

03072



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

12  
2ej

## DISEÑO Y CONSTRUCCION DE VEHICULOS DE CLONACION PARA *Kluyveromyces fragilis* Y OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES PARA SU TRANSFORMACION

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA  
P R E S E N T A :  
JORGE ALBERTO RIOS GARCIA

ASESOR DEL TEMA  
DR. MIGUEL ANGEL CEVALLOS GAOS

TESIS CON  
FALLA DE CUBIEN  
CUERNAVACA, MOR.

1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

### CAPITULO I

<b>INDICE GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>4</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>7</b>
<b>1.1 GENETICA DE LEVADURAS.</b>	<b>8</b>
<b>1.2 SISTEMAS DE TRANSFORMACION EN LEVADURAS.</b>	<b>9</b>
1.2.1 Transformación mediante la formación de esferoplastos.	9
1.2.2 Transformación de levaduras usando iones alcalinos.	10
1.2.3 Transformación por medio de electroinyección de DNA.	10
<b>1.3 MARCADORES USADOS EN LA TRANSFORMACION DE LEVADURAS.</b>	<b>10</b>
1.3.1 Sensibilidad de las levaduras a G-418.	11
1.3.2 Sensibilidad de las levaduras a higromicina B.	11
<b>1.4 VEHICULOS DE TRANSFORMACION EN LEVADURAS.</b>	<b>11</b>
1.4.1 Vectores integrativos.	11
1.4.2 Vectores de replicación autónoma	12
1.4.2.1 Vectores replicativos (YRp).	12
1.4.2.2 Vectores episomales de levadura (YEp).	12
1.4.2.3 Vectores centroméricos de levadura (Y Cp).	13
<b>1.5 VECTORES DE EXPRESION.</b>	<b>13</b>
<b>1.6 GENETICA DE <i>Kluyveromyces</i>.</b>	<b>13</b>
1.6.1 El sistema killer en <i>Kluyveromyces lactis</i> .	13
1.6.2 El plásmido pKD1 de <i>Kluyveromyces</i> .	14
<b>1.7 <i>K. fragilis</i>: ALTERNATIVA BIOTECNOLOGICA.</b>	<b>15</b>
<b>1.8 GENETICA DE ASIMILACION DE LACTOSA EN <i>Kluyveromyces</i>.</b>	<b>16</b>

## CAPITULO II

	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>18</b>
2.1	CEPAS.	18
2.1.1	Bacterias.	
2.1.2	Levaduras.	18
2.2	PLASMIDOS.	18
2.3	MEDIOS DE CULTIVO.	18
2.3.1	Medio de cultivo para bacterias.	18
2.3.2	Medio de cultivo para levaduras.	18
2.3.3	Antibióticos.	19
2.4	TECNICAS.	19
2.4.1	Purificación de plásmidos.	19
2.4.2	Digestión de DNA.	19
2.4.3	Ligación de DNA.	19
2.4.4	Transformación de bacterias.	20
2.4.5	Transformación de levaduras.	20
2.4.6	Selección de transformantes.	20
2.4.7	Purificación de DNA genómico de levadura.	20
2.4.8	Electroforesis en gels de agarosa y poliacrilamida.	21
2.4.9	Purificación de fragmentos de DNA de gels de agarosa.	21
2.4.10	Análisis de DNA por hibridación.	21
2.4.11	Preparación de extractos proteicos de levadura.	22
2.4.12	Medición de la concentración de proteínas.	23
2.4.13	Medición de actividad $\beta$ -galactosidasa.	23

## CAPITULO III

	<b>RESULTADOS</b>	<b>24</b>
3.1	ESTRATEGIA DE TRABAJO.	24
3.1.1	Transformación de <i>K.fragilis</i> : optimización de las condiciones de transformación.	24
3.1.2	Elección del vehículo base.	24
3.1.3	Clonación del marcador de selección.	24
3.1.4	Construcción del vehículo integrativo.	24
3.1.5	Construcción del vehículo replicativo.	25
3.1.6	Transformación de <i>K.fragilis</i> con los vehículos construidos.	25

<b>3.2</b>	<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL.</b>	<b>2 5</b>
<b>3.2.1</b>	Optimización de las condiciones de transformación.	<b>2 5</b>
<b>3.2.2</b>	Clonación del marcador de selección: construcción del pRG1.	<b>2 7</b>
<b>3.2.3</b>	Construcción del vehículo integrativo: pIL3.	<b>3 0</b>
<b>3.2.4</b>	Construcción del vehículo replicativo: pRL33.	<b>3 2</b>
<b>3.2.5</b>	Transformación de <i>K.fragilis</i> con pIL3 y pRL33.	<b>3 3</b>
<b>3.2.6</b>	Presencia del gen de resistencia a kanamicina en transformantes.	<b>3 3</b>
<b>3.2.7</b>	Cinética de crecimiento de transformantes.	<b>3 4</b>
<b>3.2.8</b>	Resistencia de los transformantes a G-418.	<b>3 5</b>
<b>3.2.9</b>	Estabilidad de transformantes.	<b>3 6</b>
<b>3.2.10</b>	Actividad $\beta$ -galactosidasa de transformantes.	<b>3 9</b>

## **CAPITULO IV**

<b>DISCUSION</b>	<b>4 4</b>
------------------	------------

## **CAPITULO V**

<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>4 6</b>
------------------------------------	------------

<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>4 7</b>
--------------------------	------------

## INDICE DE FIGURAS

1.	Patrón de restricción del plásmido pRG1 cortado con Hae II.	28
2.	Esquema de la construcción del pRG1.	29
3.	Patrón de restricción de pIL3 cortado con SphI.	30
4.	Construcción del vehículo integrativo.	31
5.	Esquema de la construcción del vehículo replicativo.	32
6.	Presencia del gen Km en transformantes.	33
7.	Cinética de crecimiento de transformantes; condiciones de crecimiento: 100 ml de medio YPD y 200 rpm.	34
8.	Cinética de crecimiento de transformantes; condiciones de crecimiento: 100 ml de YPD, 100 µg/ml de G-418 y 200 rpm.	35
9.	Resistencia de transformantes a G-418	36
10.	Estabilidad del vehículo replicativo pRL33 en presencia de G-418.	37
11.	Estabilidad del vehículo replicativo pRL33 sin presión selectiva.	38
12.	Estabilidad del vehículo integrativo pIL3 en presencia de G-418.	38
13.	Estabilidad del vehículo integrativo pIL3 sin presión selectiva.	39
14.	Actividad β-galactosidasa de transformantes a partir de extractos proteicos.	40
15.	Electroforesis de extractos proteicos de transformantes con pRL33.	41
16.	Electroforesis de extractos proteicos de transformantes con pIL3.	42

## INDICE DE TABLAS

1.	Sensibilidad de <i>K. fragilis</i> a G-418.	26
2.	Tiempo de recuperación de las células antes de estar en contacto con el antibiótico.	26
3.	Transformación de <i>K. fragilis</i> con pKR1B.	27
4.	Actividad $\beta$ -galactosidasa de transformantes (U/g).	43

## RESUMEN

*Kluyveromyces fragilis* es una levadura de uso industrial muy importante que es utilizada en la producción de etanol, lactasa, pectinasas, o proteína unicelular. Sin embargo, el conocimiento en genética que se ha generado hasta ahora de esta levadura es muy poco y limita la utilización potencial de la misma. El objetivo de este trabajo fue diseñar y construir vehículos de clonación para esta levadura que contribuyan no solo al conocimiento de la genética de *K. fragilis*, sino que sirvan como base para la construcción de nuevos vehículos de expresión que permitan la obtención de productos de interés biotecnológico. Tomando como base al plásmido bacteriano pUC19, se construyó un vehículo replicativo y otro integrativo llevando como marcador de selección el gen Km del transposón Tn903, un gen que da resistencia a kanamicina en bacterias y a geneticina (G-418) en levaduras. Llevan además el gen LAC4 de *Kluyveromyces fragilis* que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa y en el caso del vehículo replicativo un origen de replicación (ARS), también de *K. fragilis*. Los vehículos transformaron a la levadura con baja frecuencia y las transformantes fueron capaces de resistir concentraciones mayores a 400  $\mu$ g/ml de G-418. Las transformantes con los dos vehículos fueron estables en presencia de G-418 pues más del 85% de las células viables fueron resistentes después de crecer durante 4 generaciones en un medio con antibiótico, mientras su estabilidad decreció al 70% en el caso del integrativo y 40% con el replicativo al crecer durante el mismo tiempo en un medio sin presión selectiva. Este comportamiento es semejante a los plásmidos de su tipo. Aún contando con más copias del gen LAC4, las transformantes no mostraron una actividad mayor de  $\beta$ -galactosidasa y los resultados mostraron que tal vez no hay síntesis de proteína a partir de las copias presentes en los plásmidos.



## CAPITULO I

### INTRODUCCION

Muchos de los procesos biotecnológicos como la producción de vino, pan y cerveza se llevan a cabo mediante la intervención de microorganismos. Estos productos se elaboraron durante muchos años en forma empírica. El siglo pasado Louis Pasteur reconoció el papel crucial que juegan los microorganismos en estos procesos; desde entonces la utilización de los microorganismos se ha generalizado, ahora se usan en una gran variedad de procesos industriales, como son la producción de alcoholes, polisacáridos, vitaminas, aminoácidos y enzimas. El nacimiento en 1973 de la ingeniería genética impulsó a la biotecnología. Con las técnicas de manipulación *in vitro* de DNA, ahora es posible modificar e introducir material genético a gran cantidad de microorganismos, controlar su expresión y canalizar el metabolismo de los microorganismos hacia la producción de sustancias deseadas. No son pocos los casos en que se ha logrado que los microorganismos sobreproduzcan sustancias propias o extrañas a ellos de gran interés industrial y económico.

*Escherichia coli* es el microorganismo mejor conocido en términos de genética y fisiología, en él, la ingeniería genética ha logrado grandes avances en el conocimiento de su regulación y de su expresión genética. Este conocimiento ha permitido usar a este organismo para expresar proteínas tales como insulina (Goedel D.V., 1979), interferón (Taniguchi, T., 1980); (Goedel D.V., 1980), inmunoglobulinas (Amster, O., 1980) y otras proteínas del suero humano. Sin embargo, no siempre se puede utilizar a *E.coli* como un sistema huésped para la producción de proteínas heterólogas (eucariotas), puesto que esta bacteria no cuenta con la maquinaria apropiada para la modificación postraduccional de la proteína como por ejemplo, la glicosilación que muchas veces está en relación directa con su actividad biológica. Además *E.coli* es incapaz de secretar proteínas al medio por lo que las proteínas de interés se acumulan dentro de la célula. Para solucionar este último problema se ha utilizado a *Bacillus subtilis* como alternativa, pero en ocasiones su productividad no ha sido muy buena (Saunders, C.W. 1987) y tampoco hace las modificaciones postraduccionales adecuadas.

La necesidad de expresar proteínas recombinantes cada vez más complejas ha hecho necesaria la búsqueda de nuevos organismos huésped. Entre esos organismos se encuentran las levaduras, las cuales, por ser organismos eucariotes, presentan un número de ventajas en expresión y procesamiento de proteínas heterólogas sobre los sistemas bacteriales, particularmente con *E.coli*. Las levaduras presentan la maquinaria necesaria para el procesamiento postraduccional que es indispensable para el funcionamiento de muchas proteínas y entre las modificaciones podemos mencionar la formación de puentes disulfuro, maduración proteolítica de prohormonas y la glicosilación. Además las levaduras cuentan con sistemas de secreción de proteínas lo que da una gran ventaja a los procesos de purificación evitando pasos innecesarios para la obtención de los productos terminados.

Como es claro suponer, *S.cerevisiae* ha sido la levadura donde se han producido la mayoría de las proteínas recombinantes debido al conocimiento que se tiene de ella acerca de su genética y fisiología. Pero además *S.cerevisiae* también se considera una levadura GRAS por lo que puede ser utilizada en la obtención de productos que son de gran interés farmacéutico.

*S.cerevisiae* cuenta con un número de marcadores auxotróficos entre los que se encuentran LEU2, HIS3, URA3, TRP1, promotores fuertes como GAL 1-10, ADH1, PHO4 y una gran variedad de vectores de clonación muy estables que han permitido la construcción de vectores de expresión para esta levadura. Existen una variedad de productos recombinantes obtenidos con *S.cerevisiae* entre los que se encuentran el antígeno de superficie de la hepatitis B, albúmina de suero

humano y proquimosina, por citar algunos de los más importantes. Sin embargo, en *S.cerevisiae* se han encontrado algunas limitaciones al ser utilizada como huésped para la expresión de proteínas heterólogas. En algunos casos la cantidad de proteína alcanzada es de 5% de la proteína total, aún con promotores fuertes ( Buckholz, R.G. y Gleeson, M.A.G. 1991). Este comportamiento quizás es debido al estrés producido por la síntesis adicional del gen que se está sobreexpresando o al uso de plásmidos replicativos, los cuales presentan baja estabilidad en los procesos de producción. Algunos de estos inconvenientes han sido resueltos utilizando plásmidos con promotores inducibles los cuales son encendidos en el momento adecuado para evitar en gran medida el estrés en la célula.

Por otro lado, muchas cepas de *S.cerevisiae* no secretan las proteínas al medio sino que se quedan retenidas en el espacio periplásmico en una forma asociada a la célula (Smith, R.A. et al 1985) presentándose problemas en la purificación y por lo tanto disminución del rendimiento del producto deseado.

El desarrollo de nuevos sistemas de expresión utilizando otras levaduras ha permitido la producción de proteínas recombinantes con mayor eficiencia que lo obtenido con *S.cerevisiae*. Al aumentar el número de especies de levadura utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas, se ve incrementada en gran medida la probabilidad de obtener el producto con mayor facilidad y a bajo costo.

Las levaduras más importantes que se han utilizado para la producción de proteínas heterólogas son *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Shizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* y *Kluyveromyces lactis*. Aunque es poco el conocimiento en genética que se tiene de estas levaduras en comparación con *S.cerevisiae*, tienen la ventaja de ser levaduras industriales donde las condiciones de cultivo y escalamiento de procesos son bien conocidos. Además en estas levaduras los vehículos de expresión utilizados en los procesos han sido construidos utilizando promotores fuertes inducibles como AOX1, MOX1, GAL7 y CUP1 lo que les ha dado ventaja sobre los promotores constitutivos de *S.cerevisiae* (Buckholz, R.G. et al 1991) y como buena alternativa, muchas de ellas cuentan con poderosos sistemas de secreción de proteínas (ejemplo el sistema que secreta la proteína killer de *K.lactis*) los cuales son utilizados en la secreción de proteínas heterólogas (Fleer, R. et al 1991).

La gran variedad de productos producidos por estas levaduras entre los que se encuentra la albúmina de suero humano, la proquimosina,  $\alpha$ -galactosidasa, glucoamilasa y muchos otros más (Buckholz, R.G. et al 1991) nos permite tener una buena alternativa biotecnológica que permitirá el desarrollo de otros productos de interés comercial.

*K.fragilis* también es una levadura industrial importante y por sus características de fácil manejo en cultivos simples así como su aceptación como levadura GRAS, permiten su aplicación en la producción de proteínas heterólogas. Quizás el mínimo conocimiento que se tiene acerca de su genética no ha permitido el desarrollo de la levadura en esta área. Por eso es que la construcción de nuevos vehículos nos abre la posibilidad de aumentar la potencialidad biotecnológica de esta levadura. El objetivo central de este trabajo es diseñar y construir vehículos óptimos adecuados a *K.fragilis* que nos permitan la manipulación genética y expresión de proteínas de interés biotecnológico como la lactasa, enzima que hemos escogido como sistema modelo ya que la levadura tiene la capacidad de producirla.

## 1.1 GENÉTICA DE LEVADURAS

El estudio de la genética de levaduras es muy extenso debido a que las levaduras son organismos eucariotes sencillos que se duplican rápidamente con pocas exigencias nutricionales. Las levaduras tienen un ciclo de vida en que se alternan una fase haploide con otra diploide. Esto hace posible aplicar las técnicas de la obtención y selección de mutantes de la bacteriología, en la

fase haploide y combinarlo con las ventajas de tener un análisis genético mendeliano en la fase sexual. Las levaduras, además, cuentan con un genoma pequeño de aproximadamente 15000 Kb, solo cuatro veces mayor que el de *E.coli*. Todas estas características han facilitado que las técnicas del DNA recombinante se apliquen fácilmente a estos organismos. El pequeño tamaño del material genómico de las levaduras permite que se construyan bancos de genes y de expresión sin dificultad. Además se han desarrollado sistemas y vehículos de transformación con los cuales se ha logrado la introducción de genes homólogos y heterólogos en levaduras.

## 1.2 SISTEMAS DE TRANSFORMACION EN LEVADURAS.

El aislamiento del primer gen de levadura se logró complementando una auxotrofia de *E.coli* con genes de levadura (Struhl, K. *et al* 1976). Utilizando el bacteriofago  $\lambda$  como un vector, se construyó un banco genómico de una cepa de *S.cerevisiae*. Mutantes de *E.coli* auxotrofos de histidina (his B<sup>-</sup>) fueron infectados con los fagos recombinantes seleccionando posteriormente células de *E.coli* his B<sup>+</sup>. La funcionalidad de estos genes en *E.coli* se debió principalmente a la propiedad de la bacteria de reconocer el promotor y el sitio de iniciación de la traducción de algunos genes de levadura.

Al lograr reintroducir nuevamente el gen aislado a la levadura permitió iniciar el desarrollo de sistemas huésped-vector en las levaduras (Hinnen, A. *et al* 1978), sistemas en que las células huésped permiten la estancia de los vectores en su núcleo o en su citoplasma y son esenciales para la clonación o expresión de los genes deseados.

Una parte integral de la clonación de genes es la transformación, que es un proceso mediante el cual las células toman y mantienen DNA exógeno propio o extraño, expresando los genes recibidos, lo que trae como consecuencia una alteración del fenotipo de la célula receptora. Como muchos organismos, las levaduras no tienen un sistema natural para la captación o introducción de material genético por lo que todos los procedimientos de transformación son métodos artificiales.

Existen varios métodos de transformación, cada uno con sus características específicas, sin embargo la eficiencia dependerá del tipo de vehículo y el huésped utilizado.

### 1.2.1 Transformación mediante la formación de esferoplastos.

Las células de levadura están rodeadas por una gruesa pared celular compuesta principalmente por polisacáridos de manosa y glucano con algunos componentes proteicos y lipídicos y una pequeña cantidad de quitina (Zoltnik *et al*. 1984). Para transformar a las levaduras es necesario generar esferoplastos eliminando la pared celular de las levaduras con preparados enzimáticos de  $\beta$ -glucanasas (glucosasa, zimolasa, hemicelosa y litalasa). Los tratamientos con estas enzimas deben hacerse con cuidado pues una exposición prolongada puede dañar seriamente a las células provocando una mala regeneración de los esferoplastos. Para aumentar la eficacia del tratamiento enzimático, las células se tratan con un agente reductor tal como 2-mercaptoetanol o ditioneitol los cuales reducen los puentes disulfuro de las proteínas de la pared y facilita la acción de los preparados enzimáticos.

Una vez formados los esferoplastos se mantienen en un medio hipertónico con sorbitol o KCl. La entrada del DNA se promueve con calcio y polietilenglicol los cuales se supone actúan sobre las cargas de la membrana, induciendo cambios conformacionales que permiten la entrada de DNA. La regeneración de la pared celular y la selección de las transformantes se hace poniendo los esferoplastos en agar de regeneración y en un medio selectivo, el cual permite solo el crecimiento de las transformantes. Este método lo desarrollaron Hinnen y colaboradores en 1978.

Se han descrito nuevas variantes del método las cuales han simplificado el procedimiento, aumentado el tiempo de almacenaje de las células competentes y la eficiencia de transformación (Dohmen R.J. *et al.* 1991).

### 1.2.2 Transformación de levaduras usando iones alcalinos.

En este método desarrollado por Ito, *et al* 1983, las células se tratan con las sales de litio, rubidio, cesio, sodio ó potasio. Se supone que el efecto de los iones sobre las cargas negativas de la pared producen una serie de poros en células tratadas. La incubación de las células tratadas con polietilenglicol junto con un tratamiento térmico promueven la entrada del DNA. Las transformantes se crecen directamente en un medio selectivo sin usar agar de regeneración. Este método es más rápido que el anterior puesto que elimina por completo la formación de esferoplastos, procedimiento que consume mucho tiempo. Sin embargo, la eficiencia de transformación obtenida con este método es hasta un orden de magnitud menor que con el método anterior.

### 1.2.3 Transformación por medio de electroporación de DNA.

El método desarrollado por Hashimoto y colaboradores (1985) consiste en la introducción del DNA a las células a través de un choque eléctrico que modifica la pared celular. En este procedimiento se mezclan las células con DNA y polietilenglicol, se introducen en una cámara de electrofusión donde se someten las células a pulsos eléctricos durante varios segundos. Inmediatamente después las células se platan en un medio selectivo. Con este método se obtienen buenas eficiencias de transformación pero disminuye considerablemente el número de células viables.

## 1.3 MARCADORES USADOS EN LA TRANSFORMACION DE LEVADURAS

Existen dos esquemas básicos de selección de transformantes. El primero de ellos se basa en la capacidad de los genes llevados en el vehículo para complementar mutaciones auxotróficas en las células receptoras. Los primeros genes aislados de la levadura codifican enzimas que participan en la vía de síntesis de aminoácidos. Estos genes ahora se utilizan en sistemas huésped-vector donde la célula receptora porta una mutación auxotrófica que se complementa con el gen que porta el vector. Sin embargo, la presión selectiva para las transformantes depende en gran parte de la frecuencia de reversión de las mutaciones (la cual es del orden de  $10^{-6}$  a  $10^{-7}$ ) lo que puede permitir la aparición de un gran número de revertantes que enmascaran la identificación de las células transformantes, sobre todo cuando la transformación es ineficiente. Este problema se resolvió haciendo mutaciones estables en los marcadores auxotróficos más utilizados. Estas mutaciones pueden ser dobles o triples en un gen como en el caso de LEU 2 (Hinnen *et al* 1978) o por la construcción de delecciones en los genes de interés de la levadura (Sherer y Davis, 1979).

La construcción de cepas auxótrofas con baja tasa de reversión es con frecuencia difícil y tardada. La utilización de resistencia a antibióticos como los usados en los vehículos moleculares bacterianos solo pueden ser usados en la transformación de levaduras siempre y cuando el antibiótico sea letal para la levadura y que exista un gen que confiera resistencia al antibiótico que se exprese en levadura. Antibióticos como la geneticina o G-418 y la higromicina B que inhiben el crecimiento de un amplio rango de organismos procariotes y eucariotes, (Jimenez y Davies, 1980; Santerre, R.F. 1984) se han utilizado con éxito en esquemas de selección de levaduras. La resistencia a G-418 está codificada en los transposones Tn5 y Tn903 (601) los cuales codifican para las fosfotransferasas APH I y APH II respectivamente, que dan resistencia a altos niveles del antibiótico, mientras que la resistencia a higromicina B la confiere la fosfotransferasa HPH.

Otro marcador que se utiliza con frecuencia es el gen CUP1. Este gen se aisló de algunas cepas de *S. cerevisiae* y codifica para una metalotioneína, enzima que se induce al crecer las células en un medio con cobre, un metal tóxico para las levaduras.

### 1.3.1 Sensibilidad de las levaduras a G-418.

La sensibilidad de las levaduras al antibiótico depende del medio de cultivo utilizado. Cuando las células se crecen en medio rico, las levaduras son muy sensibles, pero en medio mínimo las células básicamente sobreviven en las mismas concentraciones de antibiótico. Esta resistencia al antibiótico es debida a algunas sales presentes en los medios de cultivo particularmente  $\text{CaCl}_2$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{MgSO}_4$  que son las sales que principalmente se encuentran en los medios mínimos o químicamente definidos. Otras sales como  $\text{NaCl}$  o  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  no afectan la actividad del antibiótico aún adicionadas a concentraciones elevadas en los medios de cultivo (Webster, T.D. y Dickson, R.C. 1983).

### 1.3.2 Sensibilidad de las levaduras a higromicina B.

La sensibilidad que presentan las levaduras a la higromicina B también depende del medio de cultivo donde estén creciendo. Al igual que con G-418 las levaduras son muy sensibles en medio rico pero no en medio mínimo. Sin embargo, cuando se adicionan iones de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) al medio mínimo la higromicina B si ejerce su efecto inhibitorio (Gonzalez, A. *et al* 1978).

## 1.4 VEHICULOS DE TRANSFORMACION EN LEVADURAS.

Los vectores para transformar levaduras además de tener secuencias de levadura también contienen secuencias bacterianas debido a que su construcción y amplificación requiere un paso inicial en *E. coli*. En las levaduras se han desarrollado 2 clases de vectores de clonación que se clasifican dependiendo de la manera en que se mantienen dentro de la célula: vectores integrativos y vectores de replicación autónoma. Cada tipo de vector tiene diferentes usos y características pero comparten las siguientes propiedades:

1. Llevan un origen de replicación para su preservación y amplificación en *E. coli*.
2. Un marcador de selección para *E. coli*.
3. Contienen marcadores genéticos convenientes para la selección de las levaduras transformantes.
4. Contienen sitios únicos para una o más enzimas de restricción los cuales sirven para la clonación del gen deseado.

### 1.4.1 Vectores Integrativos.

**Plásmido Integrativo de levadura (Yip)** Los vectores integrativos de levadura consisten de un plásmido bacteriano más un gen que complementa una auxotrofia en levadura o lleva la resistencia a un antibiótico. El vector transforma al integrarse en el genoma del huésped por recombinación homóloga entre el gen llevado en el vector y el de la célula. La integración se puede llevar a cabo en varios puntos de la región homóloga por lo que se obtienen dos tipos de transformantes: transformantes por adición en las cuales el plásmido completo se integra a través de un solo entrecruzamiento, lo que da como resultado la duplicación de la secuencia homóloga flanqueando al DNA extraño. El segundo tipo obtenido son los transformantes por sustitución que se producen por un doble entrecruzamiento, en donde el DNA bacteriano se pierde

completamente (Hinnen, A. *et al.* 1978). La eficiencia de transformación de estos plásmidos es

muy baja (de 1 a 10 transformantes por microgramo de DNA) y normalmente se encuentra una copia por célula. Las transformantes obtenidas son muy estables, pues menos del 1% de la población por generación pierde el plásmido en un medio no selectivo. Esto se debe a que el plásmido segrega como un gen más del genoma del huésped. Una estrategia para aumentar la eficiencia es transformar con el plásmido linealizado cortado en un sitio dentro del gen de la levadura. Los extremos libres obtenidos son muy recombinogénicos por lo que la eficiencia de transformación aumenta de 10 a 1000 veces (Orr-Weaver *et al.* 1981).

Algunas secuencias del genoma de la levadura pueden favorecer la integración múltiple de los plásmidos integrativos. Una de estas secuencias se encuentra cerca de un telómero en el cromosoma XIII a 5 kilobases del gen SUC4 que codifica para la invertasa en *S.cerevisiae*. Una parte de esta secuencia insertada a un plásmido integrativo, permitió la integración múltiple y en tandem de varios genes SUC en *S.cerevisiae* (Hohmann, S. 1987).

La integración múltiple también se promueve por otras secuencias. El locus de DNA ribosomal (rDNA) se encuentra de 100 a 200 copias repetidas en tandem en el genoma de la levadura. Los vehículos que contienen estas secuencias se integran muchas veces en los loci de rDNA. Estos plásmidos también son muy estables y han permitido la sobreexpresión de proteínas homólogas y heterólogas (Lopes, S.T. *et al.* 1989).

#### 1.4.2 Vectores de replicación autónoma.

Estos vectores contienen secuencias especiales que les permite replicarse independientemente del genoma celular. En base a sus características estructurales estos vectores pueden ser divididos en tres grupos: vectores replicativos (YRp), vectores episomales (YEp) y vectores centroméricos (YCp).

##### 1.4.2.1 Vectores replicativos (YRp).

Los plásmidos replicativos contienen, un gen de selección para levadura y una secuencia de replicación autónoma (ARS). Estas secuencias se encuentran aproximadamente 25 veces en cada cromosoma y son esenciales en la replicación de los cromosomas. Los vectores YRp transforman a *S.cerevisiae* con alta eficiencia ( $10^3$  a  $10^4$  transformantes por microgramo de DNA) y las transformantes obtenidas contienen una o dos copias del plásmido por célula. La desventaja de estos vectores es su alta inestabilidad mitótica, pues se pierden de 5 a 10 % por generación en un medio no selectivo. En raras ocasiones sin embargo, se obtienen transformantes estables en las cuales el vector se ha integrado en un sitio homólogo en el genoma de la célula, en forma idéntica a los vectores integrativos.

##### 1.4.2.2 Vectores episomales de levadura (YEp).

Muchas cepas de *S.cerevisiae* contienen una pequeña molécula de DNA circular de aproximadamente 6 kilobases conocida como plásmido 2 micras o plásmido Scp1 que se replica independientemente de los cromosomas y existen de 50 a 100 copias por célula (Pottier, A.A. *et al.* 1985). Los plásmidos YEp tienen, un marcador de selección para levadura y todo o una parte del plásmido 2  $\mu$ m. Estos vectores transforman a *S.cerevisiae* con buena eficiencia ( $10^3$  a  $10^4$  transformantes por microgramo de DNA) y se pierden de 1 a 3% por generación en un medio no selectivo. La estabilidad de estos plásmidos depende de que la célula receptora contenga el plásmido 2  $\mu$ m nativo (cir<sup>+</sup>). Este comportamiento quizás se debe a que el fragmento del plásmido 2  $\mu$ m clonado en el vector, no cuenta con ciertas secuencias que se requieren para una replicación eficiente. Sin embargo, se ha observado que la estabilidad del plásmido se afecta

debido a que se establece una competencia replicativa con el plásmido residente. Este problema pudiera ser resuelto utilizando una cepa cítrica pero el plásmido recombinante en esta cepa se pierde rápidamente (Broach, J.R.1981).

#### 1.4.2.3 Vectores centroméricos de levadura (YCp).

Se han construido plásmidos de levadura que contienen secuencias centroméricas y secuencias ARS que funcionan como pequeños cromosomas. Las secuencias centroméricas limitan la replicación, estabilizan el número de copias (una copia por célula) y regularizan la segregación de los plásmidos replicativos. Estos plásmidos son muy estables y se pierden a menos de 1% por generación en un medio sin presión selectiva (Bolstein y Davis, 1982).

### 1.5 VECTORES DE EXPRESION.

Los vectores de expresión son más complejos que los plásmidos de clonación pues además de las características presentes en estos últimos, los plásmidos de expresión contienen secuencias regulatorias que permiten aumentar y/o regular la expresión del gen deseado. Las secuencias regulatorias son un promotor fuerte y un terminador las cuales se encuentran en los finales 5' y 3' respectivamente del gen estructural. Estos vehículos pueden contener otros aditamentos como secuencias que codifiquen para péptidos señal que ayuden a la secreción de la proteína de interés. Los promotores presentes en los vehículos pueden ser constitutivos o inducibles y la elección de cualquiera de ellos estará determinado por el sistema al que se aplique su uso.

### 1.6 GENETICA DE *Kluyveromyces*

Las levaduras del género *Kluyveromyces* (sobre todo *K.lactis* y *K.fragilis*) se utilizan en la industria desde hace varios años, sin embargo el estudio de su genética es incipiente. Mucha de la metodología tanto genética como molecular se ha adaptado de lo diseñado para *S.cerevisiae*.

Se ha transformado a *K.lactis* y *K.fragilis* con los métodos desarrollados para *S.cerevisiae*. *K.lactis* se transformó inicialmente con el método de esferoplastos (Das, S. and Hollenberg C.P.1982) mientras que *K.fragilis* se transformó con el método de iones alcalinos (Das, S. et al 1984). Las variaciones para optimizar las condiciones de transformación fueron relativamente mínimas sin embargo, se requirieron grandes modificaciones para adaptar los vectores. Las secuencias de replicación autónoma (ARS) de los vehículos de *S.cerevisiae* no son funcionales en *K.lactis* lo que indicó que hay una gran especificidad en los mecanismos de replicación entre las dos especies. Un caso similar se observó al transformar a *K.lactis* con plásmidos derivados de 2µm, donde se obtuvieron pocas transformantes o simplemente no se obtuvieron (Sreekrishna, L. et al 1984).

Los problemas se resolvieron al incluir en los vehículos secuencias de replicación autónoma de *K.lactis* llamadas secuencias KARS. Estos vehículos transformaron a *K.lactis* con una eficiencia comparable a la obtenida con *S.cerevisiae* con plásmidos equivalentes. Los plásmidos con secuencias KARS son inestables en medios sin presión selectiva, pero se estabilizan si se incluyen regiones centroméricas de *K.lactis* que regularizan la segregación de los plásmidos en forma semejante a los cromosomas (Haus, J.J. et al 1990). Los vectores centroméricos presentan solo una copia por célula. Se han hecho estudios colaterales para obtener vehículos estables con alto número de copias a partir de plásmidos endógenos de especies de *Kluyveromyces*.

#### 1.6.1 El sistema killer de *Kluyveromyces lactis*.

Muchos organismos eucariotes tienen plásmidos lineales, pero, la gran mayoría, se encuentran en los hongos (Mainhardt, F. et al. 1990). Presentan características estructurales

comunes como proteínas ligadas a sus finales 5' y extremos repetidos invertidos, sin embargo, poco se conoce acerca de su función en las células. Generalmente se encuentran en las mitocondrias pero en el caso de las levaduras su localización es en el citoplasma. Algunas cepas de *K.lactis* contienen unos plásmidos lineales que le confieren a la célula portadora un carácter "killer" o asesino al secretar una toxina que inhibe el crecimiento de las levaduras que no lo contienen. Los plásmidos mejor conocidos son el K1 (pGKL1) y K2 (pGKL2) que tienen un tamaño de 8.9 y 13.4 Kb respectivamente. Entre las características más importantes que poseen es un sistema de replicación independiente al genoma nuclear; tienen secuencias terminales repetidas invertidas (TIR), un alto contenido en A + T y proteínas ligadas covalentemente a sus extremos 5' que juegan un papel importante en la replicación de los plásmidos.

En el sistema killer, el plásmido K1 codifica para la toxina y para una proteína que le confiere "inmunidad" contra la toxina, mientras que el plásmido K2 permite el mantenimiento de los plásmidos en la célula (Gunge, N. et al 1981).

El efecto tóxico de la proteína killer no está limitado a cepas de *K.lactis*, también es tóxica en un amplio espectro de especies de levadura entre las cuales se encuentran *Kluyveromyces thermotolerans*, *Kluyveromyces vanudenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces rouxii*, *Torulopsis glabrata*, *Candida utilis* y *Candida intermedia*. *Schizosaccharomyces pombe* tiene una resistencia natural a esta toxina (Stark, M.J.R. et al. 1990). Estos plásmidos se han transferido a otras levaduras como *S.cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida pseudotropicalis* por fusión celular o transformación (Sugisaki, Y. et al. 1985). Los plásmidos killer son particularmente estables en cepas de *S.cerevisiae*  $\sigma^-$  (deficientes respiratorias) pues muestran una marcada inestabilidad con el DNA mitocondrial, aunque su huésped natural (*K.lactis*) es una  $\sigma^+$  obligada. Este hecho abre la perspectiva de utilización de estos plásmidos para la construcción de vectores que puedan ser utilizados en otras especies de levadura.

Los plásmidos tipo killer se han usado en la clonación y expresión de varios genes de levadura. Sin embargo, debido a las proteínas unidas covalentemente a sus extremos 5' y a su propio sistema de replicación, ha sido difícil su manipulación *in vitro* y en *E.coli*. Un gran avance se logró con la incorporación del gen de selección LEU2 de *S.cerevisiae* introducido por clonación en el plásmido K1 y posteriormente introducido por recombinación homóloga al plásmido K1 nativo. A pesar que el LEU2 con sus secuencias regulatorias completas, el gen no se expresó. Los plásmidos recuperados de las pocas transformantes LEU2 presentaron modificaciones en el plásmido K1. Estas modificaciones consistieron en la desaparición de las proteínas ligadas a los extremos 5', la adición de telómeros en los extremos del plásmido lineal y la relocalización de los plásmidos híbridos del citoplasma al núcleo (Kamper, J. et al 1989 a). Pero cuando el gen LEU2 estuvo bajo la acción del promotor y terminador del plásmido K1, el gen fue expresado y el plásmido no sufrió ninguna modificación, replicándose en el citoplasma. Bajo condiciones no selectivas estos plásmidos fueron muy estables (casi el 100 % de las transformantes mantuvieron el plásmido durante 48 horas) y el número de copias del plásmido fue similar al encontrado en la cepa original (50-100 copias por célula) (Kamper, J. et al 1989 b).

A pesar de las dificultades presentadas, estos vehículos reúnen las características ideales para el desarrollo de vectores, pues conjuntan las ventajas de replicación y estabilidad de los plásmidos circulares y además cuenta con un amplio rango de huéspedes.

### 1.6.2 El plásmido pKD1 de *Kluyveromyces*

El estudio de genética de otras levaduras diferentes a *S.cerevisiae* ha permitido el hallazgo de nuevos plásmidos circulares. Como por ejemplo, el plásmido pKD1 aislado de *Kluyveromyces drosophilorum* (Falcone, C. et al 1986) que tiene un tamaño de 5.7 Kb. Al comparar pKD1 con el



2µm de *S.cerevisiae* se encontraron varias similitudes estructurales como es la presencia de tres genes (A,B y C) y un par de secuencias repetidas invertidas así como la presencia producto de un fenómeno llamado interconversión, de dos formas isoméricas en la célula.

El plásmido pKD1 se ha transferido a *K.lactis* donde se mantiene y replica en forma estable produciendo cerca de 70 copias por célula, número comparable a las encontradas en *K.drosophilum* (Bianchi, M.M. et al. 1987). Hecho ventajoso, en términos prácticos, ya que la genética de *K.lactis* se conoce mejor que la de *K.drosophilum*.

Inicialmente para estabilizar los plásmidos recombinantes de pKD1 en *K.lactis*, fué necesario construir cepas cir<sup>+</sup> (con el pKD1 intacto) para permitir la complementación de funciones y una adecuada replicación de los plásmidos recombinantes. Posteriormente se construyeron nuevos vehículos estables en cepas cir<sup>-</sup>, propiedad que permitió transformar a muchas especies de *Kluyveromyces* y así observar el rango de huéspedes del plásmido pKD1 (Chen, X.J. et al. 1989). Las especies como *K.vanudenii*, *K.dobzhanskii* y *K.phaseolusporus* relacionadas en su contenido cromosomal de G + C con *K.lactis* y *K.drosophilum* pudieron transformarse con alta frecuencia y las transformantes fueron muy estables. En contraste, *K.fragilis* la cual no pudo ser transformada a pesar de estar en relación filogenética estrecha con *K.lactis*. Una observación importante es que *K.waltii* y *K.thermotolerans*, especies evolutivamente más lejanas a *K.lactis* y a *K.drosophilum* pudieron transformarse y las cepas resultantes fueron muy estables, demostrando que el rango de acción de pKD1 no está limitado a especies estrechamente relacionadas evolutivamente.

La utilización del plásmido pKD1 como vector de clonación en cepas de *Kluyveromyces* ha avanzado con gran rapidez, por lo que ahora esta levadura se utiliza para producir proteínas heterólogas de interés farmacéutico como es el caso de la albúmina de suero humano (Floer, R. et al. 1991).

### 1.7 *K.fragilis*: ALTERNATIVA BIOTECNOLÓGICA.

Así como en *K.lactis* se han realizado la mayoría de los estudios bioquímicos y genéticos del género *Kluyveromyces*, la levadura de este grupo mejor estudiada y trabajada a nivel industrial es *K.fragilis*. El desarrollo anticipado de esta levadura como un microorganismo industrial quizás se debió a que fué considerada apta para consumo humano (microorganismo GRAS: Generally Recognized As Safe) antes que *K.lactis*. *K.fragilis* se ha utilizado por varios años en la obtención de varios productos como proteína unicelular a partir de suero de leche (Myrath y Bayer 1979); peptinasas, utilizadas en las industrias en la clarificación de vinos y jugos de frutas (García-Garibay, M. 1987); inulina (Phaff, 1985) y para las producciones de etanol y de la enzima lactasa.

Después del etanol el producto de *K.fragilis* que más se produce es sin duda la enzima lactasa o β-galactosidasa. La lactasa hidroliza el disacárido lactosa presente en la leche y sus subproductos en sus monómeros glucosa y galactosa. La hidrólisis de la lactosa es importante ya que hace accesible la leche y sus derivados a personas intolerantes a la lactosa. Además tiene una gran variedad de aplicaciones tecnológicas en la industria láctea.

Cuando la leche la consume algún individuo, la presencia de la lactosa en el intestino, induce la síntesis de lactasa que hidroliza la lactosa y los monómeros se transportan al torrente sanguíneo. Por un proceso que se considera normal, la inducción de la enzima es alta en los primeros días de vida pero disminuye progresivamente a través de los años de tal forma que en muchos adultos la inducción es mínima o la enzima no se produce. Cuando una persona deficiente en lactasa consume leche, sufre el padecimiento conocido como intolerancia a la lactosa.

Para solucionar estos problemas lo más sencillo es eliminar la lactosa de la leche pero esto representa un enorme esfuerzo económico y técnico debido al alto contenido de la lactosa en la leche (aproximadamente 5%). Es por eso que se han desarrollado procesos para hidrolizar la lactosa utilizando productos con actividad lactasa que permita la obtención de leches y la fabricación de productos lácteos con bajo contenido de lactosa.

Algunos de los procesos tecnológicos que pueden beneficiarse al hidrolizar la lactosa de la leche es la producción de leches condensadas, evaporadas o en polvo, helados y otros productos. La lactosa, además de su elevada concentración en la leche es muy poco soluble (casi 10 veces menos soluble que la sacarosa) por lo que al reducir la cantidad de agua en las leches condensadas o en polvo forma cristales muy gruesos que dan un aspecto de "arenosidad" a los productos. Esta propiedad da un mal aspecto al producto disminuyendo su demanda y repercutiendo en forma negativa en la economía de las industrias.

Una de las aplicaciones tecnológicas más importantes de la lactasa es la que abre la oportunidad de utilización del suero de leche, un subproducto en la elaboración de quesos que es desperdiciado, en México, casi totalmente. Por su composición el suero de leche es un producto con propiedades nutricionales que pueden ser aprovechadas en la elaboración de productos alimenticios. Existen varias fuentes de  $\beta$ -galactosidasa además de encontrarse en el intestino de los mamíferos y en las levaduras *K.lactis* y *K.fragilis*.

Una de estas fuentes de  $\beta$ -galactosidasa es *E.coli* cuya lactasa se ha estudiado y caracterizado en detalle. *E.coli* es una bacteria que se manipula y crece fácilmente en medios de cultivo simples debido a sus pocas exigencias nutricionales y a su tiempo de duplicación muy corto. Sin embargo, existe un gran inconveniente. *E.coli* es una bacteria coliforme que puede producir sustancias tóxicas por lo que no se permite su uso en la producción de alimentos.

Algunos hongos filamentosos también producen  $\beta$ -galactosidasa. *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* son hongos que producen lactasa y son organismos GRAS. Su lactasa se ha utilizado en la hidrólisis de lactosa de suero de leche ácido pues en este medio la enzima encuentra su pH óptimo (3.5 a 4.5). Sin embargo por la misma razón esta enzima no puede utilizarse en la hidrólisis de la lactosa de suero dulce (pH 5.5 a 6.5) que es el que se produce más en México.

Para hidrolizar la lactosa de la leche y del suero dulce se ha utilizado generalmente la lactasa de *K.fragilis* y *K.lactis* pues el pH óptimo de estas enzimas es cercano a 7. Aunque las condiciones de actividad de las lactasas de las dos especies se asemeja, la enzima de *K.fragilis* presenta la ventaja de que la temperatura óptima para su actividad es de 40°C mientras que la de *K.lactis* es de 37°C. Esta característica confiere a la lactasa de *K.fragilis* un rango más amplio de operación en los procesos de hidrólisis y además al trabajar a 40°C evita en parte el crecimiento de microorganismos contaminantes, los cuales pueden proliferar en los reactores del proceso continuo de hidrólisis de suero que permanecen en función durante días o semanas.

## 1.8 GENÉTICA DE ASIMILACION DE LACTOSA EN *Kluyveromyces*.

Los estudios de genética en esta área se han hecho utilizando a *K.lactis* como modelo. *K.lactis* crece en lactosa como única fuente de carbono puesto que la  $\beta$ -galactosidasa se induce por lactosa y galactosa. Cuando las células se crecen usando glucosa o glicerol como únicas fuentes de carbono, la  $\beta$ -galactosidasa se encuentra en su nivel más bajo, pero al transferirse a un medio con lactosa o galactosa los niveles aumentan de 100 a 150 veces (Dickson, R.C. y Markin, J.S.1980).

El gen que codifica para la  $\beta$ -galactosidasa de *K.lactis* se aisló por complementación de

mutantes *lacZ* de *E. coli*, incapaces de crecer en lactosa como única fuente de carbono (Dickson, R.C. y Markin, J.S. 1978). Hasta ahora el gen no se ha secuenciado totalmente. Solo se conoce la secuencia de 668 nucleótidos del extremo 5' del gen que incluye la secuencia promotora y 359 nucleótidos después de el marco abierto de lectura (Breung, K.D. *et al* 1984).

Para esclarecer el mecanismo de inducción de la enzima, el gen de lactasa se utilizó como sonda para detectar los niveles de RNA mensajero (RNAm) presente antes y después de la inducción (Lacy, L.R. y Dickson, R.C. 1981). Los niveles de RNAm después de la inducción se elevaron concomitantemente a los niveles de enzima y actividad de la misma lo que hizo suponer que la regulación es a nivel transcripcional. Sin embargo, un incremento en la concentración de RNAm puede implicar solo un aumento en la velocidad de transcripción o una disminución en la velocidad de degradación. Para eliminar esta incertidumbre se determino la vida media del RNAm la cual fué semejante antes y después de la inducción confirmando que ésta es a nivel transcripcional.

Los primeros estudios para entender los mecanismos de regulación de la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa se realizaron utilizando mutantes de *K. lactis* auxótrofos de lactosa (Sheetz R.M. y Dickson R.C. 1980). La caracterización bioquímica de las mutantes, el mapeo genético y los estudios de complementación fueron la base para definir 7 genes llamados LAC 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9. El gen LAC4 codifica para la  $\beta$ -galactosidasa (Sheetz R.M. and Dickson R.C. 1981). La función de los demás genes no se identificó, pero varias mutantes *lac* no pudieron crecer en galactosa como única fuente de carbono (la galactosa es un fuerte inductor de la  $\beta$ -galactosidasa). Estudios con cruza genéticas de estas mutantes, mostraron que los fenotipos GAL<sup>-</sup> y LAC<sup>-</sup> segregaron juntos indicando que los fenotipos se deben a mutaciones en un mismo gen. El descubrimiento de una nueva mutante (LAC10) la cual produce constitutivamente  $\beta$ -galactosidasa (Dickson, R.C. *et al* 1981) así como el conocimiento de que mutantes en LAC9 no inducen la enzima, contribuyeron a esclarecer los mecanismos que utiliza la célula para metabolizar lactosa y galactosa. El producto del gen LAC9 juega un papel importante al conferir una regulación positiva a la producción de lactasa en condiciones de inducción. La proteína se une a un sitio en la región no codificante del final 5' del gen LAC4 (región UAS) activando la transcripción. En condiciones de no inducción, el producto de LAC 10 inactiva la proteína de LAC9 evitando la transcripción (Ruzzi M. *et al* 1987). Este mecanismo es muy parecido al llevado a cabo en *S. cerevisiae* en el metabolismo de galactosa donde el gen GAL4 y el gen GAL 80 realizan funciones muy semejantes a LAC9 y LAC10 respectivamente, además de que mutantes *gal4* de *S. cerevisiae* pueden ser complementadas con el gen LAC9 (Salmeron, J.M. *et al* 1986).

Al ser la  $\beta$ -galactosidasa una enzima intracelular, la lactosa necesita ser transportada al interior celular a través de una permeasa presente en la membrana. El gen que codifica para la permeasa (LAC12) se ha aislado y mapeado encontrándose aproximadamente a 3 Kb arriba del 5' del gen LAC4 (Sreekrishna, K. y Dickson R.C. 1985).

A diferencia con las bacterias en las cuales los genes de una vía metabólica están preferentemente organizados en operones, los genes que controlan el metabolismo de lactosa en *K. lactis* no se encuentran todos ligados, sin embargo, se regulan coordinadamente.

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 CEPAS.

##### 2.1.1 Bacterias

*E.coli* CMK. Una cepa lacZ<sup>-</sup> con la cual se puede hacer  $\alpha$ -complementación. Fué utilizada para hacer las construcciones de los plásmidos de este trabajo.

##### 2.1.2 Levaduras.

*Kluyveromyces fragilis* NRRL Y-09, cepa silvestre.

*Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8729, cepa silvestre.

*Kluyveromyces lactis* SD11(lac4 ; trp1).

#### 2.2 PLASMIDOS.

pKR1B - Plásmido de 8.4 Kb derivado del pBR322 el cual lleva la resistencia a ampicilina, la resistencia a kanamicina del transposón Tn 903 y una secuencia de replicación autónoma (ARS) de *K.lactis*.

pBLAC5 - Plásmido de 14 Kb de estructura semejante al anterior con la diferencia de tener insertado completamente el transposón Tn903 y llevar el gen LAC4 de *K.lactis*

pUC19 - Plásmido multipropósito de 2.7 Kb que lleva un origen de replicación de ColE1, la resistencia a ampicilina y un fragmento del gen lacZ ( $\beta$ -galactosidasa) de *E.coli*, que codifica para el amino terminal e incluye una región para clonación múltiple. Con este vehículo puede ser llevada  $\alpha$ -complementación en un hoesped adecuado.

#### 2.3 MEDIOS DE CULTIVO.

##### 2.3.1 Medio de cultivo para bacterias

LB (medio rico)

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g
Agua	1000 ml

Medio con X-Gal e IPTG.

Cuando fué requerido, se adicionó al medio LB 50  $\mu$ l de X-gal (20mg/ml en dimetilformamida) y 8  $\mu$ l de IPTG (1M).

##### 2.3.2 Medios de cultivo para levaduras.

YPD (medio rico),

Bacto peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Glucosa	20 g
Agua	1000 ml
pH	5.5 con HCl

La glucosa puede ser sustituida por otra fuente de carbono.

### YNB (medio mínimo)

Este medio contiene los elementos mínimos necesarios para el crecimiento de las levaduras excepto la fuente de carbono y los aminoácidos que fueron adicionados según el requerimiento de las mutantes y el experimento.

#### 2.3.3 Antibióticos.

**Carbenicilina.** Solución "stock" de 200 mg/ml disuelta en agua estéril. Se utilizó a una concentración final de 200 µg/ml.

Este antibiótico es inactivado por la  $\beta$ -lactamasa, enzima que hidroliza a la ampicilina.

**Kanamicina** Solución "stock" de 25 mg/ml disuelta en agua estéril. Se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml.

**Geneticina (G-418)** Solución "stock" de 100 mg/ml disuelta en agua estéril. Fué utilizada a una concentración final de 400 µg/ml.

Los "stocks" de antibiótico no fueron utilizados después de un mes de almacenamiento a -20°C.

## 2.4 TECNICAS.

### 2.4.1 Purificación de plásmidos.

Los plásmidos fueron purificados siguiendo la técnica de minipreparaciones de DNA descrita por Maniatis *et al* 1989. El procedimiento se escaló a volúmenes mayores obteniéndose buenos resultados.

### 2.4.2 Digestión de DNA.

Los DNA analizados se digirieron con endonucleasas siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

### 2.4.3 Ligación de DNA.

Se mezclaron las concentraciones adecuadas de vehículo e inserto (normalmente una relación 1-5 respectivamente), buffer de ligación 5X y agua para completar 50 µl. A esta mezcla se adicionó 1 µl de enzima DNA ligasa T4 y se incubó toda la noche a 4°C.

#### **Buffer 5X ligasa.**

Tris HCl	250 mM pH 7.6
MgCl <sub>2</sub>	50 mM
PEG 8000	25% (peso/volumen)
ATP	5mM
DTT	5mM

#### **2.4.4 Transformación de bacterias.**

Las bacterias fueron transformadas siguiendo el método descrito por Chung C.T. *et al* 1989.

#### **2.4.5 Transformación de levaduras.**

Dos mililitros de un preinóculo de levaduras fueron adicionados a 100 ml de YPD e incubados 3 horas a 30°C y 340 rpm. Después de este tiempo las células fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, se tiró el sobrenadante y se resuspendieron en 10 ml de buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 2 mM pH 8) centrifugando nuevamente en las condiciones citadas anteriormente. Las células fueron resuspendidas en 10 ml de acetato de litio 0.1 M, tris-HCl 5mM EDTA 2mM pH 8 e incubadas durante 1 hora a 30°C sin agitación. Posteriormente 100 µl de la suspensión fueron mezclados con 1 - 10 µg de DNA siguiendo la incubación a 30°C durante media hora. Transcurrido este tiempo 0.9 ml de PEG 3350 fueron adicionados a las células y mezclados suavemente por inversión. La mezcla se incubó a 30°C durante una hora agitando intermitentemente. Una vez terminada la incubación, las células fueron centrifugadas 3 minutos a 2000 rpm y se tiró el sobrenadante. Las células fueron lavadas con 1 ml de agua y centrifugadas 3 minutos a 2000 rpm. Se extrajo el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 100 µl de agua.

#### **2.4.6 Selección de transformantes.**

Al seleccionar por resistencia a G-418 se prosiguió del siguiente modo: las células fueron plateadas en 2 ml de YPD agar 2% e incubadas por 4 horas a 30°C. Después de este tiempo 8 ml de agar 1% con G-418 fué adicionado (concentración final 400 µg/ml) y se siguió la incubación durante 2 o 3 días.

#### **2.4.7 Purificación de DNA genómico de levadura.**

Las levaduras se crecieron en 100 ml de medio YPD hasta la fase estacionaria a 30°C y 200 rpm. Las células se centrifugaron por 5 minutos a 5000 rpm, la pastilla se lavó con agua desionizada y se centrifugaron nuevamente en las condiciones citadas anteriormente. La pastilla se congeló en hielo seco-etanol durante 5 minutos. Inmediatamente la pastilla se transfirió a un baño maría con agua caliente (entre 80 y 90°C). El paso de congelamiento y descongelamiento se repitió dos veces más. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en buffer SET y 1/25 volúmenes de NaCl 5 M. Se adicionó 2/10 volúmenes de SDS 10 %, se agitó suavemente por inversión y se dejó incubando 1 hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la mezcla lítica se incubó una hora a 65 °C. El lisado se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico 25/1 agitando en vortex durante 1 minuto. La mezcla se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se extrajo la fase acuosa poniéndose en un tubo limpio y se repitió el proceso de extracción.

El DNA se precipitó adicionando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y dos volúmenes y medio de etanol absoluto frío, incubándose por dos horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  o 20 minutos a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El DNA se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm, se tiró el sobrenadante y se lavó con etanol al 70% agitando en vortex por 2 minutos. Nuevamente se centrifugó en las condiciones citadas en el paso anterior y se descartó el sobrenadante, posteriormente se secó el DNA y se resuspendió en 0.5 ml de buffer TEN. Se agregó 20  $\mu\text{l}$  de RNasa (10 mg/ml) y se incubó 1 hora a  $3^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se adicionó 20  $\mu\text{l}$  de solución de pronasa y continuó la incubación a la misma temperatura. Se desproteinizó la solución con fenol-cloroformo (adicionando un volumen de cada uno) agitando en vortex durante un minuto y centrifugando 4 minutos a 2000 rpm en una microfuga, pasando la fase superior a un tubo nuevo. Este paso se repitió tantas veces como fué requerido hasta que el DNA estuvo limpio. Finalmente se hizo una extracción solo con cloroformo, se precipitó el DNA y se resuspendió en agua.

#### **Soluciones.**

<b>SET</b>	Sacarosa 20%, tris-HCl 50 mM pH 7.6, EDTA 50mM.
<b>TEN</b>	Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA mM, NaCl 10 mM.
<b>Pronasa</b>	20 mg/ml en buffer TEN, precalentada a $37^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos.

#### **2.4.8 Electroforesis en geles de agarosa y poliacrilamida.**

##### **a) Electroforesis en gel de agarosa.**

La electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa al 1 o 2% en buffer TBE 1X según requirió el caso y se corrieron a 100 volts.

##### **b) Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

La electroforesis se llevó a cabo en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8% y se corrieron a 300 volts.

#### **2.4.9 Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa.**

Los fragmentos de DNA fueron purificados con membranas de DEAE celulosa siguiendo el método descrito por Lizardi, P.M. *et al* 1984.

#### **2.4.10 Análisis de DNA por hibridización**

El DNA se digirió con la enzima de restricción adecuada y los fragmentos se resolvieron en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X. Además de las muestras a hibridar en todos los geles se corrió DNA de  $\lambda$  digerido con Hind III como marcador de peso molecular. El gel se tiñó con bromuro de etidio (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 5 minutos y lavado con agua durante 10 minutos con agitación suave. Se observó en el transiluminador de luz ultravioleta y se prosiguió del siguiente modo:

##### **a) transferencia del DNA**

Antes de transferir el DNA a un filtro de nitrocelulosa el gel se trató con HCl 0.2N y se agitó suavemente durante 15 minutos. Se repitió el tratamiento dos veces más. El gel se lavó con agua por 5 minutos y se pasó a una solución desnaturalizante (NaOH 0.5M, NaCl 1.5M) agitando suavemente por 15 minutos, repitiendo nuevamente dos veces más. El gel se lavó con agua 5 minutos y se trató con la solución neutralizante (Tris-HCl 0.5M pH 8, NaCl 1.5 M) agitando

durante 15 minutos y repitiendo el procedimiento 2 veces más. Finalmente el gel se lavó con agua durante 5 minutos y se equilibró en una solución SSC 6X por 15 minutos.

Terminado el tratamiento, el DNA se transfirió por capilaridad siguiendo las recomendaciones de Maniatis *et al.* 1989. El DNA transferido se fijó al papel de nitrocelulosa con ultravioleta usando el aparato Stratilinker.

#### **b) prehibridación.**

Después de la transferencia, el papel se prehibridó con una solución de formamida al 50%, SSC 20X, solución Denhardt's 50X y DNA de timo de ternera (10 mg/ml) a 42°C por toda la noche en una bolsa de plástico.

#### **c) hibridación**

El filtro fue hibridado con la sonda marcada con P<sup>32</sup> por el procedimiento de "nick translation" adicionada a la bolsa en la cual se prehibridó el filtro y se siguió la incubación a 42°C por lo menos doce horas más.

#### **d) lavado del filtro.**

Una vez terminada la hibridación el filtro fue liberado de la marca sobrante lavando de la siguiente forma: el filtro fue puesto en una solución de SSC 2X, 0.1% de SDS por 5 minutos a temperatura ambiente y después transferido a una solución de 0.1X de SSC y 0.1% de SDS incubando 20 minutos a 65°C con agitación suave, repitiéndose el tratamiento 2 veces más. Finalmente el filtro es pasado a una solución de 0.1X de SSC por 5 minutos después de los cuales es secado al aire. El papel es envuelto en una hoja de "Kleen pack" y checada con el contador Gieger para comprobar si no hay marca de sobre que pudiera interferir en la interpretación de resultados. El filtro es puesto en contacto con una placa de rayos X y expuesta toda la noche a -70 °C. La placa fue revelada y se observó el resultado.

#### **Soluciones**

##### **SSC 20X**

NaCl	175.3 g
Citrato de sodio	88.2 g
Ajustar pH a 7 con unas gotas de NaOH 10 N	
Aforar a 1000 ml	

##### **Denhart's**

Ficol	5 g
Polivinilpirrolidona	5 g
Albumina de suero de bovino	5 g
Agua	500 ml

#### **2.4.11 Preparación de extractos proteicos de levadura.**

Después de crecer las levaduras durante toda la noche en 50 ml, de YPD, el cultivo se filtró a través de una membrana milipore de 1.2 µm y el paquete celular fue puesto en un tubo de ensayo, al cual se adicionaron de 100 a 200 µl de buffer de fosfatos pH 6.6 mezclándose suavemente hasta homogenizar. A la mezcla se agregó un volumen aproximadamente igual de



perlas de vidrio\* de 1mm de diametro y se agitó con vortex por un minuto para romper las células y se dejó el tubo en hielo. La suspensión obtenida se transfirió a un tubo eppendorf, se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fase superior. Los extractos fueron almacenados a -20°C.

\* **Pretratamiento de las perlas de vidrio** las perlas fueron tratadas con mezcla crómica agitando continuamente durante toda la noche. Posteriormente fueron lavadas varias veces con agua desionizada y secadas a 65°C.

#### 2.4.12 Medición de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas obtenidas de los extractos fué determinada usando el método estandar reportado por Bradford 1977.

#### 2.4.13 Medicion de actividad $\beta$ -galactosidasa.

##### a) actividad en unidades/gramo de célula.

Las células fueron crecidas en medio rico YPD y se determinó la concentración celular mediante una curva estandar cuya ecuación es:

$$\text{Concentración (g/l)} = \frac{\text{abs. (650 nm)} \cdot 0.03}{0.0599}$$

Para permeabilizar las células, se centrifugó la cantidad de caldo de cultivo necesaria para obtener un paquete celular de 12.5 mg. Las células se resuspendieron en 5 ml de alcohol isoamílico en un matraz volumétrico de 25 ml y se aloró con buffer de fosfatos 0.1 M con Mg 1mM y Mn 0.1mM pH 6.6 incubando 1 hora a temperatura ambiente.

Después de la permeabilización 0.1 ml de la mezcla se puso en un tubo que contenía 2.7 ml de buffer de fosfatos 0.1M, 0.1ml de 2-mercaptoetanol 3.36 M y 0.1 ml de o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactósido 0.068M, se agitó perfectamente en vortex. A una alicuota se le tomaron medidas espectrofotométricas a 40°C, cada 30 segundos (producción de ONP) a una longitud de onda de 410 nm. La actividad específica se estableció como unidades de  $\beta$ -galactosidasa por gramo de célula (U/g) donde una unidad es la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un  $\mu$ mol de ONPG por minuto a condiciones dadas.

##### b) actividad en unidades/miligramo de proteína.

Se diluyeron 10 $\mu$ l de extracto proteico en 100  $\mu$ l de buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.6 con Mg1 mM y Mn 0.1 mM, se pusieron en la mezcla de reacción semejante a la utilizada en el método anterior y se midió la producción de ONP a 40°C como citado anteriormente. Se obtuvo la actividad en unidades/mililitro que dividido entre los miligramos/mililitro utilizados nos dió la actividad en unidades/miligramo de proteína (U/mg).

## CAPITULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 ESTRATEGIA DE TRABAJO.

##### 3.1.2 Elección del vehículo base.

Hasta ahora el estudio de la genética que se ha hecho en *K. fragilis* ha sido muy poca y por lo tanto casi no se han construido vehículos para esta levadura. No se conocen plásmidos en esta especie (como el 2 $\mu$  de *S. cerevisiae*) que pudieran servir para el desarrollo de nuevos vehículos y además, el plásmido pKD1 un plásmido semejante al 2 $\mu$  aislado en *Kluyveromyces drosophilae*, no funciona bien en *K. fragilis*. Ante estos inconvenientes, elegimos a pUC19 como vehículo base para la construcción de los vehículos debido a que presenta las siguientes ventajas:

a) **Versatilidad** es un vehículo de fácil manejo para la clonación de secuencias debido al sitio de clonamiento múltiple y a su capacidad de llevar a cabo  $\alpha$ -complementación en un huésped adecuado. Los sitios únicos del vehículo permitirán no solo la construcción de los plásmidos, sino la introducción posterior de nuevas secuencias que facilitarán el estudio de la genética de *K. fragilis* o la clonación de promotores fuertes para la expresión de la proteína deseada.

b) **Tamaño pequeño** pUC19 presenta un tamaño aproximado de 2.686 Kb, talla que permite clonar varios fragmentos de DNA sin aumentar mucho el tamaño que afecte su estabilidad.

c) **Alto número de copias** El plásmido presenta un alto número de copias por célula (aproximadamente 700 en *E. coli*) permitiendo una fácil amplificación del mismo y los plásmidos derivados de él.

##### 3.1.3 Clonación del marcador de selección.

El primer paso en la construcción de los vehículos fue la clonación en pUC19 de un marcador de selección para levaduras. Debido a la dificultad que se presentó en obtener una cepa auxotrofa de *K. fragilis* ya sea por mutagénesis o de una colección, se eliminó la posibilidad de clonar un marcador de auxotrofia. La alternativa fue seleccionar por resistencia a un antibiótico. Las levaduras naturalmente son resistentes a antibióticos como la ampicilina y la tetraciclina por lo que el gen de resistencia a ampicilina presente en pUC19 no puede ser utilizado para la selección. Sin embargo, el gen que confiere resistencia a kanamicina en bacterias del transposón Tn903 ha mostrado ser un excelente marcador de selección en levaduras (Jimenez, A. y Davies, J. 1980) confiriéndoles resistencia a kanamicina o G-418. Este gen fue utilizado en la construcción de los vehículos debido a su disponibilidad y además de que se ha utilizado en la selección de transformantes de *K. lactis* y *K. fragilis* (Das, S. et al 1984; Sreekrishna, K. et al 1984).

El gen de resistencia a kanamicina (Km) se clonó en pUC19 a partir del plásmido pBLAC5, vehículo que lleva el transposón Tn903. Para evitar clonar secuencias innecesarias, pBLAC5 se digirió con HaeIII, una enzima que corta en los extremos del gen de km. Para introducir el fragmento a pUC19 se linealizó con la misma enzima.

### 3.1.4 Construcción del vehículo integrativo.

Una de las ventajas de contar con un plásmido integrativo para esta especie es que será una herramienta de trabajo muy útil para el estudio de la genética de *K. fragilis*. Se podrán clonar diferentes genes para su estudio o construir mutantes al dirigir la mutación hacia el gen deseado.

Otra característica importante es que estos plásmidos son muy estables sin presión selectiva, ventaja que a nivel industrial es muy importante. Generalmente la presión selectiva que se aplica es un antibiótico y para los volúmenes de trabajo industriales resultaría muy costoso. Además, si el producto está destinado a la rama de alimentos no podrá adicionarse el antibiótico.

Para construir el vehículo integrativo se utilizó el gen LAC4 (D-galactosidasa) de *K. lactis* para permitir la recombinación homóloga del vehículo con el cromosoma de la levadura. pLAC5 que lleva el gen LAC4 se dignó con SphI, una enzima que libera el gen con sus secuencias regulatorias. El gen se ligó a pFG1 en el sitio único SphI de la región de clonamiento múltiple.

### 3.1.5 Construcción del vehículo replicativo.

Para mantener un gen en alto número de copias dentro de un huésped ya sea para su estudio o la sobreproducción de una proteína se utilizando un vehículo multicopia. Los vehículos replicativos son poco estables aun con presión selectiva, sin embargo esto se compensa con el alto número de copias presente en el huésped y su aplicación en la industria dependerá de procesos en que no se tenga que mantener el plásmido durante muchas generaciones.

En la construcción se utilizó una secuencia de replicación autónoma de *K. lactis* secuencia que ha demostrado funcionar en *K. fragilis* (Das, S. et al 1984) y que se clonará en el vehículo integrativo.

La construcción se llevó a cabo en dos pasos para introducir la secuencia ARS sin dañar el gen LAC4. La secuencia ARS se libera del plásmido pKR1B mediante una digestión doble con BamHI/Sall, pero no pudo ser clonada fácilmente en pL3 debido a que BamHI además de cortar en el sitio de clonamiento múltiple corta el gen LAC4. La estrategia fue crear un nuevo sitio a un lado de BamHI que nos permitiera clonar la secuencia ARS sin destruir el gen LAC4 y el nuevo sitio fué SacI un sitio cerca de BamHI en la región de clonamiento múltiple.

### 3.1.6 Transformación de *K. fragilis* con los vehículos construidos.

*K. fragilis* será transformada con los vehículos obtenidos probando su resistencia a G-418, estabilidad y frecuencia de transformación. La levadura ha sido transformada por el método de iones alcalinos (Das, S. et al 1984) así que este método se utilizó en la transformación de la cepa, optimizando algunos parámetros del método para su desarrollo en el laboratorio.

## 3.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 3.2.1 Optimización de las condiciones de transformación.

#### a) Sensibilidad de *K. fragilis* a G-418.

La sensibilidad de *K. fragilis* al antibiótico se determinó al crecer la cepa en medio YPD

con diferentes concentraciones de G-418 en un rango de 100 hasta 1000  $\mu\text{g/ml}$ , encontrándose que a partir de una concentración de 400  $\mu\text{g/ml}$ , las células ya no crecen. Esta concentración fué utilizada en la selección de las transformantes (tabla 1).

CONCENTRACION G-418 ( $\mu\text{g/ml}$ )	VIABILIDAD
0	+
100	+/-
200	+/-
300	+/-
400	-
500	-
600	-
700	-
800	-
900	-
1000	-

**TABLA No. 1** Sensibilidad de *K. fragilis* a G-418. Simbología (+) Alto crecimiento celular (incontables); (+/-) bajo crecimiento celular; (-) no hubo crecimiento.

**b) Determinación del tiempo de recuperación antes de adicionar el antibiótico.**

Después de la transformación, el antibiótico debe ser adicionado a un tiempo que permita la recuperación de las transformantes pero sin dejar crecer las células no transformadas. Se trataron las células según el protocolo de transformación sin adicionar DNA y se crecieron durante 2, 4, 6 y 8 horas antes de adicionar el antibiótico. Se encontró que 4 horas fué el tiempo óptimo para seleccionar a las transformantes pues permitimos una mejor recuperación de las células y evitamos la aparición de células no transformadas (tabla 2).

HORAS	VIABILIDAD
2	-
4	-
6	+
8	+

**TABLA No. 2** Tiempo de recuperación de las células antes de estar en contacto con el antibiótico. Simbología: (+) Crecimiento; (-) sin crecimiento.

### c) Transformación de *K.fragilis* con pKR1B.

Para transformar a *K.fragilis* se utilizó el vehículo replicativo pKR1B el cual lleva una secuencia de replicación autónoma de *K.lactis* y se utilizó una cepa de esta última especie como control de transformación. Los primeros intentos por transformar a *K.fragilis* fallaron mientras que *K.lactis* transformó con buena frecuencia (500 a 1000 transformantes por cada  $10^7$  células viables). Una de las principales variables en la transformación de levaduras es la concentración de DNA y se adicionaron 10  $\mu$ g por transformación, sin embargo, después de aumentar 2 y 3 veces la concentración de DNA no se obtuvieron transformantes. Finalmente la concentración de DNA utilizada fué de 150  $\mu$ g (tabla 3).

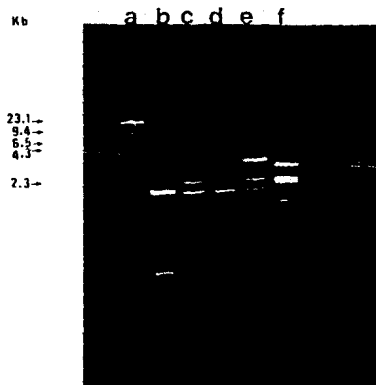
CEPA	DNA ( $\mu$ g)	CELULAS VECES	No. TRANSF.	FRECUENCIA
<i>K.lactis</i>	150	1	800	$8 \times 10^{-4}$
<i>K.fragilis</i>	150	1	1	$5 \times 10^{-7}$
<i>K.fragilis</i>	150	2	10	$5.5 \times 10^{-6}$
<i>K.fragilis</i>	150	5	150	$8.3 \times 10^{-5}$

TABLA No. 3 Transformación de *K.fragilis* con pKR1B. Simbología: VECES = número de veces en que se aumentó la concentración inicial de células (1); FRECUENCIA = Número de transformantes /Número de células viables.

Una nueva variable ensayada fué la concentración de células. En este punto fué importante observar que a pesar de iniciar con cultivos a la misma densidad óptica (0.8 -1.0 a 650 nm) la cantidad de células de *K.lactis* fué 5 veces mayor que el número de células de *K.fragilis* ( $8 \cdot 9 \times 10^8$  y  $1 \cdot 2 \times 10^8$  células/ml respectivamente). El experimento realizado fué entonces utilizar la cantidad inicial de células de *K.fragilis* y probar 2 y 5 veces más con respecto a la cantidad inicial. Se obtuvieron 150 transformantes con la concentración más alta de células que representa una frecuencia baja sin embargo, se logró transformar a la levadura.

#### 3.2.2 Clonación del marcador de selección: construcción del pRG1.

Como se mencionó en la estrategia de trabajo, para poder introducir el gen de Km en pUC19 se linealizó con HaeIII. pUC19 presenta 3 sitios HaeIII (sitios 235, 680 y 1050) así que fué necesario hacer digestiones parciales para linealizar el plásmido. Las reacciones de digestión se pararon a los 5', 15', 30', 1h y 2h encontrándose que 30' fué el tiempo óptimo para linealizar la mayor cantidad de plásmido. pBLAC5 fué digerido completamente con HaeIII y los fragmentos se ligaron a pUC19 linealizado con la misma enzima. Se obtuvieron 8 clonas las cuales mostraron el fenotipo de resistencia a kanamicina, ampicilina y fueron azules en presencia de X-Gal e IPTG. Los plásmidos aislados de estas clonas, digeridos con HaeIII, mostraron un patrón similar a pUC19 más una banda de aproximadamente 2.8 Kb (figura 1).



**FIGURA No. 1** Patrón de restricción del plásmido pRG1 cortado con Haell. Carriles: A) Marcador de peso molecular:  $\lambda$  Hind III; B) pUC19 Haell; C), D) y E) clonas 5, 6 y 9 de pRG1 Haell; F) pBLAC5 Haell. Los valores del marcador están dados en kilobases.

Aún después del análisis de restricción de los plásmidos con Sau3A no se determinó con exactitud donde se insertó el fragmento de kanamicina en pUC19. Sau3A corta en 5 sitios a pUC19 siendo el fragmento más grande de 955 pb y en el que se presentan 2 sitios Haell (sitios 680 y 1050). Todas las clonas presentaron el mismo patrón de restricción, donde se nota la ausencia del fragmento de 955 pb y la aparición de nuevas bandas diferentes a las observadas en los plásmidos de origen (pUC19 y pBLAC5) indicando la inserción de un nuevo fragmento pero no la posición exacta del mismo.

Los plásmidos fueron digeridos con Hind III, una enzima que corta una vez al vehículo y al inserto y nos permitiría conocer si el fragmento había sido clonado en sitio diferente, sin embargo, nuevamente las clonas mostraron el mismo patrón de restricción. El vehículo obtenido de un tamaño de 5.7 Kb fué llamado pRG1 y su construcción se muestra en forma esquemática en la figura 2.

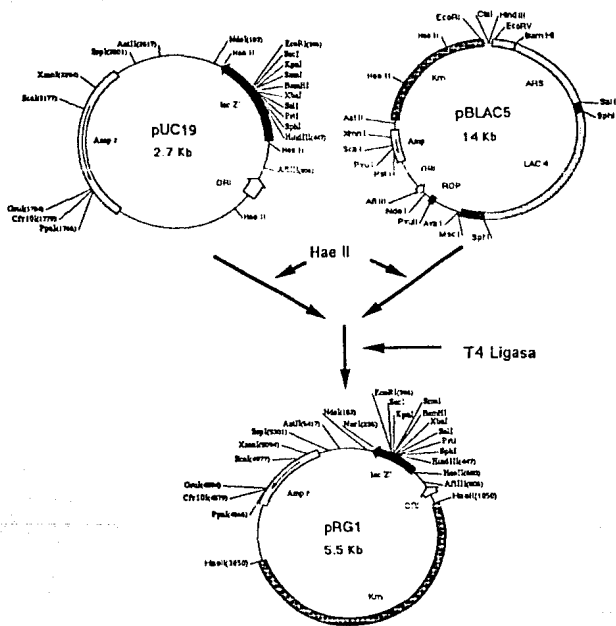
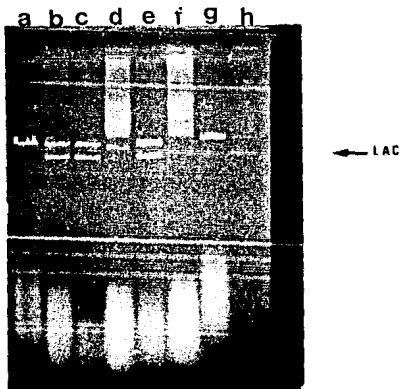


FIGURA No. 2 Esquema de la construcción del pRG1.

### 3.2.3 Construcción del vehículo integrativo: pIL3.

Como se planteó anteriormente, pBLAC5 se digirió con SphI y se liberó un fragmento de 3.6 Kb que lleva el gen LAC4 de *K.lactis*. pRG1 se linealizó con la misma enzima. El fragmento se ligó y se transformó con la mezcla de reacción a *E.coli* CMK. De las transformantes que mostraron un fenotipo de resistencia a kanamicina, ampicilina y fueron blancas en presencia de X-gal e IPTG, se seleccionaron 6 clones al azar para ser analizadas. Los plásmidos aislados de estas clonas se digirieron con SphI (figura 3) y se observaron los siguientes patrones de restricción: las clonas 1, 2 y 4 mostraron el patrón esperado donde se observan claramente las bandas de pRG1 y LAC4 mientras que el plásmido de la clona 3 solo se linealizó presentando un peso aproximado de 5.3 Kb. Este patrón de restricción quizás muestra la otra dirección en que pudo clonarse el gen. El vehículo de la clona 3 (pIL3) fué utilizado en la construcción del plásmido replicativo. La figura 4 muestra un esquema de la construcción del vehículo integrativo.



**FIGURA No. 3** Patrón de restricción de pIL3 cortado con SphI. Carriles A) pRG1 SphI; B), C), D), E), F) y G) clonas 1- 6 de pIL3 cortado con SphI; H) pBLAC5 SphI.





### 3.2.4 Construcción del vehículo replicativo: pRL33.

Guiándonos en la estrategia de trabajo, primeramente clonamos la secuencia ARS con extremos BamHI y Sall en pUC19 cortado con las mismas enzimas obteniéndose el vehículo pARS19. En el segundo paso se liberó el fragmento ARS de pARS19 mediante la digestión con Sall y después con SacI, un sitio cerca de BamHI y que además lineariza a pIL3. El fragmento de ARS no fué purificado antes de clonar debido a que presenta un tamaño muy semejante a pUC19 (2.7 Kb) y en un gel de agarosa al 1% aparece solo una banda. Sin embargo, no hubo problema al seleccionar las transformantes ya que deberían ser blancas y resistentes a kanamicina. Para distinguir los nuevos vehículos de pIL3 se purificó el plásmido de 10 clones escogidas al azar y se cortaron con Sall y SacI observándose en todas los fragmentos esperados

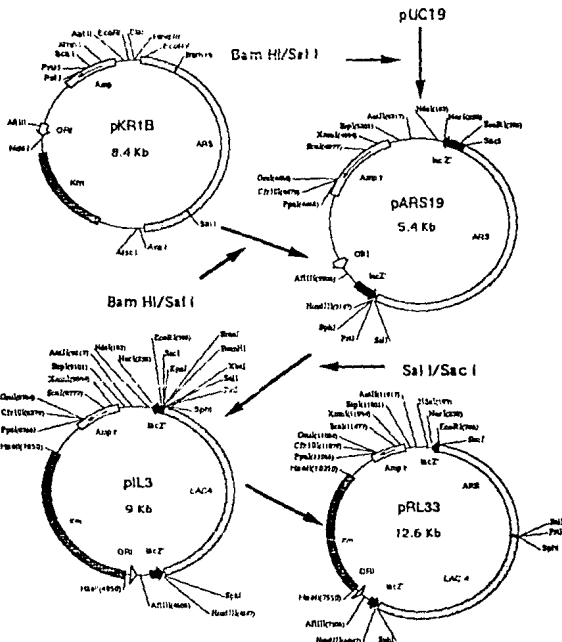


FIGURA No. 5 Esquema de la construcción del vehículo replicativo.

### 3.2.5 Transformación de *K. fragilis* con pIL3 y pRL33.

*K. fragilis* se transformó con los vehículos construidos y se obtuvieron 150 transformantes con pRL33 y 6 con pIL3 utilizando aproximadamente 150 µg de cada plásmido en la transformación. Todas las transformantes con el plásmido integrativo y 3 con el replicativo escogidas al azar, se utilizaron en experimentos posteriores.

### 3.2.6 Presencia del gen de resistencia a Km en transformantes.

Para demostrar que las cepas resistentes a G-418 son verdaderas transformantes, se llevaron a cabo experimentos de hibridación utilizando como sonda el fragmento HaeII de 2.8 Kb que da resistencia a Km en pRG1. La figura 6 muestra el resultado de este experimento donde se hibridaron los genomas digeridos con EcoRI y sin digerir de las cepas transformadas con pRL33 (cepas 1, 3 y 4) y las transformadas con pIL3 (cepas 2, 4 y 6), poniendo como control los genomas de las cepas silvestres de *K. fragilis* y *K. lactis*.

Cabe señalar que las transformantes con pRL33 se eligieron al azar de 150 transformantes mientras que las transformantes con pIL3 muestran el orden progresivo en que aparecieron después de la transformación.

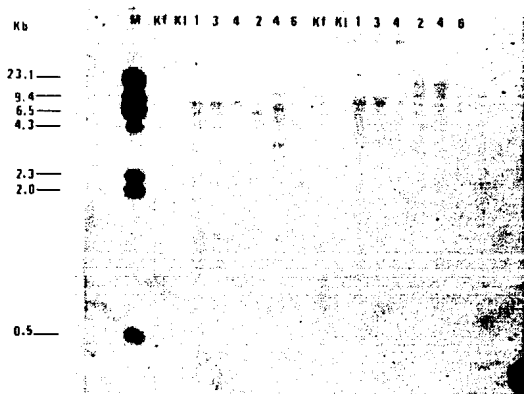


FIGURA No.6 Presencia del gen de kanamicina en transformantes. Carriles: M=  $\lambda$  Hind III; KI = *K. fragilis*; KI = *K. lactis*; 1,3 y 4 = transformantes con pRL33; 2,4 y 6 = transformantes con pIL3.

El experimento muestra con claridad la presencia del gen de resistencia en las transformantes y no en las cepas control indicando que la resistencia a G-418 es conferida por el gen Km introducido por transformación. Todos los genomas digeridos de las transformantes muestran una banda de hibridación excepto la clona 6 que es una mutante espontánea.

La hibridación de la sonda con los genomas no digeridos nos permitió demostrar la integración del pIL3 en el genoma y la replicación del pRL33 en el citoplasma de las transformantes. En el caso del vehículo integrativo solo se ve una banda indicando su integración en el genoma mientras que en las transformantes con el vehículo replicativo aparecen varias bandas que muestran las diferentes formas que presenta el plásmido después de la purificación del DNA.

### 3.2.7 Cinética de crecimiento de transformantes.

Un estudio importante en la caracterización de las transformantes es el estudio del crecimiento. El crecimiento de las cepas recombinantes suele ser distinto a la cepa silvestre debido a la carga metabólica que representa el mantenimiento del vehículo y la producción de las proteínas codificadas en él. Estos experimentos nos permitieron conocer el comportamiento de las transformantes y sentar las bases para posteriores experimentos.

Las transformantes se crecieron en medio rico YPD y se comparó su crecimiento con la cepa silvestre. Como se ve en la figura 7, el comportamiento de las transformantes (cepas pIL3-2 y pRL33-3) fué similar a la cepa silvestre con una fase lag de 7 u 8 horas y alcanzando la fase estacionaria en 3 o 4 horas. Así mismo presentan una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.26 \text{ h}^{-1}$  dando como resultado un tiempo de duplicación de 2.7 horas.

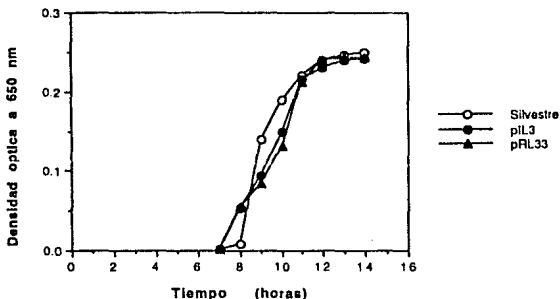
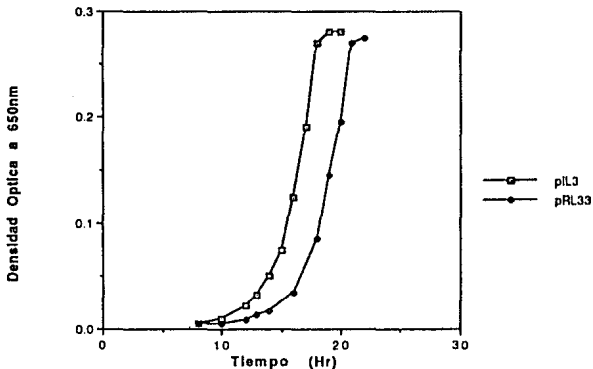


FIGURA No.7 Cinética de crecimiento de transformantes. Condiciones de crecimiento: 100 ml de medio YPD y 200 rpm.

Al crecer las transformantes en medio rico YPD con antibiótico ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) el comportamiento no fué muy distinto (figura 8). La fase lag fué 3 o 4 horas más grande en comparación con el crecimiento sin antibiótico y alcanzaron la fase estacionaria en 19 o 20 horas. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento no cambió, obteniéndose valores muy semejantes al caso anterior ( $0.3 \text{ h}^{-1}$  para la cepa con el vehículo integrativo y  $0.27 \text{ h}^{-1}$  para la

cepa con el vehículo replicativo; el tiempo de duplicación fué de 2.3 y 2.6 horas respectivamente).

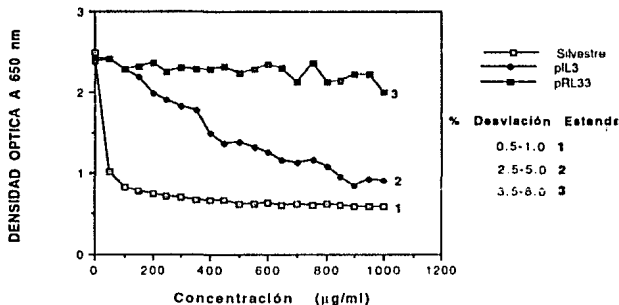


**FIGURA No. 8** Cinética de crecimiento de transformantes. Condiciones de crecimiento: 100 ml de medio YPD, 100  $\mu\text{g/ml}$  de G-418 y 200 rpm.

Estos resultados nos muestran que las transformantes no sufren ningún cambio metabólico significativo al crecer en medio rico con G-418 y el retardamiento en la fase lag puede ser debido solo a la acción tóxica del antibiótico.

### 3.2.8 Resistencia de las transformantes a G-418.

La resistencia de las transformantes a G-418 se probó al crecerlas con diferentes concentraciones de antibiótico. La figura 9 muestra el comportamiento de las transformantes crecidas en medio rico YPD durante 20 horas y en concentraciones de 0 a 1000  $\mu\text{g/ml}$  de G-418. Las transformantes mostraron diferentes niveles de resistencia dependiendo del plásmido contenido en ellas. Observamos claramente que el crecimiento de la cepa con el plásmido replicativo (pRL33) fué constante en todas las concentraciones descendiendo ligeramente en las concentraciones más altas, mientras que la cepa con el vehículo integrativo (pIL3) muestra una rápida disminución de la resistencia, siendo mínimo el crecimiento obtenido con concentraciones arriba de 800  $\mu\text{g/ml}$ .



**FIGURA No. 9** Resistencia de transformantes a G-418. Condiciones de crecimiento: por cada concentración de antibiótico (intervalos de 50 µg/ml) las células se crecieron en 2 ml de medio YPD y 200 rpm.

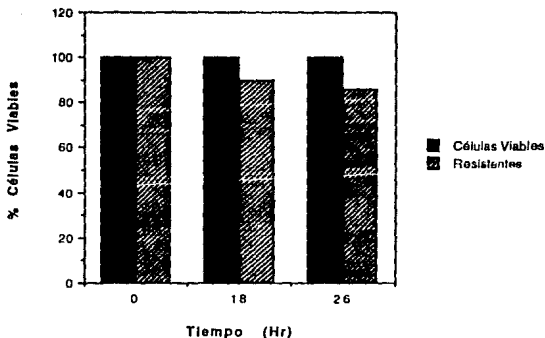
Este comportamiento se explica por la dosis del gen de resistencia presente en cada cepa. La cepa con el vehículo replicativo presenta varias copias del gen *kan* que le permiten resistir altas concentraciones de antibiótico, mientras que la cepa con el vehículo integrativo solo presenta una copia, lo que reduce considerablemente su resistencia a altas concentraciones de G-418.

Las transformantes se distinguieron de la cepa silvestre al crecerlas en presencia de G-418 pues el crecimiento de esta última se afecta drásticamente a una concentración de 50 µg/ml y es casi nulo su crecimiento a 400 µg/ml. Tomando en cuenta estos resultados, la selección de las transformantes después de la transformación siguió siendo de 400 µg/ml mientras que el mantenimiento y crecimiento de las transformantes en posteriores experimentos se hizo con 100 µg/ml permitiendo facilitar el trabajo y disminuyendo la cantidad de antibiótico utilizada.

### 3.2.9 Estabilidad de transformantes.

La estabilidad de las transformantes se determinó a través del tiempo durante el crecimiento de las cepas en medio rico YPD con y sin G-418. Cuando se crecieron en presencia de antibiótico la concentración fué de 200 y 300 µg/ml para pIL3-2 y pRL33-3 respectivamente, debido a que 100 µg/ml de G-418 permitió el crecimiento de muchas células no resistentes.

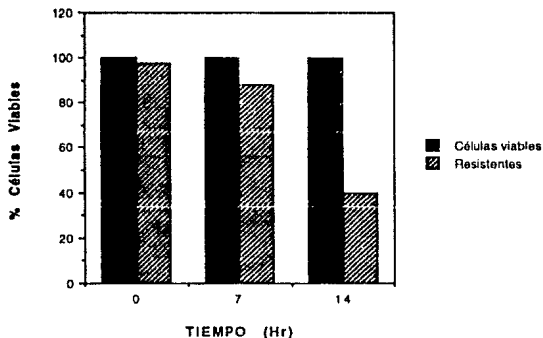
Al trabajar con concentraciones más altas de antibiótico la fase lag de las transformantes fué mayor, iniciando la fase exponencial a las 17 o 18 horas y alcanzando la estacionaria en 26 horas (figuras 10 y 12).



**FIGURA No. 10** Estabilidad del vehículo replicativo pRL33 en presencia de G-418. Condiciones de crecimiento: 100 ml de medio YPD, 300  $\mu$ g/ml de G-418 y 200 rpm.

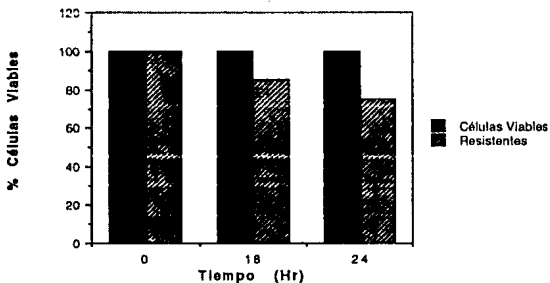
Se tomaron muestras al inicio (inoculación), a la mitad (inicio de fase exponencial) y al final de la curva de crecimiento (fase estacionaria) que se plaquearon en cajas de YPD con y sin G-418, un procedimiento que nos permitió conocer el número de células viables de cada punto.

La figura 10 nos muestra la estabilidad del vehículo replicativo con presión selectiva. Debido a la presión selectiva aplicada, el plásmido es muy estable durante el crecimiento pues en la fase estacionaria el 85% de las células viables fueron resistentes. Al crecer en medio sin presión selectiva la proporción de resistentes a mitad del crecimiento es muy semejante al caso anterior, pero al final de la curva las resistentes representan solo el 40% de las células viables (figura 11).



**FIGURA No. 11** Estabilidad del vehículo replicativo pRL33 sin presión selectiva. Condiciones de crecimiento: 100 ml de medio YPD y 200 rpm.

El vehículo integrativo también es estable con presión selectiva, sin embargo la proporción de células viabiles obtenidas al final de la curva con respecto al vehículo replicativo es menor en 10%. Por la integración del vehículo en el genoma de la levadura esperabamos que la proporción de resistentes se mantuviera constante durante el crecimiento, sin embargo baja de 85% en la fase media a 75% al final de la curva (figura 12).



**FIGURA No. 12** Estabilidad del vehículo integrativo pI.3 en presencia de G-418. Condiciones de crecimiento: 100 ml de medio YPD, 200 µg/ml de G-418 y 200 rpm.



La estabilidad del pIL3 en un medio sin presión selectiva disminuye significativamente, sin embargo esta disminución no es tan drástica como en el caso del pRL33 en las mismas condiciones. Las resistentes disminuyen de 77% en la fase media a 55% en la estacionaria (figura 13). Esto representa una caída de solo el 20% mientras que la diferencia con el pRL33 fué de 45% (figura 11).

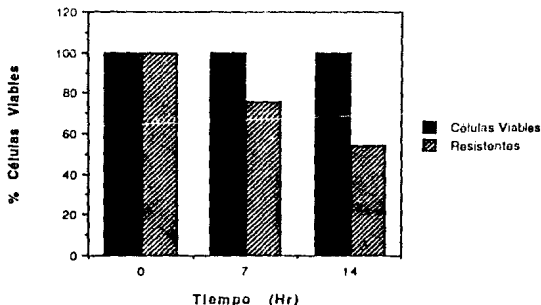


FIGURA No. 13 Estabilidad del vehículo integrativo pIL3 sin presión selectiva. Condiciones de crecimiento: 100 ml de medio YPD y 200 rpm.

Como observamos anteriormente, la fase lag es muy larga pero la velocidad específica de crecimiento fué de  $0.26 \text{ h}^{-1}$  dando un tiempo de duplicación de 2.7 horas. Tomando en cuenta que la fase exponencial inicia a las 17 o 18 horas y alcanza la fase estacionaria a las 26 o 27 horas, tenemos en ese lapso de tiempo 3 o 4 generaciones. Con los datos anteriores se calculó el porcentaje de pérdida por generación para cada plásmido con y sin presión selectiva. El porcentaje de pérdida para el vehículo replicativo en un medio con presión selectiva fué de 1.66 % y sin antibiótico de 15 %. El pIL3 fue un poco más estable al obtener un promedio de 3.33 % con presión selectiva y 7.33 % sin ella.

### 3.2.10 Actividad $\beta$ -galactosidasa de transformantes

La producción de  $\beta$ -galactosidasa por las transformantes se determinó mediante la medición de actividad de la enzima en diferentes puntos de la curva de crecimiento (inicio de la fase exponencial y en fase estacionaria). Las transformantes, se crecieron en medio rico con 100  $\mu\text{g/ml}$  de G-418, con la adición de glucosa como fuente de carbono, carbohidrato que no induce la síntesis de la enzima, o con la de lactosa para inducirla. Como control la cepa silvestre se creció en los mismos medios sin antibiótico.

La figura 14 nos muestra la actividad de las transformantes en Unidades / miligramo de proteína y podemos observar claramente como la actividad es 5 o 6 veces mayor al crecer las

células en presencia de lactosa en comparación al crecimiento en glucosa. Además la actividad de las células en la fase estacionaria es un poco más grande que al inicio de la fase exponencial. Sin embargo, la actividad de las transformantes con respecto a la cepa silvestre fue semejante en todos los casos de inducción, datos no esperados debido al mayor número de copias del gen LAC4 presente en las transformantes, que nos darían como resultado una actividad mayor.

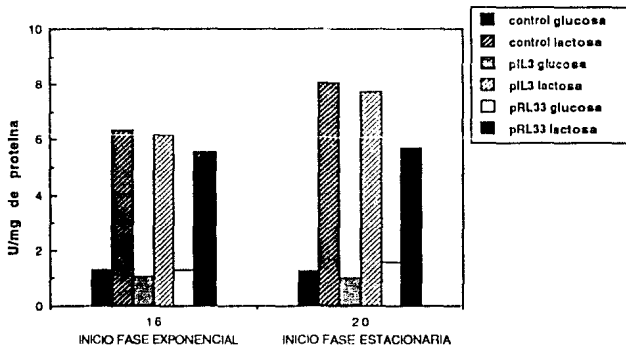
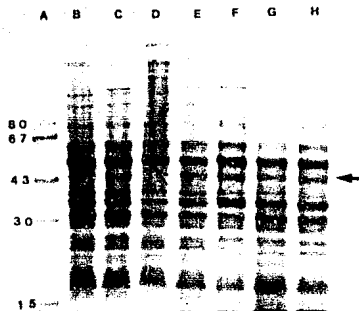


FIGURA No. 14 Actividad  $\beta$ -galactosidasa de transformantes a partir de extractos proteicos. Las células fueron crecidas en 100 ml de medio rico con inductor (lactosa) o sin inductor (glucosa) y 100  $\mu$ g/ml de G-418 para las transformantes.

La hiperproducción de la enzima tampoco la detectamos en los gels de poliacrilamida. Varias muestras de las copas con pRL33 (figura 15) y pIL3 (figura 16) en condiciones de inducción y no inducción se corrieron junto con muestras de la cepa silvestre en las mismas condiciones. La  $\beta$ -galactosidasa es una proteína de peso molecular de 201 000 daltons (Mahoney R.R. y Whitaker, J.R. 1977) compuesta de cuatro monómeros homólogos, por lo que en un gel desnaturante vemos una proteína de 50 000 daltons. Una banda de aproximadamente ese peso aparece en todos los carriles, siendo de mayor intensidad en las muestras de lactosa. Sin embargo, las muestras de las transformantes inducidas con lactosa no muestran un aumento significativo en la concentración de proteína lo que hace suponer que no hay síntesis de la proteína a partir del gen presente en los plásmidos.



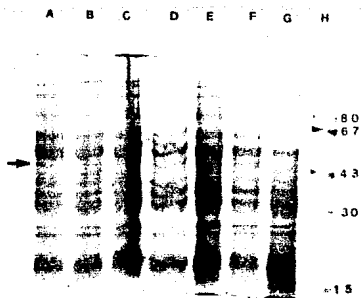
**A No. 15** Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida a 8% de extractos proteicos de transformantes con pRL33, crecidas en medio rico con inductor (lactosa) y sin inductor (glucosa) y 100  $\mu$ g/ml de G-418, poniendo como control a la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones excepto el antibiótico.

Carriles: A) Marcador de peso molecular; B) Control glu IFExp; C) Control lac IFExp; D) Control glu IFEst; E) Control lac IFEst; F) pRL33 lac IFExp; G) pRL33 glu IFEst; H) pRL33 lac IFEst.

Los valores del marcador de peso molecular son expresados en miles de daltons.

IFExp. = Inicio Fase Exponencial.

IFEst. = Inicio Fase Estacionaria.



**FIGURA No. 16** Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 8% de extractos proteicos de transformantes con pIL33, crecidas en medio rico con inductor (lactosa) y sin inductor (glucosa) y 100  $\mu\text{g/ml}$  de G-418 poniendo como control a la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones sin antibiótico.

Carriles: A) Control glu IFEsp.; B) Control lactosa IFEsp.; C) Control glu IFEst.; D) Control lac IFEst.; E) pIL3 glu IFEsp.; F) pIL3 IFEst.; G) pIL3 lac IFEst.; H) Marcador de peso molecular. Los valores del marcador son expresados en miles de daltons.

IFEsp. = Inicio de fase exponencial.

IFEst. = Inicio de fase estacionaria.

Finalmente, la actividad fué determinada en unidades por gramo de célula (U/g) y nuevamente no se notó aumento en la actividad de las transformantes crecidas en lactosa respecto a la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones. La actividad en condiciones de inducción estuvo entre 2500 y 3000 U/g y en condiciones de no inducción entre 700 y 900 U/g para todos los casos (tabla 4).

CEPA	INDUCCION (LACTOSA)		NO INDUCCION (GLUCOSA)	
	IFExp.	IFEst.	IFExp.	IFEst.
SILVESTRE	2 5 5 0	3 1 0 0	9 2 0	1 0 5 0
pIL3	2 3 8 5	2 9 7 0	7 2 5	9 2 4
pRL33	2 6 7 5	3 2 5 0	6 9 5	9 3 0

**TABLA No. 4** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de transformantes (U/g).

IFEst. = Inicio de fase estacionaria

IFExp. = Inicio de fase exponencial

## CAPITULO IV

### DISCUSION

Hemos logrado la construcción de dos vehículos de clonación para *Kluyveromyces fragilis* a partir del plásmido bacteriano pUC19. Los plásmidos transformaron a *K. fragilis* y las transformantes fueron seleccionadas por su capacidad de resistir 400 µg/ml de G-418.

Estudios preliminares en la obtención de una cepa de *K. fragilis* sobreproductora de β-galactosidasa se llevaron a cabo en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana Cuba utilizando el vehículo pBLAC5 (ver sección Materiales y Métodos) sin embargo, no se logró obtener transformantes de *K. fragilis* resistentes a Km y *K. lactis* SD11 (lac4<sup>-</sup>) se transformó a Lac<sup>+</sup> con baja frecuencia. Quizás el gen de resistencia a Km y la secuencia ARS no funcionaron en esta construcción.

Se intentaron nuevas estrategias en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y para lograr la transformación de la levadura se optimizaron las condiciones de transformación las cuales incluyeron dos parámetros principales: el número de células y la concentración de DNA. El número óptimo de células que se utilizó en la transformación fue de  $1-2 \times 10^8$  células/ml que es un número similar al reportado por varios autores para el método de iones alcalinos (Ito, H. *et al* 1983; Das, S. *et al* 1984) y una concentración de DNA de 150 µg por transformación. Esta concentración de DNA es muy alta en comparación a los 10 µg que se utilizan normalmente para transformar sin embargo, esta concentración se refiere solo a plásmido superentrollado mientras que en este trabajo utilizamos el plásmido en todas sus formas.

Sin duda otros factores que contribuyeron en la transformación fueron el gen de resistencia a kanamicina de Tn903 y la secuencia de replicación autónoma de *K. lactis*, con los cuales demostramos nuevamente que funcionan en *K. fragilis*. La resistencia conferida por el gen de Km bajo la acción de su propio promotor permitió que transformantes con pRL33 resistieran concentraciones de 1mg/ml de G-418 aunque se ha demostrado que cuando su expresión es controlada por un promotor y un terminador fuerte de levadura, la resistencia aumenta considerablemente (transformantes de *S. cerevisiae* resistieron concentraciones mayores a 30 mg/ml) (Lang-Hinrichs, Ch. *et al* 1989).

La secuencia de replicación autónoma permitió la obtención de transformantes de *K. fragilis* aunque con una frecuencia 10 veces menor que *K. lactis*. Estos resultados son comparables a los obtenidos por S. Das, y colaboradores (1984) los cuales montaron un sistema de transformación para *K. fragilis* utilizando un vehículo con una secuencia de replicación autónoma de *K. lactis* obteniendo bajas eficiencias de transformación.

No es fácil explicar la presencia en pRC1 del fragmento que da resistencia a kanamicina de 2.8 Kb cuando la secuencia esperada era de 1.4 Kb guiándonos por un mapa de restricción. El fragmento de 1.4 Kb contiene las secuencias promotoras y el gen estructural por lo que no era necesario clonar un segmento mayor. Sin embargo, suponemos que los sitios Hae II que bordean el gen kanamicina en pBLAC5 no se encuentran, por lo que la enzima corta en sitios exteriores generando un fragmento mayor.

Una de las características de los plásmidos replicativos es su baja estabilidad en un medio sin presión selectiva y el plásmido replicativo construido en este trabajo no fue la excepción. La estabilidad del vehículo fue comparable a vehículos semejantes utilizados anteriormente para transformar a *K. lactis* y *K. fragilis* (Das, S. y Hollenberg, C.P., 1982; Das, S. *et al* 1984)

donde el 90% de las células viables pierde el plásmido después de crecer durante 10 generaciones en un medio sin presión selectiva mientras que 40% de las células viables transformadas con pRL33 mantienen el plásmido después de crecer 4 generaciones en las mismas condiciones. En ocasiones se ha probado la estabilidad de los plásmidos replicativos durante 20 generaciones sin presión selectiva (Sreekrishna, K. *et al* 1984) y se encontró que menos del 5% de las transformantes mantuvieron el plásmido. Estos datos pueden sugerir una mayor estabilidad de los mismos comparado con los datos anteriores sin embargo, la estabilidad no es del vehículo replicativo en sí sino debida a su integración al genoma de la levadura, un evento que se produce a baja frecuencia.

La estabilidad del vehículo integrativo no fué muy buena si tomamos en cuenta que la característica distintiva de los plásmidos integrativos es su alta estabilidad. Generalmente más del 90% de las transformantes mantienen el plásmido después de crecer durante 10 generaciones en un medio no selectivo, propiedad que no se presentó en pL3 donde más del 40% de las transformantes perdieron el plásmido después de crecer durante 4 generaciones en condiciones semejantes. La baja estabilidad de pL3 aún en condiciones de presión selectiva, pudo ser causada por una alta frecuencia de expulsión del plásmido del cromosoma por un mecanismo semejante por el cual se integró (entrecruzamiento sencillo).

Las cepas transformantes tienen un número más alto de copias del gen LAC4 sin embargo, no se observó un aumento en la actividad de  $\beta$ -galactosidasa. La causa es difícil de explicar pues como mencionamos anteriormente se logró complementar con pBLAC5 mutantes Lac<sup>-</sup> de *K.lactis*. La transformación de *K.lactis* SD11 (Lac<sup>-</sup>), la cual tiene una frecuencia de reversión de  $10^{-10}$  con pBLAC5 permitió obtener cepas Lac<sup>+</sup> con una frecuencia semejante a la esperada para plásmidos integrativos, sugiriendo primero que pBLAC5 no se replica en *K.lactis* y segundo que las transformantes obtenidas se debieron a que el vehículo se integró por recombinación homóloga en el genoma de la levadura en el gen LAC4 corrigiendo la mutación cromosomal. Hay que recalcar que la mutación puede corregirse con solo un fragmento del gen estructural sin sus secuencias promotoras o una parte de ellas como pensamos que es el caso de pBLAC5.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se han construido dos vehículos de clonación para *K. fragilis* los cuales transforman a la levadura y podrán ser utilizados en la clonación de secuencias para la expresión de proteínas homólogas y heterólogas o para la introducción de genes de la levadura para su posterior estudio.

Aunque se logró transformar a la levadura se deberán realizar estudios más a fondo para mejorar la eficiencia de transformación o introducir un nuevo método más eficiente para *K. fragilis*. Quizás uno de los puntos que contribuyan a este mejoramiento sería utilizar una secuencia de replicación autónoma de la misma levadura.

La estabilidad de los plásmidos cae dentro del rango de los plásmidos de su tipo y podrán ser utilizados con facilidad para el estudio de la genética del microorganismo sin embargo, su aplicación en un proceso industrial se verá limitado a procesos de alto rendimiento en pocas generaciones.

La secuencia de replicación autónoma se clonó con facilidad en el sitio de clonamiento múltiple de pIL3 para construir el vehículo replicativo, sin embargo se tendrán que utilizar otras estrategias para clonar la secuencia en otro sitio para que no interfiera el sitio de clonamiento múltiple.

El desarrollo de nuevos vehículos para *K. fragilis* incluirá vehículos más estables y que permitan la sobreexpresión de la proteína deseada. Entre estos vehículos están los plásmidos multiintegrativo los cuales son vehículos con secuencias que codifican para rRNA 16S que permiten una integración múltiple de los mismos en el genoma de la levadura, debido a que estas secuencias se encuentran repetidas de 100 a 200 veces y en tandem en el cromosoma. Esta propiedad permitirá obtener cepas con muchas copias del gen deseado contando con la estabilidad de un plásmido integrativo.



## LITERATURA CITADA.

1. Amster, O., Salomon, D., Zemel, O., Zamir, A., Zeelon, E.P., Kantor, F. and Schechter, I. (1980). Synthesis of part of an immunoglobulin light chain in a bacterial clone. *Nucleic Acids Res.* **8** : 2055-2065.
2. Bianchi, M.M., Falcone, C. Chen, X.J., Wąsłowski-Louvet, M., Frontali, L. and Fukuhara, H. (1987). Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new derived from the 1.6  $\mu$ m circular plasmid pKD1. *Current Genetics* **12** : 185-192.
3. Bolstein, D. and Davis, R.W. (1982). Principles and practice of recombinant DNA research with yeast. In *The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression*. Edited by: J.N. Strathern, E.M. Jones and J.R. Broach. Cold Spring Harbor Laboratory, New York **2** : 607-636.
4. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** : 248-254.
5. Breunig, K.D., Dahlems, U., Das, S. and Hollenberg C.P. (1984). Analysis of a eucaryotic  $\beta$ -galactosidase gene: the N-terminal end of the yeast *Kluyveromyces lactis* protein shows homology to the *Escherichia coli* lacZ product. *Nucleic Acids Res.* **12** : 2327-2341.
6. Broach, J.R. (1981). The yeast 2 $\mu$  circle. In: *The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Life cycle and inheritance*. J.M. Strathern, E.M. Jones and J.R. Broach editors. Cold Spring Harbor Laboratory, New York **1** : 445-470.
7. Buckholz, R.G. and Gleeson, M.A.G. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *BioTechnology* **9** : 1067-1072.
8. Chen, X.J., Bianchi, M.M. Suda, K. and Fukuhara, H. (1989). The host range of the pKD1 derived plasmids in yeast. *Current Genetics* **16** : 95-98.
9. Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli* : transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** : 2172-2175.
10. Das, S. and Hollenberg, C.P. (1982). A high frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces*. *Current Genetics* **6** **1**: 123-128.
11. Das, S., Kellermann, E. and Hollenberg, C.P. (1984). Transformation of *Kluyveromyces fragilis*. *J. Bacteriol.* **154** : 1165-1167.
12. Dickson, R.C. and Markin, J.S. (1978). Molecular cloning and expression in *E.coli* of a yeast gene coding for  $\beta$ -galactosidase. *Cell* **15** : 123-130.
13. Dickson, R.C. and Markin, J.S. (1980). Physiological studies of  $\beta$ -galactosidase induction in *Kluyveromyces lactis*. *J. Bacteriol.* **142** : 777-785.
14. Dickson, R.C., Sheetz, R.M. and Lacy, L.R. (1981). Genetic regulation : Yeast mutants constitutive for  $\beta$ -galactosidase activity have an increased level of  $\beta$ -galactosidase messenger ribonucleic acid. *Mol. Cell. Biol.* **1** : 1048-1056.

15. Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Honer, C.B. and Hollenberg, C.P. (1991). An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7** : 691-692.
16. Falcone, C., Saliola, M., Chen, X.J., Frontali, L. and Fukuhara, H. (1986). Analysis of a 1.6  $\mu$ m circular plasmid from the yeast *Kluyveromyces drosophilaram*: structure and molecular dimorphism. *Plasmid* **15** : 248-252.
17. Fleer, R., Yoh, P., Amellal, N., Maury, J., Fournier, A., Bacchetta, F., Baduel, P., Jung, G., L'Hote, L., Becquart, J., Fukuhara, H., and Mayaux, J.F. (1991). Stable multicopy vectors for high-level secretion of recombinant human serum albumin by *Kluyveromyces* yeast. *BioTechnology* **9** : 968-974.
18. García-Garibay, M., Gomez-Ruiz, L. and Barrana, E. (1987). Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters* **9** : 411-416.
19. Goedel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yansura, D.C., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. and Seeburg P.H. (1979). Direct expression in *Escherichia coli* of DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* **281** : 544-548.
20. Goedel, D.V., Yelverton, E., Ullrich, A., Heyneker, H.L., Miozzari, G., Holmes, W., Seeburg, N., Crea, R., Maeda, S., Mc Candless, R., Sloma, A., Tabor, J.M., Gross, M., Familletti, P.C. and Pestka, S. (1980). Human leukocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active. *Nature* **287** : 411-416.
21. Gonzalez, A., Jimenez, A., Vazquez, D., Davies, J.E. and Schindler, D. (1978). Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eucaryotes. *Biochimica Biophysica Acta* **521** : 459-469.
22. Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F. and Sakaguchi, K. (1981). Isolation and characterisation of linear deoxyribonucleic acids plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J. Bacteriol.* **145** : 382-390.
23. Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, Y. and Kimura, A. (1985). A novel method for transformation of intact yeast cells by electroinjection of plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21** : 336-339.
24. Heus, J.J., Zonenveld, R.J.M., Yde Steensma, H. and Van den Berg, J.A. (1990). Centromeric DNA of *Kluyveromyces lactis*. *Current Genetics* **18** : 517-522.
25. Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** : 1929-1953.
26. Hohmann, S. (1987). A region in the yeast genome which favours multiple integration of DNA via homologous recombination. *Current Genetics* **12** : 519-526.
27. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153** : 163-168.
28. Jimenez, A. and Davies, J. (1980). Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* **287** : 869-871.
29. Kamper, J., Meinhardt, F., Gunge, N. and Esser, K. (1989 a). New recombinant linear

DNA-elements derived from *Kluyveromyces lactis* killer plasmids. Nucleic Acids Res. 17 : 1781.

30. Kamper, J., Meinhardt, F., Gunge, N. and Esser, K. (1989 b). In vivo construction of linear vector based on killer plasmids from *Kluyveromyces lactis*: selection of a nuclear gen results in attachment of telomeres. Mol. Cell. Biol. 9 : 3931-3937.
31. Lacy, L.R. and Dickson, R.C. (1981). Transcriptional regulation of the *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase gene. Mol. Cell Biol. 1 : 629 - 634.
32. Lang-Hinrichs, Ch., Berndorff, D., Seefeldt, C. and Stahl, U. (1989). G-418 resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of the neomycin resistance genes from Tn5 and Tn903. Appl. Microbiol Biotechnol 3 0 : 388-394.
33. Lizardi, P.M., Binder, R. and Short, S.A. (1984). Preparative isolation of DNA and biologically active mRNA from diethylaminoethyl membrane. Gene Anal Techn. 1 : 33-39.
34. Lopes, T.S., Klootwijk, J., Veenstra, A.E., van der Aar, P.C., van Heerikhuizen, H. Raué, H.A. and Planta, R.J. (1989) High-copy number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high-level expression. Gene 7 9 : 199-206.
35. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
36. Meinhardt, F., Kempken, F., Kamper, J. and Esser, K. (1990). Linear plasmids among eucaryotes: fundamentals and application. Current Genetics 17 : 89-95.
37. Meyrath, J. and Bayer, K. (1979). In Microbial Biomass, Economic Microbiology. G. Reed editor. 4 : 208-267 Academic Press, London.
38. Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W. and Rhthstein, R.J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7 8 : 6354-6358.
39. Phaff, H.J. (1985). In Biological of Industrial Microorganisms. A.L. Demain and N.A. Solomon editors : 537-562. The Benjamin/Cummings Pub. Co. Menlo Park, California.
40. Potter, A.A. Nasim, A., Zitomer, R.S. and Hollenberg, C.P. (1985). Gene cloning in *Saccharomyces cerevisiae*. In Recombinant DNA Methodology. Jo-Anne R. Dillon, A. Nasim and E.R. Nestmann editors. John Wiley & Sons USA.
41. Ruzzi, M., Breuunig, K.D., Ficca, A.G. and Hollenberg, C.P. (1987). Positive regulation of the  $\beta$ -galactosidase gene from *Kluyveromyces lactis* is mediated by an upstream activation site that shows homology to the GAL upstream activation site of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 7 : 991-997.
42. Salmeron, J.M., and Johnston, S.A. (1986). Analysis of the *Kluyveromyces lactis* positive regulatory gene LAC9 reveals functional homology to, but sequence divergence from, the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. Nucleic Acids Res. 1 4 : 7767-7781.
43. Santerre, R.F., Allen, N.E., Hobbs Jr., J.N., Rao, R.N. and Schmidt, R.J. (1984). Expression of prokariotic genes for hygromycin B and G-418 resistance as dominant selection markers in mouse L-cells. Gene 3 0: 147-156.

44. Saunder, C.W., Schmidt, B.J., Mallonee, R.L. and Guy, M.S. (1987). Secretion of human serum albumin from *E.coli*. *BioTechnology* **9** : 1067-1072.
45. Sheetz, R.M. and Dickson R.C. (1980). Mutations affecting synthesis of  $\beta$ -galactosidase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **95** : 877-890.
46. Sheetz, R.M. and Dickson R.C. (1981). LAC4 is the structural gene for  $\beta$ -galactosidase in *Kluyveromyces lactis* *Genetics* **98** : 729-745.
47. Sherer, S. and Davis, R.W. (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 4951-4955.
48. Smith, R.A., Duncan, M.J. and Moir, D.T. (1985) Heterologous protein secretion from yeast. *Science* **229** : 1219-1224.
49. Sreekrishna, K. and Dickson R.C. (1985). Construction of strains of *Saccharomyces cerevisiae* that grow on lactose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82** : 7909-7913.
50. Sreekrishna, K., Webster, T.D. and Dickson, R.C. (1984). Transformation of *Kluyveromyces lactis* with the kanamycin (G-418) resistance gene of Tn903. *Gene* **28** : 73-81.
51. Stark, M.J.R., Boyd, A., Mileham, A.J. and Romanos, M.A. (1990). The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis* : a review. *Yeast* **6** : 1-29.
52. Struhl, K., Cameron, J.R. and Davis, R.W. (1976). Functional genetic expression of eucaryotic DNA in *E.coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73** : 1471.
53. Sugisaki, Y., Gunge, N., Sakaguchi, K., Yamasaki, M. and Tamura, G. (1985). Transfer of DNA killer plasmids from *Kluyveromyces lactis* to *Kluyveromyces fragilis* and *Candida pseudotropicalis*. *J. Bacteriol.* **164** : 1373-1375.
54. Taniguchi, T., Guarente, L., Roberts, T.M., Kimelman, D., Douhan, J. and Ptashne, M. (1980). Expression of the human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Academic. Sci USA.* **77** : 5230-5233
55. Webster, T.D. and Dickson, R.C. (1983). Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene Tn903. *Gene* **26** : 243 - 252.
56. Zoltnik, Fernandez, M.P. Bowers, B. and Cabib, E. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity. *J. Bacteriol.* **159** : 1018-1026.