

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

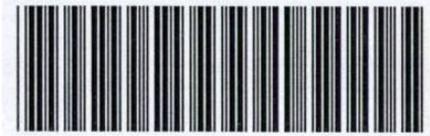


CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris*
SOBREPRODUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa
DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

Por
Q. B. P. EDDY LUZ CAB BARRERA

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

Octubre 2000



1080111679

24700

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris*
SOBREPRODUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa
DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO**

Por

Q. B. P. EDDY LUZ CAB BARRERA

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

Octubre, 2000

QIM
QH445

.C3

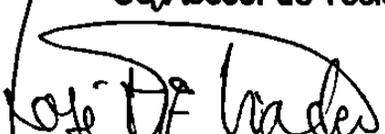


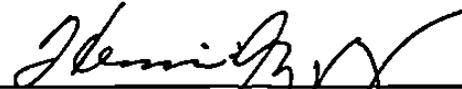
**CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris*
SOBREPRODUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa
DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO**

Aprobación de la Comisión de Tesis:


DRA. MARTHA GUERERO OLAZARAN
Asesor de Tesis


DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
Co-Asesor de Tesis


DR. JOSE MA. VIADER SALVADO
Comisión de Tesis


DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Comisión de Tesis


M.C. NORMA ESTHER GUERRA RODRIGUEZ
Comisión de Tesis


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



KI' IMAK IN WÓOL

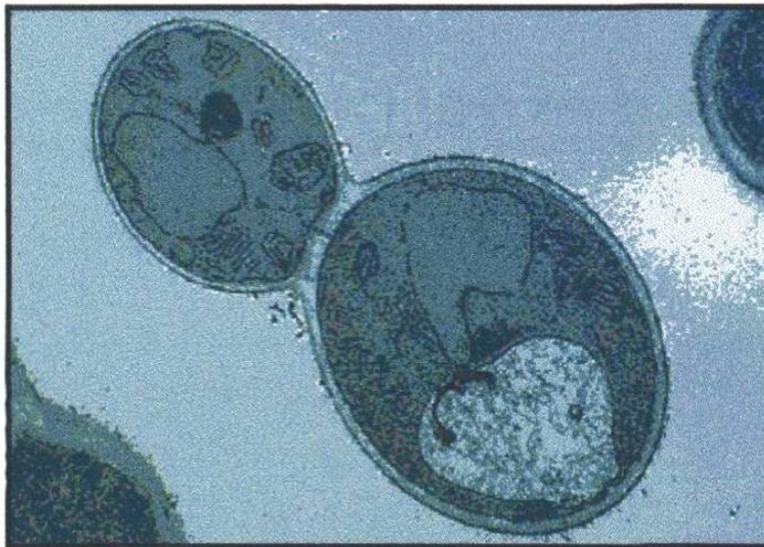
IN NÍIB-OOLAL

KÍ' ICHKELEM YUUM

MA' ALOB TUÚN

AREA DE TRABAJO

El presente trabajo titulado "CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris* SOBREPDUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO" se llevó a cabo 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., bajo la Asesoría de la Dra. Martha Guerrero Olazarán y la Co-asesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña.



Micrografía electrónica de una célula de *P. pastoris* en gemación (Cregg y Higgins, 1995).

La investigación científica consiste en ver lo que todos han visto, pero pensar lo que nadie más pensó.

Albert Szent-Gyorgyi

DEDICATORIA

A Dios por todo lo bello que me ha dado.

Con gran amor a mis padres, Elva Barrera de Cab y Raúl C. Cab Berzunza. Gracias por fomentar en mí ese espíritu de superación, por su apoyo incondicional, comprensión y palabras de aliento,

A mis GRANDES TESOROS, Ingrid, Karen y Jenni por ser el mejor regalo que me ha dado la vida, el motor que me impulsa a seguir adelante, mis mayores alegrías.

Especialmente a Jorge con quien comparto mi vida, sueños y metas. Gracias por tu comprensión, sin tu apoyo esto sería solo una idea.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Guerrero por su gran apoyo, su ejemplo de tenacidad y constancia para resolver los contratiempos y sobre todo su valiosa asesoría.

Al Dr. Hugo Barrera por darme la oportunidad de realizar una meta mas en mi vida, por su asesoría y por ser un ejemplo de constancia y trabajo.

Al Dr. José Ma. Viader por su gran disponibilidad y sus comentarios siempre tan acertados y oportunos.

A la Dra. Herminia Martínez y a la M. C. Norma Guerra por las correcciones y comentarios hechos a la tesis.

A la Dra. Agnès de Mendoza y a la M. C. Irma A. Martínez Dávila por el apoyo brindado en la secuenciación de DNAc de hGH 20 K.

A mis compañeros de laboratorio, Luis, Flor y Hugo, por compartir conmigo su experiencia y formar un equipo de trabajo.

A mis compañeros de generación, Flor, Maribel, Sandra, Dolores, Víctor, Mario y Fermín, por compartir una meta un sueño.

A Claudio, Martín y Andrés, por su invaluable ayuda en los programas computacionales.

A todos los integrantes de la U.L.I.E.G., quienes de una u otra manera contribuyeron a que este proyecto saliera adelante.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

RESUMEN

Q.B.P. Eddy Luz Cab Barrera

Fecha de Graduación Octubre, 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: CONSTRUCCION DE UNA CEPA DE *Pichia pastoris* SOBREPDUCTORA DE LA ISOFORMA DE 20 kDa DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO.

Número de páginas: 125

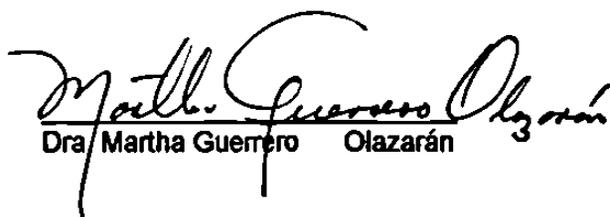
Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Area de Estudio: Biotecnología.

Propósito y Método de Estudio: La isoforma de 20 kDa (20K) de la hormona del crecimiento humano (HGH 20K), es la segunda hormona más abundante en la pituitaria, posee una cadena sencilla de 176 aminoácidos, y un peso molecular de 20,269 Da. A pesar de que las propiedades biológicas de la HGH de 20K han sido investigadas desde su descubrimiento en 1978, éstas son aún controversiales. Esto debido en buena parte a la dificultad de su preparación en cantidades y pureza suficientes. En el presente trabajo, empleando técnicas estándares de biología molecular, se construyó el plásmido pPIC9KhGH20K, conteniendo la secuencia completa del DNAC de hGH 20K, el cual fue utilizado para transformar la cepa GS115 de *Pichia pastoris* mediante la técnica de formación de esferoplastos. La integración por recombinación homóloga del plásmido en el genoma de la levadura fue verificada mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las clonas conteniendo multicopias del cassette de expresión fueron seleccionadas mediante la determinación de la cinética de su crecimiento a dosis crecientes del antibiótico G418 (geneticina). La identificación de la HGH recombinante (HGHR) de 20K secretada al medio de cultivo, se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PA-SDS). La amplificación por PCR de una banda de 1016 pb confirmó la integración del plásmido al genoma de la levadura. La identidad de HGHR de 20K fue confirmada por su peso molecular en geles de PA-SDS. Todas las clonas analizadas sintetizaron y secretaron al medio de cultivo la hormona. Se logró la selección de cepas de *P. pastoris* sobreproductoras de HGH 20K, presentando niveles máximos de producción de hasta 17.63 mg/L de cultivo representando el 51.6% de las proteínas totales de medio de cultivo.

Contribuciones y Conclusiones: En este trabajo se lograron obtener clonas recombinantes de *Pichia pastoris* sobreproductoras y secretoras de la forma madura de HGHR de 20K.

FIRMA DEL ASESOR:


Dra. Martha Guerrero Olazarán

FIRMA DEL CO-ASESOR

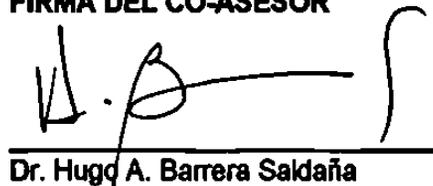

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION.....	1
1.1 <i>P. pastoris</i> : un nuevo hospedero biotecnológico	2
1.1.1 Vectores de expresión para <i>P. pastoris</i>	6
1.1.2 Integración del vector al genoma de <i>P. pastoris</i>	8
1.1.3 Producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	12
1.1.4 Fermentación	14
1.2 Hormona del crecimiento humano de 20kDa	15
1.2.1 Actividad biológica y propiedades terapéuticas	16
1.2.2 Síntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGH 20 y 22K).....	18
1.2.3 Potencial farmacológico de HGH 20K y perspectivas para su producción.....	20
1.3 Justificación.....	21
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo general.....	22
2.1.1 Objetivos particulares	22
3. MATERIAL Y METODOS.....	23
3.1 Area de Trabajo, Reactivos y Material Biológico..	23
3.2 Equipo.....	24
3.3 Métodos.....	25
3.3.1 Estrategia general.....	25
3.3.1.1 Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGH22K en <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	27

3.3.1.2	Construcción del plásmido pBS20K.....	28
3.3.1.2.1	Preparación de los fragmentos de ligación.....	29
3.3.1.2.2	Reacción de ligación.....	30
3.3.1.2.3	Selección y análisis de clonas de <i>E. coli</i> XL1-Blue portadoras de pBS20K.....	31
3.3.1.3	Construcción del plásmido pBSPIC9.....	32
3.3.1.3.1	Preparación de los fragmentos de ligación.....	33
3.3.1.3.2	Reacción de ligación.....	34
3.3.1.3.3	Selección y análisis de clonas de <i>E. coli</i> XL1-Blue portadoras de pBSPIC9.....	35
3.3.1.4	Construcción del plásmido pBSPIC20.....	35
3.3.1.4.1	Preparación de los fragmentos de ligación.....	37
3.3.1.4.2	Reacción de ligación.....	39
3.3.1.4.3	Selección y análisis de clonas <i>E. coli</i> XL1-Blue portadoras de pBSPIC20.....	39
3.3.1.5	Construcción del vector pPIC9KhGH20K.....	40
3.3.1.5.1	Preparación de los fragmentos de ligación.....	41
3.3.1.5.2	Reacción de ligación.....	45
3.3.1.5.3	Selección y análisis de clonas de <i>E. coli</i> XL1-Blue portadoras de pPIC9KhGH20K.....	46
3.3.1.5.4	Aislamiento a mediana escala del DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K	47
3.3.1.5.5	Secuenciación.....	48
3.3.2	Transformación de <i>P. pastoris</i> GS115.....	49
3.3.2.1	Crecimiento celular.....	49
3.3.2.2	Formación de esferoplastos.....	50
3.3.2.3	Transformación.....	51
3.3.2.4	Selección de recombinantes.....	52
3.3.3	Caracterización de genotipos y fenotipos de las clonas recombinantes.....	53
3.3.3.1	Extracción de DNA.....	53
3.3.3.2	Análisis de DNA por espectrofotometría.....	54
3.3.3.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	55
3.3.3.4	Inducción de la expresión del DNAc de HGH 20K.....	56

3.3.4 Selección de clones conteniendo copias múltiples del cassette de expresión.....	57
3.3.5 Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K.....	59
3.3.5.1 Análisis de proteínas.....	60
4. RESULTADOS.....	62
4.1 Propagación de los plásmidos: pBS, pJV, pPIC9K y pPIC9hGH22K en <i>E. coli</i> XL1-Blue.....	62
4.2 Construcción del plásmido pBS20.....	63
4.3 Construcción del plásmido pBSPIC9.....	65
4.4 Construcción del plásmido pBSPIC20.....	67
4.5 Construcción del vector pPIC9KhGH20K.....	70
4.5.1 Secuenciación.....	75
4.5.2 Aislamiento a mediana escala del DNA plasmídico de pPIC9KhGH20K.....	76
4.6 Transformación de <i>P. pastoris</i> GS115.....	76
4.7 Selección de clones multicopias del cassette de expresión, mediante su crecimiento a dosis crecientes del antibiótico G418 (geneticina).....	78
4.8 Caracterización genotípica y fenotípica de las cepas obtenidas.....	81
4.8.1 Extracción de DNA y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	81
4.8.2 Fermentación	84
4.9 Selección de la clona sobreproductora de HGH 20K.....	85
5. DISCUSION.....	94
5.1 Construcción del vector pPIC9KhGH20K.....	94
5.2 Transformación de <i>P. pastoris</i> con el vector pPIC9KhGH20K.....	95
5.3 Selección mediante G418	96
5.4 Biosíntesis de HGH 20K en <i>Pichia pastoris</i>	97
5.5 Selección de la cepa sobreproductora.....	98

6. CONCLUSIONES.....	100
7. BIBLIOGRAFIA.....	101
8. ANEXOS.....	111
ANEXO 1 Composición de los medios de cultivo.....	112
ANEXO 2 Distribución en las cajas de Petri de las 108 clonas construídas para la selección con G418.....	113
ANEXO 3 Concentración máxima de antibiótico inhibitoria para cada una de las clonas analizadas.....	114
ANEXO 4 "Ontogenia" de pJV.....	115
ANEXO 5 Resumen de los plásmidos construídos.....	117
ANEXO 6 Estrategia general de construcción....	118
ANEXO 7 Mapa de restricción del plásmido pBS20K.....	119
ANEXO 8 Mapa de restricción del plásmido pBSPIC9.....	120
ANEXO 9 Mapa de restricción del plásmido pBSPIC20.....	121
ANEXO 10 Mapa de restricción del plásmido pPIC9KhGH20K.....	122
ANEXO 11 Mapa de restricción del plásmido pPIC9K.....	123
ANEXO 12 Secuencia nucleotídica del fragmento de 724 pb conteniendo el DNAC de HGH 20K.....	124

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Ventajas y desventajas del sistema de expresión de <i>P. Pastoris</i>	3
II Niveles de producción de proteínas recombinantes sintetizadas en <i>P. pastoris</i> a nivel fermentador.....	13
III Descripción de los controles.....	58
IV Rendimiento y calidad de las preparaciones plasmídicas.....	62
V Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBS20K.....	63
VI Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBSPIC9.....	65
VII Resultados obtenidos en la transformación con el plásmido pBSPIC20.....	68
VIII Resultados obtenidos con la transformación del plásmido pPIC9KhGH20K.....	71
IX Rendimiento y calidad de las preparaciones plasmídicas a mediana escala.....	76
X Transformación por la técnica de formación de esferoplastos.....	77
XI Porcentaje de clonas que crecieron a concentraciones crecientes de G418.....	81
XII Rendimiento y calidad de las preparaciones de DNA genómico y plasmídico.....	82
XIII Niveles de producción de HGH 20K de las 19 clonas seleccionadas.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Vía metabólica para la oxidación del metanol en levaduras.....	5
2. El plásmido pPIC9K como vector modelo para la producción de proteínas recombinantes en <i>P. Pastoris</i>	7
3. Integración del vector de expresión dentro del genoma de <i>P. Pastoris</i>	9
4. Inserción génica del cassette de expresión en el locus <i>AOX1</i>	11
5. Múltiples eventos de inserción génica.....	12
6. Etapas de la producción de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	14
7. Representación esquemática de la estrategia general.....	26
8. Representación esquemática de la construcción del vector pBS20K.....	28
9. Representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC9.....	33
10. Representación esquemática de la construcción del vector pBSPIC20.....	36
11. Corte enzimático de pBS20K con <i>Xba I</i> y <i>Sma I</i>	38
12. Representación esquemática de la construcción del vector pPIC9KhGH20K.....	41
13. Estrategias de ligación.....	42

14.	Digestión adicional con las enzimas de restricción <i>Apa</i> I y <i>Sna</i> B1	44
15.	Caracterización enzimática del plásmido pBS20K.....	64
16.	Caracterización enzimática del plásmido pBSPIC9.....	66
17.	Verificación de la liberación del fragmento de 516 pb producto de la doble digestión de pBS20K con <i>Xba</i> I y <i>Sma</i> I.....	67
18.	Caracterización enzimática del plásmido pBSPIC20.....	69
19.	Reacción de ligación para generar a pPIC9KhGH20K.....	70
20.	DNAs superenrollados de las clonas de pPIC9KhGH20K.....	72
21.	Clonas de pPIC9KhGH20K caracterizadas con <i>Pvu</i> II.....	73
22.	Caracterización enzimática del plásmido pPIC9KhGH20K.....	74
23.	Secuencia de pPIC9KhGH20K de 724 pb.....	75
24.	Crecimiento en RDB agar sin histidina para corroborar la selección de transformantes HIS4 ⁺	79
25.	Selección por G418 de las clonas obtenida.....	80
26.	Extracción de DNA genómico y PCR de ocho clonas elegidas al azar.....	83
27.	Fermentación e inducción de cuatro clonas, en las cuales se comprobó la integración del gen heterólogo.....	84
28.	Cinéticas de crecimiento	85

29.	Análisis electroforético en gel de poliacrilamida de proteínas en los medios de cultivo.....	87
30.	Determinación de proteínas totales de las 19 clonas analizadas.....	88
31.	Porcentaje de HGH 20K respecto a las proteínas totales en el medio de cultivo.....	89
32.	Análisis densitométrico de las proteínas de los medios de cultivo fermentados	90
33.	Niveles de producción de HGH 20K	91
34.	Correlación de la concentración inhibitoria de G418 y la producción de HGH 20K.....	92

NOMENCLATURA

AOX	Alcohol oxidasa
AOX1	Gen codificante para la AOXI
AOX2	Gen codificante para la AOXII
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BMG	Medio amortiguado y con glicerol
BMM	Medio amortiguado y con metanol
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNAm
dNTPs	Trifosfatos de desoxirribonucleósidos
DO600nm	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Acido etilendiamino-tetraacético
g	Fuerza de gravedad
G418	Geneticina
GHs	Hormonas del crecimiento
h	Hora
HGH	Hormona del crecimiento humano
<i>hGH</i>	Gen o DNA complementario de la hormona del crecimiento humano
His ⁺	Clonas que poseen el gen <i>HIS4</i> funcional
<i>his4</i>	Gen de la histidinol deshidrogenasa
<i>his4</i>	Gen disfuncional de la histidinol deshidrogenasa
IPTG	Isopropil β-tiogalactósido
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
L	Litro
LB	Caldo de cultivo Luria-Bertani
M	Molar
MD	Medio mínimo con dextrosa
MDH	Medio mínimo con dextrosa e histidina
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
MM	Medio de cultivo mínimo con metanol
mM	Milimolar
MMH	Medio de cultivo mínimo con metanol e histidina
Mut ⁺	Mutante que posee el gen <i>AOX1</i> funcional
Mut ^s	Mutante que carece del gen <i>AOX1</i> funcional
μg	Microgramo
ng	Nanogramo

nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de iones hidrógeno
RDB	Medio de cultivo con biotina y dextrosa para regeneración celular
RDBH	Medio de cultivo con biotina, dextrosa e histidina para regeneración celular
RNA	Acido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	Sorbitol-citrato de sodio-EDTA
SDS	Dodecil sulfato de sodio (lauril sulfato de sodio)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SE	Sorbitol-EDTA
SED	Sorbitol-EDTA-Ditiotrietol
s	Segundo
SOS	Sorbitol-YPD-CaCl ₂
SS	Secuencia señal
TBE	Amortiguador Tris-Boratos-EDTA
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TSNT	Tritón-SDS-NaCl-Tris-HCl
TT	Terminador de la transcripción
U	Unidades
UV	Ultravioleta
V	Voltio
X	Número de veces la concentración con respecto a la solución de trabajo
X-Gal	5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-galactopiranósido
YNB	Base nitrogenada de levadura
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa