

CONSTRUCCION DE VECTORES DE INTEGRACION DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y SU APLICACION EN EL GENOMA DE NEUROSPORA CRASSA.

Víctor Cifuentes

Laboratorio de Genética Departamento de Ciencias Ecológicas
Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
Las Palmeras 3425, Casilla 653 Santiago

Palabras clave: Vectores de integración, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, Secuencias de replicación autónoma, Transformación

Key words: Integrating vectors, *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, Autonomously replicating sequence, Transformation.

RESUMEN

El presente trabajo describe la construcción de tres vectores de integración y un vector de replicación autónoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Dichos vectores se caracterizan por poseer el gen *LEU2* de levadura y los genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina que sirven como marcadores genéticos en *Escherichia coli*. Por otro lado, el gen *LEU2* puede ser utilizado en la selección de transformantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Los plásmidos VCp1, VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3 transforman a la levadura en baja frecuencia (aproximadamente 10 transformantes/ug de DNA) y se comportan como vectores de integración verdaderos.

Los plásmidos VCp1 y VCp2.1 fueron utilizados para la construcción de dos genotecas de *Neurospora crassa* a fin de aislar secuencias de replicación autónoma de *Neurospora* en levadura. A partir de la genoteca en VCp1, se pudo aislar un plásmido portador de un inserto que corresponde a un fragmento de 3.5 kb de DNA del hongo.

INTRODUCCION

El análisis de secuencias de DNA eucariótico ha sido facilitado por la simplicidad con la cual el DNA de estos organismos puede ser clonado en procariontes mediante los sistemas de transformación (Cohen et al. 1972) y vectores desarrollados para

SUMMARY

[Construction of integrating vectors of *Saccharomyces cerevisiae* and their application in the genome of *Neurospora crassa*]

This work describes the construction of three integrating and a replicating vector from *Saccharomyces cerevisiae*. Such vectors carry the yeast *LEU2* gene and the ampicillin and tetracycline resistance genes utilized as genetic markers in *Escherichia coli*. Therefore, the *LEU2* gene can be used in the selection of transformants in *Saccharomyces cerevisiae*. The plasmids VCp1, VCp2.1, VCp2.2 and VCp2.3 showed low transformation frequency (about 10 transformants/ug DNA) and behaved as true integrating vectors.

The VCp1 and VCp2.1 plasmids were used to construct two genome libraries from *Neurospora crassa* to isolate autonomously replicating sequences from *Neurospora crassa* in yeast. From the VCp1 *Neurospora* genomic library, it was possible to isolate a plasmid carrying a DNA insert of 3.5 kb from the fungus.

estos últimos (Balbas et al. 1986; Bolívar et al., 1977). Secuencias de DNA eucarióticas pueden ser obtenidas y alteradas fácilmente *in vivo* e *in vitro* mediante el uso de técnicas de genética molecular y DNA recombinante. Esto permite estudiar el efecto de cambios inducidos experimentalmente sobre la función y expresión de los genes analizados.

La mayoría de los estudios a este nivel,

requieren de la construcción de una genoteca del organismo en un vector adecuado para el hospedador a utilizar. Algunos genes de organismos eucariontes inferiores se expresan en *E. coli*. De hecho, muchos genes de *S. cerevisiae* han sido clonados y seleccionados por expresión en *E. coli*. Sin embargo, otros genes muestran grados de funcionalidad variable y no es posible expresarlos en dicha bacteria. Esta situación hace necesario recurrir a otras estrategias para su aislamiento.

La utilización de hongos como hospedadores de clonado, podría ser ventajosa como estrategia de clonamiento de genes que no se expresan en *E. coli*. En relación a esto, *S. cerevisiae* puede constituir una alternativa conveniente para la clonación molecular de aquellos genes eucarióticos que no pueden ser seleccionados por complementación en la bacteria.

La eficiencia de los sistemas de clonación de genes en hongos, depende de la disponibilidad de vectores para el desarrollo de los respectivos sistemas de transferencia y expresión génica. Es así como la utilidad que prestan los vectores de integración de *S. cerevisiae* para el aislamiento de secuencias de replicación autónoma de otros hongos y para la realización de experimentos de mutagénesis dirigida, es enorme.

Los vectores de integración de *S. cerevisiae*, transforman en baja frecuencia, aproximadamente 1 a 10 transformantes por μ g de DNA, integrándose en una región de homología en el genoma de la levadura y generalmente son estables mitóticamente. Una excepción a esto, ocurre con aquellos vectores de integración que son portadores del gen LEU2 de este organismo. Dicho gen se encuentra ubicado en el cromosoma III de *S. cerevisiae* (Broach, 1981). En la posición 5' respecto a la dirección de transcripción, se encuentra ubicada una de las 50 copias (aproximadamente) del transposón Ty1 de la levadura (Cameron et al. 1979; Scherer et al. 1980; Kingsman et al. 1981). En ambos extremos de este transposón existen 2 secuencias repetidas directas (DR) denominadas secuencias ϕ . Estas características hacen que los vectores de integración portadores del gen LEU2, transformen con una frecuencia mayor de la esperada, para un vector de esta naturaleza. Todos los plásmidos que llevan el gen LEU2, poseen parte del extremo de dicho elemento genético y por lo tanto pueden integrarse por homología en otras regiones

fuera del locus LEU2, aumentando por lo tanto la frecuencia de transformación. De esta manera, tales vectores no pueden ser utilizados para aislar secuencias ARS mediante selección por incremento de la frecuencia de transformación. Por otro lado, se han construido cepas auxotróficas para leucina que tienen dobles mutaciones en el gen LEU2. Dichas cepas de *S. cerevisiae* son muy estables y no se ha detectado reversión en ellas.

Los antecedentes recién mencionados sugieren que la elaboración de vectores de integración de *S. cerevisiae* portadores del gen LEU2, que carezcan de las secuencias de Ty1 del extremo de dicho gen, serán de mucha utilidad para aplicarlos en la selección de secuencias de interés y elaboración de vectores de clonación para otros hongos tales como *N. crassa*.

En el presente trabajo se describe la construcción de vectores de integración de *S. cerevisiae* y su utilización en la construcción de genotecas de *N. crassa*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas

En este estudio se utilizó *Escherichia coli* cepa C600 (F⁺ *thi* 1, *thr* 1, *leu* B6, *lac* Y1, *ton* A21, *sup* E44, λ); Appleyard, 1954) y la cepa HB101 (F⁺ *hsd* 20 (r⁺ B⁺, mB⁻), *rec* A13, *ara* 14, *pro* A2, *lac* Y1, *gal* K2, *rps* L20 (*Sm*⁻), *xyl* 15, *mtl* 1, *sup* E44, λ -); Boyer et al., 1969).

S. cerevisiae, cepa Sc483 (a, *leu*2.3, *leu*2.112, *his*4, *can*1; Jimenez et al., 1980). Esta cepa fue proporcionada por el Dr. Antonio Jiménez (C.S.I.C. España), cepa D234-3B (alfa, *leu*2.3, *leu*2.112, *his* 3.11, *ura* 3.52, *trp* 1.289, *tcn*). Esta cepa fue proporcionada por el Dr. J.W. Szostak (Harvard Medical School, Boston, MA., U.S.A.).

Plásmidos

Los plásmidos pBR322, (Bolvvar et al., 1977) e YRp7 (Tschumper et al., 1980) fueron utilizados para la construcción de vectores. También se utilizó el plásmido pTS1.2, derivado de pBR322 al cual se le ha insertado un fragmento Sal I- Xho I de 2 kb portador del gen LEU2 de levadura en el sitio Sal I de

dicho plásmido y fué obsequiado gentilmente por la Dra. Teresa Suárez, Depto. de Genética, U. de Salamanca, España.

Condiciones de Cultivo

E. coli fué cultivada en medio LB a 37°C con agitación constante (Davis et al. 1980). Cuando fue necesario se suplementó con ampicilina a una concentración final de 100 ug/ml. y/o tetraciclina a una concentración final de 15 ug/ml.

S. cerevisiae fué cultivada a 30°C en medio YEP o medio mínimo SD suplementado con los requerimientos metabólicos histidina o triptofano según la cepa utilizada (Cifuentes, 1988).

Purificación de DNA

El DNA plasmidial fue purificado por el método de Clewell et al. (1969). Para minipreparaciones de DNA plasmidial se utilizó la técnica de Birnboim et al. (1979). El DNA plasmidial de *S. cerevisiae* fue purificado de acuerdo a Yeh et al. (1986).

La purificación de DNA a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión se realizó como se describe en Cifuentes, (1988).

Transformación genética

Las transformaciones de *E. coli* y *S. cerevisiae* fueron realizadas como se describe en Cifuentes (1988). Para la manipulación del DNA mediante técnicas de recombinación de DNA *in vitro*, se utilizó los métodos descritos en Sambrook et al., (1989).

RESULTADOS

La figura 1 muestra la estrategia utilizada para la construcción de los vectores de integración VCp1, VCp2.1, VCp2.2, VCp2.3 y el vector replicativo VCp3.1. El plásmido VCp1 fue construido a partir del fragmento HpaI/AvaI de 5,5 kb del plásmido pTS1.2. Los extremos cohesivos Ava I fueron rellenados con la enzima DNA polimerasa I (Klenow) de *E. coli*, luego fue ligado con DNA ligasa de T4 y finalmente se transformó *E. coli* C600. Se selecciona-

ron 6 transformantes con fenotipo Leu+, Amp^r, Tet^r. El análisis del DNA plasmidial de las colonias transformantes indicó que todas portaban un plásmido de un tamaño de 5.5 kb que fué denominado VCp1. Experimentos de transformación de *E. coli* C600 indican que VCp1 tiene la capacidad de transformar en alta frecuencia (ver tabla 1).

Para la construcción de los otros vectores se utilizó el plásmido pBR322 y el gen LEU2 de levadura el cual fue obtenido a partir del plásmido pTS1.2 como un fragmento Hpa I Sal I de 1.8 kb (ver figura 1). El extremo cohesivo generado por Sal I se rellenó con DNA polimerasa I (Klenow) de *E. coli*. Por otro lado, el plásmido pBR322 fue digerido con EcoR I y sus extremos cohesivos fueron llenados con DNA polimerasa I (Klenow), luego ambos DNAs fueron mezclados y ligados con DNA ligasa de T4. Después de transformar *E. coli* C600, se seleccionaron 2 clones capaces de crecer en medio mínimo, complementando la mutación leuB6 de la bacteria y preservando las características de resistencia a tetraciclina y ampicilina. Los plásmidos, denominados VCp2.1 (6.2 kb), y VCp2.2 (8.0 kb), fueron analizados por su capacidad de retransformar *E. coli* C600 (ver tabla 1) y mediante digestión con enzimas de restricción (ver figura 2). Dichos plásmidos son capaces de cotransformar los genes LEU2, resistencia a ampicilina y tetraciclina. El análisis de restricción muestra que el plásmido VCp2.2 posee el gen LEU2 en una orientación opuesta a la presente el VCp2.1. Además, VCp2.2 es portador de una duplicación en tandem del gen LEU2.

A partir VCp2.2 se procedió a construir otro plásmido, extrayendo una copia del gen LEU2 mediante digestión con EcoRI (ver figura 1). Después de ligar el DNA y transformar *E. coli* C600, se seleccionaron 10 transformantes con fenotipo Leu+, Amp^r y Tet^r, cuyo DNA plasmidial fué analizado mediante digestión con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. Se seleccionó uno de ellos y se denominó VCp2.3 (6.2kb). Este plásmido fué posteriormente analizado mediante retransformación (ver tabla 1) y por digestión con enzimas de restricción. Los resultados indican que VCp2.3 es portador de una copia del gen LEU2 en la misma orientación

Tabla 1. Transformación de *E. coli* con vectores de clonado de levadura.

Plásmido	Frecuencia de transformación (transformante/ug de DNA)		
	Amp ^r	tet ^r	leu ⁺
VCP1	3.8 x 10 ⁵	0	3.6 x 10 ⁵
VCp2.1	5.2 x 10 ⁵	4.1 x 10 ⁵	4.1 x 10 ⁵
VCp2.2	4.0 x 10 ⁵	2.3 x 10 ⁵	1.9 x 10 ⁵
VCp2.3	3.5 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁵	2.3 x 10 ⁵
VCp3.1	5.5 x 10 ⁵	5.4 x 10 ⁵	4.7 x 10 ⁵
pTS1.2	8.0 x 10 ⁵	0	7.8 x 10 ⁵
pBR322	7.4 x 10 ⁵	7.0 x 10 ⁵	0
YRp7	7.8 x 10 ⁵	n.d.	0
YEp13	7.2 x 10 ⁵	6.3 x 10 ⁵	6.4 x 10 ⁵

Células competentes de cepa *Escherichia* C600 fueron transformadas con 50 o 80 ug de DNA de cada plásmido.

Tabla 2. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con vectores de clonamiento.

Plásmido	cepa	Frecuencia de transformación (Transformantes /ug de DNA)	
		leu ⁺	trp ⁺
VCp1	Sc483	10	0
VCp2.1	Sc483	15	0
VCp2.1	D234-3B	13	0
VCp2.2	Sc483	13	0
VCp2.3	Sc483	12	0
VCp3.1	D234-3B	983	957
pTS1.2	Sc483	110	0
YEp13	Sc483	1895	0
YEp13	D234-3B	2725	0

Las cepas Sc483 (a, leu2-3, 112; his4, can1) y D234-3B (α leu2-3, 112; his3, 11; ura3,52; trp1, 289; tem) fueron transformadas con 1 ó 2 ug de DNA de cada plásmido. Los transformantes leu⁺ o trp⁺ fueron seleccionados en medio mínimo suplementado con histidina para la cepa Sc483 y uracilo, histidina y/o leucina para la cepa D234-3B.

Tabla 3 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* cepa Sc483 con genotecas de *Neurospora crassa* en vectores de integración.

A. Genoteca de *N. crassa* en VCp1

B. Genoteca de *N. crassa* en VCp2.1

DNA	Tipos de Transformantes		DNA	Tipos de Transformantes	
	Pequeño	Grande		Pequeño	Grande
-	0	0	-	0	0
YEp13	-	978	YEp13	10	1072
VCp1	15	7	VCp2.1	12	8
Genoteca	599	255	Genoteca	429	163

Esferoplastos de la cepa Sc483 de *Saccharomyces cerevisiae*, fueron transformados con 1 ug de DNA de los plásmidos YEp13, VCp1 y VCp2.1 respectivamente y con 5 ug de DNA de las diferentes mezclas de DNA de las genotecas respectivas.

Tabla 4 Tiempo de generación de transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* con plásmidos provenientes de las genotecas.

(A)	Tiempo de generación (horas)	(B)	Tiempo de generación (horas)
Transformante		Transformante	
Control (Sc483)	3.5	Control	3.5
Sc483-YEp13	2.5	Sc483-YEp13	2.5
Sc5.30	3.5	YeT-5	4.0
Sc14.12	8.0	YeT-19	4.1
Sc5.10	10.0	YeT-32	3.8
ScB.4	12.0	YeT-41	3.5
Sc14.14	14.0	YeT-44	4.5
Sc15.5	15.0	YeT-67	4.6
Sc14.1	20.0	YeT-69	4.6
		YeT-70	4.4

El tiempo de generación fue determinado mediante el crecimiento de los transformantes en medio mínimo suplementado con histidina. El crecimiento fue medido como el aumento de la D.O.

Figura 1.
Estrategia utilizada para la construcción de los vectores de clonado de *Saccharomyces cerevisiae*.

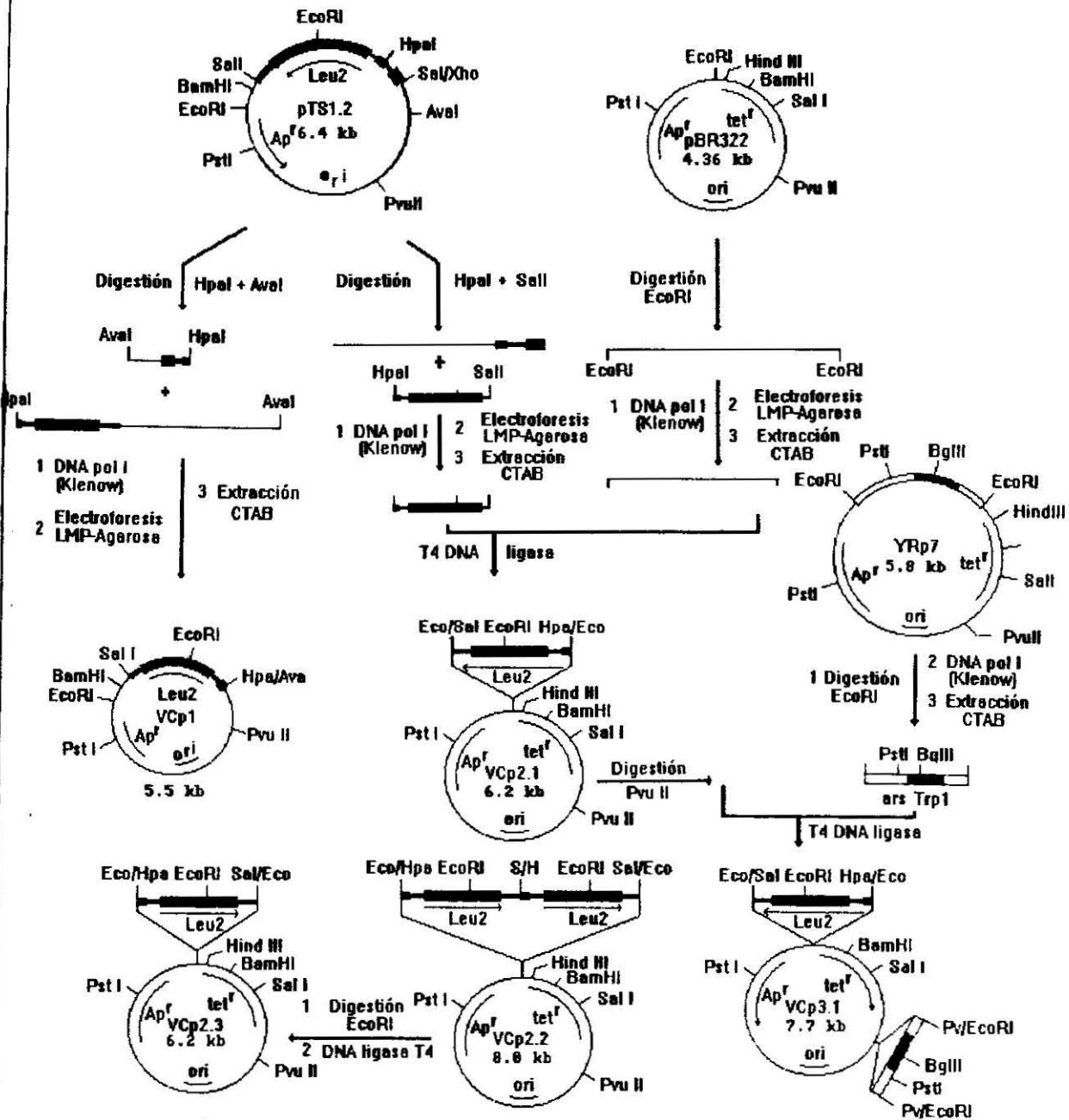


Figura 2

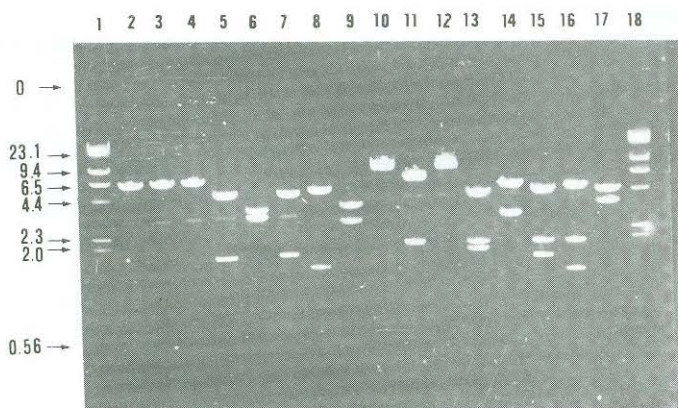


Figura 3

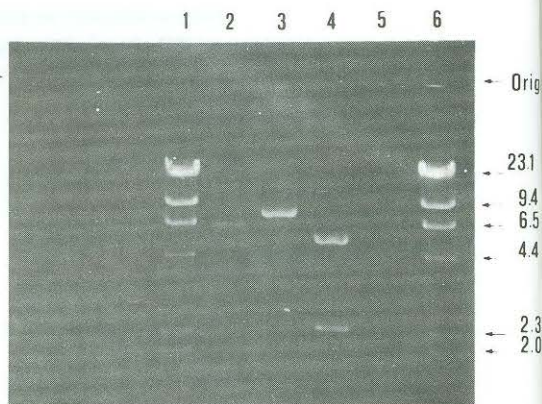


Figura 4

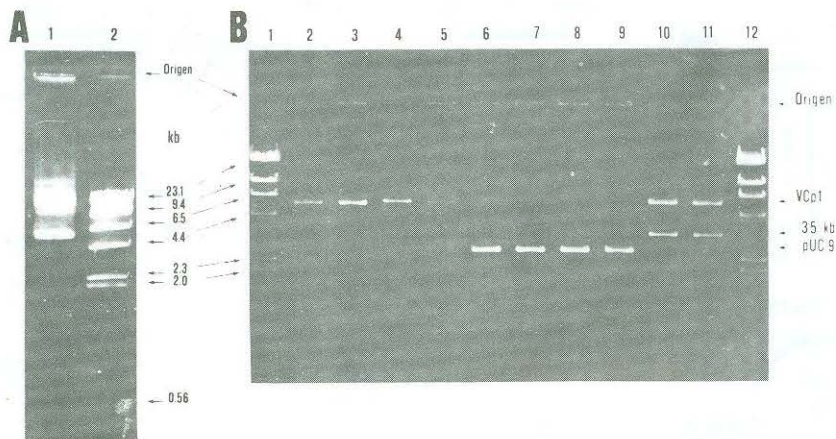


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos VCp2.1 y VCp2.2 con diferentes endonucleasas de restricción. El DNA plasmidial fue tratado con las endonucleasas de restricción y los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII. 2) al 9) VCp2.1 digerido con: 2) PstI. 3) EcoRI. 4) SaII. 5) PstI + EcoRI. 6) PstI + SaII. 7) EcoRI + SaII. 8) EcoRI + BamHI. 9) HindIII + PstI. 10) al 17) VCp2.2 digerido con: 10) PstI. 11) EcoRI. 12) SaII. 13) PstI + EcoRI. 14) PstI + SaII. 15) EcoRI + SaII. 16) EcoRI + BamHI. 17) HindIII + PstI. 18) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión de los plásmidos VCp2.1 y VCp3.1 con endonucleasas de restricción. Los productos de la reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.7% 1) DNA del bacteriófago λ + HindIII. 2) VCp2.1 EcoRI. 3) VCp3.1 + EcoRI 4) VCp3.1 + PstI 6) DNA del bacteriófago λ + HindIII.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del DNA plasmidial de un transformante (SC14.12) de *Saccharomyces cerevisiae* rescatado en *Escherichia coli* C600. A: DNA sin digerir: 1) SCp14,2) DNA de λ + HindIII. B: DNA plasmidial digerido con endonucleasas de restricción: 1) DNA de λ + HindIII. 2) al 5) VCp1 + PstI. 6) al 9) pUC9 + SaII. 10) y 11) SCp14 + PstI. 12) DNA de λ + HindIII.

que en VCp2.2 y que mantiene las resistencias a ambos antibióticos.

Se construyó un nuevo vector de *S. cerevisiae* insertando en el sitio PvuII de VCp2.1 un fragmento EcoRI de 1.45 kb, portador del gen TRP1 y una secuencia de replicación autónoma (ARS1) de levadura. Dicho fragmento fue obtenido a partir del plásmido YRp7 mediante digestión con EcoRI. Los extremos cohesivos fueron rellenados con DNA polimerasa I (Klenow) de *E. coli*. El plásmido VCp2.1 linearizado con PvuII y el fragmento de 1.45 kb portador de TRP1 y ARS1 fueron ligados y con la mezcla se transformó *E. coli* HB101. Como resultado se seleccionó un clon portador de un plásmido de 7.7 kb, denominado VCp3.1 (ver figura 3). Este plásmido fue analizado mediante transformación de *E. coli* C600 (ver tabla 1). Además, todos los transformantes presentan el fenotipo de resistencia a ampicilina y tetraciclina como se esperaba.

Para comprobar que los vectores construidos (VCp1, VCp2.1, VCp2.2, VCp2.3 y VCp3.1) corresponden a lo esperado, se realizó experimentos de transformación de *S. cerevisiae*. Para ello se utilizó las cepas Sc483 y D234-3B; esta última se caracteriza por llevar mutaciones de auxotrofia para leucina y triptofano (*leu2* y *trp1*) y fue utilizada para el análisis del plásmido VCp3.1. La tabla 2 muestra claramente que los vectores de integración VCp2.1, VCp2.2 VCp2.3 transforman a *S. cerevisiae*, a una frecuencia baja, del orden de 10 transformantes / μ g de DNA plasmidial. Por otro lado, el plásmido VCp3.1 presenta una frecuencia de transformación del orden de 10^3 transformantes/ μ g de DNA como se esperaba por el hecho de llevar un replicador de levaduras. Además se puede apreciar que VCp3.1, puede transformar para prototrofia para leucina tanto como para triptofano tal como era de esperar para un plásmido portador de ambos genes.

Las características de los vectores de integración portadores del gen LEU2 libre de secuencias del transposón Ty1, indican que dichos plásmidos podrán ser utilizados para la selección y aislamiento de secuencias de replicación autónoma de otros organismos eucariontes. Para probar esto, se construyeron 2 genotecas de *N. crassa* en los vectores VCp1 y VCp2.1 respectivamente y se realizaron experimentos tendientes a seleccionar clones portadores de una de tales secuencias.

La genoteca en VCp1, fue construida a partir de fragmentos de restricción parcial, con PstI del DNA de *N. crassa*. Esta genoteca quedó constituida por 8345 clones diferentes con un tamaño promedio de inserto de 6kb, los cuales fueron distribuidos en 12 grupos de 50 clones, 15 de 100 y 12 de 500, en tubos de almacenamiento.

La genoteca de *N. crassa* en el vector VCp2.1 fue elaborada en el sitio BamHI de dicho vector y se utilizó DNA de *N. crassa* digerido parcialmente con la enzima de restricción Sau3A1. Después de ligar ambos tipos de DNA, se transformó *E. coli* C600 y se seleccionaron los transformantes *Leu*⁺, *Amp*^r. El análisis de una población representativa de 300 clones de la genoteca indica que hubo un 7% de religamiento del vector. Esta genoteca quedó constituida por 8161 clones con un tamaño promedio de inserto de 10 kb, los cuales fueron distribuidos en 15 grupos de aproximadamente 550 clones en tubos de almacenamiento.

La tabla 3 muestra los resultados de experimentos de transformación de *S. cerevisiae* cepa Sc 483 con el DNA plasmidial de la genoteca en VCp1 (tabla 3A) y de la genoteca en VCp2.1 (tabla 3B). En todos los casos se obtuvieron 2 tipos de transformantes *Leu*⁺. La mayoría corresponde a colonias de pequeño tamaño y otras, en menor número, presentan un tamaño mayor. Los transformantes se replicaron en medio mínimo para seleccionar aquellos transformantes verdaderos y eliminar a los abortivos. Para caracterizar a los transformantes, se determinó la velocidad de crecimiento, esperando que aquellos que son portadores de secuencias de replicación autónomas tengan un crecimiento más lento (Stinchcomb, et al., 1979; 1980). Dado que una de las características de los transformantes de levadura que portan un plásmido con una secuencia ARS es el aumento del tiempo de generación, acompañado de inestabilidad mitótica, se utilizó como criterio de selección adicional, el tiempo que demoran en duplicarse estos transformantes. La tabla 4 muestra los resultados para los transformantes con las genotecas en VCp1 (tabla 4A) y en VCp2.1 (tabla 4 B).

Una etapa de selección adicional, consistió en la determinación de la estabilidad mitótica de los transformantes en medio completo (YEP) y en medio

selectivo (SD). Como resultado de este análisis se encontró que 96 transformantes eran estables mitóticamente, con porcentajes de estabilidad que oscilaron entre 96.5 al 99.4%. El resto de los transformantes, presentaron niveles de estabilidad mitótica que varió entre el 83 y el 91.7%. De esta manera, fue posible determinar que 250 transformantes de la genoteca en VCp1 y 320 transformantes con la genoteca en VCp2.1 tienen las características de portar secuencias ARS.

Con el objeto de rescatar plásmidos de aquellos clones de levadura que son portadores de replicadores de *N. crassa*, se purificó DNA de todos los transformantes de *S. cerevisiae*, seleccionados de acuerdo a los criterios antes mencionados y se realizaron experimentos de transformación de *E. coli* C600. Estos experimentos significaron un análisis del DNA de más de 300 clones de *S. cerevisiae*. Como resultado de esto, se logró obtener sólo un transformante de *E. coli* portador de un plásmido SCp14. Este proviene de la genoteca en VCp1. La figura 4 muestra los resultados del análisis mediante electroforesis en gel de agarosa de dicho plásmido. La digestión con la enzima de restricción PstI muestra la presencia de 2 bandas de DNA, una corresponde al vector de clonado VCp1 (5.5kb) y la otra, un inserto de 3.5 kb (ver figura 4B). Sin embargo, estudios posteriores, indican que este plásmido transforma en baja frecuencia a la cepa Sc483 de *S. cerevisiae*.

DISCUSION

Se han construido vectores de clonación de *S. cerevisiae*, portadores del gen LEU2 y que tienen la capacidad de expresarse tanto en levadura como en la bacteria *E. coli*. Además, dichos vectores llevan los genes de resistencia a ampicilina y a tetraciclina los cuales pueden ser utilizados para la selección de transformantes en la bacteria. Cuatro de estos vectores son de integración, VCp1, VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3 y transforman en baja frecuencia a *S. cerevisiae*. Otro es de replicación autónoma, VCp3.1 y transforma en alta frecuencia a *S. cerevisiae*.

Para el clonamiento de genes de *N. crassa*, se construyó una genoteca en dos vectores de integración de levadura. Estos son los plásmidos VCp1 y VCp2.1. El objetivo de las genotecas fue aislar y clonar fragmentos de DNA de *N. crassa* portadores

de una secuencia de replicación autónoma (ARS) que sea funcional en *S. cerevisiae*. El diseño experimental se basó en el hecho que en *S. cerevisiae* las secuencias ARS aumentan la frecuencia de transformación del hongo cuando se introducen en un vector de integración (Struhl et al., 1979; Stinchcomb et al., 1980). Además los transformantes de levadura portadores de este tipo de plásmido, presentan inestabilidad mitótica y meiótica asociada a un incremento del tiempo generacional. El gen LEU2 fue elegido como marcador seleccionable debido a que se dispone de cepas de *S. cerevisiae* que llevan mutaciones dobles en dicho gen (*leu**). Tales cepas muestran una frecuencia de reversión inferior a 10^{-12} , parámetro importante de considerar, cuando se trabaja con frecuencias de transformación bajas.

Las secuencias del transposón Ty1, responsables de aumentar la frecuencia de transformación con plásmidos de integración, fueron eliminadas mediante la construcción de los vectores de integración portadores del gen LEU2 de *S. cerevisiae*. La frecuencia de transformación a *leu** obtenida con estos vectores es de aproximadamente 10 transformantes/ μ g de DNA. Esto está de acuerdo a lo esperado para un vector de esta naturaleza (Hicks et al., 1979). De hecho, al comparar esta frecuencia de transformación con la obtenida con el plásmido pTS1.2, se observa que los vectores construidos a partir de este último, transforman aproximadamente 10 veces menos, lo que los convierte en vectores de integración verdaderos. Cuando se compara las frecuencias de transformación de los vectores de integración VCp1, VCp2.1, VCp2.2 y VCp2.3 con aquellas obtenidas con vectores episómicos como YEp13 o con un vector de replicación autónoma como YRp7 o VCp3.1, se observa que en los primeros la eficiencia es de 2 a 3 órdenes de magnitud menor. Además, el fragmento portador del gen LEU2 de levadura utilizado en estos vectores, ha sufrido una alteración de una secuencia ubicada entre el transposón Ty1 y un gen que codifica por tRNA_{3^{leu}} adyacente al LEU2 (Martínez-Arias et al., 1984). Esto permite una mayor expresión de este último gen, facilitando el crecimiento de los transformantes en los medios selectivos.

Dado que en *N. crassa*, no existe en la actualidad vectores de clonamiento molecular, portadores de secuencias de DNA cromosómicas que le confieran una replicación autónoma a tales plásmi-

dos, y sólo se dispone de un vector basado en un plásmido mitocondrial (Sthol et al., 1983), se ha hecho necesario aislar secuencias que puedan funcionar como replicadores para la construcción de vectores adecuados a las necesidades de la genética de *N. crassa*.

En relación a lo anterior, en el presente trabajo se intentó clonar y aislar tales secuencias ARS, utilizando a *S. cerevisiae* como un hospedador de clonado. Para ello se realizaron experimentos de transformación de levadura con DNA plasmidial provenientes de las genotecas de *N. crassa*. Los resultados obtenidos a partir de la genoteca en VCp1, mostraron la presencia de 2 tipos principales de transformantes. Un tipo corresponde a los transformantes por integración, que son colonias de mayor tamaño y muy estables; el otro tipo presenta un tamaño de colonia menor e inestabilidad mitótica.

A partir de los transformantes inestables, se rescató un plásmido en *E. coli*. Este plásmido es portador del vector VCp1 completo y un inserto de 3.5 kb. Esto sugiere que dicho plásmido se encontraba en forma extracromosómica como una molécula circular cerrada en la levadura, dado que de otra manera no habría podido transformar a la bacteria. Se esperaba que el plásmido SCp 14 retransformara en alta frecuencia a la levadura, sin embargo, a pesar de llevar una secuencia de *N. crassa* con características de ARS, su comportamiento correspondió a un típico plásmido de integración. Una explicación de tal comportamiento es que podría ser un transformante en el cual el DNA plasmidial se encontraba en vías de integración o un transformante abortivo, sin embargo debido a que el procedimiento de selección requiere del crecimiento de los transformantes durante un tiempo prolongado, hace poco probable dicha explicación. Es posible que ocurriera un rearrreglo del inserto de DNA de *N. crassa* presente en el vector y que de esta manera perdió su capacidad de replicarse posteriormente. Fenómenos de rearrreglo del DNA en *S. cerevisiae* ya han sido descritos (Clancy et al., 1984) y este tipo de evento puede ser tan drástico que llega a eliminar completamente fragmentos de DNA de otro origen en el vector donde se encuentra (Clancy et al., Toh-e et al., 1981) o bien ocurren deleciones parciales en dicho plásmido (Gerbaud et al., 1979).

Las características de los transformantes de

levadura, portadores de secuencias ARS, permitieron diseñar una estrategia para clonar y aislar secuencias de replicación autónomas de *N. crassa* en *S. cerevisiae*. No obstante la relación filogenética existente entre ambos organismos, debe existir diferencias que hacen que secuencias de DNA de uno de ellos no puedan funcionar en el otro, o bien, sí en algún momento son funcionales, estas secuencias pueden llegar a ser modificadas.

El procedimiento seguido utiliza fragmentos PstI oSau3A1 de *N. crassa*. Los resultados están de acuerdo a los ya descritos (Stinchcomb et al., 1980), en los cuales fue posible aislar una secuencia funcional en *S. cerevisiae*, denominada ARS8, la cual aparentemente tampoco es capaz de retransformar a la levadura. Además, esta secuencia no es funcional en *N. crassa* cuando se prueba por retransformación (Vapnek et al., 1981; Suzci et al., 1983). Es probable que dicho fragmento BamHI fuera reconocido como un origen de replicación por la levadura. Sin embargo, para funcionar como tal en *N. crassa*, posiblemente necesita elementos extras no presentes en dicho fragmento. Por otro lado, no está claro si los plásmidos portadores de ARS8 son capaces de retransformar en alta frecuencia a la levadura y no es posible aislar su DNA plasmidial de todos los transformantes inestables por el sistema de selección de *E. coli* descrito por Stinchcomb, 1980.

En *S. cerevisiae* existiría al menos 1 ARS por cada 40 a 50 kb de DNA cromosómico (Beach et al., 1980; Chan et al., 1980; 1983). Dada la cercanía filogenética entre *Saccharomyces* y *Neurospora* se podría esperar para *N. crassa* una disposición de las secuencias ARS similar a levadura, y por lo tanto, debería ser posible su aislamiento si éstas se expresan en este último organismo.

De acuerdo a la ecuación de Clarke et al., (1976), con un tamaño de inserto de 6 kb, los 8345 clones de la genoteca en VCp1 representan aproximadamente el 55% del genoma de *N. crassa*, esto es, 14.800 kb. Por otra parte, si se supone que los 250 transformantes inestables de levadura, obtenidos con esta genoteca, corresponden a clones portadores de secuencias con algún tipo de función ARS, entonces se puede estimar que habría aproximadamente 1 ARS por cada 59 kb en *N. crassa*.

De la misma manera, al realizar un cálculo similar con la genoteca de *N. crassa* en el vector

VCp2.1, con un tamaño promedio de inserto de 10 kb, los 8161 clones representan el 65% del genoma del hongo, esto es 17.500 kb. Como se obtuvieron aproximadamente 320 transformantes que fueron seleccionados en mezclas con un número mayor de clones, resulta aproximadamente 1 ARS por cada 58,5 kb, resultado que estaría de acuerdo con el obtenido con la genoteca en VCp1 y con los descritos para levaduras.

Debido a que en promedio un total superior a 14.000 kb de DNA de *N. crassa* ha sido analizado en búsqueda de una secuencia ARS aislable y funcional,

se podría asumir que estas secuencias no se expresan en plenitud en *S. cerevisiae*. Sin embargo, este último organismo puede ser un buen hospedador para el clonamiento directo por expresión de genes de *N. crassa*. De hecho, en nuestro laboratorio se han realizado experimentos que han permitido un clonamiento del gen de invertasa de *N. crassa* por expresión en *S. cerevisiae* (Carú et al., 1989). La disponibilidad de vectores que puedan replicarse en *N. crassa* facilitará el estudio de la organización del genoma de este organismo.

REFERENCIAS

- Appleyard, R.K. (1954). Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strains derived from *E. coli* K12. *Genetics* 39: 440-444.
- Balbas, P.; Soberon, X.; Merino, E.; Zurita, M.; Lomeli, H.; Valle, F.; Flores, N. and Bolívar, F. (1986). Plasmid vector pBR322 and its spacial purpose derivatives: a review. *Gene* 50: 3-40.
- Beach, D.; Piper, M. and Shall, S. (1980). Isolation of Chromosomal origins of replication in yeast. *Nature (London)* 284: 185-187.
- Birboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid. Res.* 7: 1513-1523.
- Bolívar, F.; Rodríguez, R.L.; Betlach, M.C. and Boyer, H.W. (1977). Construction and Characterization of new cloning vehicles I. Ampicillin resistant derivatives of plasmid pMB9. *Gene* 2: 75-93.
- Boyer, H.W. and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Broach, J.R. (1981). *Genes of Saccharomyces cerevisiae*. In the molecular biology of the yeast *Saccharomyces*; Life cycle and inheritance. Edited by Strathern, J.N.; E.W. and Broach, J.R. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Cameron, J.R.; Loh, E.Y. & Davis, R.W. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* 16: 739-751.
- Carú, M.; Cifuentes, V.; Pincheira, G. & Jimenez, A. (1989). Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* of the invertase gene from *Neurospora crassa*. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 401-410.
- Chan, C.S.M. & Tye, B. (1980). Autonomously replicating sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6329-6333.
- Cifuentes, V. (1988). Clonamiento de genes de *Neurospora crassa*. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 182 pp.
- Clancy, N.; Mann, C.; Davis, R.W. & Calos, M.P. (1984). Deletion of plasmid sequences during *Saccharomyces cerevisiae* transformation. *J. Bacteriol.* 159: 1065-1067.
- Clarke, L. & Carbon, J. (1976). A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91-99.
- Clewell, L. & Helinsky, D. (1969). Supercoiled circular DNA-protein complex in *Scherichia coli*: Purification and induced conversion to an open circular DNA form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62: 1159-1166.
- Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y. & Hsu, L. (1972). Non chromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *E. coli* by -factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2110-2114.
- Davis, R.; Botstein, D. & Roth, J. (1980). Advanced bacterial genetics. A manual for genetics engineering. pp 202-203. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. New York.
- Gerbaud, C.; Fournier, H.; Blanc, H.; Aigle, M.; Heslot, H. & Guerlaineau, M. (1979). High frequency of yeast transformation by plasmids carrying part or entire 2 μ m yeast plasmid. *Gene* 5: 233-253.
- Hicks, J.; Hinnen, A. & Fink, G.R. (1979). Properties of yeast transformation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43: 1305-1313.
- Jimenez, A. & Davis, J. (1980). Expression of a transposable antibiotic resistant element in *Saccharomyces*. *Nature (London)* 287:869-871.
- Kingsman, A.J.; Gimlich, R.L.; Clarke, L.; Chinault, A.C. & Carbon, J. (1981). Sequence variation in dispersed repetitive sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 145:609-632.

- Martínez-Arias, A.; Yost, H. J. & Casadaban, M.J.** (1984). Role of an upstream regulatory element in leucine repression of *Saccharomyces cerevisiae* leu2 gene. *Nature* (London) 307: 740-742.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, J.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Scherer, S. & Davis, R.** (1980). Recombination of dispersed repeated DNA sequences in yeast. *Science* 209: 1380-1384.
- Stinchcomb, D.T.; Struhl, K. & Davis, R.W.** (1979). Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282: 39-41.
- Stinchcomb, D. T.; Thomas, M.; Kelly, J.; Selker, E. & Davis, R.W.** (1980). Eukaryotic DNA segments capable of autonomous replication in yeast. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 77: 4559-4563.
- Stohl, L.L. & Lambowitz, A.M.** (1983). Construction of a shuttle vector for the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 1058-1062.
- Struhl, K.; Stinchcomb, D.; Scherer, S. & Davis, R.** (1979). High frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 1035-1039.
- Suzci, A. & Radford, A.** (1983). ARS8 sequence in the *Neurospora* genome. *Neurospora Newslett.* 30: 13.
- Toh-e, A. & Wickner, R.B.** (1981). Curing of the 2u DNA plasmid from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 145: 1421-1424.
- Tschumper, G. & Carbon, J.** (1980). Sequence of a yeast DNA fragment containing a chromosomal replicator and TRP1 gene. *Gene* 10: 157-166.
- Vapnek, D.; Hautala, J.A.; Jacobson, J.W.; Giles, N.H. & Kushner, S.R.** (1977). Expression in *E. coli* K-12 of structural gene for catabolic dehydroquinase of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74: 3508-3512.
- Yeh, E.; Carbon, J. Bloom, K.** (1986). Tightly centromere-linked gene (SPO15) Essential for meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 6: 158-167.