

EL GEN *suc 2* DE *Saccharomyces cerevisiae* PRESENTA ACTIVIDAD "ARS" EN LA LEVADURA METILOTRÓFICA *Pichia pastoris*.

Emma Borrego¹, Vladimir Yong² y Julio Delgado²

¹ División Agropecuaria. ² División de Biotecnología Industrial. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), La Habana, Apartado 6162, Cuba.

Recibido en enero de 1993. Aprobado en agosto 1993

Key words: ARS activity, *suc2* gene, *S. cerevisiae*, methylotrophic, *P. pastoris*

SUMMARY

A family of vectors containing *his 3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* yeast as selection marker was used in experiments for *Pichia pastoris* methylotrophic yeast transformation, in order to measure ARS activity on a 2.3 kb fragment containing *Saccharomyces cerevisiae* gene *suc 2*.

Vector pYFSUS2 containing *suc 2* showed a frequency of transformation and a high mitotic unstableness which is a replicant vector feature; however this vector's mitotic unstableness is suppressed when it contains a fragment similar to one of the host.

RESUMEN

Una familia de vectores conteniendo el gen *his 3* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de selección, se utilizaron en experimentos de transformación en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, con el objetivo de evaluar la actividad ARS de un fragmento de 2.3 kb que contiene el gen *suc 2* de *S. cerevisiae*.

El vector pYFSUS2 que contiene el gen *suc 2*, mostró una alta frecuencia de transformación y una gran inestabilidad mitótica, característica de vectores replicativos, sin embargo la inestabilidad mitótica de este vector es suprimida cuando este contiene un fragmento homólogo al genoma del hospedero.

INTRODUCCION

Los elementos de replicación autónoma ARS, actúan como origen de replicación del ADN en células eucariotas (Brewer y Fangman, 1987) y éstos permiten que los plasmidios se mantengan como elementos extracromosomales en levaduras (Stinchcomb *et al.*, 1979). Las secuencias requeridas para la eficiente función de los elementos ARS precisan de un núcleo consenso de 9 a 11 pares de bases ricas en adenina y timina (Kearsey, 1984 y Kimmerley *et al.*, 1987).

Los replicones cromosomales requieren además de secuencias flanqueantes que, al parecer, juegan un papel decisivo en la regulación de la iniciación de la replicación del ADN, estas secuencias, al igual que el núcleo consenso son reconocidas por proteínas que enlazan el ADN (Scott *et al.*, 1989). Estos elementos

son característicos de organismos eucariotas y difieren grandemente del origen de replicación bacteriano, a pesar de que estos últimos presentan también un núcleo rico en adenina y timina. En la levadura *S. cerevisiae* la presencia de actividad ARS en plasmidios incrementa notablemente la frecuencia de transformación de los mismos (Williason *et al.*, 1985). Esta propiedad ha permitido desarrollar una metodología que posibilita el aislamiento y caracterización de replicones cromosomales en dicha levadura. Esta metodología es importante debido a que ha permitido que en trabajos posteriores, llevados a cabo en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se pudieran aislar secuencias con actividad ARS (Cregg *et al.*, 1985).

En experimentos de transformación llevados a cabo en nuestro laboratorio, se evidenció que vectores que contienen el gen *suc 2* de la levadura *S. cerevisiae*, estimulan la frecuencia de transformación de modo similar a vectores que contienen secuencias ARS en su estructura.

En este trabajo nosotros demostramos que un fragmento de 2.3 Kb, que porta el gen *suc 2* de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta actividad de replicación autónoma en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Cepas de bacterias y levaduras

Escherichia coli MC1066 (f⁻, *hsdR*⁻, *hsdM*⁻, *rps1*, *galU*, *galK*, *trpC*, *pyrF*, *leuB600*, *lacX74*, *Kan^r*), se utilizó para todas las transformaciones bacterianas y propagaciones de plasmidios.

Pichia pastoris MP-36 *his⁻* (Yong *et al.*, 1992), fue la cepa utilizada en todos los experimentos de transformación llevados a cabo en este trabajo.

b) Medios y condiciones de cultivos

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio LBA (NaCl 20 g/l, tryptona 10 g/l, extracto de levadura 0.5 g/l, Ampicilina 50 mg/l, pH 7.5).

Las cepas de levaduras se crecieron a 30°C en medio YPG (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l y glucosa 20 g/l) y medio mínimo G (Galzy y Slonimsky, 1957).

c) Preparaciones de plasmidios

Las preparaciones de los plasmidios se realizaron a partir de transformantes de la cepa bacteriana MC1066 siguiendo el método descrito por Maniatis *et al.* (1982). Las minipreparaciones de plasmidios se realizaron de acuerdo al método de Birboin y Doly (1979).

d) Procedimiento de transformación y pruebas de estabilidad mitótica

El procedimiento de transformación y las pruebas de estabilidad mitótica se llevaron a cabo según el método descrito por Cregg *et al.* (1985).

e) Aislamiento de ADN total y análisis por Southern blot

Las células de levaduras transformadas se crecieron en medio mínimo y el aislamiento del ADN y los experimentos de Southern blot se realizaron según el método descrito por Maniatis *et al.* (1982).

f) Análisis de homología de secuencia.

El análisis de homología de secuencia se realizó mediante el empleo del paquete de programas BioSOS descrito por Bringas *et al.* (1992).

RESULTADOS

Plasmidios y construcciones

Todas las construcciones se realizaron en nuestro laboratorio (figura 1) y presentan como marcador común de selección el gen *his 3* de la levadura *S. cerevisiae*. Los vectores pYFSUC 2 y pISUC 2 presentan además el gen *suc 2* de la propia *S. cerevisiae* y la diferencia fundamental entre estos vectores radica en que el vector pISUC 2 porta un fragmento de 5.5 kb que contiene el gen *AOX I* de *P. pastoris*. El vector pYF 85 (Yong *et al.*, 1992) es similar al vector pISUC 2 pero carece del gen *suc 2*.

Los vectores VE II y VE III son muy similares entre sí, solo que el vector VE II contiene un

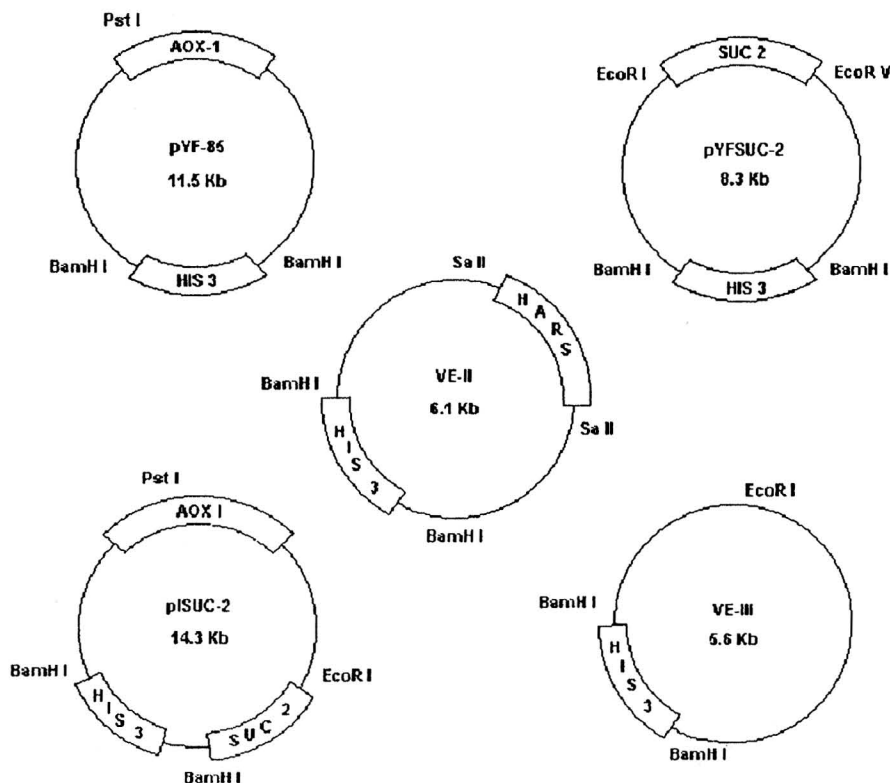


Fig. 1 Familia de vectores utilizados para el estudio de la actividad ARS del gen *suc 2* en la levadura *P.pastoris*. Los vectores pYFSUC 2 y pISUC 2 se utilizaron para evaluar la actividad de replicación autónoma a través de la frecuencia de transformación y de la estabilidad mitótica. El vector pYF 85 contiene el gen *AOX I*, que le sirve como secuencia de integración al hospedero. El vector VE III es un derivado del vector VE II, obtenido por digestión con la endonucleasa de restricción Sal I, la cual permite eliminar el replicón cromosomal de la levadura metilotrófica *H. polymorpha* de su estructura.

fragmento de 500 pb flanqueados por sitios Sall que porta el replicon cromosomal de la levadura metilotrónica *Hansenula polymorpha* (Roggenkamp *et al.*, 1986). Estos vectores, al igual que el vector pYF 85, se utilizaron como controles internos de nuestros experimentos de transformación.

Experimentos de transformación

Los mutantes *his⁻* de *P. pastoris* son incapaces de crecer en medio mínimo si estos carecen de histidina (Yong *et al.*, 1992). Nosotros tratamos de probar en estos experimentos si el gen *suc 2* puede conferirle actividad **ARS** a los vectores que lo contienen. Para probar esta posibilidad la cepa MP-36 *his⁻* de *P. pastoris* se transformó con los vectores presentados anteriormente (figura 1).

De los cinco vectores transformados en esta levadura solamente los vectores pYFSUC 2 y pISUC 2 mostraron una alta frecuencia de transformación, similar a la presentada por vectores replicativos reportados en otros trabajos. Sin embargo, la estabilidad mitótica para ambos vectores es extremadamente diferente (Tabla 1).

Tabla 1
Frecuencia de transformación y porcentaje de estabilidad mitótica de los vectores utilizados en los experimentos de transformación

Vector		Frecuencia de transformación	Estabilidad %
pYFSUC-2	SUC2	1×10^5	1-5
pISUC-2	SUC2	1×10^4	100
pYF-85	HIS3	1×10^2	100
VE-II	HARS1	2×10^2	100
VE-III	HIS3	abortivas	-

Nota: Estos experimentos se utilizaron para cada uno de los vectores utilizados y en todos los casos se utilizaron 10 μ de ADN transformante.

Para el caso del vector pYFSUC 2, la estabilidad mitótica es muy baja y presenta además una gran heterogeneidad en la población de colonias transformantes (colonias grandes y pequeñas), propiedad esta que se le atribuye a los plasmidios replicativos (Haas *et al.*, 1990), en cambio, las colonias transformantes para el vector pISUC 2, son muy estables y además presentan una gran homogeneidad.

Con los vectores pYF 85 y VE II (tabla 1), se logran resultados de frecuencia de transformación y

estabilidad mitótica típica de vectores integrativos, lo cual hace pensar que los mismos se encuentran integrados al cromosoma hospedero. Sin embargo, el vector VE III no funcionó como vehículo de transformación, debido a que las colonias son abortivas, posiblemente debido a la imposibilidad de poder integrarse en el cromosoma hospedero y a la incapacidad de replicarse autónomamente.

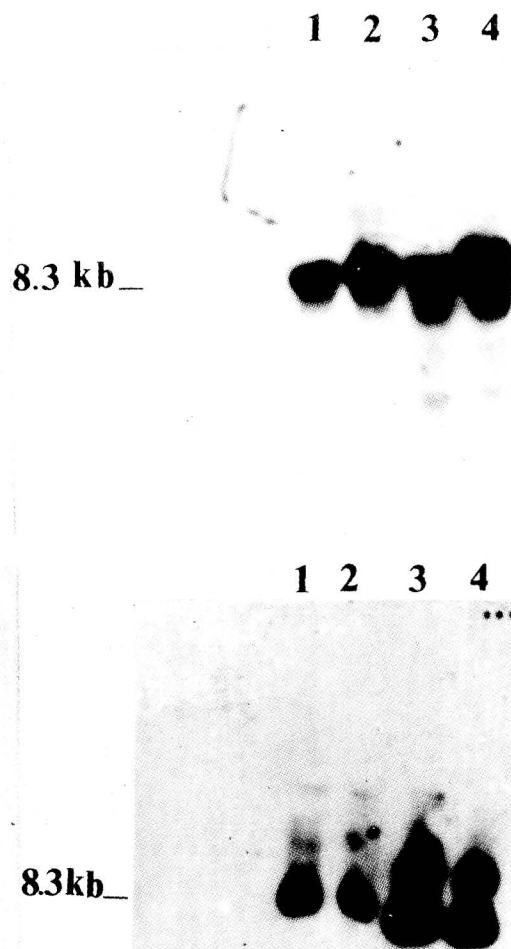


Fig. 2 Análisis de Southern blot de clones transformados con el vector pYFSUC 2. A)- Líneas 1 y 2: vector utilizado como control experimental, digerido con la endonucleasa de restricción Pvu II; líneas 3 y 4: ADN de dos clones transformantes donde se observa una señal de hibridación correspondiente a diferentes isoformas del vector en estadio de replicación autónoma. B)- Líneas 1 y 2: patrón de restricción del ADN de alto peso de clones transformantes digeridos con la endonucleasa de restricción Pvu II, donde se puede apreciar la desaparición de las bandas correspondientes a las diferentes isoformas del vector; líneas 3 y 4: vector pYFSUC 2 nativo. En ambos experimentos se utilizó el gen *suc 2* como sonda para hibridar.

Análisis mediante Southern blot de los clones transformantes para cada uno de los diferentes vectores:

Con el objetivo de verificar los eventos moleculares, ocurridos en los experimentos de transformación, se realizó un análisis mediante Southern blot de diferentes clones transformantes para cada uno de los vectores utilizados en este trabajo.

El estudio se realizó en todos los casos, comparando el ADN de alto peso molecular nativo con los vectores nativos y en otros casos los experimentos se diseñaron comparando diferentes patrones de restricción del ADN cromosomal con los patrones de restricción de los vectores correspondientes.

Los experimentos de Southern blot evidenciaron que todos los vectores probados se encontraban integrados al genoma hospedero, excepto el vector pYFSUC 2 (figura 2), el cual mostró un patrón característico de replicación. En este caso, el vector muestra un bandeo que hibrida a diferentes niveles, separándose del ADN cromosomal y el mismo hibrida a la misma talla del vector nativo. No obstante, se realizó un segundo experimento de Southern blot digiriendo el ADN cromosomal y el vector nativo con la endonucleasa de restricción PVU II (figura 3) y se

observó una banda que migra a la misma altura del vector pYFSUC 2/PVU II (8.1 kb), confirmando que el mismo se encuentra en estado de replicación autónoma en esta levadura.

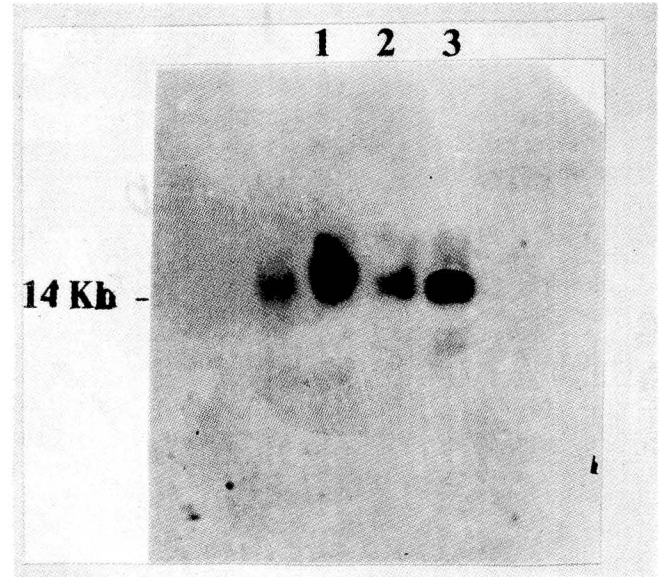


Fig.4 Análisis mediante Southern blot de dos clones integrativos para el vector pISUC 2. En las líneas 1 y 2 se aplicó el ADN nativo de los clones transformados y en la línea 3 se aplicó el vector digerido con la endonucleasa de restricción Sal I. La sonda utilizada en este experimento fue el gen *Suc 2*.

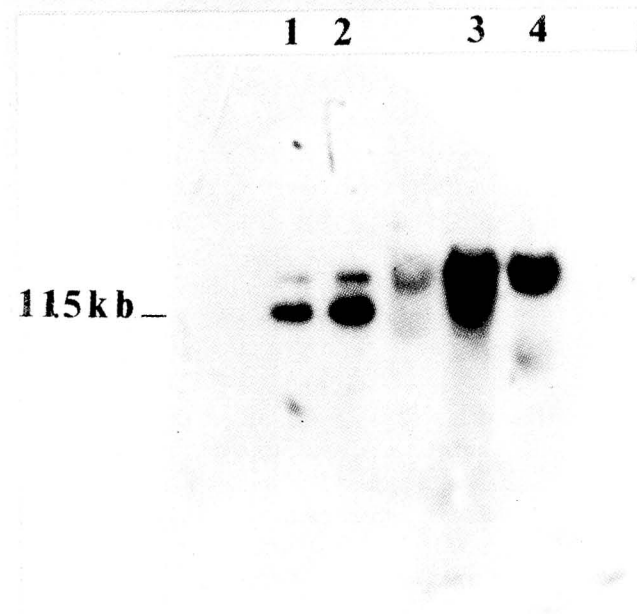


Fig. 3 Southern blot de clones recombinantes para el vector pYF 85. En las líneas 1 y 2 se observa una banda correspondiente al vector linearizado con la endonucleasa de restricción Sal I y en las líneas 3 y 4 se encuentran los ADNs nativos de los clones transformantes. En este experimento se utilizó como sonda el plasmidio pUC 19.

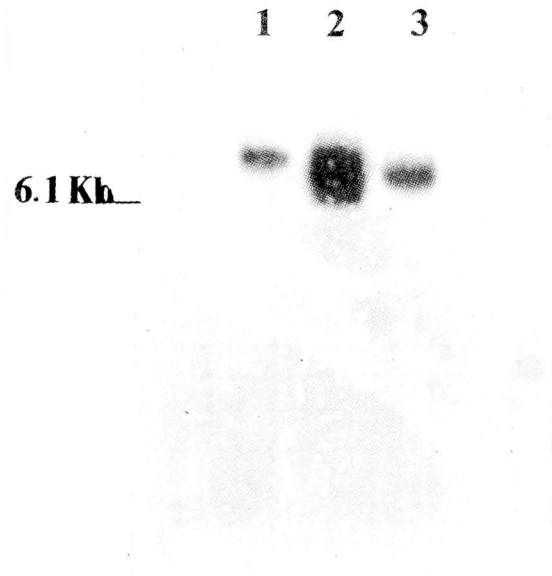


Fig. 5 Experimento de southern blot de dos clones transformados con el vector VE II. En las líneas 1 y 2 se muestran los ADNs de alto peso molecular de ambos clones digeridos con la endonucleasa de restricción EcoRI y en la línea 3 se muestra el vector VE II utilizado como control, digerido con la misma enzima de restricción. La sonda utilizada para la hibridación en este experimento fue el gen *his 3*.

Sin embargo, para los vectores pYF 85 y pISUC 2 se observan señales que se corresponden con el ADN cromosomal (figuras 3 y 4), evidenciándose la integración de los mismos en el genoma de la célula hospedera. En el caso del vector VE II, el ADN de alto peso molecular de los clones transformantes se digirió con la endonucleasa de restricción EcoRI y el patrón de restricción se observa en la figura 5. En este experimento de Southern blot se obtuvo en uno de los clones (línea 2, figura 5) dos bandas que corresponden a tallas de 6.1 kb y 12 kb respectivamente y el otro clon solo presentó una banda. Todo parece indicar que el vector se integra por la región que contiene el ARS de la levadura metilotrófica *H. polymorpha* y que las regiones homólogas a ésta se encuentran distribuidas al azar en el genoma de la célula hospedera.

Análisis de la homología de secuencia

Utilizando la información reportada sobre la secuencia de los diferentes fragmentos de ADN utilizados en este trabajo, comparamos las secuencias ARS de la levadura metilotrófica *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 1985), con las secuencias de los genes *suc 2*, *his 3* y *his 4* de la levadura *S. cerevisiae* y el replicón cromosomal de la levadura *H. polymorpha* que en este trabajo se utilizó como control interno de todos los experimentos.

En la tabla 2, se muestran los resultados y se observa que el porcentaje de homología de los genes probados para cada una de las secuencias con las cuales se compararon se encuentra entre 80 y 90%. Sin embargo, la mayor coincidencia de esta se encuentra localizada en las regiones 3' de los genes probados. El gen *his 4* de *S. cerevisiae* se utilizó en este estudio como secuencia de referencia, debido a que se ha reportado que éste presenta actividad de replicación autónoma en la levadura *P. pastoris* (Cregg *et al.*, 1985).

Tabla 2.

Porcentaje de homología presentado por las diferentes secuencias analizadas en este trabajo.

Secuencia de ADN	% de Homo. ARS I	% de Homo. ARS II	% de Homo. consenso
SUC 2	81.82	81.82	90.91
HIS 3	-	90.91	81.82
HIS 4	90.91	81.82	81.82
HARS I	72.73	63.64	72.73

El análisis de la homología de 34 secuencia se realizó mediante el uso del paquete de programas BioSOS como se ha descrito en materiales y métodos. Las secuencias ARS I, ARS II y la región consenso han sido reportadas por Cregg *et al.* (1985).

Sin embargo, el fragmento de ADN que contiene el replicón cromosomal de la levadura *H. polymorpha* presentó un porcentaje de homología entre 63.64 y 72.73%, lo cual es muy bajo comparado con el porcentaje presentado por las otras secuencias analizadas.

En cambio este replicón presenta probablemente una alta homología con algunas regiones del cromosoma hospedero, lo cual permite que el vector VE II se comporte como un sistema integrativo.

DISCUSION

Con el objetivo de evaluar que el gen *suc 2* de la levadura *S. cerevisiae* presenta actividad ARS en la levadura metilotrófica *P. pastoris* se construyeron cinco vectores que contienen como marcador común el gen *his 3* de *S. cerevisiae*.

En los experimentos de transformación se evidenció que las células transformadas con los vectores pYFSUC 2 y pISUC 2 (figura 1), mostraron una frecuencia de transformación superior al resto de los vectores utilizados en el trabajo (Tabla 1). Todo esto hace pensar que es posible que el gen *suc 2* contenga alguna secuencia que de algún modo simule un origen de replicación en la levadura *P. pastoris*.

La diferencia entre los vectores anteriores radica en que el vector pISUC 2 contiene además del gen *suc 2*, un fragmento de ADN que incluye el gen AOX I; y en este caso la frecuencia de transformación de este vector es un orden menor que para el vector pYFSUC 2. Sin embargo, a pesar de esta alta frecuencia de transformación que se manifiesta en la transformación con el vector pISUC 2, el mismo se encuentra integrado al cromosoma hospedero, como se demostró a través de las pruebas de estabilidad mitótica y de experimentos de Southern blot. Evidentemente la presencia del fragmento que contiene el gen AOX I suprime de algún modo la actividad replicativa de este plasmidio, probablemente debido a que el propio gen *suc 2* presenta solamente una débil actividad replicativa, como se evidencia en los experimentos de estabilidad mitótica. En cambio es sabido que los vectores que contienen ARS manifiestan su actividad aún cuando éstos contienen secuencias homólogas en su estructura (Struhl *et al.*, 1979), o sea, la función replicativa es dominante sobre la función recombinogénica. Sin embargo Cregg *et al.*, 1985, aislaron secuencias en la levadura *P. pastoris* con actividad ARS que estimulan la frecuencia de transformación, pero estos vectores integran en el cromosoma antes de las 20 generaciones, debido probablemente a ineficiencias de éstas como origen de replicación del ADN. Sin embargo, las

secuencias ARS 1 y ARS 2 de la levadura *P. pastoris* presentan porcentos de estabilidad de 48 y 59% repectivamente (Cregg *et al.*, 1985), o sea valores muy superiores a los mostrados por el vector pYFSUC 2 en este trabajo.

Los otros vectores utilizados en este trabajo sólo funcionan como controles de nuestros experimentos y permitieron evidenciar que las otras secuencias utilizadas en nuestro trabajo no introducen interferencias en nuestros resultados. La presencia del gen AOX I en el vector pYF 85 permite que éste se comporte como un vector integrativo (Yong *et al.*, 1992). En cambio el vector VE II que contiene el ARS de la levadura metilotrófica *H. polymorpha* y que se utilizó como control interno en los estudios de homología de secuencias, se comportó inesperadamente como un vector integrativo, donde los eventos de recombinación ocurren en sitios que se encuentran distribuidos al azar en todo el genoma de la célula hospedera y que parece ser que contienen una alta homología con las secuencias ARS de *H. polymorpha* (figura 5).

Sin embargo, la evidencia más clara de la integración del vector VE II por la secuencia ARS, es la falta de funcionalidad del vector VE III, que es un derivado del vector VE II (figura 1) y como se ha visto anteriormente, produce colonias abortivas en *P. pastoris*.

El análisis de la homología de secuencias no permite predecir en modo alguno que secuencias ricas en adenina y timina e incluso secuencias que contengan el núcleo consenso de las secuencias ARS puedan funcionar como orígenes de replicación del ADN. Además, es importante decir que todos los genes analizados en nuestro estudio presentan en diferentes regiones de los mismos hasta un 90% de homología con los ARS de *P. pastoris* y solo el HARS 1, de la levadura *H. polymorpha*, presentó niveles de homología inferiores a estos valores (Tabla 2). Sin embargo a pesar de que existen secuencias con porcentos de homología muy similares, sólo el gen *suc 2* es el fragmento de ADN que presenta actividad ARS. Esto permite afirmar que no solo la región consenso es importante y suficiente, sino que se requiere que estén presentes otras secuencias necesarias para la funcionalidad de las mismas como ARS (Umek *et al.*, 1989).

En experimentos posteriores se podrá definir exactamente que región del gen *suc 2* es realmente responsable de esa actividad, probablemente la región 3' del gen esté involucrada en la misma debido a que precisamente es en ésta región, donde se

encuentran distribuídas todas las regiones que presentan una alta homología con las secuencias ARS de *P. pastoris*.

REFERENCIAS

- BIRBOIN, H.C. and J. DOLY (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7:1513-1523.
- BREWER, B.J. and W.L. FANGMAN (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 51:463-471.
- BRINGAS, R.; R. RICARDO; J.F. COSSIO; M.E. OCHAGAVIA; A. SUAREZ and R. RODRIGUEZ (1992). BioSOS: A program package for the analysis of biological sequences in the microcomputer. *Biotecnología Aplicada*. 9:180-185.
- CREGG, J.M., J. KEVIN; J. BARRINGER; Y. ANITA; H. HESSLER and NUT R. MADDEN (1985). *Pichia pastoris* as a host system for transformation. *Mol. Cell. Biol.* 5:3376-3385.
- GALZY, P.T. and P.P. SLONINSKY (1957). Variations physiologiques de la levure au course de la croissance sur l'acides lactiques au sur glucose comme seule source de carbone. *Comte Rendu*. 245:2423-2433.
- HAAS, L., J. CREGG and M. GLEESON (1990). Development of an integrative DNA transformation system for the yeast *Candida tropicalis*. *J. Bacteriol.* 172:4571-4577.
- KEARSEY, S. (1984). Structural requirements for the function of yeast chromosomal replicator. *Cell*. 37:299-307.
- KIMMERLY, W.J. and J. RINE (1987). Replication and segregation of plasmids containing cis-acting regulatory sites of silent mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae* are controlled by SIR genes. *Mol. Cell. Biol.* 7:4225-4237.
- MANIATIS, T., E.F. FRISTCH and J. SAMBROOK (1982). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- OGGENKAMP, R., H. HANSEN; M. ECKART; Z. JANOWICZ and C.P. HOLLENBERG (1986). Transformation of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. *Mol. Gen. Genet.* 202:302-308.
- SCOTT, S. WALKER, STEPHEN C. FRANCESCO, BIK-KWON TYE and SHLOMO EISEMBERG (1989). The OBF 1 protein and its DNA binding site are important for the function of an autonomous replication sequence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 9:2914- 2921.
- STINCHCOMB, D.T.; K. STRUHL and R.W. DAVIS (1979). Isolation and characterization of the yeast chromosomal replicator. *Nature* 282:39-43.
- STRUHL, K.; D.T. STINCHCOMB; S. SCHERER and R.W. DAVIS (1979). High frequency of transformation of yeast: Autonomous replication in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77:1035-1039.
- UMEK, R.; M. MAARTEN; M.K. LINSKENS; D. KOWALSKI and J. HUBERMAN (1989). New beginnings in studies of eukaryotic DNA replication origins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1007:1-14.
- WILLIAMSON, D.H. (1986). Genomic instability in microorganism. *Fifth International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganism*.
- YONG, V.; M.E. GONZALEZ; L. HERRERA y J. DELGADO (1992). El gen *his 3* de *Saccharomyces cerevisiae* complementa una mutación *his⁻* de *Pichia pastoris*. *Biotecnología Aplicada*. 9:55-61.