

## El gen HIS-3 de *Saccharomyces cerevisiae* complementa una mutación his<sup>-</sup> de *Pichia pastoris*

V. YONG, M.E. GONZÁLEZ, L. HERRERA y J. DELGADO

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado postal 6162, La Habana 6, Cuba

Recibido en junio de 1991

Aprobado en noviembre de 1991

### RESUMEN

Un grupo de mutantes his<sup>-</sup> seleccionados a partir de una mutagénesis se sometieron a ensayos de complementación por transformación, utilizándose para ello un vector que contiene el gen HIS-3 de *Saccharomyces cerevisiae*. En este trabajo se demuestra que el gen HIS-3 de *S. cerevisiae* complementa una mutación his<sup>-</sup> de *Pichia pastoris*.

### SUMMARY

Several his<sup>-</sup> mutants isolated after a mutagenesis were subjected to complementation assays by transformation experiments, using for that a vector bearing HIS-3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. In this work was demonstrated that such gene complements a his<sup>-</sup> mutation in *Pichia pastoris*.

### INTRODUCCION

Las levaduras metilotróficas comprenden un grupo de microorganismos capaces de utilizar el metanol como fuente de carbono y energía. La levadura *P. pastoris* por presentar esta característica es de considerable interés académico.

La primera enzima requerida para el proceso de asimilación del metanol es la alcohol oxidasa, la cual se encuentra

compartimentada en los peroxisomas (Veenhuis *et al.*, 1983). Estos orgánulos contienen también catalasas, las cuales destruyen el peróxido de hidrógeno, que es uno de los productos finales de la oxidación del metanol; el otro producto de la reacción es el formaldehído, el cual puede ser asimilado por una vía cíclica que involucra la enzima dihidroxiacetona-sintetasa (DHAS) que es la enzima más importante del ciclo, o puede ser degradado a CO<sub>2</sub> y agua para producir energía.

El proceso en general es fuertemente regulado por represión catabólica. En condiciones apropiadas, los peroxisomas alcanzan hasta el 80% del volumen celular, las enzimas alcohol oxidasa (AOX) y dihidroxiacetona-sintetasa alcanzan hasta el 30% de la proteína total soluble (Couderec y Baratti, 1980) cuando las células son crecidas en medio con metanol como fuente de carbono.

Sin embargo, una de las cuestiones que afecta el estudio de la biología molecular de estas levaduras es la ausencia de

mutantes y de vectores que porten marcadores genéticos capaces de complementar algunos tipos de mutaciones.

Recientemente, Cregg *et al.* (1985), han desarrollado un sistema de transformación en la levadura *P. pastoris* empleando el gen HIS-4 de *S. cerevisiae* como marcador de selección. En nuestro trabajo se llevó a cabo la caracterización de mutantes his<sup>-</sup> de la levadura *P. pastoris*, utilizando para ello un vector que contiene el gen HIS-3 de *S. cerevisiae*.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas de bacterias y levaduras

*Escherichia coli* MC1066 (F, lacX74, r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>, gal U, gal K, Kan, trpC 9830, leu B600, pirF::Tn5) se usó en todas las transformaciones bacterianas y propagaciones de plasmidios. *P. pastoris* BCM-90 fue la cepa utilizada en esta investigación. Los mutantes his<sup>-</sup> de *P. pastoris* MP-4, MP-9, MP-18, MP-29 y MP-36 se aislaron en este laboratorio.

### Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio LB (NaCl 20 g/l, triptona 10 g/l, extracto de levadura 0,5 g/l, pH 7,5) y la ampicilina se añadía al medio con una concentración final de 50 µg/ml.

Las cepas de levadura se crecieron a 30°C en medio YPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, dextrosa 20 g/l) o medio GO. El medio agar de regeneración contiene sorbitol 1 M, agar 3% y medio mínimo GO (Galzy y Slonimski, 1957).

### Preparaciones de plasmidios

Las preparaciones de plasmidios se llevaron a cabo a partir de transformantes de la cepa bacteriana MC-1066 siguiendo el método descrito por Maniatis *et al.* (1982). Las minipreparaciones de plasmidios se realizaron de acuerdo con el método de Birboin y Doly (1979).

### Procedimiento de transformación

El procedimiento de transformación se llevó a cabo según el método descrito por Cregg *et al.* (1985), con algunas modificaciones.

## Aislamiento de ADN total

Las células de levadura transformadas se crecieron en medio mínimo y el ADN de alto peso molecular se purificó según el método descrito por Maniatis *et al.* (1982).

## Análisis de Southern blot

El análisis de Southern blot se llevó a cabo según el método descrito por Maniatis *et al.* (1982).

## Enzimas y reactivos

Las endonucleasas de restricción, ADN T4 ligasa y el fragmento Klenow de la ADN pol-I, se obtuvieron de Enzibiot (Cuba). Los deoxinucleótidos y el ATP se obtuvieron de Boehringer Mannheim (RFA). La agarosa se obtuvo de Sigma Chemical Co. (USA). El dATP se obtuvo de Amersham (U.K.). La fosfatasa alcalina bacteriana se obtuvo de Boehringer Mannheim (RFA). El polietilenglicol PEG-4000 se obtuvo de BDH Chemical (U.K.).

## RESULTADOS

### Construcción del vector pYF-85

Para llevar a cabo la caracterización de los mutantes his<sup>-</sup> se construyó un vector integrativo que contiene una secuencia de 5,5 kb aproximadamente, que codifica para la enzima alcohol oxidasa (AOX-I). Este vector porta, además, el gen HIS-3 de *S. cerevisiae* como marcador de selección en levaduras y el gen responsable de la síntesis del enzima beta-lactamasa que permite seleccionar transformantes en bacterias (figura 1).

El vector pYF-85 se construyó a partir de la clonación de un fragmento que contiene el gen AOX-I de *P. pastoris* en un sitio EcoRI del vector pYF-92, con anterioridad a este paso se eliminó el único sitio Sal-I del vector por tratamiento con el fragmento Klenow de la enzima polimerasa

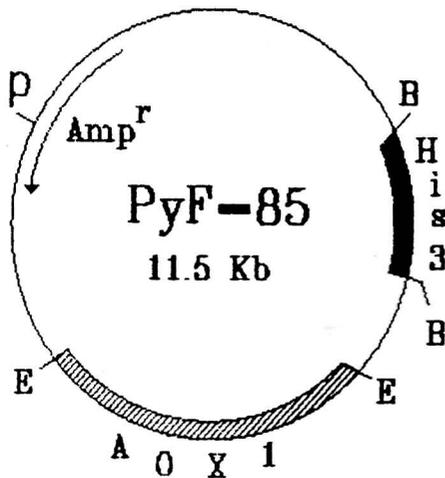


FIG. 1. Vector integrativo pYF-85 utilizado para todos los experimentos de transformación llevados a cabo en este trabajo. Las regiones flanqueantes al fragmento AOX-1, señaladas con la letra E y las regiones que se encuentran en las fronteras del gen HIS-3 señaladas con la letra B, corresponden a los sitios de restricción EcoRI y BamHI respectivamente. El sitio S señalado en el fragmento correspondiente al gen AOX-1 y el sitio P señalado en el gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, corresponden a los sitios de restricción Sal-I y BamHI respectivamente.

del ADN de *E. coli* y un fragmento que contenía el origen de replicación del plasmidio 2  $\mu$  de la levadura *S. cerevisiae*.

### Experimento de transformación

Para transformar una levadura, la pared celular debe ser removida por digestión enzimática con glucanasas que den lugar a la formación de esferoplastos que puedan ser transformados con un plasmidio recombinante (Hinnen *et al.*, 1978) (tabla 1).

Los mutantes his<sup>-</sup> de *P. pastoris* son incapaces de crecer en medio mínimo, si éste carece de histidina. En este experimento nosotros tratamos de probar si el gen HIS-3 de *S. cerevisiae* podía conferirle un fenotipo his<sup>+</sup> a algunos de los mutantes his<sup>-</sup> de *P. pastoris*. Para probar esta posibilidad estos mutantes se transformaron con el vector pYF-85 (ver figura 1).

Tabla 1

#### EXPERIMENTO DE TRANSFORMACION CON DIFERENTES MUTANTES HIS<sup>-</sup> DE LA LEVADURA *P. PASTORIS*

Cepas	Frecuencia de transformación por $\mu$ g de ADN	Frecuencia de transformación por cada $10^7$ células viables
MP-4	2-4	10-20
MP-9	1	1-10
MP-18	2-4	10-20
MP-29	20-40	200-400
MP-36	20-40	200-400

Los experimentos de transformación se realizaron según se describe en *Materiales y Métodos*. Para ellos se emplearon en todos los casos 20  $\mu$ g de ADN.

El número de transformantes por célula viable se calculó mediante la relación del número de colonias transformantes y el número de colonias viables capaces de regenerar la pared celular.

El número de transformantes por microgramos de ADN se calculó mediante la relación del número de colonias transformantes y la cantidad de ADN empleado en cada experimento de transformación.

En todos los casos se utilizó como vector de transformación el vector pYF-85.

De los 57 mutantes probados cinco cepas mostraron un fenotipo his<sup>+</sup>, sin embargo, la frecuencia de transformación de cada una de las cepas no fue la misma (ver tabla 1).

Los transformantes HIS<sup>+</sup> aislados se verificaron reestriando sobre medio mínimo.

### Evidencia para la integración del vector pYF-85

En la transformación de levadura, es posible lograr la integración dirigida de un vector transformante a un sitio específico del genoma celular, si se linealiza el mismo por una región homóloga a la del cromosoma (Orr-Weaver *et al.*, 1981).

El vector pYF-85 contiene una región de homología con el gen AOX-1 de *P. pastoris*, el cual permite dirigir la integración del vector hacia el locus alcohol oxidasa del cromosoma celular y contiene además, como marcador de selección, el gen HIS-3 de *S. cerevisiae* (ver figura 1), atributo indispensable para lograr la funcionalidad del mismo.

Este vector es linealizado por un sitio Sal-I que se encuentra en el extremo 3' que flanquea el gen AOX-I y, de esta forma, se utilizó para todos los experimentos de transformación.

Sin embargo, las pruebas de estabilidad sirven como criterio para definir si un plasmidio se replica con autonomía o se integra al cromosoma, de acuerdo con su crecimiento en medio no selectivo, al cabo de 10 ó 20 generaciones (Sreekrishna *et al.*, 1987). Además, la inestabilidad es una característica fundamental de los plasmidios replicativos y generalmente está por debajo del 1% al cabo de 10 generaciones en medio no selectivo (Chang y Tye, 1980).

En nuestro trabajo, algunos de los transformantes obtenidos manifestaban el 40% de estabilidad al cabo de 10 generaciones de crecimiento en medio no selectivo (datos no mostrados). La posibilidad de demostrar si el vector se replicaba fue confirmada por análisis de *Southern* (ver figura 2) y se observó que preparaciones de ADN de alto peso molecular de levaduras transformadas digeridas con la endonucleasa de restricción Pst-1, mostraban un patrón de restricción similar al plasmidio replicativo al ser hibridado con el plasmidio pUC-19. Ellos muestran dos bandas, una de 4 kb y la otra de 5,4 kb correspondiente al patrón replicativo del vector.

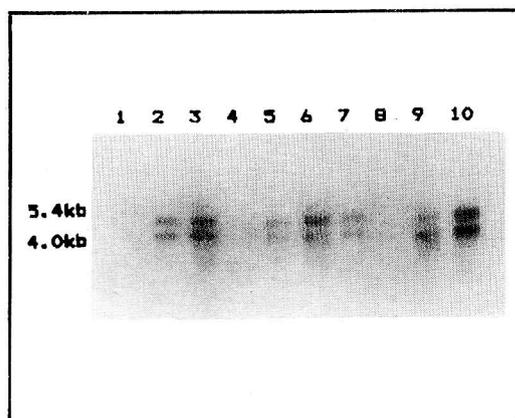


FIG. 2. Análisis por *Southern blot* de algunas colonias transformantes con el vector pFY-85 donde se evidencia el estadio de replicación del mismo:

1) ADN del fago lamda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III; 2, 3, 5, 7 y 10) ADN de algunos clones transformantes; 4 y 8) ADN de una cepa no transformada; 6 y 9) Vector pYF-85.

En todos los casos, el ADN de alto peso molecular de cada una de las cepas transformantes y de las cepas no transformadas, al igual que el vector pYF-85, fue digerido con la endonucleasa de restricción Pst-I.

El plasmidio pUC-18 marcado con alfa ATP se utilizó como sonda de hibridación en este experimento.

No obstante, algunos clones mostraron una estabilidad mucho mayor (más del 96%) y por análisis de *Southern* se demostró que el vector estaba integrado al genoma de *P. pastoris* (ver figura 3). En este caso, el patrón de restricción observado es diferente cuando es comparado con el patrón de restricción mostrado por los clones replicativos, a causa de que al estar integrado el vector en el cromosoma, aparece una señal a la altura de 7,5 kb, correspondiendo esto con el patrón del vector integrativo.

## DISCUSION

Entre los mutantes auxotróficos al aminoácido histidina probados en este trabajo, solo cinco revirtieron el fenotipo *his<sup>-</sup>* al tipo salvaje.

En el trabajo se demostró que el gen HIS-3 de *S. cerevisiae* complementa una mutación *his<sup>-</sup>* de la levadura *P. pastoris*. Estos fenómenos de complementación génica son comunes y ya ha sido demostrado que algunas mutaciones de la biosíntesis de los aminoácidos y bases

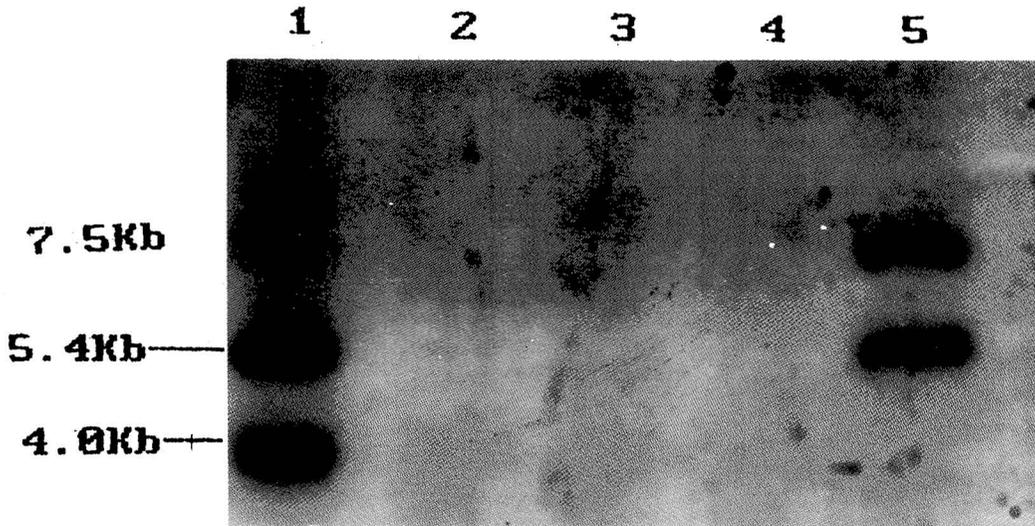


FIG. 3. Análisis por *Southern blot* de colonias transformantes con el vector pYF-85 donde se evidencia la integración del mismo al cromosoma:

1) ADN de alto peso molecular de un clon transformante donde se muestra un patrón de restricción correspondiente a un vector replicativo; 2) ADN del fago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III; 3 y 4) ADN de alto peso molecular de las cepas mutantes *his<sup>-</sup>* MP-29 y MP-36 no transformadas respectivamente; 5) ADN de alto peso molecular de clon transformante donde se muestra un patrón de restricción correspondiente a un vector integrativo.

En este experimento, al igual que en el anterior, el ADN de alto peso molecular se sometió a digestión enzimática con la endonucleasa de restricción Pst-I.

nitrogenadas en *E. coli* son complementadas por genes de levaduras (Ratzkin y Carbon, 1977). También es conocido que algunas mutaciones de la vía biosintética de la histidina en la levadura *S. cerevisiae* se complementan con genes en *Neurospora crassa* (Fink, 1964). En el caso que estudiamos, el gen HIS-3 de *S. cerevisiae* se utilizó como marcador de selección y complementa una mutación his<sup>-</sup> en experimentos de transformación llevados a cabo.

Resulta interesante en nuestro caso que tres de las cinco cepas his<sup>-</sup> estudiadas mostraran una frecuencia de transformación característica de vectores integrativos, como era de esperar en nuestro caso, sin embargo, las cepas mutantes MP-29 y MP-36 mostraron una frecuencia de transformación extremadamente alta (ver tabla 1); la causa de esto puede ser que estos dos tipos de mutantes manifiestan una mutación his<sup>-</sup> de distinta naturaleza. En experimentos de *Southern blot* se demostró que el vector pYF-85 se mantenía en estado replicativo en algunos casos e integraba al cromosoma en otros. Resultados similares han sido obtenidos para otros genes de levaduras (Cregg et al., 1985).

Todos estos resultados permiten suponer la existencia de una actividad ARS probablemente asociada al gen HIS-3 o al fragmento AOX-I de *P. pastoris*\*. Esto no es un fenómeno raro; es conocido que algunos genes manifiestan actividad ARS en *P. pastoris*, como son los genes HIS-4 y Leu-2 de *S. cerevisiae* (Cregg et al., 1985) sin embargo, no existen reportes de la función ARS del gen HIS-3 de *S. cerevisiae* en esta levadura metilotrófica.

No obstante, se conoce que los plasmidios que se replican presentan un alto grado de inestabilidad por no estar sometidos al sistema de distribución celular.

La distribución desigual ocurre relativamente a alta frecuencia (0,2-0,3/división celular) (Clarke y Carbon, 1980), pero en nuestro caso encontramos que el grado de inestabilidad del vector pYF-85 es mucho menor que el reportado para vectores replicativos. Nosotros pensamos que el grado de inestabilidad puede estar relacionado con el fragmento homólogo de 5,5 kb que contiene el gen AOX-I\* o es una propiedad de los vectores replicativos en la levadura *P. pastoris* como ha sido reportado por Cregg et al. (1985).

## REFERENCIAS

- BIRBOIN, H.C y J. DOLY (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-152.
- CLARKE, L. y J. CARBON (1980). Isolation of yeast centromere and construction of functional small circular chromosome. *Nature* 287: 504-509.
- CREGG, J.; M. BARRINGER; K.J. HESSLER y K.R. MADEN (1985). *P. pastoris* as a host system for transformation. *Mol. Cell. Biol.* 5: 3376-3385.
- CHANG, C.S. y B. TYE (1980). Autonomously replicating sequences in *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 6329-6333.
- COUDEREC, R. y J. BARATTI (1980). Oxidation of metanol by the yeast *P. pastoris*. Purification and properties of alcohol oxidase. *Agri. Biol. Chem.* 44: 2279-2289.
- FINK, G.R. (1964). Gene-enzyme relation of histidine biosynthesis in yeast. *Science* 146: 525-527.
- GALZY, P.T. y P.P. SLONIMSKI (1957). Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique au sur glucose comme seule source de carbone. *Comptes rendu* 245: 2423.

\* Manuscrito en preparación.

- HINNEN, A.; J.B. HICKS y G.R. FINK (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 1929-1933.
- MANIATIS, T.; E.F. FRISTCH y J. SAMBROOK (1982). Molecular cloning. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
- ORR-WEAVER, T.L.; J.W. SZOSTAK y R.J. ROTHSTEIN (1981). Yeast transformation a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 6354-6358.
- RAZTKIN, B. y J. CARBON (1977). Functional expression of cloned yeast DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 487-491.
- SREEKRISHNA, K.; J.F. TSCHOP y M. FUKU (1987). Invertase gene (SUC-2) of *S. cerevisiae* as a dominant marker for transformation of *P. pastoris*. *Gene* **59**: 115-125.
- VEENHUIS, M.; J.P. VAN DIJKEN y W. HARDER (1983). The significance of peroxisomes in the metabolism of one carbon compounds in yeast. *Adv. Micro. Physiol.* **24**: 2-12.