

# Expresión del gen dex en la levadura *Kluyveromyces lactis*

Carmen E Gómez, Javier J Menéndez, y Bianca M García

División de Biotecnología Industrial, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfonos: (53-7) 21 6022, 21 8164, Fax: (53-7) 21 8070. E-mail: dextranasa@cigb.edu.cu

## ABSTRACT

In this study, the expression and secretion of dextranase enzyme from the fungus *Penicillium minioluteum* in the non-conventional yeast *Kluyveromyces lactis*, was evaluated. The cDNA encoding this protein with its own signal peptide was integrated into the genome of *K. lactis* strain MW105-2A under the control of the *LAC4* promoter. Dextranase was detected by the hydrolysis of blue dextran added to solid growth medium and the enzymatic activity was determined colorimetrically by the DNSA method. Dextranase was efficiently expressed and secreted in this yeast. The obtention of this construction constitutes the first step in the use of dextranase-encoding gene as reporter in gene expression studies in the yeast *K. lactis*.

Keywords: dextranase, gene expression, *Kluyveromyces lactis*, *Penicillium minioluteum*

*Biotecnología Aplicada* 1999;16:97-102

## RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó la expresión y secreción de la enzima dextranasa del hongo *Penicillium minioluteum* en la levadura no convencional *Kluyveromyces lactis*. El ADN complementario que codifica la proteína con su propia secuencia señal, se integró en el genoma de la cepa MW105-2A de *K. lactis* bajo el control del promotor del gen *LAC4*. La presencia de la enzima dextranasa se detectó por la formación de halos de hidrólisis en placas que contienen dextrana azul, y la actividad enzimática se determinó de forma colorimétrica mediante el método del DNSA. Esta enzima se expresó y secretó eficientemente en esta levadura, lo que constituye el primer paso para el empleo del gen codificante de esta enzima como reportero en estudios de expresión génica en *K. lactis*.

Palabras claves: dextranasa, expresión génica, *Kluyveromyces lactis*, *Penicillium minioluteum*

## Introducción

Uno de los métodos más empleados para el estudio de la expresión génica en levaduras, es la fusión de la región promotora de interés a un gen reportero, el cual debe codificar una proteína que sea detectada fácilmente. Entre los genes reporteros utilizados más frecuentemente en estos microorganismos, se encuentra el gen *lacZ* de *Escherichia coli*, que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa [1, 2]. Esta enzima tiene varias ventajas que la hacen atractiva como reportera en el estudio de la expresión génica: primero, el gen y su producto están bien caracterizados, tanto genética como bioquímicamente [2]; segundo, existen ensayos que emplean sustratos disponibles comercialmente, incluyendo algunos que permiten la visualización de la actividad enzimática *in situ*.

No obstante, esta enzima no es ideal en todos los sistemas. Por ejemplo, en el caso de la levadura *Kluyveromyces lactis*, los niveles endógenos de actividad  $\beta$ -galactosidasa son lo suficientemente altos como para impedir la detección de la  $\beta$ -galactosidasa química por métodos enzimáticos.

Otro de los genes que se han empleado como reporteros para el estudio de la expresión génica, es el que codifica la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT). En la mayoría de los eucariotas existe una actividad CAT endógena muy baja, pero los ensayos enzimáticos suelen ser muy caros [3].

La enzima dextranasa (EC 3.2.1.11,  $\alpha$ -1,6-glucano  $\alpha$ -D-6-glucanohidrolasa) hidroliza los enlaces glicosídicos  $\alpha(1\rightarrow6)$  dentro de la molécula de dextrana. El ADNc codificante de esta enzima de 67 kDa fue aisla-

do por García y colaboradores [4]. Por otra parte, Roca y colaboradores [5] reportaron el aislamiento y la secuenciación de este gen, al que denominaron *dex*. La secuenciación del clon genómico mostró que, a diferencia de lo que ocurre en otros genes aislados de hongos, el gen *dex* no contiene intrones. Además, este gen se expresó eficientemente en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* [5]. Este resultado sugirió el posible empleo del gen codificante de esta enzima como reportero en el estudio de la expresión génica en levaduras.

Otra de las ventajas que presenta el empleo del gen *dex*, es que los sustratos de la enzima dextranasa son solubles en agua y están disponibles comercialmente. También, al secretarse esta enzima en el medio de cultivo, es posible realizar el ensayo de actividad en placas de medio sólido mediante el empleo de un sustrato cromogénico, la dextrana azul. La actividad enzimática se evidencia por la formación de halos de hidrólisis.

La levadura no convencional *Kluyveromyces lactis* es ampliamente utilizada en la expresión de proteínas heterólogas por su capacidad secretora y su crecimiento fácil en sustratos baratos como el suero de leche [6, 7].

En el presente trabajo se reporta la expresión y secreción eficiente al medio de cultivo de la dextranasa proveniente del hongo *Penicillium minioluteum* como primer paso en la construcción de vectores que permitan el estudio de la expresión génica en esta levadura mediante el empleo del gen *dex* como reportero.

1. Lis JT, Simon JA, Sulton CA. New heat shock puts and beta-galactosidase activity resulting from transformation of *Drosophila* with an *hsp70-lacZ* hybrid gene. *Cell* 1983;35:403-10.

2. Beckwith JR, Zipser D. The lactose operon. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory; 1970.

3. Gorman CM, Moffatt LF, Howard BH. Recombinant genomes which express chloramphenicolacetyltransferase in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1982; 2:1044-51.

4. García B, Margolles E, Roca H, Mateu D, Raíces M, González ME, et al. Cloning and sequencing of a dextranase-encoding cDNA from *Penicillium minioluteum*. *FEMS Microbiol Lett* 1996;143:175-83.

5. Roca H, García B, Rodríguez E, Mateu D, Coroas L, Cremata J, et al. Cloning of the *Penicillium minioluteum* gene encoding Dextranase and its expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* 1996;12:1187-200.

6. Van der Berg JA, van der Laken KJ, van Ooyen AJJ, Renniers TCHM, Rietveld K, Schaap A, et al. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression. Expression and secretion of prochymosin. *Biotechnology* 1990;8:135-9.

7. Gellisen G, Hollenberg CP. Application of yeast in gene expression studies: a comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis*- a review. *Gene* 1997; 190:87-97.

## Materiales y Métodos

### Cepas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas de bacterias y levaduras, así como los plásmidos empleados en este estudio, se muestran en la Tabla 1. Las cepas de bacterias utilizadas en la propagación de las construcciones genéticas, se crecieron en medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,2 M) suplementado con ampicilina (50 mg/ml.). Las cepas de levaduras se crecieron en medio rico YP (extracto de levadura 1% y peptona bacteriológica 2%) suplementado con glucosa 2% (YPD) o lactosa 1% (YPL). En la selección y manipulación de los transformantes, se empleó el medio mínimo YNB (*Yeast Nitrogen Base*) suplementado con glucosa 2%. Para la preparación de los medios sólidos, se adicionó agar técnico a los medios líquidos.

### Métodos de ADN recombinante

Todas las técnicas rutinarias de manipulación del ADN se realizaron según Sambrook y colaboradores [11]. El marcaje de ADN para los experimentos de hibridación, se realizó de acuerdo a las especificaciones del juego de reactivos de Boehringer Mannheim, que se basa en los resultados de Feinberg y Volgelstein [12], y utilizando [ $\alpha^{32}$ P]dATP (> 3000 Ci/mmol, Amersham, Reino Unido) como nucleótido radiactivo. Las sondas empleadas fueron el ADNc que codifica la dextranasa, extraído del plásmido pBDEX mediante digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, o un fragmento de 300 pb del gen de la lactasa de *K. lactis*, extraído del plásmido pK16 mediante digestión con la enzima de restricción *HindIII*. Para los experimentos de Southern blot, el ADN total se separó electroforéticamente en geles de agarosa a 0,6% y se transfirió a membranas de Hybond-N (Amersham, Reino Unido), y las hibridaciones se realizaron durante toda la noche a 42 °C en una solución que contiene SSC 6X, Denhardt's 5X, SDS 0,5%, formamida 50% y ADN de esperma de salmón 200 µg/mL, previamente desnaturado a 95 °C. Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces a temperatura ambiente en una solución de SSC 2X, SDS 0,1%, y una vez en una solución de SSC 0,2X y SDS 0,1% a 65 °C. El ADN genómico de levadura se purificó de acuerdo con el protocolo descrito por Rothstein [10].

### Construcción del vector de expresión en *K. lactis* pGKC1-DEX

El fragmento de ADN codificante de la dextranasa se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utilizándose el plásmido pBDEX como molde, la enzima *Taq* ADN polimerasa y los oligonucleótidos D2 (5'-CATGCTAAAGCTAC TTGCGTTGA-3') y D5 (5'-GGAAACCTG GAAATGTCCTTAT-3'). La reacción de PCR se llevó a cabo durante 30 ciclos de desnaturalización (30 s a 94 °C), hibridación (30 s a 60 °C) y extensión (2 min a 72 °C). El producto de la RCP se fosforiló en los extremos empleando la enzima T4 PNK (Boehringer Mannheim, Alemania) y se ligó al vector pGKC1 [13], para dar lugar al plásmido pGKC1-DEX. Previo a la ligación con el gen *dex*, el plásmido pGKC1 se digirió con la enzima *HindIII*, seguido de tratamiento con la nucleasa Mung bean durante 1 h a 25 °C y por último, se desfosforilaron

Tabla 1. Cepas y plásmidos empleados en este trabajo.

Cepas	Genotipo o fenotipo	Referencias
<i>E. coli</i> MC 1061	<i>HsdR mcrB araD139 Δ(araABC-leu) 7679ΔlacX74 galU galK rpsL thi his3</i>	8
<i>K. lactis</i> MW 105-2A	Mutante <i>ura3<sup>-</sup></i>	Cepario CIGB
<i>K. lactis</i> MW DEX	Productora de dextranasa	Este trabajo
Plásmidos		
pK16	LAC4	9
pGKC1	Ap <sup>r</sup> URA3	10
pBDEX	ADNc de la dextranasa en el plásmido pBluescript SK(-)	4
pGKC1-DEX	El gen <i>dex</i> en el plásmido pGKC1	Este trabajo

los extremos con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim, Alemania).

### Transformación de *K. lactis* y selección de los clones productores de dextranasa

Para la transformación de la levadura *K. lactis*, se emplearon alrededor de 5 µg del plásmido pGKC1-DEX, digerido previamente con la enzima *PvuII*. La transformación se llevó a cabo mediante electroporación [14] en cubetas de 0,2 cm. Las condiciones de electroporación fueron las siguientes: 4,5 kV/cm, 25 µF y 400 Ω durante 11 ms. Inmediatamente después de la aplicación del pulso eléctrico, se adicionó 1 mL de sorbitol 1M frío a la suspensión celular y los transformantes URA3<sup>+</sup> se seleccionaron en placas de medio mínimo YNB [15] con glucosa 2%. De los transformantes obtenidos, se transfirieron 21 a placas de medio mínimo suplementado con glucosa 2% o lactosa 1%, y en ambos casos se adicionó dextrana azul 0,4%. Las placas se incubaron durante toda la noche a 28 °C hasta que aparecieron halos de hidrólisis de la dextrana alrededor de las colonias.

Finalmente, se seleccionaron tres de los transformantes para realizar estudios de expresión. Estos clones se inocularon en 5 mL de medio YPD líquido y se crecieron a 28 °C durante toda la noche. A partir de estos precultivos, se inocularon independientemente 200 mL de medio YPD, los que a su vez sirvieron de inóculo para un fermentador Biolafite de 4,5 L de volumen efectivo. La fermentación se mantuvo durante 90 h a 30 °C, 1,5 v/v/m de aereación, 600 rpm de agitación y pH 5,4. Cada 24 h se adicionó lactosa 1% como inductor.

### Preparación de los extractos celulares y determinación de la actividad dextranasa

Las células se colectaron por centrifugación del cultivo fermentado y el sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad de la enzima secretada al medio de cultivo. Del sedimento se pesaron 400 mg, se lavaron dos veces con agua destilada, se resuspendieron en 400 µL de tampón de ruptura (NH<sub>4</sub>Ac 20 mM pH 5, EDTA 5 mM y PMSF 2 mM) y se adicionaron 400 mg de perlas de vidrio (0,3 mm) esterilizadas. La ruptura se realizó mediante agitación rigurosa en vórtex cuatro veces durante 1 min, con reposo de 1 min en hielo entre golpes. Posteriormente, se centrifugó a 500 rpm (Himac Centrifuge, Hitachi<sup>®</sup>, Japón) para separar las perlas de vidrio, el sobrenadante se pasó a otro tubo y las perlas se lavaron con 50 µL adicionales de tampón de ruptura. Por último, se centrifugó a 15 000 rpm (Himac Centrifuge, Hitachi<sup>®</sup>, Japón) durante 10 min para separar el

8. Meissner PS, Sisk WP, Berman ML. Bacteriophage λ cloning system for the construction of directional cDNA libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:4171.

9. Dickson RC, Markin JS. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of a yeast gene coding for β-galactosidase. *Cell* 1978;15:123-30.

10. Rothstein R. Cloning in yeast. In: Glover DM, editor. *DNA Cloning* Vol II. Oxford: IRL Press; 1985. p.45-6.

11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

12. Feinberg AP, Volgelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;137:6-13.

13. García C. *Kluyveromyces lactis* como hospedero para la producción de proteínas heterólogas. Clonación y estudio de expresión de dos proteínas estructurales del virus de la hepatitis B. [disertación]. La Habana (Cuba): Instituto Superior de Ciencias y Tecnologías Nucleares; 1993.

14. Becker DM, Guarente L. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in Enzymol* 1991;194:182-7.

15. Galzy P, Slonimsky PP. Variation de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique ou sur glucose comme source de carbone. *CR Acad Sci Paris* 1975;245:2423-7.

sobrenadante de ruptura del sedimento. Para las determinaciones de la actividad enzimática, se pesaron 100 mg del sedimento de ruptura, se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada.

La actividad dextranasa se determinó según Kosaric y colaboradores [16]. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de azúcar reductor, expresada en micromoles, liberada en 1 min a pH 5 y 40 °C. Los azúcares reductores se determinaron por la reacción con el ácido dinitrosalicílico (DNSA) [17], de la siguiente manera: a 100 µL de muestra se le añadieron 400 µL de tampón acetato de sodio 50 mM pH 5,2 y 500 µL de dextrana T-2000 2,5% (Farmacia, Estados Unidos). Se incubó 10 min a 40 °C y se inactivó la enzima mediante calentamiento durante 5 min a 100 °C. Luego, se añadió 1 mL de DNSA y se incubó 10 min a 100 °C para desarrollar el color. Finalmente, se determinó la absorbancia a 546 nm contra un blanco formado por sustitución de la muestra por 100 µL de tampón acetato. Paralelamente, se prepararon controles para determinar la cantidad de azúcares reductores presentes inicialmente en las muestras; en este caso, se adiciona la dextrana después de inactivada la enzima y se continúa el procedimiento igual que para las determinaciones de actividad enzimática.

### Western blot

El método de Western blot se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Towbin y colaboradores [18]. La electroforesis en geles de poliacrilamida (12,5%) se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del manual de protocolos de Promega (Estados Unidos) [19]. Una vez realizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham, Reino Unido), utilizando el sistema *Mighty Small Transunit* (Hofer Scientific Instrument, CA, Estados Unidos) a una corriente constante de 300 mA por 2 h. Para la preparación de las muestras, se tomó 1 mL del sobrenadante de cultivo, se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min y se desechó el sedimento. Al sobrenadante se le adicionaron 16 µL de desoxicolato de sodio 2% preparado al momento, se agitó y se incubó en hielo durante 15 min. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% y se agitó por inversión. Posteriormente, se centrifugó a 15 000 rpm durante 30 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 660 µL de TCA 8% (v/v) y luego con acetona, se secó y se resuspendió en 10 µL de EDTA 50 mM pH 8. En la electroforesis se aplicó todo el volumen, el cual corresponde a 1 mL del sobrenadante del cultivo inicial.

Las muestras del sobrenadante y del sedimento de ruptura, se prepararon como se describió anteriormente, pero a partir del sedimento de la centrifugación del cultivo original. Para la electroforesis en gel de poliacrilamida (12,5%) se tomaron 15 µL, equivalentes a 0,3 mL del volumen del cultivo inicial.

## Resultados y Discusión

### Transformación de *K. lactis* con el vector pGKC1-DEX y selección de los transformantes

Con el objetivo de fusionar el ADNc codificante de la dextranasa al promotor y al terminador del gen *LAC4* de *K. lactis*, se construyó el plásmido pGKC1-DEX. En

esta construcción se empleó como señal de secreción la del propio gen que codifica la dextranasa (Figura 1).

La frecuencia de transformación de la levadura se ve estimulada cuando los plásmidos integrativos utilizados se linealizan con una enzima de restricción que permita dirigir la integración al locus cromosomal de interés, lo que favorece el evento de recombinación [20]. Van der Berg y colaboradores [6] reportaron la expresión de la proquimosina bovina mediante el empleo de plásmidos integrativos linealizados con la enzima *SacII*, que corta en un sitio único presente en el promotor. En el caso que se reporta, no se pudo aplicar este mismo esquema de integración por la carencia de un sitio único en la región promotora del gen *dex* en el plásmido pGKC1-DEX. Por tal motivo, se digirió con la enzima *PvuII* que corta a ambos lados del fragmento de expresión, de forma tal que esta construcción genética integra en el genoma de *K. lactis* de acuerdo con el modelo de reemplazamiento génico de Rothstein [21]. Este modelo predice una gran estabilidad del ADN integrado y la pérdida de la información en el locus de integración.

Una vez realizada la digestión del plásmido pGKC1-DEX, la banda de 5,3 kpb que contiene el fragmento de expresión se empleó para transformar la cepa MW 105-2A, y se seleccionaron los transformantes por su capacidad de crecer en placas de medio mínimo carente de uracilo. De los transformantes obtenidos, se aplicaron 21 sobre placas que contenían medio selectivo suplementado con glucosa o lactosa como fuente de carbono, y dextrana azul como sustrato de la enzima para la identificación de los transformantes con actividad dextranasa.

Las placas se incubaron a 28 °C y al cabo de las 6 h se observaron zonas de aclaramiento alrededor de algunas colonias producto de la hidrólisis del sustrato por la dextranasa (Figura 2). Como la dextrana azul es un polímero de elevado peso molecular ( $2 \times 10^6$  g/mol) que no puede entrar a la célula, el hecho de encontrar actividad enzimática implica que la proteína se está secretando al

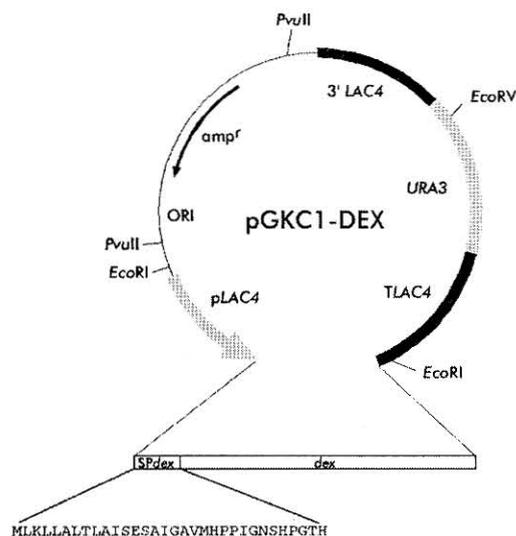


Figura 1. Esquema del plásmido pGKC1-DEX en el que el gen *dex* de *P. minioluteum* se fusionó al promotor *LAC4* de *K. lactis*. El plásmido se digirió con la enzima *PvuII*, previo a la transformación.

16. Kosaric N, Yu K, Zajic JE. Dextranase production from *Penicillium funiculosum*. *Biotech Bioeng* 1973;15:729-41.

17. Miller GL. Use of dinitrosalicilic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal Chem* 1959;31:426-8.

18. Towbin HT, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets, procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.

19. Promega protocols and applications guide. Promega corporation, 1991.

20. Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K, Romanos MA. High level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strain containing multiple tandem integrations of the gene. *Bio/Technology* 1991;9:455-60.

21. Rothstein RJ. *Method Enzymol* 1983; 101:202-11.

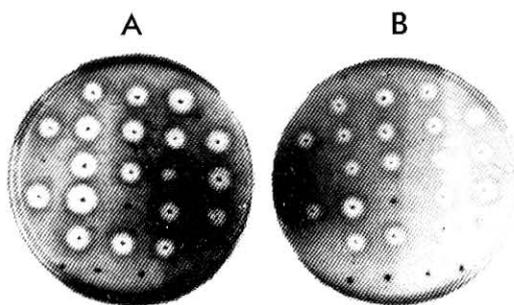


Figura 2. Análisis de los transformantes que contienen el plásmido pGKC1-DEX en placas de medio mínimo YNB, empleando lactosa (A) o glucosa (B) como fuente de carbono. En ambos casos, se adicionó dextrana azul 0,4% a cada placa, lo que permitió visualizar la actividad enzimática a través de la formación de halos de hidrólisis alrededor de las colonias que expresan y secretan correctamente la enzima. En la parte inferior de la placa, aparecen cuatro colonias que se emplearon como control negativo, y que se corresponden con una construcción integrativa que porta el gen de la insulina.

medio de cultivo o que se libera producto de autólisis celular. Como control negativo del experimento, se emplearon transformantes de la cepa MW 105-2A que contienen el plásmido pGKC1. En ninguno de ellos se observó actividad dextranasa. Curiosamente, la actividad que se encontró en algunos transformantes pudo ser detectada, tanto en placas que presentan el inductor, como en las que contienen glucosa, aunque la actividad fue mayor en las primeras. Este resultado evidenció que en la cepa empleada no se manifiesta la represión por glucosa sobre el gen *LAC4* al mismo nivel que en otras cepas hospederas de *K. lactis* [6]. Callejo reportó un resultado similar en la expresión de la proquimosina bovina utilizando la cepa CBS 683 del mismo hospedero [22].

**Análisis del evento de integración**

Con el objetivo de determinar el tipo de integración en el genoma de *K. lactis* que presentan los transformantes estudiados, se realizó un análisis de nueve de ellos mediante Southern blot. La Figura 3 muestra los tipos de integración que pueden producirse al introducir el ADN plasmídico en la célula hospedera. La Tabla 2 resume las tallas de las bandas que deben obtenerse en cada caso con el empleo del gen de la dextranasa o de la lactasa como sondas.

Para analizar el patrón de integración presente en cada uno de los transformantes, el ADN total extraído de cada uno de ellos se digirió con la enzima de restricción *KpnI*. Todos los transformantes analizados muestran una banda de 4,3 kpb al hibridar con el gen *dex* (Figura 4A). En la carrilera 2, aparece la banda utilizada como control positivo de hibridación, correspondiente al plásmido pGKC1-DEX digerido con la enzima *PvuII*. En la carrilera 11, se aprecia el ADN total de la cepa hospedera utilizado como control negativo, sin que se detecte señal alguna. En este caso se observa una sola banda, pues el sitio *KpnI* presente en el gen *dex* se encuentra muy próximo al extremo 5' (Figura 4). Con este experimento se evidenció que el gen *dex* se integró en el genoma de la levadura, pero no puede determinarse el tipo de integración que ocurrió.

Para discriminar entre un evento de simple y uno de doble recombinación, los filtros con el ADN fijado

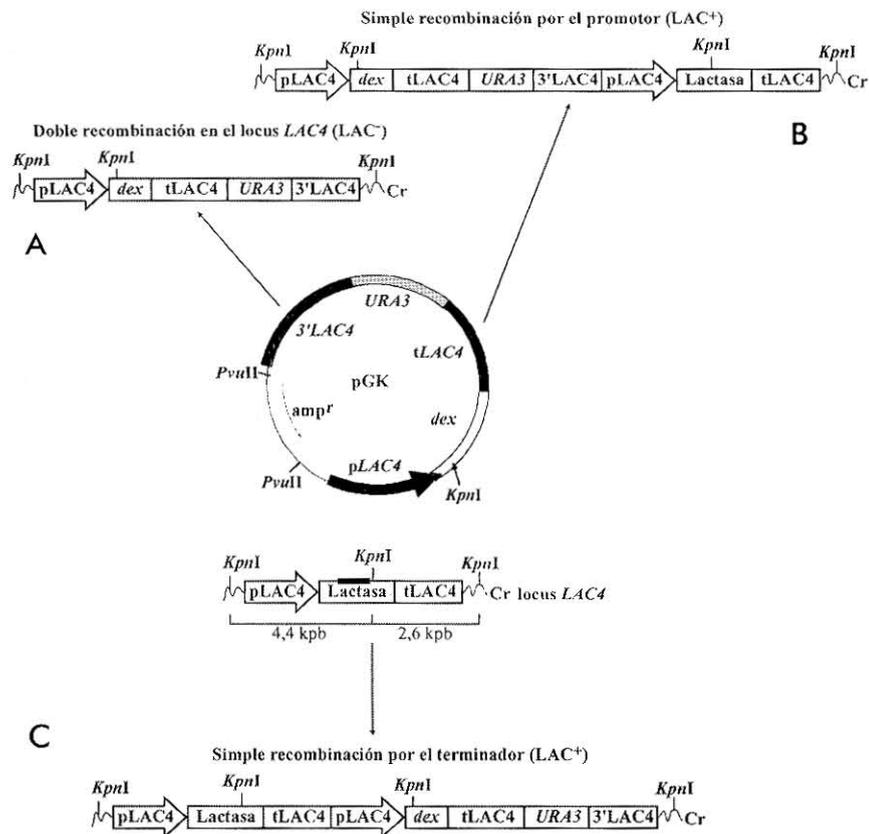


Figura 3. Esquema del vector de expresión pGK de *K. lactis* y eventos de integración más probables que pueden ocurrir en el locus *LAC4*. (A) Integración por doble recombinación. (B) Integración por simple recombinación en el promotor. (C) Integración por simple recombinación en el terminador. La banda reforzada que se señala en el locus cromosomal *LAC4*, representa el fragmento *HindIII* de 300 pb empleado como sonda radiactiva en los experimentos de Southern blot.

se hirvieron en una solución de SDS 0,1% y se dejaron a temperatura ambiente hasta que descendió a 50 °C. Posteriormente, se utilizaron para hibridar con una sonda de 300 pb correspondiente a la región central del gen codificante de la lactasa. Esta sonda se obtuvo mediante digestión del plásmido pK16 con la enzima de restricción *HindIII*, la cual no incluye ni al promotor ni al terminador del gen presentes en el plásmido pGKC1-DEX. Como se observa en la Figura 4B, en todas las líneas aparece una banda de 4,4 kpb que no difiere en intensidad cuando se compara con el ADN de la cepa salvaje (carrilera 11), lo que descarta la posibilidad de que el fragmento de expresión se haya integrado por doble recombinación con la consiguiente pérdida del locus *LAC4*. Con este resultado, también se descarta un evento de simple recombinación por la región promotora, lo que deja solamente la posibilidad de que el fragmento de interés se haya integrado

22. Callejo M. Expresión de proquimosina bovina en *Kluyveromyces lactis*. [disección]. Ciudad de La Habana: Universidad de La Habana; 1992.

Tabla 2. Tallas obtenidas al hibridar el ADN cromosomal de los transformantes de *K. lactis* con las sondas de la dextranasa y la lactasa.

Tipo de integración	Dextranasa	Lactasa
Simple recombinación por el promotor	6,7 kb	6,7 kb
Simple recombinación por el terminador	4,3 kb	4,4 kb
Doble recombinación	4,3 kb	-
Recombinación no homóloga	No predecible	4,4 kb
Cepa MW 105-2A	-	4,4 kb

-No se detecta señal

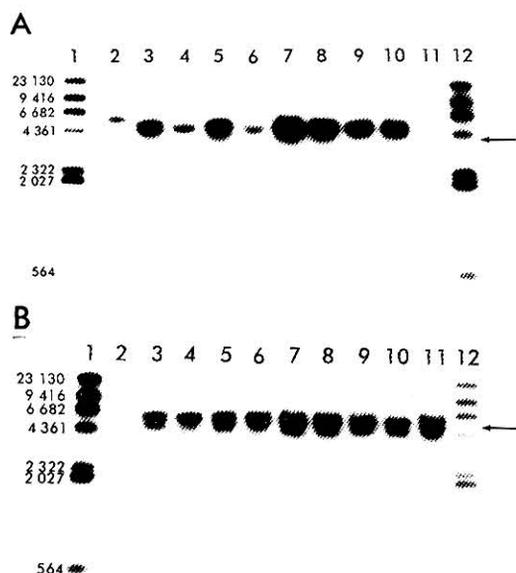


Figura 4. Análisis por Southern blot de los transformantes que portan el plásmido pGKC1-DEX. En el panel A se empleó como sonda el ADN codificante de la enzima dextranasa, y en el panel B el fragmento *Hind*III de 300 pb del gen de la lactasa de *K. lactis* extraído del plásmido pK16. En las carrileras 3-10 aparecen los ADN de los diferentes transformantes digeridos con la enzima *Kpn*I (10 µg); en las carrileras 2 y 11 aparecen el plásmido pGKC1-DEX/*Pvu*II (30 ng) y el ADN de la cepa hospedera (10 µg), empleados como control positivo y negativo, respectivamente. Las tallas del ADN empleado como patrón de peso molecular ( $\lambda$ /*Hind*III) se muestran a la izquierda de esta Figura. Las flechas indican la posición de la banda de interés.

mediante simple recombinación por el terminador, o por un evento de recombinación no homóloga.

Finalmente, se pueden concluir que el locus *LAC4* permanece intacto, lo que se corroboró, además, en experimentos de cultivo en zaranda realizados con varios de estos transformantes, mediante el empleo de lactosa 1% como fuente de carbono. En todos los casos se obtuvo un crecimiento similar al de la cepa salvaje (resultado no mostrado).

En *Saccharomyces cerevisiae*, el reemplazamiento de la información del locus de integración es una regla general. Bastan solamente 0,2 kpb de homología para obtener 100% de recombinación homóloga [23]. De manera diferente, en hongos, la mayoría de los eventos de integración ocurren por recombinación no homóloga [23]. En un estudio realizado en *Neurospora crassa*, sólo 1 de 89 transformantes resultó de un evento de recombinación homóloga que involucró de un fragmento de integración con una homología de 5 kpb en cada extremo con relación al genoma del hospedero. Sin embargo, al emplearse una de región de homología de 9 kpb, se logró aumentar en 30% la probabilidad de que ocurra una recombinación homóloga [24].

Los resultados obtenidos con la cepa hospedera empleada en este trabajo, muestran que ésta se comporta de manera similar a los hongos. Un resultado similar fue obtenido por Ferbeyre para la expresión de proquimosina bovina en la cepa VDI de *K. lactis* [25].

### Expresión del gen *dex* en *K. lactis*

La expresión del gen *dex* a nivel de la traducción se monitoreó en la levadura, tanto por inmunodetección,

como por actividad enzimática. Como se observa en la Tabla 3, en la cepa transformada con el plásmido pGKC1 no se evidenció actividad dextranasa en ninguna de las condiciones probadas. Sin embargo, en los transformantes que portan el gen *dex* se detectó actividad dextranasa en el sobrenadante de cultivo. La expresión de la enzima no afectó los parámetros de crecimiento de la cepa transformada (MWDEX), ya que el tiempo de generación en medio YPD fue muy similar al que se obtuvo para la cepa que no porta el gen (resultado no mostrado).

Al igual que en el caso del experimento realizado en placas con dextrana azul, se pudo detectar actividad dextranasa al final del crecimiento en presencia de glucosa como fuente de carbono. Estos valores de actividad son dos veces inferiores (1,45 µmol/min/mL de cultivo) a los que se obtuvieron al final del crecimiento con el empleo de la lactosa como inductor (3,4 µmoles/min/mL de cultivo), lo que corrobora que la represión por la glucosa sobre el gen *LAC4* no es tan fuerte en la cepa empleada por nosotros. En este sentido, es importante mencionar que Sheetz y Dickson [26] encontraron una inducción de la expresión del gen *LAC4* aproximadamente 40 veces mayor en presencia de lactosa; no obstante, también reportaron expresión en los cultivos crecidos en presencia de glucosa.

Los experimentos de Western blot realizados con el empleo de un anticuerpo específico contra la enzima dextranasa purificada del hongo *P. minioluteum* [27], permitieron detectar la enzima solamente en la fracción correspondiente al sobrenadante del cultivo (Figura 5). Por lo tanto, la carencia de actividad en las fracciones correspondientes al sobrenadante y al sedimento de ruptura, se debe a que la enzima es eficientemente secretada al medio de cultivo.

En el estudio de los elementos que controlan la expresión génica, se hace necesario contar con métodos sencillos y rápidos que permitan evaluar si una región determinada es responsable o no de la función del promotor en estudio. En este sentido, se ha desarrollado una serie de vectores que emplean diversos genes como reporteros, entre los que se encuentran el gen que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa de *E. coli* [28, 29], la luciferasa [30] y la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* [31], entre otros. Específicamente, en levaduras, uno de los genes reporteros más empleados es el que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* [32]. Sin embargo, este gen tiene como desventaja que la proteína que se produce es de gran tamaño y se expresa intracelularmente, por lo que es necesario rom-

23. Fincham JR. Transformation in fungi. *Microbiol Rev* 1989;53:148-70.

24. Asch DK, Kinsey JA. Relationship of vector/insert size to homologous integration during transformation in fungi. *Mol Gen Genet* 1990;221:37-43.

25. Ferbeyre G. Expresión de genes heterólogos en *Kluyveromyces lactis*. [dissertación]. La Habana (Cuba): Instituto de Ciencias Médicas "Victoria de Girón". 1991.

26. Sheetz RM, Dickson RC. *LAC4* is the structural gene for  $\beta$ -galactosidase in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 1981; 98:729-45.

27. Raíces M, Molerio MC, Li IM, Morera V, Roca H, Delgado J, et al. Purificación y caracterización parcial de una enzima dextranasa a partir de una cepa de hongo del género *Penicillium*. *Biotechnologia Aplicada* 1991;8:248-55.

28. Jeffersson RA, Burgess SM, Hirsh D.  $\beta$ -glucuronidase form *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8447-51.

29. Beneke S, Bestgen H, Klein A. Use of the *Escherichia coli uidA* gene as a reporter in *Methanococcus voltae* for the analysis of the regulatory function of the intergenic region between the operons encoding selenium-free hydrogenases. *Mol Gen Genet* 1995;248:225-8.

30. Gailey PC, Miller EJ, Griffin GD. Low-cost system for real-time monitoring of luciferase gene expression. *Biotechniques* 1997;22:528-34.

31. Dehio M, Knorre A, Lanz C, Dehio C. Construction of versatile high-level expression vectors for *Bartonella henselae* and the use of green fluorescent protein as a new expression marker. *Gene* 1998;215: 223-9.

32. Myers AM, Tzagoloff A, Kinney DM, Lusty CJ. Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* 1986; 45:299-310.

Tabla 3. Determinación de la actividad dextranasa en la levadura *K. lactis*.

Cepas <sup>b</sup>	Actividad dextranasa (nmoles/min/mL de cultivo)*					
	Sobrenadante de cultivo		Sobrenadante de ruptura		Sedimento de ruptura	
	G	L	G	L	G	L
MWDEX	1450 <sup>c</sup>	3400 <sup>c</sup>	< 1	< 1	< 1	< 1
MX 105-2A	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

\*Las células se crecieron inicialmente en 200 mL de medio YP con glucosa (G) como fuente de carbono. Seguidamente, se colectaron las células, 1 mL del sobrenadante se utilizó para el ensayo de actividad en presencia de glucosa, mientras que del sedimento se tomaron 400 mg en peso húmedo. El resto de las células se utilizó como inóculo para un fermentador Biolafitte de 4,5 L de volumen efectivo que contenía lactosa (L) como fuente de carbono. La fermentación se mantuvo por 90 h y después de ese tiempo, se midió la actividad dextranasa

<sup>b</sup>MWDEX es la cepa transformada con el plásmido pGKC1-DEX y MX 105-2A es la cepa hospedera

<sup>c</sup>Los valores de actividad son la media de los de tres transformantes independientes analizados por duplicado

per la célula para poder hacer las determinaciones de actividad enzimática. Además, en algunas especies de levadura como *K. lactis* se ha encontrado una actividad  $\beta$ -galactosidasa endógena [6] que puede afectar la detección de la proteína exógena.

En este trabajo, se estudió la expresión del gen *dex* del hongo *P. minioluteum* en la levadura *K. lactis*, con el objetivo de evaluar su posible aplicación como gen reportero en esta levadura. Como se pudo demostrar, la enzima dextranasa se expresó a partir del promotor del gen *LAC4* y su producto se secretó eficientemente al medio de cultivo, con el empleo de su propia señal de secreción. El modo tan sencillo de detectar la presencia de la enzima en los transformantes que portan el gen, así como la disponibilidad de sustratos comerciales para los ensayos de actividad enzimática, hacen muy atractivo el uso del gen que codifica la dextranasa como reportero en el estudio de la expresión génica en *K. lactis* y, a su vez, permiten valorar su empleo en otras levaduras.

Recibido en septiembre de 1998. Aprobado en diciembre de 1998.

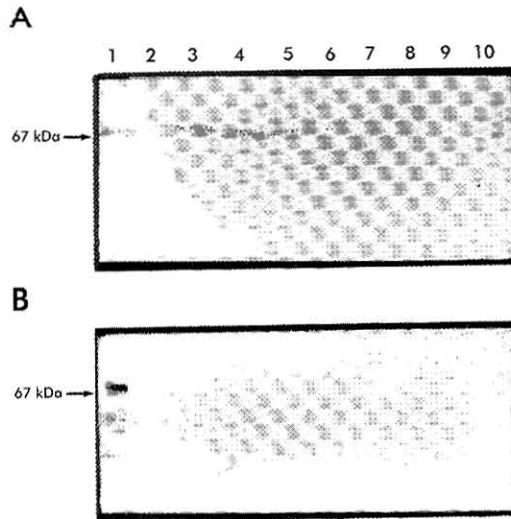


Figura 5. Análisis por Western blot de la expresión de la enzima dextranasa de *P. minioluteum* en *K. lactis*. (A) Dextranasa secretada al medio de cultivo. (B) Muestras del sedimento de ruptura, se aplicaron en todos los casos 1,5 mg en peso húmedo. Carrilera 1: 100 ng de dextranasa nativa producida por el hongo; carrilera 2 muestra correspondiente a la cepa MW 105-2A y carrilera 3-10, las muestras aplicadas en orden decreciente y extraídas cada 12 horas. La flecha señala la posición de la dextranasa natural (67 kDa). La Figura muestra el resultado obtenido para uno de los transformantes analizados.



## Tercer Congreso Internacional de Plantas Medicinales Chile '99

23 - 26 de Octubre de 1999

Centro El Canelo de Nos  
Av. Portales N° 3020  
San Bernardo  
Santiago de Chile, Chile

Lic. José L. Martínez  
Presidente Comisión Organizadora  
Tercer Congreso Internacional  
de Plantas Medicinales Chile '99

Casilla 70036, Santiago 7, Chile  
Fax: (562) 6300467 / 6300507  
E-mail: [pulpito@entelchile.net](mailto:pulpito@entelchile.net)

La Corporación para la Investigación Multidisciplinaria y el Desarrollo Sustentable de la Flora Nacional le invitan a participar en este Congreso.

El programa comprenderá las siguientes actividades:

- Comunicaciones libres orales
- Paneles
- Simposia
- Conferencias