno y minerales. Se dice que sus efectos son anabólicos, diabetogénicos y lipolíticos, actuando a través de mecanismos directos e indirectos. Escamilla en 1996 realizó la construcción de un vector portador del DNAc de HGH con el que obtuvo cepas recombinantes de *Pichia pastoris* productoras y secretoras de HGHr madura alcanzando un 82% de las proteínas totales secretadas al medio de cultivo (equivalente a 12 mg/L).

El objetivo del presente estudio fue construir cepas de *Pichia pastoris* conteniendo más de una copia del ADNc de HGH integrado en el genoma de la levadura, capaces de producir y secretar HGHr con mejores niveles de producción que la cepa previamente construída y evaluar esquemas de purificación para el mismo producto recombinante.

Se obtuvieron clones de *E. coli* conteniendo el vector construído (pPIC9KhGH22K). Posteriormente se construyeron cepas recombinantes de *P. pastoris* (cepa GS115) mediante su transformación por la técnica de esferoplastos con el vector recombinante pPIC9KhGH22K linearizado con *Sac I*. Después de verificar la integración del cassette de expresión por PCR, se seleccionaron las cepas con más de una copia del cassette de expresión por tamizaje con el antibiótico G418. Se ensayó la producción de HGHr en el medio de cultivo en fermentaciones a nivel matraz empleando las cepas de *Pichia pastoris* GS115hGH22KG418-1, GS115hGH22KG418-19 y GS115hGH22KG418-76, con una sobreproducción del 44, 22 y 25 % respectivamente, respecto a la cepa GS115hGH22K-unicopia previamente construída. El PCR semicuantitativo de dichas cepas mostró que el cociente de las intensidades de las bandas de 1060/2200 es mayor en las cepas construídas que en la cepa unicopia, sugiriendo la presencia de más de una copia integrada del cassette de expresión. La evaluación de la producción de HGHr mostró que la cepa GS115hGH22KG418-1 presentó mayores niveles de producción. Al evaluar los esquemas de purificación, no se obtuvo precipitación selectiva con sulfato de amonio al 20 % de saturación ni buena recuperación en las condiciones trabajadas. Es necesario evaluar las variables involucradas en el proceso. Aunque no se lograron obtener buenos resultados con la cromatografía de intercambio aniónico, el primero de los tres ensayos efectuados sugiere que puede ser una buena opción para purificar HGHr, sin embargo se requiere optimar las condiciones experimentales.

Contribuciones y Conclusiones: Se logró la construcción de una cepa de *Pichia pastoris* sobreproductora de HGHr, obteniendo hasta un 44% de sobreproducción que la cepa de *Pichia pastoris* previamente construída. El PCR semicuantitativo permitió estudiar la relación de las intensidades de las bandas de 1060 y 2200 pb. Se logró implementar en el laboratorio la técnica de esferoplastos como opción para la transformación de *Pichia pastoris*, así como la técnica de tamizaje con G418 para la selección de posibles cepas multicopias. No se obtuvo precipitación selectiva con sulfato de amonio al 20 % de saturación ni buena recuperación en las condiciones trabajadas, y aunque los resultados de la cromatografía de intercambio aniónico no fueron satisfactorios, sugieren que puede ser una buena opción para purificar HGHr, sin embargo se requiere optimar las condiciones.

FIRMA DEL ASESOR:

