

AISLAMIENTO DE SECUENCIAS DE REPLICACIÓN AUTONOMA DE *Xanthophyllomyces dendrorhous* EN *Saccharomyces cerevisiae**

(Isolation of autonomously replicating sequences of *Xanthophyllomyces dendrorhous* in *Saccharomyces cerevisiae*)

Jennifer Alcaíno¹, Nuria Carvajal¹,
Blanca Urzúa², Claudio Martínez³, Victor Cifuentes¹ **

¹: Laboratorio de Genética,

Depto de Cs. Ecológicas, Facultad de Ciencias,

²: Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral,

Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Las Palmeras 3425, Casilla 653,

³: Cecta, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago, Santiago Chile

**Email: vcifuent@uchile.cl,

Palabras clave: Secuencias de replicación autónoma, *Xanthophyllomyces dendrorhous* (= *Phaffia rhodozyma*).

Key words: Autonomously replicating sequences, *Xanthophyllomyces dendrorhous* (= *Phaffia rhodozyma*).

RESUMEN

Xanthophyllomyces dendrorhous (= *Phaffia rhodozyma*), es una levadura basidiomicética carotenogénica, en la cual aspectos importantes de su biología, como la organización general su genoma, número de cromosomas y nivel de ploidía, aún no son completamente entendidos. En atención a esto, se han orientado esfuerzos hacia la obtención de marcadores genéticos de auxotrofia, pigmentación y resistencia a antibióticos. Además, se ha progresado lentamente en estudios moleculares con el objetivo de aumentar el conocimiento de su genética, mediante el desarrollo de procedimientos de transformación genética, los cuales tienen una eficiencia baja.

Con el objeto de construir un vector de clonado de *X.dendrorhous*, se describen los experimentos para lograr el clonamiento de Secuencias de Replicación Autónoma (ARS) de este basidiomicete en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se procedió a transformar la cepa FBL1-8B de *S. cerevisiae* con clones recombinantes de la genoteca de *X.dendrorhous* construida en el vector de integración YIp5. Como resultado se lograron 4 transformantes URA3⁺ de *S. cerevisiae*, denominados 6(1), 37(1), 38(1) y 38(4). Adicionalmente se realizaron experimentos de rescate de plásmidos mediante transformación de *E. coli* DH5 α con

*Financiado por: Convenio D.I.D. Universidad de Chile- C.S.I.C. de España y Fondecyt 197-0456.

DNA total de los transformantes de levadura, rescatándose 6 clones recombinantes. El análisis de restricción de los plásmidos, indicó que 5 son idénticos, estando formados por el vector YIp5 (5.4 kb) y 3 fragmentos *Ban*HI de 7.7, 2.4 y 1.5 kb. El otro carece del inserto de 2.4 kb. La retransformación de *S. cerevisiae* con estos plásmidos se presentó en alta frecuencia y sugiere la presencia de un ARS. El subclonado de los insertos indica que la función ARS radica en el mayor y corresponde a un rearrreglo del vector e inserto.

SUMMARY

Xanthophyllomyces dendrorhous (= *Phaffia rhodozyma*) is a carotenogenic basidiomycetous yeast in which main aspect of its biology such as genome organization, chromosome number and ploidy level are not well understand. Currently, several efforts are in progress to obtain auxotrophy, antibiotic resistance and color genetics markers. In addition, the progress of molecular studies has been slow, resulting in the development of a poor transformation system with low efficiency.

We describe an assay to the cloning of Autonomously Replicating Sequences (ARS) from *X. dendrorhous* in *S. cerevisiae* to elaborate a cloning vector of this basidiomycetous yeast. For this purpose, the *S. cerevisiae* FBL1-8B was transformed with DNA of a *X. dendrorhous* genome library constructed in the yeast integrating vector

Ylp5. We obtain four ura⁺ transformants named 6(1), 37(1), 38(1) and 38(4). In addition, we have performed an E. coli rescue experiment using purified DNA from the four yeast transformants. We obtain six clones in E. coli DH-5 α strain, five of them were identical carrying the Ylp5 (5.4 kb) vector plus three fragments of X. dendrorhous DNA of 7.7, 2.4 and 1.5 kb. The other clone has lost the 2.4 kb fragment. Additionally, re-transformation experiment in S. cerevisiae with the rescue plasmids yield high frequency of transformation. The subcloning of the different fragments suggest that the ARS function was in the 7.7 kb fragment and restriction mapping indicate that this fragment result of a rearrangement between the vector and X. dendrorhous DNA.

INTRODUCCION

Xanthophyllomyces dendrorhous es una levadura carotenogénica recientemente clasificada como basidiomicete (Golubev, 1995), aislada de exudados de árboles en regiones montañosas y frías de Alaska, Japón y de Rusia (Phaff & Stanner, 1989). Posee la capacidad de fermentar glucosa y sintetizar carotenoides, entre éstos se observa la presencia de fitoeno, neurosporeno, licopeno, β -caroteno, equinenona, 3-hidroxi equinenona, fenicoxantina, astaxantina (3,3'-dihidro- β , β -caroten-4,4-diona) y otros, siendo la astaxantina su pigmento principal (Andrewes et al., 1976).

El desarrollo de la genética de *X. dendrorhous*, está limitado debido a la imposibilidad de realizar análisis genéticos que involucren cruzamientos y el subsiguiente análisis de los productos meióticos. Esto representa un enorme obstáculo para resolver asuntos fundamentales como la mantención de la diversidad genética, organización de su genoma y otros aspectos de su biología, tales como el control genético de la carotenogénesis. Como alternativa para sobrepasar dichas dificultades, se han desarrollado sistemas de análisis genético parasexual mediante la formación y regeneración de protoplastos (Hermosilla et al., 1995), que permitió realizar análisis de complementación mediante la fusión de protoplastos de cepas auxótrofas y afectadas en la carotenogénesis (Retamales et al., 1998). Adicionalmente, la transformación genética de *X. dendrorhous*, puede ser una herramienta esencial de análisis genético de esta levadura que permitirá el estudio del control genético de la síntesis de carotenoides. Sin embargo, los sistemas de transformación en *X. dendrorhous* se han limitado, por las características de esta levadura. No obstante, recientemente se ha descrito la transformación de la levadura utilizando un plásmido portador del gen *URA3* de *S. cerevisiae* y un gen bacteriano de resistencia a kanamicina (*Km^r*) como marcadores genéticos (Adrio & Veiga, 1995). Otros métodos, han utilizado DNA ribosómico

que conduce a una mayor frecuencia de transformación debido a la integración en alto número de copias del DN, transformante (Wery et al., 1997) o bien electroporación con DNA cromosómico lineal (Rubinstein et al., 1996). En nuestro laboratorio hemos logrado la transformación de cepas mutantes de carotenogénesis de *X. dendrorhous* mediada por eventos de integración utilizando un genoteca de la levadura en un vector de integración de *S. cerevisiae* (Martinez et al., 1998). A pesar de ello, los resultados son poco estimulantes y solo se obtiene una baja frecuencia de transformación, la dificultad se debe principalmente a que hasta el momento no existe un vector para transformación. La eficiencia de los sistemas de clonaje de genes en hongos depende de la disponibilidad de vectores para el desarrollo de los respectivos sistemas de transferencia y expresión génica. La carencia de vectores de clonaje realmente eficientes de *X. dendrorhous*, se debe en parte a la falta de buenos marcadores genéticos y de la disponibilidad de secuencias de replicación autónoma (ARS) que funcionen como replicadores en este organismo. En este trabajo se utilizó un vector de integración de *S. cerevisiae* para aislar secuencias de replicación autónoma de *X. dendrorhous*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas

En este trabajo se utilizó la cepa portadora de delecciones FYBL1-8B (a, ura3- Δ 851; leu2- Δ 1; his3- Δ 201; lys2- Δ 202) de *S. cerevisiae*, como huésped para transformación con la genoteca de *X. dendrorhous* en el vector de integración YIp5. *Escherichia coli* DH-5 α , fue utilizada para construir la genoteca de *X. dendrorhous* en YIp5 para el rescate de plásmidos a partir de los transformantes de levadura. La cepa silvestre UCD 67-385 de *X. dendrorhous*, American Type Culture Collection (ATCC 24230), fue utilizada como dador de DNA genómico para construcción de la genoteca. Todas las cepas transformantes de *S. cerevisiae* fueron desarrolladas en medio YNB suplementado con los requerimientos nutricionales excepto uracilo a 30 °C, utilizando glucosa al 2% como fuente de carbono. *X. dendrorhous* fue cultivada en medio YM con agitación a 22°C, según la técnica descrita por A et al, (1989). *E. coli* fue cultivada en medio LB en presencia de ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml.

Transformación de *S. cerevisiae* y *E. coli*:

La cepa FYBL1-8B fue transformada con DNA en mezclas de 100 clones diferentes de la genoteca de *X. dendrorhous*, mediante la técnica del acetato de litio. Las células fueron lavadas con agua estéril, luego lavadas con LiAc 100 mM y finalmente resuspendidas en LiAc 100 mM. Para la transformación se utilizó 50 μ l de células en LiAc

100 mM, 240 μ l de polietilenglicol 50% w/v, 60 μ g de DNA carrier y 1 μ g de DNA de la genoteca. Posteriormente se incubó por 30 min. a 30 °C, seguido de un pulso a 42 °C durante 20 min. Las células transformadas fueron resuspendidas con 1 ml de agua estéril y plaqueadas en medio selectivo (YNB sin uracilo). Para el rescate de plásmidos, se preparó DNA total de los transformantes de levadura y se utilizó para transformar *E. coli* DH-5 α mediante electroporación en un aparato BioRad. Las transformantes bacterianas fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml y luego fueron chequeadas para sensibilidad a tetraciclina.

Análisis de los plásmidos:

El DNA plasmidial fue purificado mediante la técnica de la lisis alcalina (Birboim & Doly, 1979) y fue analizado mediante digestión con endonucleasas de restricción, seguido de electroforesis en geles de agarosa al 0.7% en TBE más 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio. Para el subclonamiento, las bandas de DNA inserto en el vector YIp5, previamente separadas por electroforesis, fueron cortadas del gel y el DNA fue purificado mediante la técnica de gene clean. Luego, cada banda de DNA fue mezclada con el vector YIp5, ligada con T4 DNA ligasa y se utilizó dicha mezcla para transformar *E. coli* DH-5 α por electroporación y *S. cerevisiae* por la técnica del Acetato de Litio.

RESULTADOS Y DISCUSION

Selección de transformantes *ura3*⁺ de *S. cerevisiae*

La Figura 1 muestra la estrategia utilizada para el clonado de secuencias de replicación autónoma de *X. dendrorhous* en *S. cerevisiae*, basada en la utilizada por Sthruel *et al.*, (1979). Para ello se construyó una genoteca de *X. dendrorhous* en el sitio *Bam*HI del vector de integración YIp5 de *S. cerevisiae*.

El análisis de los clones recombinantes (*amp*^r, *let*^r) de la bacteria *E. coli* DH-5 α indicó que la genoteca tiene un tamaño de inserto de DNA de *X. dendrorhous* de aproximadamente 8 a 10 kb y fue agrupada en mezclas de 100 clones diferentes. En una primera etapa se purificó DNA plasmidial de 6 grupos de la genoteca (aproximadamente 600 clones) y se transformó la cepa FYBL1-8B de *S. cerevisiae*.

Como resultado se observó la aparición de 4 transformantes *ura*⁺ que fueron denominados 6(1), 37(1), 38(3) y 38(4). En una segunda etapa se preparó DNA de 30 grupos adicionales de la genoteca y se volvió a transformar a la cepa FYBL1-8B de la levadura, seleccionándose 3 transformantes *ura*⁺ (datos no mostrados).

Rescate de plásmidos de transformantes de *S. cerevisiae*

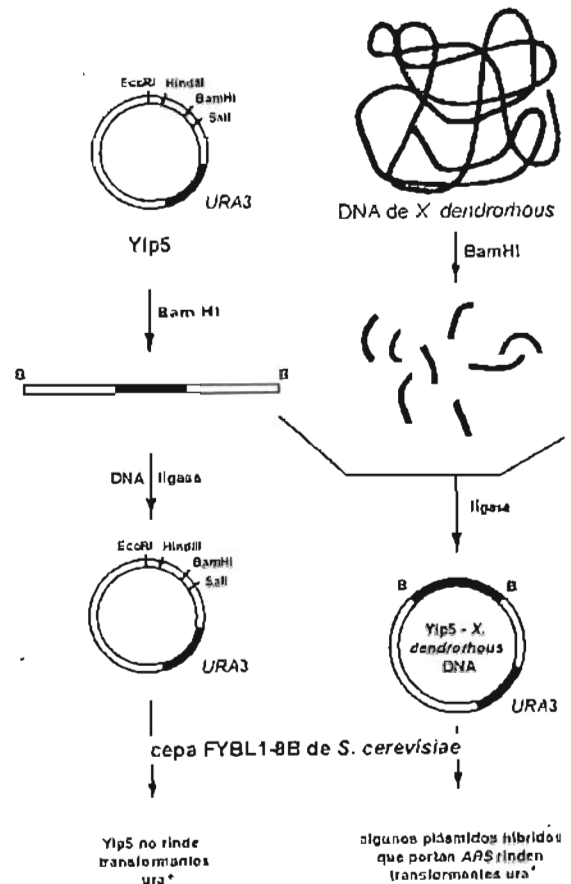


Figura 1. Esquema de clonación de una secuencia de replicación autónoma *ARS*. (Adaptado de Stinchcomb, D. *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 4559-4563.)

en *E. coli*.

Debido a que la cepa FYBL1-8B (*ura*⁻) de *S. cerevisiae* tiene una delección en el gen *URA3*, el vector de integración YIp5 no puede transformar a *ura3*⁺ por integración. La aparición de transformantes *ura3*⁺ de *S. cerevisiae* puede ser explicada solamente si el vector YIp5 ha adquirido un fragmento de DNA de *X. dendrorhous* portador de una secuencia *ARS* que le confiere la capacidad de replicarse en la levadura y por lo tanto mantenerse como un elemento extracromosómico. De ser así, entonces sería posible rescatar plásmidos recombinantes mediante transformación de *E. coli* con DNA genómico intacto de los transformantes de la levadura. Para probar lo anterior, se purificó DNA total de los transformantes 6(1), 37(1), 38(3) y 38(4) de *S. cerevisiae* y se utilizó en experimentos de rescate de plásmidos transformando *E. coli* DH-5 α .

La tabla I muestra los resultados de la transformación bacteriana con el DNA de los transformantes de *S. cerevisiae* e indica que todos tienen la capacidad de producir transformantes *Ap*^r de *E. coli*. El análisis del DNA mediante electroforesis en geles de agarosa, indica la presencia de plásmidos recombinantes. En la tabla I se mues-

tra también la re-transformación de la cepa FYBL1-8B de *S. cerevisiae* con DNA plasmidial rescatado en *E. coli*. Los resultados indican que los plásmidos de los clones 37(1), 38(3) y 38(4) re-transforman en alta frecuencia a la levadura y aquellos provenientes del clon 6(1) no tienen la capacidad de re-transformar, sugiriendo que no son portadores de un *ARS*.

Tabla I. Transformación de *E. coli* y *S. cerevisiae*.

Clon de Levadura	Transformantes	
	<i>E. coli</i> (Transformantes totales)	<i>S. cerevisiae</i> (Transformantes/ µg DNA)
YIp5	> 10 ⁴	0
6(1)	2	0
37(1)	39	52
38(3)	218	11
38(4)	178	28

Análisis del DNA plasmidial rescatado en *E. coli*.

Se realizó un estudio del DNA plasmidial rescatado de los clones de *S. cerevisiae* en *E. coli* mediante electroforesis en gel de agarosa. Se analizó 6 plásmidos de cada uno de los clones 37(1), 38(3) y 38(4) y 2 del clon 6(1). Todos tienen plásmidos similares en tamaño excepto aquellos 2 provenientes del clon 6(1). Posteriormente, se analizó mediante digestión con la endonucleasa *Bam*HI los 6 plásmidos provenientes de 37(1), observándose que 5 de ellos son iguales y contienen 3 fragmentos de DNA denominados: A de 7.4 kb, B de 2.4 kb y C de 1.5 kb, además del vector YIp5 (5.4 kb). El otro plásmido carece de la banda B (ver figura 2). Sin embargo, todos tienen la capacidad de re-transformar en alta frecuencia a *S. cerevisiae*, sugiriendo que el fragmento B no contiene la función *ARS*. Las bandas A, B y C fueron purificadas a partir de un gel de agarosa utilizando el kit de extracción "geneclean" de BIO 101. La figura 3 muestra los fragmentos aislados que posteriormente fueron utilizados para ligar al vector YIp5 en forma independiente. Con cada mezcla de ligado se transformó *E. coli* DH-5a, seleccionando los clones Ap^r, t^{c+}, portadores de los respectivos insertos. Los plásmidos resultantes fueron denominados como pA, pB y pC de acuerdo al inserto que cada uno portaba. Experimentos de re-transformación de *E. coli* con estos plásmidos da como resultado un gran número de transformantes, indicando que tienen la capaci-

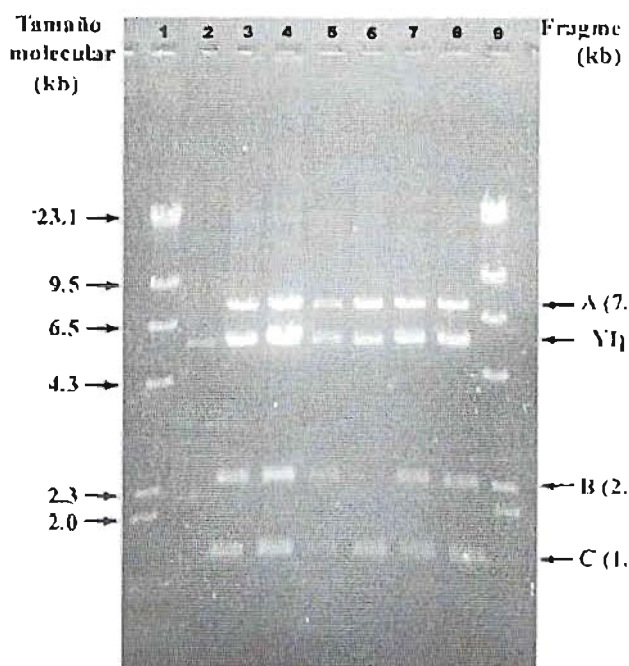


Figura 2. Digestión con *Bam*HI de plásmidos obtenidos de 6 colonias transformantes de *E. coli* con el plásmido 37(1). Carriles 1 y 9 DNA del bacteriofago lambda/*Hin* utilizado como estándar de tamaños moleculares; 2) YI digerido con *Bam*HI, 3) clon I; 4) clon II; 5) clon III; 6) clon IV; 7) clon V; 8) clon VI.

dad de transformar a la bacteria como era esperado. Posteriormente se realizó un análisis de restricción de cada plásmido, utilizando las enzimas *Bam*HI y *Pst*I (ver Fig 4). Los resultados muestran que el plásmido pA está constituido por solo una banda de DNA de 7.2 kb. Sin embargo se esperaban dos bandas, una de 7.2 kb que corresponde al fragmento A del clon original y otra de 5.4 kb correspondiente al vector YIp5 (ver Figura 4a carriles 1 y 2). El análisis de la digestión con *Bam*HI indica que el plásmido está constituido de dos fragmentos, uno de 5.4 kb, correspondiente al vector Yip5 y otro de 2.4 kb correspondiente al fragmento B del plásmido original. Similarmente, plásmido pC está formado por dos fragmentos uno de 5.4 kb correspondiente al vector YIp5 y el otro de 1.5 kb correspondiente al fragmento C del clon original. Adicionalmente, la digestión del vector YIp5 con *Pst*I como resultado dos fragmentos, uno de 3.3 kb y otro de 2.2 kb en el cual se encuentra el sitio *Bam*HI (ver Figura 4a carril 8). El patrón de digestión con *Pst*I de los plásmidos pA, pB y pC, indica que todos son portadores de la banda de 3.3 kb correspondiente al vector Yip5 y que la banda

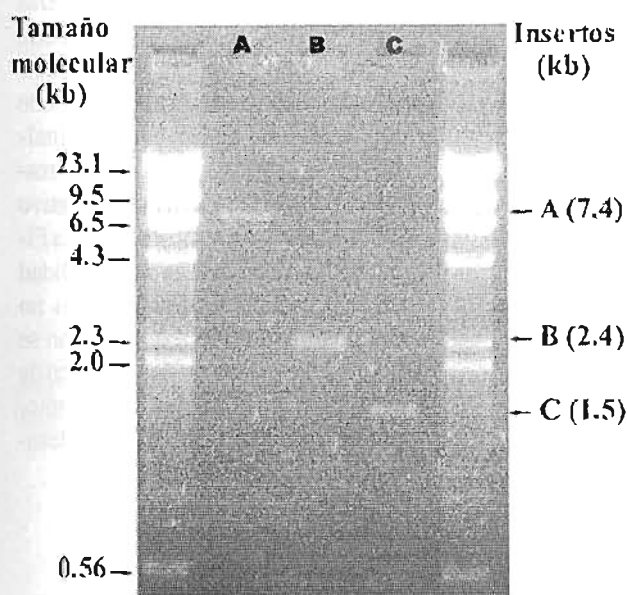


Figura 3. Purificación de las bandas A, B y C a partir de un gel. El carril 1 y 5 DNA del bacteriofago lambda digerido con *Hind*III, 2) fragmento A (7,4 kb). 3) fragmento B (2,4 kb) y 4) fragmento C (1,5 kb).

2.2 kb ha sido modificada por la inserción de una pieza de DNA en el sitio *Bam*HI (ver Figura 4b, carriles 1 al 7). La Figura 2 muestra los resultados esperados para cada plásmido (pA, pB y pC) y se observa que los datos obtenidos para pB y pC concuerdan con lo esperado, no siendo el caso para pA, ya que el DNA plasmidial obtenido de los transformantes presenta un tamaño similar al de la banda A aislada. Este resultado sugirió que la banda A corresponde a YIp5 con un inserto, el cual sufrió un rearrreglo genético que significó la pérdida de un sitio de corte *Bam*HI. Para confirmar esta hipótesis, la banda A se autiligó y posteriormente se transformó *E. coli*, seleccionándose clones Ap^r, Tc^r similares a pA en sus características electroforéticas.

Estructura del plásmido replicativo aislado en *S. cerevisiae*.

El análisis de digestión, sugiere que el plásmido original tendría un tamaño molecular de aproximadamente 16.5 kb y estaría conformado por tres fragmentos de DNA de 7.2, 2.4 y 1.5 kb además del vector YIp5 de 5.4 kb. Adicionalmente, el fragmento A, correspondería a un rearrreglo del vector YIp5 y un inserto de DNA de *X. dendrorhous* cuyo tamaño total es de 7.2 kb.

Con el objetivo de determinar el fragmento de DNA de *X. dendrorhous* portador de la secuencia *ARS*, se

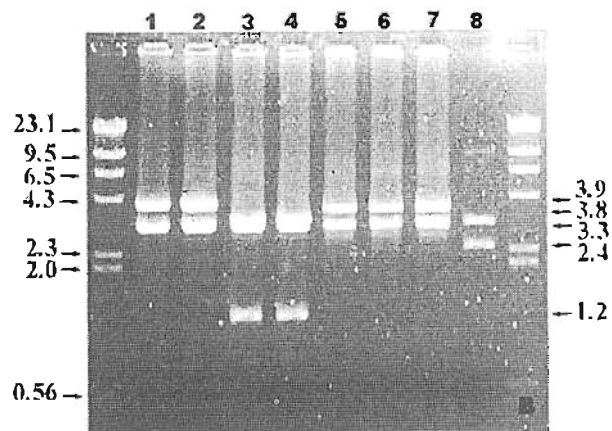
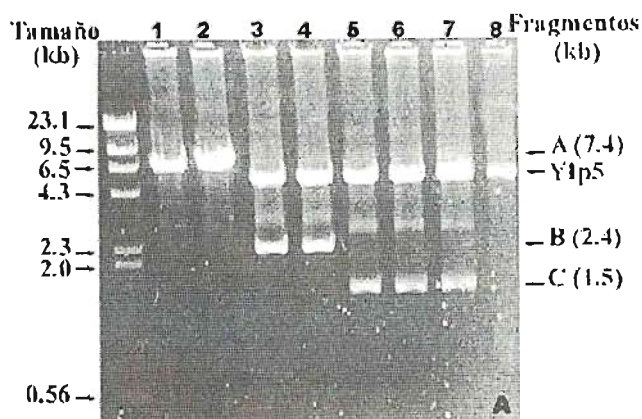


Figura 4. Análisis de transformantes (*E. coli*) con cada uno de los fragmentos A, B y C subclonados en YIp5. En ambos casos el primer carril corresponde a DNA del bacteriofago lambda/*Hind*III. A: Digestión con *Bam*HI: carril 1 y 2 corresponden a pA (7,2 kb), carril 3 y 4 corresponden a pB (5,4 kb y 2,4 kb), carril 5, 6 y 7 corresponden a pC (5,4 kb y 1,5 kb) y carril 8 corresponde a YIp5 (5,4 kb). B: Digestión del DNA clones con *Pst*I: carriles 1 y 2 corresponden a pA (3,9 kb y 3,3 kb), carril 3 y 4 corresponden a pB (2 fragmentos de 3,3 kb y uno de 1,2 kb), carril 5, 6 y 7 corresponden a pC (3,8 kb y 3,3 kb) y carril 8 corresponde a YIp5 (3,3 kb y 2,2 kb).

realizó un análisis de transformación de *S. cerevisiae*. Para ello, el DNA de los clones pA (autoligado), pB y pC, fue utilizado para transformar *S. cerevisiae*, cepa FYBL1-8B, a un \log rándose aproximadamente 3800 transformantes con pA con una frecuencia de transformación de 1580 transformantes/ μ g de DNA. Con los plásmidos pB y pC no

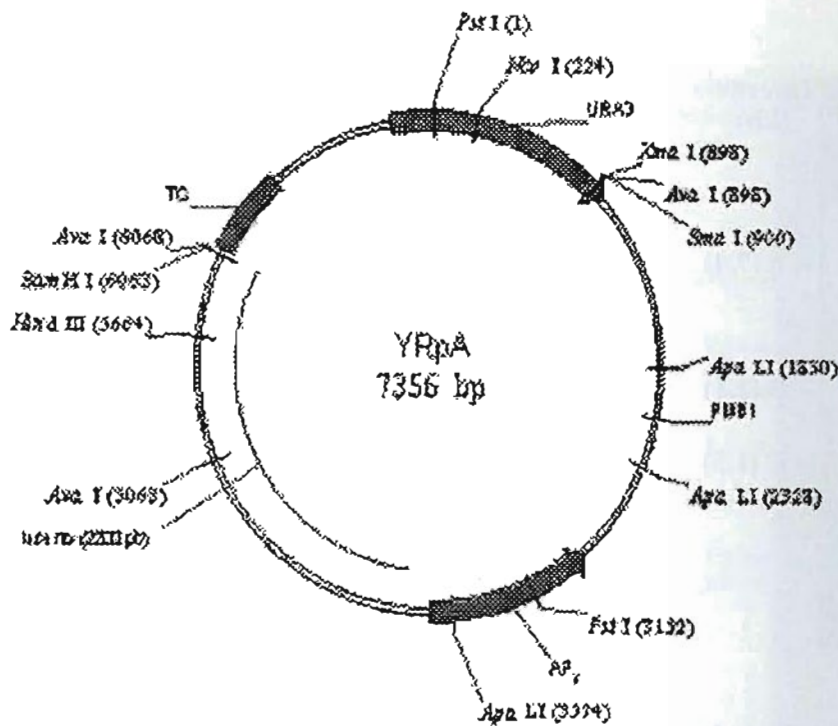


Figura 5. Mapa de restricción de YRpA.

se obtuvieron transformantes. Este resultado indica que la función *ARS* radica en *pA*. Este último plásmido fue denominado como YRpA, debido a que funciona como un plásmido replicativo en *S. cerevisiae*. Finalmente se contruyó un mapa de restricción de este plásmido replicativo YRpA tal como se muestra en la Figura 5. La prueba de su funcionalidad en la levadura *X. dendrorhous* no fue posible debido a que aún no se dispone de un marcador genético de selección para dicho organismo, proceso que se encuentra en desarrollo en nuestro laboratorio.

REFERENCIAS

- Adrio, J.L. & Velgn, M. (1995). Transformation of the astaxanthin-producing yeast *Phaffia rhodozyma*. *Biotechnol. Techniques* 9: 509-512
- An, G.H.; Schuman, D.B. & Johnson, E.A. (1989). Isolation of *X. dendrorhous* mutants with increased astaxanthin content. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:116-124
- Andrewes, A.G.; Phaff, H.J. & Starr, M.P. (1976). Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, a red pigmented fermenting yeast. *Phytochemistry* 15:1003-1007
- Birboin, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 2: 1513-1523
- Golubev, W.I. (1995) Perfect state of *Rhodomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*). *Yeast* 11: 101-110
- Hermosilla, G.; León, R.; Martínez, C.; Cifuentes, V. (1995). Formation and regeneration of *Phaffia rhodozyma* protoplasts. *Boletín Micológico* 10:71-75
- Martínez, C.; Hermosilla, G.; León, R.; Pincheira, G.; Cifuentes, V. (1998). Genetic transformation of astaxanthin mutants of *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 73:147-153
- Phaff, H.J. & Starmer, W.T. (1989). Yeast associated whit plants, insects and soil, p.123-180. In *The Yeasts*, Rose A. and Harrison J. (eds.), vol.2. Academic Press, London.
- Retamales, P.; León, R.; Martínez, C.; Hermosilla, G.; Pincheira, G.; Cifuentes, V. (1998). Complementation analysis with new genetics markers in *Phaffia rhodozyma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 229-236
- Rubinstein, L.; Altamirano, A.; Ducrey-Santopietro, L.; Baigori, M.; de Figueroa, L.C. (1996). Transformation of *X. dendrorhous* by electroporation. *Biotechnol. Techniques*. 10:929-932
- Sthrul, K.; Stinchcomb, D.; Scherer, S.; Davis, R. (1979). High frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 76: 1035-1039
- Stinchcomb D.T.; Thomas, M.; Kelly J.; Selker E. and Davis R.W. (1980). Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replicating in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 77: 4559-4563
- Wery, J.; Gutker, D.; Renniers, A.C.H.M.; Verdoes, J.C.; van Ooyen, A.J.J. (1997). High copy number integration into the ribosomal DNA of the yeast *Phaffia rhodozyma*. *Gene* 184: 89-97