

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



CONSTRUCCION DE CEPAS DE *Pichia pastoris*
PORTADORAS DEL DNA_c DE LA HORMONA
DEL CRECIMIENTO BOVINO

POR

BIOLOGO HUGO LEONID GALLARDO BLANCO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

MARZO, 1999

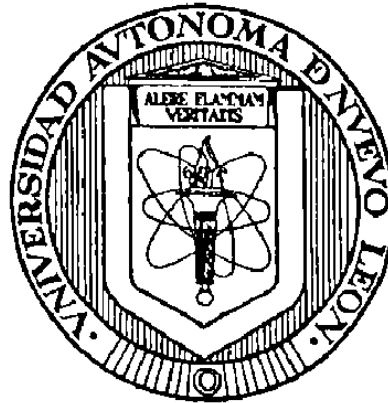
TM
QH445
G3
c.1



1080085700

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pichia pastoris*
PORTADORAS DEL DNAc DE LA HORMONA
DEL CRECIMIENTO BOVINO**

Por

Biólogo Hugo Leonid Gallardo Blanco

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

Marzo, 1999



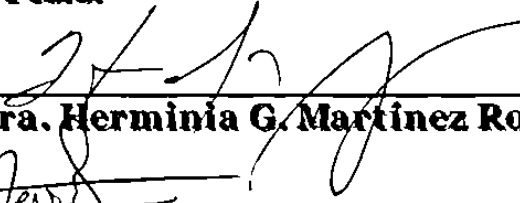

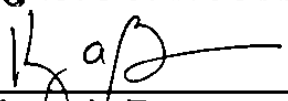
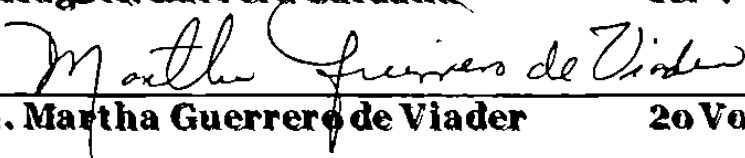

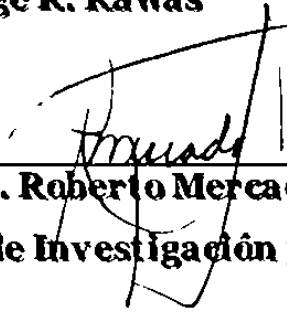
R n of
52

MAESTRIA

**CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pichia pastoris*
PORTADORAS DEL DNA_c DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO BOVINO**

**Por
Hugo Leonid Gallardo Blanco
Biólogo**

Aprobación de Tesis:

		
	Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez	Presidente
		
	Dr. Agnes Revol de Mendoza	Secretario
Asesor		
	Dr. Hugo A. Barrera Saldaña	1er Vocal
		
Coasesora	Dra. Martha Guerrero de Viader	2o Vocal
		
	Dr. Jorge R. Kawas	3er Vocal
		
	Dr. Roberto Mercado Longoria	Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo titulado “Construcción de Cepas de *Pichia pastoris* Portadoras del DNAC de la Hormona del Crecimiento Bovino” fue llevado a cabo por el Biólogo Hugo Leonid Gallardo Blanco 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 U.A.N.L., con la Asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y la Co-asesoría de la Dra. Martha Guerrero de Viader.

AGRADECIMIENTOS

A Carmen, Ana Laura, Claudio, Mario y Celia por ser buenos compañeros de maestría.

A los doctores Hugo A. Barrera Saldaña, Agnés Revol de Mendoza y Herminia G. Martínez Rodríguez, por su ayuda.

A la Dra. Martha Guerrero de Viader

A todo el excelente Personal del Departamento de Bioquímica.

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

DEDICATORIA

A mis padres por su confianza, apoyo y amor; Elvira Blanco Flores y Hugo Gallardo G. y a mi hermana Diana C. Gallardo B.

A mi esposa Celia Nohemí y a nuestra hija Karla Itzel, ustedes son la fuerza que me permite seguir adelante y dar todo mi esfuerzo, en el trabajo y en la familia.

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1	Las Hormonas del Crecimiento.....	1
1.2	La <i>BGHR</i> : su Función Biológica y su uso en la Ganadería.....	2
1.2.1	Controversias sobre el uso de <i>BGHR</i> :	6
1.2.2	Características Moleculares de la <i>BGH</i> :	7
1.2.3	Producción de <i>PGH</i> , <i>OGH</i> y <i>BGH</i> Recombinantes (r) en <i>E. coli</i>	9
1.2.3.1	Expresión en <i>E. coli</i> :	9
1.2.3.2	Producción de <i>BGHR</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Streptomyces lividans</i>	11
1.3	<i>Pichia pastoris</i> como Hospedero Biotecnológico.....	11
1.3.1	Ventajas de las Levaduras.	11
1.3.2	Levaduras Metilotróficas.....	12
1.3.3	Producción de Proteínas Recombinantes en <i>Pichia pastoris</i> :	14
1.3.4	Introducción de Genes Extraños en <i>Pichia pastoris</i> :.....	16
1.3.5	Los Plásmidos pPIC9 y pPIC9K:.....	17
1.3.6	Integración del Cassette de Expresión al Genoma de <i>P. pastoris</i>	21
1.3.6.1	Inserción Génica en <i>AOX1</i> :.....	21
1.3.6.2	Inserción Génica en <i>his4</i> :	22
1.3.6.3	Reemplazamiento Génico en <i>AOX1</i> :	23
1.3.7	El Procesamiento de la <i>Secuencia Señal</i> en <i>P. pastoris</i> :	24
1.4	¿Es <i>Pichia pastoris</i> una Panacea?.....	25
1.5	Producción de <i>GHS</i> en Nuestro Laboratorio.....	28
1.6	Justificación:	28
1.7	Objetivo General:.....	29
1.7.1	Objetivos Específicos:.....	29

CAPITULO 2	30
MATERIAL Y MÉTODOS	30
2.1	Área de Trabajo, Reactivos y Material Biológico.....	30
2.2	Equipo.....	31
2.3	Métodos.....	32
2.3.1	Primera Fase.	34
2.3.1.1	Amplificación: <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	35
2.3.1.2	Clonación.....	38
2.3.1.3	Inactivación de Enzimas.....	40
2.3.1.4	Transformación.	41
2.3.1.5	Minipreparaciones.....	42
2.3.1.6	Caracterización Enzimática.....	43
2.3.1.7	Secuenciación.....	43
2.3.1.8	Purificación de Fragmentos de <i>DNA</i> con Fibra de Vidrio Siliconizada.....	44
2.3.1.9	Transferencia del <i>DNA</i> de <i>bGH</i> al Vector pPIC9K (Ligación de dos Fragmentos).....	45
2.3.1.10	Transferencia y Reparación del <i>DNA</i> de <i>bGH</i> en el Vector pPIC9K (Ligación de Tres Fragmentos).....	45
2.3.2	Segunda Fase:.....	47
2.3.2.1	Electroporación.	47
2.3.2.2	Tamizaje de Multicopias.....	49
2.3.2.3	<i>PCR</i> Analítico.....	51
2.3.2.4	Fermentaciones.....	53
2.3.2.5	Diálisis del Medio de las Fermentaciones.....	54
2.3.2.6	Lisis celular.	54
2.3.2.7	Geles de Poliacrilamida SDS-PAGE.....	55
CAPÍTULO 3	57

RESULTADOS	57
3.1	Primera Fase.....	57
3.1.1	Oligonucleótidos Diseñados para Amplificar <i>bGH</i> por <i>PCR</i>	57
3.1.2	Condiciones Establecidas para la <i>PCR</i>	58
3.1.3	Clonación del <i>DNAc de bGH</i> en el Vector pPIC9.....	59
3.1.4	Caracterización Enzimática de las Clonas pPIC9bGH.	60
3.1.5	Secuenciación de las Clonas.....	61
3.1.6	Transferencia y Reparación del <i>DNAc de bGH</i> en pPIC9K.....	62
3.2	Segunda Fase.....	64
3.2.1	Transformación de <i>P. pastoris</i> con la Técnica de Electroporación.....	64
3.2.2	Estandarización del <i>PCR Semicuantitativo</i> para <i>Pichia pastoris</i>	65
3.2.3	Confirmación de la Integración del Vector pPIC9KbGH en GS115 por <i>PCR</i>	67
3.2.4	Tamizaje de Clonas Multicopias en G418.....	68
3.2.5	Ensayos de Fermentación.....	69
3.3	Tercera Fase.....	70
3.3.1	Análisis del Medio de Cultivo.....	70
3.3.2	Análisis de los Lisados Celulares.	71
3.3.3	Cinéticas de Crecimiento.....	72
3.3.4	Re-verificación de la Secuencia de las Clonas pPIC9KbGH.	73
CAPÍTULO 4	76
DISCUSIÓN	76
4.1	Construcción de los Vectores pPIC9bGHTaq y pPIC9kbGH-02:	76
4.1.1	El Vector de Integración pPIC9bGHTaq:	76
4.1.1.1	Notas Sobre los Problemas por el uso de la <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa</i> en la Construcción del Vector de Expresión.....	76
4.1.2	El Vector de Integración pPIC9kbGH-02:	78

CAPÍTULO 5	80
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
CAPÍTULO 6	82
REFERENCIAS	82
APÉNDICE A	Ontogenia de los Vectores Construidos.	88
APÉNDICE B	Mapas Gráficos de los Vectores Construidos; pPIC9bGHTaq y pPIC9KbGH-02.....	89
APÉNDICE C	Secuencia del <i>RNA_m</i> Teórico Producto del Cassette de Expresión pPIC9bGHTaq y pPIC9kbGH-02.	90
APÉNDICE D	Secuencia Codificante de <i>HIV-1 gp120</i> que Emula la Señal de Terminación de la Transcripción en <i>P. pastoris</i>.....	91
APÉNDICE E	Hidrofobicidad de los Sitios de Corte para KEX2.....	92
APÉNDICE F	Características Generales de las Secuencias Señal:.....	94
APÉNDICE G	Preparación de Reactivos y Medios	95

Lista de Figuras

	Página
<p>FIGURA 1. Representación gráfica del modelo tridimensional hipotético de la BGH. La estructura tridimensional de BGH fue deducida por comparación con la PGH y con la isoforma de 22 kDa HGH, considerando los cambios aminoacídicos presentes en la BGH (Carlacci <i>et al.</i>, 1991).</p>	8
<p>FIGURA 2. Vía metabólica para la oxidación del metanol en dióxido de carbono y agua en levaduras metilotróficas. Las enzimas involucradas se representan con números romanos y los compuestos presentes en las reacciones se representan con abreviaciones (Ellis <i>et al.</i>, 1985).</p>	13
<p>FIGURA 3. Representación esquemática de los elementos constituyentes del vector de integración pPIC9: Dichos elementos incluyen a los de origen eucariótico (de la levadura) como en el caso del promotor y terminador de la transcripción del gen AOX1 de <i>P. pastoris</i> (regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 TT, respectivamente), región 3' del mismo gen (3'AOX1), gen de la <i>histidinol deshidrogenasa</i> (HIS4) de <i>P. pastoris</i> y secuencia señal del factor alfa de <i>S. cerevisiae</i> (SS). También contiene secuencias de origen bacteriano, necesarias para propagación del plásmido en <i>Escherichia coli</i> tales como el gen de <i>resistencia a ampicilina</i> (<i>amp^r</i>) y el origen de replicación (<i>ColE1</i>). Además, incluye un sitio múltiple de clonación (SMC), precedido de la secuencia señal para propiciar la secreción de la proteína recombinante de interés (Invitrogen, 1994).</p>	18
<p>FIGURA 4. Representación esquemática de los elementos constituyentes del vector de integración pPIC9K: Este plásmido es empleado para la producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i> y selección de clones con múltiples integraciones del cassette de expresión de acuerdo al nivel de resistencia a G418 (geneticina). Además de los elementos ya descritos para pPIC9 en la FIGURA 3, este otro plásmido también incluye al gen de <i>resistencia a kanamicina</i> (<i>Kan^r</i>) que confiere resistencia a kanamicina en <i>E. coli</i> y a G418 en <i>Pichia</i> (Invitrogen, 1996).</p>	19
<p>FIGURA 5. La inserción génica en AOX1 es originada por un evento de entrecruzamiento simple entre el locus AOX1 del genoma y las regiones AOX1 del vector.</p>	22
<p>FIGURA 6. La inserción génica en <i>his4</i> es originada por un evento de entrecruzamiento simple entre el locus <i>his4</i> del genoma y el gen HIS4 del vector.</p>	23

- FIGURA 7.** El reemplazamiento génico. Este se lleva a cabo en AOX1, mediante un doble entrecruzamiento entre las regiones 5'AOX1 y 3'AOX1 del vector con el genoma de la levadura. 24
- FIGURA 8.** Representación esquemática de la fase I. Construcción del vector de integración pPIC9KbGH. 33
- FIGURA 9.** Representación esquemática de la fase II. Construcción de clonas de *Pichia pastoris* portadoras de múltiples copias del cassette de expresión de la bGH. 34
- FIGURA 10.** Representación del procedimiento experimental para el diseño de los oligonucleótidos. 35
- FIGURA 11. Mutagénesis sitio-dirigida por PCR.** El esquema ilustra los ciclos de la PCR: desnaturalización, apareamiento y extensión. Inicialmente los oligonucleótidos 5' y 3' no son totalmente complementarios a la secuencia blanco, pero después de varios ciclos de extensión se originan productos amplificados con la secuencia de los oligonucleótidos mutagénicos. 36
- FIGURA 12.** Estrategia de clonación en pPIC9. Mediante el reemplazo del cassette de expresión para *HGHr* presente en el vector pPIC9hGH22K, se clonó el producto amplificado correspondiente al *DNAc de bGH*, el cual fue amplificado a partir del inserto de p63 (Amaya F 1988). Los sitios de clonación usados fueron *Xho I* y *Avr II*, con los cuales se reemplazó el *DNAc de HGH* por el de *BGH*. 39
- FIGURA 13.** Esquema de preparación de los fragmentos de *DNA* a ligar, para la construcción del vector pPIC9bGH. Se indican los pasos, reactivos y condiciones empleadas en la construcción del vector de expresión de la *BGHr*. 40
- FIGURA 14.** Transferencia del *DNAc de bGH* al vector pPIC9K (ligación de dos fragmentos). Aquí se muestra la clonación que fue inicialmente diseñada, en la cual a partir de los vectores pPIC9K y pPIC9bGH se construiría el vector pPIC9KbGH, las enzimas involucradas en la clonación son *Sac I* y *Avr II*. 45
- FIGURA 15.** Transferencia y reparación del *DNAc de bGH* en el vector pPIC9K (ligación de tres fragmentos). Aquí se muestra la clonación que se diseñó posteriormente para transferir y reparar el *DNAc de bGH* en pPIC9K, en la cual a partir de los vectores pPIC9K, pPIC9bGH y pMALcbGH se construiría el vector pPIC9KbGH, las enzimas involucradas en la clonación son *Sac I*, *Apa I*, *Avr II* y *Xba I*. 46

- FIGURA 16.** Diagrama de flujo para la fermentación en matraces de 250 ml y su posterior análisis. El estudio abarca desde la propagación de la clona a partir de una caja de petri, hasta el análisis del lisado celular en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. 53
- FIGURA 17.** A) Regiones donde se aparean los oligonucleótidos 5' y 3' en el *DNAc de bGH*. B) Cambios introducidos por los iniciadores durante la *PCR* en el producto amplificado. El oligonucleótido 5' tiene una longitud de 35 nucleótidos de los cuales solo se aparean 25 nucleótidos; el oligonucleótido 3' tiene una longitud de 23 nucleótidos de los cuales 17 se aparean con el *DNAc de bGH*. 58
- FIGURA 18.** Caracterización enzimática con *Bgl* II de algunas de las clonas recombinantes obtenidas. Carril 1) pPIC9hGH22K; 2) Clona 9; 3) Clona 10; 4) Clona 12; 5) Clona 14; 6) Clona 15; 7) Clona 20; 8) Clona 21. Con las flechas se indican las clonas con el *DNAc de bGH*. 60
- FIGURA 19.** Representación del área secuenciada en las clonas, con el uso de los oligonucleótidos 5'*AOX1*, 3'*AOX1*, oligo interno y oligo interno reverso. Con cada oligonucleótido usado para secuenciar se lograron leer hasta 300 nucleótidos del *DNAc de bGH*, incluida gran parte de los extremos no traducibles 5'*AOX1* y 3'*AOX1*. 61
- FIGURA 20.** Autorradiografía de gel de secuenciación. Se muestra una clona con la secuencia normal en esta región (clona 14) y una con una mutación silenciosa (clona 20). 62
- FIGURA 21.** Esquema en donde se ubican las mutaciones encontradas en las clonas 9, 14, 51 y 20. Al encontrarse que la clona 20 presenta solo dos mutaciones, una de ellas silenciosa, se planteó reparar el área con la mutación en el nucleótido 1655, y clonar a la vez el *DNAc de bGH* en pPIC9K. 63
- FIGURA 22.** Autorradiografía de dos clonas reparadas pPIC9kbGH. la porción del gel de secuenciación aquí incluido, muestra la secuencia nucleotídica de dos clonas distintas de pPIC9KbGH en la región reemplazada con la región 3' del *DNAc de bGH* proveniente del vector pMALcbGH. La mutación presentada por la clona 20 fue reemplazada por la secuencia que se ilustra en las clonas 1 y 5 (secuencia complementaria). 64
- FIGURA 23.** Condiciones en las cuales se realizó la electroporación de la cepa GS115. Se incluyeron un control de presencia de contaminación (TE) y tres *DNAs* distintos. 65
- FIGURA 24.** Condiciones de reacción fijadas por Escamilla en 1995. Se muestra el primer factor que se modificó en esta tesis: la concentración de la *DNA polimerasa Taq*. 66

- FIGURA 25.** Programas de amplificación usados en este trabajo. El programa **A** es el inicial. Los programas **B** y **C** fueron los utilizados para ajustar el cociente de la intensidad de las bandas producto de la amplificación; es decir, para hacer la *PCR* lo mas semicuantitativo posible. 66
- FIGURA 26.** Optimización de la *PCR*. Las variables involucradas en los 8 experimentos de *PCR* realizados fueron: la concentración del *DNA*, la presencia o ausencia de *DMSO* y el tiempo de extensión. 66
- FIGURA 27.** Gráfica donde se ilustra la intensidad y proporción de los productos amplificados para cada ensayo. El cociente resultante de los productos amplificados de cada ensayo fue 1.193 para el ensayo 1; 1.923 para el 2; 0.000 para el 3; 1.824 para el 4; 2.477 para el 5; 1.700 para el 6; 0.309 para el 7; 1.373 para el 8. El ensayo #1 presentó el cociente mas cercano a 1, pero la intensidad del producto amplificado es muy baja. El ensayo 8 presentó un cociente de 1.4 y una intensidad de producto amplificado aceptable. 67
- FIGURA 28.** **A)** Ilustración de los sitios donde se aparean los oligonucleótidos en el genoma de *GS115* (**a**), **b**) Amplicón de 2105 pb, **c**) Amplicón de 1042 pb, **d**) Oligonucleótido 5'*AOX1*, **e**) Oligonucleótido 3'*AOX1*. **B)** Detección del vector *pPIC9KbGH* integrado al genoma de las clonas seleccionadas; **1**) clona *pPIC9hGH22k*, **(-)** control de contaminación, *GS115* cepa de *P. pastoris* y las siguientes son clonas *GS115* del vector *pPIC9bGH*, **2**) A3, **3**) A7, **4**) A11, **5**) A12, **6**) B2, **7**) B5 y **8**) B7. La reacción de amplificación se realizó con las condiciones del método 2 de amplificación establecido. 68
- FIGURA 29.** Análisis del medio de cultivo fermentado (144 h). Carriles 1), 2) y 3) corresponden a medios de cultivo de clonas *pPIC9khGH22k-GS115* resistentes a concentraciones de geneticina mayores a 25 mg/mL; **M**) marcador de peso molecular; **5**) clona *pPIC9K-GS115*; **6**), **7**) y **8**) clonas *pPIC9KbGH-GS115* resistentes a concentraciones de geneticina mayores a 0.25 mg/mL. Las fermentaciones se realizaron en medio *BMG* pH 6.0 (16 h) en la etapa inicial de fermentación y *BMM* pH 6.0 (144 h) en la inducción con metanol (0.75% de metanol cada 24 h). 69
- FIGURA 30.** Análisis proteico de lisados celulares de tres clonas *pPIC9KbGH-GS115*. Se logró determinar la presencia de la banda presumiblemente correspondiente a la proteína *pre-BGH* de 30.6 kDa y una banda a la altura aproximada a 22 kDa. 71
- FIGURA 31.** Lisados celulares de tres clonas *pPIC9KbGH-GS115* inducidas y sin inducir, en donde aparentemente aparece la banda correspondiente a *BGHr*, en la clona *pPIC9KbGH-GS115* inducida, y no en la clona *pPIC9KbGH-GS115* no inducida, al igual que en la clona *pPIC9hGH22K*. Dicha banda no se detectó en *pPIC9K-GS115*, pero no se pudo establecer si correspondía a la *BGHr* intracelular. 72

- FIGURA 32.** Cinética de crecimiento de las clonas inducidas (BMM) y sin inducir (BMG) pPIC9K-GS115 (9K), pPIC9hGH22K-GS115 (LL), pPIC9KbGH-GS115 (3A). Las determinaciones de la densidad óptica se realizaron cada 24 h. 73
- FIGURA 33.** Autorradiografía de gel de secuenciación en donde se muestra la secuencia de dos clonas pPIC9kbGH con la delección de las dos citosinas antes del codón de terminación. Como la mutación está presente en dos clonas, se concluyó que la delección proviene del vector pMALcbGH (Martinez, 1994). 74
- FIGURA 34.** Comparación de los codones de la *BGH nativa* y la *BGHr* con la delección de las dos citosinas antes del codón de terminación. 75

Lista de Tablas

		Página
TABLA 1.	EFFECTO DE LA <i>BGH</i> EN LA FISIOLOGIA Y TEJIDOS ESPECIFICOS DE BOVINOS LACTANDO.	3
TABLA 2.	INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y AUMENTO EN LA EFICIENCIA ALIMENTICIA EN GANADO VACUNO LECHERO TRATADO CON <i>BGHr</i> .	5
TABLA 3.	PROTEINAS DE ORIGEN RECOMBINANTE PRODUCIDAS EN <i>Pichia pastoris</i>	15
TABLA 4.	PRODUCCION PROTEICA DE CLONAS DE <i>Pichia pastoris</i> MULTICOPIA DEL CASSETTE DE EXPRESION.	16
TABLA 5.	CARACTERISTICAS, DESCRIPCION Y FUNCION DE LOS ELEMENTOS CONSTITUYENTES DE LOS VECTORES DE INTEGRACION pPIC9 Y pPIC9K.	20
TABLA 6.	FACTORES QUE AFECTAN LA SINTESIS Y SECRECION DE PROTEINAS HETEROLOGAS (RECOMBINANTES) EN <i>Pichia pastoris</i> .	26
TABLA 7.	CONDICIONES DE LA REACCIÓN DONDE SE PROBARON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Mg ⁺⁺ PARA OPTIMIZAR LA PRODUCCIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO.	37
TABLA 8.	CONDICIONES DE AMPLIFICACION.	38
TABLA 9.	CALCULO DE FRAGMENTOS PRODUCIDOS POR DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCION PARA VECTORES pPIC9.	43
TABLA 10.	CALCULO DE FRAGMENTOS PRODUCIDOS POR DIGESTION CON ENDONUCLEASA DE RESTRICCION PARA VECTORES pPIC9K.	43
TABLA 11.	CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA LA OBTENCION DE LOS FRAGMENTOS REQUERIDOS PARA LA CLONACION EN pPIC9K.	46
TABLA 12.	CONDICIONES ESTABLECIDAS PARA LA REACCION DE LIGACION DE TRES FRAGMENTOS (CONSTRUCCION DEL VECTOR pPIC9kbGH).	47
TABLA 13.	CONDICIONES DE REACCION DEL METODO 1.	51
TABLA 14.	CONDICIONES DE REACCION DEL METODO 2.	52
TABLA 15.	PROGRAMAS DE AMPLIFICACION DEL METODO 1 Y METODO 2.	52

TABLA 16	REACTIVOS Y CONCENTRACIONES REQUERIDAS PARA EL GEL SEPARADOR.	55
TABLA 17.	REACTIVOS Y CONCENTRACIONES REQUERIDAS PARA EL GEL CONCENTRADOR.	55
TABLA 18.	CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE LIGACIÓN PARA OBTENER EL VECTOR pPIC9bGHTaq.	59
TABLA 19.	NÚMERO DE CLONAS RESISTENTES A CUATRO CONCENTRACIONES DE GENETICINA.	68
TABLA 20.	ERROR PROMEDIO DE LAS DNA POLIMERASAS TERMOESTABLES Pfu, <i>Deep Vent</i> , <i>Vent</i> , <i>Taq</i> Y <i>UITma</i> .	78

NOMENCLATURA

(exo-)	Carente de actividad exonucleasa (actividad correctora)
Agua MiliQ	Agua ultrapura
AOX1	Gen primario de la alcohol oxidasa
AOX2	Gen secundario de la alcohol oxidasa
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BGH	Hormona del crecimiento bovino
bGH	Gen o DNA complementario de la hormona del crecimiento bovino
BMG	Medio amortiguado y con glicerol
BMM	Medio amortiguado y con metanol
cm	Centímetro
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNAm
dNTP	Desoxinucleósido trifosfatado
DO	Densidad óptica
DO600nm	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
g	Fuerza de gravedad
G418	Geneticina
GHs	Hormonas del crecimiento
g	Gramo
h	Hora
HGH	Hormona del crecimiento humano
hGH	DNA complementario a la hormona del crecimiento humano
His ⁺	Clonas que poseen el gen HIS4
HIS4	Gen de la histidinol deshidrogenasa
his4	Gen disfuncional de la histidinol deshidrogenasa
IPTG	Isopropil b-tiogalactósido
Kb	Kilobases
kcal	Kilocalorias
kDa	Kilodaltones
Kv	Kilovoltio
L	Litro
LB	Caldo de cultivo Luria-Bertani
M	Molar
malE	Gen codificante para la proteína de unión a maltosa
MBP	Proteína de unión a maltosa
MD	Medio de cultivo mínimo y dextrosa
MD	Medio mínimo con dextrosa
MDH	Medio de cultivo mínimo, dextrosa e histidina
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
MM	Medio de cultivo mínimo y metanol
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MMH	Medio de cultivo mínimo, metanol e histidina
Mut ⁺	Mutante que posee el gen AOX1 funcional

Mut ^S	Mutante que no posee el gen AOX1 funcional
mV	Milivoltio
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nmol	Nanomolar
nuc.	Nucleótido
°C	Grados centígrados
OGH	Hormona del crecimiento ovino
oGH	DNA complementario o gen de la hormona del crecimiento ovino
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGH	Hormona del crecimiento porcino
pGH	DNA complementario o gen de la hormona del crecimiento porcino
pH	Potencial de Hidrógeno
pMALc	Vector de expresión de la proteína de unión a maltosa, en el espacio citosólico
pMALp	Vector de expresión de la proteína de unión a maltosa, en el espacio periplásmico
pM	Picomolar
pTAC	Promotor TAC
RDB	Medio de cultivo, biotina y dextrosa para regeneración celular
RDHB	Medio de cultivo, biotina, dextrosa e histidina para regeneración celular
RNA	Acido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _t	RNA de transferencia
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Dodecil sulfato de sodio (Lauril sulfato de sodio)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
s	Segundo
SS	Secuencia Señal
TBE	Amortiguador Tris-Boratos-EDTA
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TT	Terminador de la transcripción
u	unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltio
Vol	Volumen
X	Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo
X-gal	5-Bromo-4Cloro-3-Indolil-b-D galactopiranósido
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa

RESUMEN

Hugo Leonid Gallardo Blanco

Fecha de Graduación: Marzo, 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: **CONSTRUCCIÓN DE CEPAS DE *Pichia pastoris* PORTADORAS DEL DNAC DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO BOVINO**

Número de páginas: 97

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

Área de Estudio: Biotecnología

Propósito y Método del Estudio: La hormona del crecimiento bovino (BGH, también llamada somatotropina bovina o BST) es una proteína de 191 aminoácidos y 22 kDa de peso molecular. Su administración al ganado bovino incrementa la tasa de crecimiento, ganancia de peso y producción de carne y leche, sin riesgo para la salud de los consumidores. El objetivo del presente estudio fue construir clonas de *P. pastoris* que portaran el DNAC de la BGH y valorar su capacidad para producir ésta y secretarla al medio de cultivo. Se efectuó el diseño, síntesis y ensayo de oligonucleótidos que nos permitieron tanto amplificar por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) el DNAC de BGH, como modificar éste para facilitar su inserción en un vector de integración (pPIC9) para *P. pastoris*. Primeramente se obtuvieron clonas de *E. coli* conteniendo el vector construido (pPIC9bGH) y posteriormente se secuenciaron 6 de ellas, encontrándose mutaciones originadas por la PCR. Se seleccionó una clona con una mutación puntual y se le manipuló para reparar la mutación, lo que se corroboró por secuenciación nucleotídica. Mediante la transformación por electroporación de la cepa GS115 de *P. pastoris* con este nuevo plásmido reparado y linearizado, se obtuvieron clonas nuevas de la levadura, de las que se seleccionaron clonas multicopias. A éstas se les ensayó la producción de BGH en fermentaciones a nivel matraz. Al no detectar secreción de BGHr al medio de cultivo, se procedió al análisis del lisado intracelular, donde tampoco se pudo detectar la hormona. Posteriormente se revisó de nuevo y mas cuidadosamente la secuencia del DNAC de bGH integrado al genoma de la levadura, encontrándose una deleción de una pareja de citosinas, normalmente ubicadas dos codones antes del codon de terminación, cuyo origen se rastreó a uno de los plásmidos fuente del DNAC de bGH. Tal deleción ocasionó un corrimiento en el marco de lectura.

Contribuciones y Conclusiones: Las mutaciones encontradas no justifican la producción nula de la proteína recombinante. Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone: reamplificar y clonar el DNAC de bGH con una polimerasa de alta fidelidad, verificando nuevamente por secuenciación nucleotídica su integridad. Solo así se podrá proseguir con la construcción de nuevas clonas con las que a su vez podrá realizarse ensayos de fermentación en varias condiciones y con un número mayor de cepas, con el fin de comprobar la producción de BGHr. De existir una baja producción de BGHr, la posible hipótesis a corroborar sería que: las diferencias aminoacídicas y/o nucleotídicas en comparación con HGH (recientemente producida en nuestro laboratorio siguiendo una estrategia similar a la aquí intentada aunque sin emplear la PCR), son relevantes a nivel del sitio de corte proteolítico de la prehormona, la inestabilidad del RNAm de bGH y la traducción ineficiente de los codones característicos de bGH; pudiendo ser una de éstas, sus combinaciones, o incluso un factor no contemplado, la causa de tal expresión baja.


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
ASESOR


Dra. Martha Guerrero de Viader
COASESORA