UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

Producción de tripsina de camarón blanco del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*

Por

M.C. Luis Lauro Escamilla Treviño

Como requisito parcial para obtener el Grado de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

ABRIL DEL 2002

TD
QP609
.T7
E7
2002
c.1

1080124450

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Producción de tripsina de camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*

Por

M.C. Luis Lauro Escamilla Treviño

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

TD
QP609
.T7
E7
2002

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
DOCTORADO

Producción de tripsina de camarón blanco del pacífico (*Litopenaeus vannamei*) en *Pichia pastoris*

Aprobación de tesis:

Dra. Martha Guerrero Olazarán
Director de Tesis

Dr. José María Viader Salvadó
Co-Director de Tesis

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Co-Director de Tesis

Dra. Katiuska Arévalo Niño
Comisión de Tesis

Dr. Luis Galán Wong
Comisión de Tesis

Dra. María Julia Verde Star
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Martha Guerrero Olazarán por su valiosa asesoría.
- Al Dr. José María Viader por su invaluable contribución en la resolución de problemas.
- A la Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos y a la Dra Katiuska Arévalo Niño por su disponibilidad.
- Al Dr. Luis Galán Wong por haberme aceptado en el programa de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Biotecnología el cual coordina.
- Al Dr. Rolando Tijerina Menchaca por permitir el uso de la diversas instalaciones del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.
- Al Dr. Julio Sepúlveda Saavedra por su valiosa colaboración en el culminación de este proyecto.
- A la Dra. Elizabeth Cruz Suárez por permitir el uso de equipo del laboratorio de Maricultura de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.
- A la Dra. Laura Elia Martínez por permitir el uso del equipo de la Unidad de Genética y Defectos Congénitos de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.
- A la Dra. Ma. del Socorro Flores por facilitarme diversos equipos indispensables en el desarrollo del proyecto.
- A los estudiantes de licenciatura por su ayuda: Lidia, Adriana, Elda, Othonyel y especialmente a Victor y Félix quienes soportaron arduas jornadas de trabajo.
- A aquellas personas que me brindaron ayuda de manera desinteresada: Martin, Carmen, Agustina, Eddy, Marta O., Flor, Carlos, Angelitos etc.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.
- Al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) por el apoyo económico brindado para financiar este proyecto.

DEDICATORIA

A ti **Brenda** por tu amor y enorme comprensión.
Discúlpame por el tiempo que te he quitado durante esta etapa.

A **Luis Osvaldo** y **Valeria** por que son el principal motivo de mi esfuerzo.

A mis padres **Carmen** y **Luis Lauro** gracias por su ejemplo,
por su amor y por su apoyo incondicional.

A mis hermanos **Iza** y **Alán** por su amistad.

Al resto de mis familiares.

A mis suegros **Amparo** y **Osvaldo** por su apoyo y amistad.

Al resto de mi familia política.

ÁREA DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo principalmente en el Laboratorio de Química Biomolecular y otros Laboratorios del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina y en el Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Martha Guerrero Olazarán y la Co-dirección del Dr. José Ma. Viader Salvadó y la Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos.

T ABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1	**INTRODUCCIÓN**	1
1.1	Biotecnología de proteínas	1
1.2	Tecnología del ADN recombinante	1
1.3	Selección del sistema de expresión	3
1.4	Sistema de expresión de *Pichia pastoris*	5
1.5	Tripsina	10
1.5.1	Tripsina de camarón	11
1.6	Producción de tripsina	13
1.7	Importancia del proyecto	14
2	**OBJETIVOS**	15
2.1	Objetivo General	15
2.1.1	Objetivos específicos	15
2.1.2	Objetivos adicionales	15
3	**MATERIAL Y MÉTODOS**	16
3.1	Area de trabajo, reactivos, y material biológico	16
3.2	Equipo	16
3.3	Metodología	18
3.3.1	Estrategia General	18
3.3.2	Construcción de Vectores	18
3.3.2.1	Diseño de iniciadores	20
3.3.2.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
3.3.2.3	Clonación de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno en pPIC9	24
3.3.3	Transformación de *Pichia pastoris* GS115	26
3.3.3.1	Crecimiento celular	27

3.3.3.2	Formación de esferoplastos	27
3.3.3.3	Transformación	28
3.3.3.4	Selección de recombinantes	29
3.3.4	Caracterización de genotipos y fenotipos de las cepas recombinantes	29
3.3.4.1	Verificación de la integración del vector de expresión	30
3.3.4.1.1	Aislamiento de ADN genómico de *Pichia pastoris*	30
3.3.4.1.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
3.3.4.2	Inducción de la expresión de los ADNc's de tripsina y Tripsinógeno	32
3.3.4.3	Análisis de proteínas	33
3.3.5	Determinación de los posibles factores que afectan la producción de las proteínas de interés	35
3.3.5.1	Cinéticas de crecimiento en medio BMM	35
3.3.5.2	Determinación enzimática de la actividad de alcohol oxidasa y catalasa en medio BMM	39
3.3.5.3	Análisis de ultraestructura por Microscopía Electrónica	43
3.3.5.4	Cinéticas de crecimiento en medio BMG	44
3.3.5.5	Cinéticas de crecimiento en medio BMM suplementado con sorbitol	45
3.3.6	Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinantes	45
3.3.6.1	Detección de transcritos por la técnica de RT-PCR	46
3.3.6.1.1	Aislamiento de ARN	47
3.3.6.1.2	Tratamiento con DNAsa I	48
3.3.6.1.3	Reacción de Retrotranscripción	49
3.3.6.1.4	PCR de la RT	50
3.3.6.2	Análisis de proteínas de fermentaciones a altas densidades Celulares	51

3.4	Determinación de la actividad de tripsina	51
4	**RESULTADOS**	**53**
4.1	Construcción de los vectores	53
4.1.1	Diseño de oligonucleótidos	53
4.1.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	57
4.1.3	Clonación de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno en pPIC9	58
4.2	Transformación en *Pichia pastoris*	61
4.3	Caracterización de genotipos y fenotipo de las clonas recombinantes	62
4.3.1	Verificación de la integración del vector de expresión	62
4.3.2	Inducción de la expresión de los ADNc's de tripsina y tripsinógeno	65
4.4	Determinación de los posibles factores que afectan la producción de las proteína de interés	68
4.4.1	Cinéticas de crecimiento en medio BMM	68
4.4.2	Determinación enzimática de alcohol oxidasa y catalasa	73
4.4.3	Análisis de ultraestructura por Microscopia Electrónica	78
4.4.4	Cinéticas de crecimiento en medio BMG	81
4.4.5	Cinéticas de crecimiento en medio BMM suplementado con sorbitol (BMM + S)	83
4.5	Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinantes	86
4.5.1	Detección de transcritos por RT-PCR	86
4.5.2	Análisis de proteínas de fermentaciones a altas densidades celulares	88
4.6	Determinación de la actividad de tripsina	90
5	**DISCUSIÓN**	**91**
5.1	Construcción de los vectores pPIC9Tr y pPIC9Tg	91
5.2	Transformación de *P. pastoris* con los vectores pPIC9Tr y	

	pPIC9Tg	92
5.3	Caracterización de genotipos y fenotipos de cepas recombinantes	92
5.3.1	Verificación de la integración de los vectores de expresión	92
5.3.2	Inducción de la expresión de los ADNc's heterólogos	93
5.4	Factores que afectan la producción de las proteínas de interés	94
5.4.1	Cinéticas de crecimiento en medio BMG	94
5.4.2	Determinación enzimática de alcohol oxidasa y catalasa	95
5.4.3	Análisis de ultraestructura por Microscopia Electrónica	96
5.4.4	Cinéticas de crecimiento en medio BMG	97
5.4.5	Cinéticas de crecimiento en medio BMM + S	97
5.5	Búsqueda de condiciones de fermentación que favorezcan la biosíntesis de los productos recombinantes	98
5.5.1	Detección de transcritos por RT-PCR	98
5.5.2	Análisis de proteínas de fermentaciones a altas densidades celulares	99
6	**CONCLUSIONES**	**101**
7	**BIBLIOGRAFÍA**	**103**
8.	**ANEXO**	**107**

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Algunas proteínas recombinantes producidas industrialmente empleando organismos modificados por técnicas de Ingeniería Genética.	2
II.	Comparación de los diferentes hospederos empleados para la producción de proteínas heterólogas.	4
III.	Niveles de producción de proteínas recombinantes sintetizadas en *Pichia pastoris*.	10
IV.	Comparación de porcentajes de similitud entre tripsinas maduras de diferentes especies.	12
V.	Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR estandarizada con *Taq* DNA polimarasa para la amplificación de productos a subclonar.	23
VI.	Mezcla de reacción de ligación.	25
VII.	Tamaño de los fragmentos teóricos obtenidos al digerir cada uno de los plásmidos con la endonucleasa *Pst* I.	26
VIII.	Volumen y concentración final de reactivos empleados en la PCR para comprobar la integración de los vectores construidos al genoma de *P. pastoris*.	32
IX.	Curva de calibración para la determinación de proteínas de soluciones de lisados por el método de Bradford.	42
X.	Mezcla de reacción para llevar a cabo el tratamiento con *RQ1 DNAasa* libre de *RNAasa*.	48
XI.	Mezcla de reacción para llevar a cabo la síntesis de ADN complementario mediante retrotranscripción empleando la enzima *M-MLv*.	49
XII.	Mezcla de reacción realizada para la PCR de la RT.	50

XIII. Resultados obtenidos de la cuantificación de ADN de diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris*. 63

XIV. Valores de logaritmos naturales de DO_{600} corregidos ($LnDO_c$) para cada cepa y a cada tiempo. 69

XV. Valores de logaritmos naturales de UFC/mL corregidos (LnV_c) para cada cepa y a cada tiempo. 70

XVI. Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMM. 72

XVII. Valores de actividad de alcohol oxidasa de extractos celulares de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a diferentes tiempos de inducción en medio BMM. 74

XVIII. Valores de actividad de catalasa de extractos celulares de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a diferentes tiempos de inducción en medio BMM. 76

XIX. Valores de $LnDO_c$ y de LnV_c para cada tiempo obtenidos durante la cinética de crecimiento en medio BMG. 81

XX. Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMG. 82

XXI. Valores de logaritmos naturales de DO_{600} corregidos ($LnDO_c$) de los tres ensayos realizados para cada cepa y a cada tiempo. 83

XXII. Valores de logaritmos naturales de UFC/mL corregidos (LnV_c) de los tres ensayos realizados para cada cepa y a cada tiempo. 83

XXIII. Tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento en medio BMM + S. 85

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Vector de integración típico empleado para la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.	7
2.	Inserción génica del cassette de expresión en el locus *his4*.	8
3.	Representación esquemática de la estrategia general.	19
4.	Estrategia empleada para la construcción de los vectores pPIC9Tr (tripsina) y pPIC9Tg (tripsinógeno).	20
5.	Representación esquemática de la estrategia de diseño del oligonuclótido 5' para la amplificación de las secuencias nucleotídicas de tripsina y tripsinógeno de camarón.	21
6.	Representación esquemática de los ensayos de fermentación llevados a cabo para obtener las cinéticas de crecimiento en medio BMM.	36
7.	Representación esquemática de las tomas de muestras y análisis realizados durante la cinética de crecimiento en medio BMM.	37
8.	Esquema general del procedimiento realizado para obtener los valores de DO_{600} y UFC/mL a cada tiempo.	38
9.	Representación esquemática de los ensayos de fermentación llevados a cabo para obtener las cinéticas de crecimiento en medio BMG.	44
10.	Representación esquemática de los ensayos de fermentación a altas densidades celulares.	47
11.	Secuencia de los iniciadores diseñados.	54
12.	Simulación de la PCR empleando el programa Amplify 1.0 alimentado con los iniciadores diseñados para amplificar el ADNc de tripsina de 738 pb.	55
13.	Simulación de la PCR empleando el programa Amplify 1.0 alimentado con los iniciadores diseñados para amplificar el	

ADNc de tripsinógeno de 780 pb. 55

14. Apareamiento de la secuencia molde con cada uno de los iniciadores empleados para la clonación. 56

15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de productos amplificados para clonación. 57

16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE para verificar la digestión de pPIC9hGH22K con las endonucleasas *Xho* I y *Avr* II. 58

17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de los plásmidos pPIC9Tg, pPIC9Tr y pPIC9hGH22K digeridos con la endonucleasa *Pst* I. 60

18. Estructura de los vectores de expresión pPIC9Tr y pPIC9Tg. 61

19. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de digestiones preparativas previas a la transformación de *Pichia pastoris*. 62

20. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE de ADN's genómicos de cepas recombinantes de *P. pastoris* y estándares de fago. 63

21. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de productos amplificados, cepa GS115-Tg. 64

22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de productos amplificados, cepa GS115-Tr. 65

23. Electroforesis SDS-PAGE al 12% e inmunodetección por la técnica de Western blot de proteínas extracelulares de cepas de GS115-Tr bajo condiciones de inducción. 66

24. Electroforesis SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de la fracción de proteínas intracelulares solubles de cepas GS115-Tr bajo condiciones de inducción. 67

25. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de proteínas extracelulares de las cepas GS115-Tg y una cepa control (GS115-22K), bajo condiciones de inducción. 68

26. Cinéticas de crecimiento de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* bajo condiciones de inducción en medio BMM (gráficas promedio). 71
27. Actividad específica de la enzima AOX de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos. 75
28. Actividad específica de la enzima catalasa de la fracción intracelular de las cepas recombinantes cultivadas en BMM a diferentes tiempos. 77
29. Micrografías electrónicas 7000X de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a las 0 h de inducción es decir durante su crecimiento en BMG. 79
30. Micrografías electrónicas 7000X de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* cosechadas a las 14 h de inducción en medio BMM. 80
31. Cinéticas de crecimiento de cepas recombinantes de *Pichia pastoris* en medio BMM suplementado con sorbitol. 84
32. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de las RT-PCR's de diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris* a las 6 h de inducción en medio BMM. 86
33. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE de las RT-PCR's de diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris* bajo condiciones de inducción en medio BMM suplementado con sorbitol. 87
34. Electroforesis SDS-PAGE al 15% de proteínas extracelulares de fermentaciones con la cepa GS115-22K. 88
35. Electroforesis SDS-PAGE al 12% de proteínas extracelulares de fermentaciones de diferentes cepas recombinantes de *P. pastoris*. 89
36. Western blot de medios de cultivo libre de células de fermentaciones a altas densidades celulares con la cepa GS115-Tg y GS115-Tr a las 48 h de inducción en medio BMM + S 90

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
AOX1	Gen de la alcohol oxidasa 1
AOX2	Gen de la alcohol oxidasa 2
AOX TT	Terminador de la transcripción del gen *AOX1*
BMG	Medio de cultivo amortiguado y con glicerol
BMM	Medio de cultivo amortiguado y con metanol
BMMY	Medio de cultivo amortiguado y con metanol, peptona y extracto de levadura
B. subtilis	*Bacillus subtilis*
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
ColE1ori	Origen de replicación de ColE1
Depto	Departamento
DO_{600}	Densidad óptica a 600 nm
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
g	Gramos
g	Gravedad
h	Horas
HBsAg	Antígeno de superficie del virus de hepatitis B
HIS4	Gen de la histidinol deshidrogenasa
his4	Gen de la histidinol deshidrogenasa defectuoso o mutado
kDa	Kilodaltones

L	Litros
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Ln	Logaritmo natural
M	Molar
MD	Medio de cultivo mínimo con dextrosa
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar
Mut^+	Cepa recombinante que posee el gen *AOX1*
Mut^s	Cepa recombinante que no posee el gen *AOX1*
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos con solución salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P. pastoris	*Pichia pastoris*
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SP	especies
TBE	Amortiguador Tris-Boratos-EDTA
TE	Amortiguador Tris-EDTA
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Unidades

UV	Ultravioleta
V	Voltio
YPD	Medio de cultivo con extracto de levadura, peptona y dextrosa
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar

RESUMEN

Luis Lauro Escamilla Treviño **Fecha de Graduación: Abril 2002**
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: PRODUCCIÓN DE TRIPSINA DE CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO (*Litopenaeus vannamei*) EN *Pichia pastoris*

Número de páginas: 108 **Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología**

Área de Estudio: Biotecnología

Propósito y Método de Estudio: La importancia de la tripsina en muchos procesos biológicos y aplicaciones industriales, han hecho de esta enzima objeto de intenso estudio en vertebrados e invertebrados. Actualmente la principal forma de producción de tripsina es mediante su obtención a partir de tejido pancreático de animales en sacrificio, sin embargo las preparaciones de tripsina obtenidas contienen actividades trazas de otras enzimas proteolíticas que son indeseables en algunos procesos industriales o de laboratorio. Adicionalmente lineamientos de organismos internacionales han conducido a la necesidad de uso de tripsina pura de origen recombinante. El presente trabajo tubo como objetivo el de llevar a cabo la producción de tripsina de camarón empleando un sistema de expresión que tiene como hospedero la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Mediante el empleo de técnicas estándar de biología molecular se construyeron vectores de expresión portando los ADNc's que codifican para la tripsina y tripsinógeno de camarón, los cuales se emplearon para transformar la cepa GS115 de *P. pastoris*. La integración de los vectores en el genoma de la levadura fue verificada mediante PCR. Las cepas recombinantes construidas se cultivaron bajo condiciones de inducción y se realizaron análisis de proteínas extracelulares e intracelulares. Al no detectar los productos recombinantes bajo condiciones habituales de inducción, se llevaron a cabo estudios para determinar los posibles factores que afectan la producción de las proteínas de interés y se realizó una búsqueda de condiciones de fermentación que favorecieran la biosíntesis de los productos recombinantes.

Contribuciones y Conclusiones: Los vectores recombinantes construidos conteniendo la secuencia completa de tripsina y tripsinógeno de camarón fueron caracterizados satisfactoriamente mediante un análisis de restricción. A pesar de que las cepas transformadas integraron en su genoma los vectores recombinantes construidos, no se detectó tripsina y tripsinógeno de camarón. Al realizar la búsqueda de los factores que afectaban la producción de tripsina o tripsinógeno se encontraron importantes diferencias (velocidad específica de crecimiento, actividad de enzimas peroxisomales y proliferación peroxisomal) entre las cepas construidas (GS115-Tr y GS115-Tg) y las cepas control (GS115-22K y GS115-pPIC9K). Los resultados obtenidos sugieren que el gen de AOX de la cepa GS115-Tr pudo haber sido afectado durante la integración, lo cual pudo haber ocurrido por un evento de integración poco habitual. Por otro lado se concluye que las alteraciones encontradas de la cepa GS115-Tg bajo condiciones de inducción son provocadas por el producto heterólogo. Estos resultados son comparables con los encontrados recientemente en la literatura donde se menciona de las dificultades encontradas al tratar de producir tripsina, tales como actividad proteolítica contra proteínas endógenas del hospedero, inestabilidad de la proteína, autodigestión de tripsina, etc. A pesar de las dificultades encontradas fue posible llevar a cabo la biosíntesis de tripsinógeno de camarón en *Pichia pastoris* en inducciones de altas densidades celulares y empleando sorbitol como fuente de carbono y energía adicional al metanol. Por otro lado los resultados obtenidos con el suplemento de sorbitol, sugieren que éste podría ser empleado en fermentaciones que utilicen este sistema de expresión, para mejorar el aumento de biomasa sin reprimir el promotor de *AOX* durante la fase de inducción.

FIRMA DEL ASESOR: _____