

MANIPULACIÓ GENÈTICA DE BACTERIS I LLEVATS

RAFAEL SENTANDREU, ENRIC HERRERO

Departament de Microbiologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de València

Manipulació genètica de bacteris i llevats

Les tècniques de manipulació genètica permeten de reordenar la informació genètica d'una manera molt més àmplia que els mètodes clàssics basats en els mecanismes naturals d'intercanvi de la informació genètica. D'aquesta manera, la denominada «tecnologia del DNA recombinant» permet d'obtenir noves combinacions de «gens» o d'alterar la informació preexistent, amb varies implicacions: I) ampliació del coneixement bàsic dels mecanismes d'expressió «gènica» i la seva regulació, i II) utilització de les noves molècules recombinants en camps d'aplicació per a l'home (indústria farmacèutica i alimentícia, agricultura, sanitat i altres) quan les noves molècules doten les cèl·lules que les posseeixen d'unes propietats que milloren les preexistents (Old i Primrose, 1985).

Eines utilitzades en la tecnologia del DNA recombinant

La possibilitat de manipulació de DNA a voluntat es va obrir quan a començament dels anys 70 es va descobrir que tota una sèrie de microorganismes (eubacteris i cianobacteris principalment) produïen de manera natural uns denominats *enzims de restricció* que reconeixen seqüències úniques de quatre a sis «nucleòtids» tallant el DNA a eixe nivell (Winnacker, 1987). Encara que no tots els enzims de restricció posseeixen una especificació tan estricta, són aquestes (denominades de la classe II) les que tenen aplicació en enginyeria genètica. Amb elles una molècula de DNA serà tallada per terme mitjà una vegada cada alguns cents o milers de parells de bases. A més, en molts casos, i com a resultat del tipus de digestió (vegeu Figura 1), els enzims de restricció generen als extrems dels fragments de DNA resultants seqüències curtes de dos a quatre nucleòtids de cadena simple; aquests «extrems cohesius» es podran aparellar amb els complementaris resultants de la digestió d'altres molècules de DNA amb el mateix enzim de restricció o amb un altre que tinga la mateixa seqüència de reconeixement, cosa que obra la possibilitat de construir (després que una lligassa tanque les mosses de la molècula recombinant) molècules híbrides de DNA.

Les molècules recombinants generades *in vitro* han d'ésser introduïdes en un organisme en el qual es multipliquen. Per aquest procés d'amplificació s'acostuma fer ús de bacteris com *Escherichia coli*, donada la seva facilitat de maneig i els amplis coneixements que es tenen de la seva fisiologia i genètica (Watson et al., 1987). Per això, cal utilitzar *vectors de clonació* en els quals inserir el DNA forani perquè aquest es replegue com a part de la molècula híbrida i asseguri la seva amplificació. El vector de clonació haurà de posseir una seqüència de bases («origen de replicació») que siga reconeguda per un complex replicador en el microorganisme hoste i, així, multiplicar-se i passar a les cèl·lules filles. Idealment, el vector de clonació (i les molècules resultants de la seva manipulació genètica) han de trobar-se en un nombre de còpies a les cèl·lules i posseir algun marcador genètic que permeta de diferenciar les cèl·lules que el posseeixen de les que no el tenen; en la pràctica, en *E. coli* s'empren vectors de tipus plasmídic (com pBR322, plàsmid de 4363 parelles de bases, que confereix resistència a ampicil·lina i tetraciclina) o fàgic (com lambda i els seus derivats).

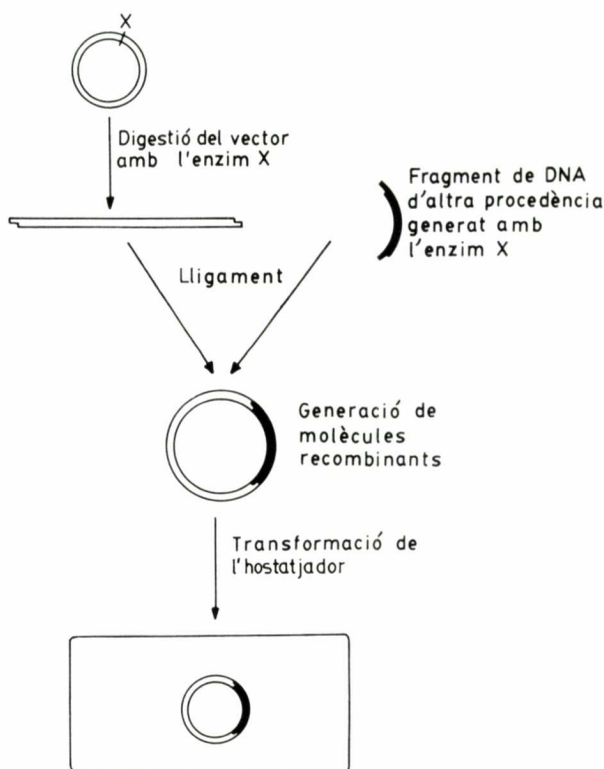


Figura 1. Procés de clonatge d'un fragment de DNA en un plàsmid vector.

Els vectors de clonació que poden replicar-se a més d'un organisme (perquè posseeixen, al menys, un origen de replicació per cada hoste) s'anomenen *vectors llançadora*, i ofereixen òbviament versatilitat pel fet de poder introduir-se i mantenir-se a diferents hostes.

Les molècules manipulades en el tub d'assaig han d'ésser introduïdes a l'hoste en el qual s'han de replicar. Això justifica la necessitat de sistemes de *transformació* o introducció del DNA recombinant a la cèl·lula. Es coneixia d'un temps ençà que una sèrie de bacteris (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Bacillus subtilis* entre d'altres) tenen capacitat per acceptar DNA nu en determinats estadis del seu cicle de desenvolupament poblacional; tanmateix, l'eficàcia del procés era baixa i no sempre les esmentades espècies bacterianes eren útils com a hostes del DNA recombinant. El 1970 es va descobrir que cèl·lules intactes de *E. coli*, en presència d'altres concentracions de Ca^{++} , transformades amb molta eficiència, mitjançant DNA circular amb capacitat d'auto-replicar-se com són els plàsmids o ags, observació que es va fer extensiva a molts altres bacteris. Posteriorment s'ha vist que els llevats també poden ésser transformats en la seva forma cel·lular intacta (en presència de Li^+) o després d'eliminar la paret cel·lular (en presència de Ca^{++}).

Clonació de bacteris

Com s'ha dit adés, *E. coli* és l'hoste més sovint usat en enginyeria genètica. A partir del plàsmid pBR322 s'han desenvolupat una sèrie de vectors utilitzables en *E. coli* que faciliten el clonatge de gens en aquesta espècie. Cal esmentar-ne la sèrie pUC (YanischPerron et al., 1985) (Figura 2). Aquests plàsmids posseeixen el gen *lac Z'* que codifica el fragment aminoterminal de 146 aminoàcids de la beta galactosidasa; quan s'introdueixen en soques d'*E. coli* que sintetitzen beta galactosidasa inactiva per tenir manca dels 14 aminoàcids de l'extrem aminoterminal, la complementació entre ambedós fragments fa que el bacteri posseeixca un enzim funcional capaç d'hidrolitzar determinats substrats cromogènics. Els transformants amb plàsmids pUC intactes formaran, així, colònies blaves. D'altra banda, una regió entre el promotor i l'operador del gen *lac Z'* i l'inici d'aquest aporta una sèrie de punts únics de reconeixement i tall per diversos enzims de restricció; la inserció de DNA forani en algun d'aquests punts és fàcilment detectable, perquè, en eliminar-se la funcionalitat del gen *lac Z'*, les colònies transformants que hi resulten seran incolores.

La sèrie de vectors pUC és útil per al subclonatge i amplificació del DNA clonat en *E. coli*, però en la majoria de casos no permet l'expressió dels gens clonats quan aquests provenen d'un organisme distint d'*E. coli* (a major distància evolutiva entre dues espècies, més difereixen els senyals de transcripció i traducció de la informació genètica, i més difícil serà que aquests senyals siguin reconeguts eficientment en l'organisme heteròleg). En aqueix cas cal l'ús de *vectors d'expressió*, en els quals el gen a expressar es col·loca sota el control de senyals (promotor i lloc d'unió de «ribosomes») de l'hoste. El resultat, molt sovint, és la formació de proteïnes híbrides que contenen la regió aminoterminal d'un polipèptid d'*E. coli* (per exemple, la pròpia beta galactosidasa) fusionada en fase amb la proteïna heteròloga. Es coneixen vectors d'expressió tant plasmídics com fàgics, alguns d'ells molt sofisticats (Winnacker, 1987).

Vectors com els indicats fins aquí posseeixen una limitació important: sols permeten la clonació en ells de fragments de DNA de fins a uns 10 kiloparells de bases. Aquesta limitació pot ésser greu quan d'allò que es tracta és de clonar tota una sèrie de fragments que, en conjunt, cobrisquen el genoma sencer d'un organisme superior, és a dir, quan es

desitja construir una *genoteca* d'aquest organisme. Per a això interessa que els fragments siguin de més grandària i que es pugui fer ús de còsmids com a vectors de clonació (Collins i Hohn 1979), els quals accepten inserts de fins a cinquanta mil parells de bases. Es tracta de plàsmids que contenen els dos extrems («llocs cos») de la molècula lineal de DNA del fag, de forma que qualsevol tros de DNA entre uns quaranta i cinquanta mil parells de bases inserits entre ambedós llocs cos podrà ésser empaquetat *in vitro* en partícules fàgiques infectives.

Actualment es disposa també de vectors plasmídics i fàgics per a la clonació de gens en bacteris grampositius com *Bacillus* (Kreft i Hughes, 1982), actinomicets (Fayerman, 1986) i corinebacteris (Batt et al., 1985) la qual cosa obri la possibilitat no sols d'utilitzar aquests organismes per a l'expressió de proteïnes heteròlogues, sino també de conèixer amb detall la biologia molecular de processos desenvolupats pels citats bacteris com són l'esporegènesi, la síntesi d'antibiòtics i la producció i excreció d'aminoàcids.

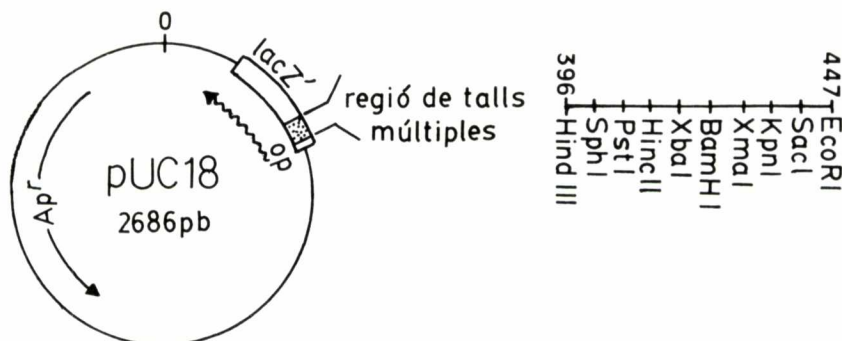


Figura 2. Estructura dels plàsmids pUC. Es descriu, amb detall, la regió de talls múltiples per enzims de restricció present en pUC18.

Clonatge de llevats

El llevat *Saccharomyces cerevisiae* presenta diversos punts d'interès que fan que pugui ésser utilitzat com a microorganisme eucariota model per a l'estudi de processos biològics que serien més difícils d'analitzar en eucariotes superiors: I) posseeix un cicle de vida simple i una quantitat de DNA que, en cèl·lules haploides, és sols tres vegades i mitja la d'*E. coli*; II) és fàcil de fer créixer en condicions de laboratori, ja que es coneix amb bastant detall la seva fisiologia; III) les tècniques de genètica clàssica han permès d'elaborar mapes genètics detallats, i es disposa de gran nombre de mutants auxòtrofs i d'altres tipus; IV) els processos bàsics d'expressió gènica i modificació posttraduccional dels productes de l'expressió són similars als existents en eucariotes superiors. Això ha fet que Watson et al. (1987) haja pogut afirmar que «*S. cerevisiae* és l'*E. coli* de les cèl·lules eucariotes»; es comprèn doncs, l'interès que té el clonatge de gens en aquest organisme.

Es disposa de tècniques eficaces de transformació de DNA plasmídic en llevats, així com de diversos tipus de vectors que faciliten la manipulació a voluntat de la informació genètica (Struhl, 1983). La majoria de vectors utilitzats en llevats (Figura 3) són del tipus llançadora, i es poden multiplicar i seleccionar també en *E. coli* gràcies a seqüències normalment derivades de pBR322.

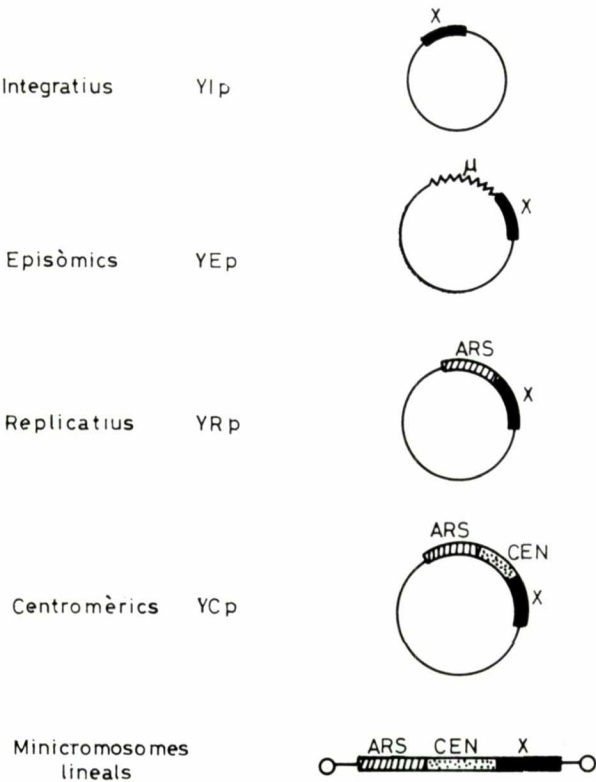


Figura 3. Tipus de vectors de clonació en *Saccharomyces cerevisiae*. Símbols: símbol : ADN de *E. coli* (per eix. pBR322); símbol : DNA del cercle de 2 u; símbol : marcador genètic de *S. cerevisiae*; símbol : ARS (seqüència de replicació autònoma, símbol : CEN (centròmer provinent d'un cromosoma de *S. cerevisiae*); símbol : regió telomèrica funcional a *s. cerevisiae*.

Els primers vectors desenvolupats devers 1978, anomenats integratius (YIp), contenen una seqüència de DNA de llevat portadora d'un marcador genètic expressable en *S. cerevisiae*, però que era incapaç de mantenir-se autònomament en aquesta espècie; l'única possibilitat d'obtenir transformants (això sí, molt estables) era per integració cromosòmica gràcies a un procés de recombinació homòloga entre la seqüència plasmídica i la corresponent d'un cromosoma. Aquesta limitació fa que els vectors integratius donen freqüències molt baixes de transformants. S'obtenen freqüències més altes amb els vectors episòmics (YE_p); aquests posseeixen seqüències del cercle de 2 micròmetres (plàsmid d'existència

autònoma al nucli de moltes soques de *S. cerevisiae*), cosa que assegura la presència del vector episòmic en un alt nombre de còpies: de 50 a 100 per dotació haploide. Tanmateix, l'estabilitat dels transformants obtinguts amb els vectors YEp és menor que amb els vectors YIp, segregant-se constantment algunes cèl·lules mancades d'ells. Altre tipus de vectors són els YRp, que posseeixen regions ARS («seqüències de replicació autònoma») d'origen cromosòmic de *S. cerevisiae* que garanteixen la seua multiplicació autònoma al nucli del llevat, àdhuc en menor nombre de còpies per cèl·lula que amb el vector YEp. Encara que s'hi obtenen freqüències molt altes de transformants, els vectors YRp són, per contra, molt inestables, segregant-se freqüentment cèl·lules mancades d'ells. Més recentment s'han desenvolupat vectors denominats centromèrics (YCp), que assegurin una alta estabilitat mitòtica pel fet que es repliquen autònomament, gràcies a posseir centròmers provinents de cromosomes de *S. cerevisiae*. A partir d'aquests s'han desenvolupat minicromosomes lineals (amb una llargària d'entre 10^2 i 10^3 kiloparells de bases), encara més estables, que posseeixen regions telomèriques també d'origen cromosòmic als seus dos extrems.

Els plàsmids autònoms posseeixen l'avantatge del seu fàcil aïllament respecte del DNA cromosòmic, amb vistes a la seua manipulació *in vitro* o la seua reintroducció a un altre organisme. Amb tot i això, en soques industrials por ésser preferible la integració cromosòmica de les seqüències plasmídiques, fins i tot a costa de la baixa eficiència del procés de transformació, perquè això assegura l'estabilitat definitiva de les noves seqüències introduïdes.

La versatilitat dels vectors de clonació per a *S. cerevisiae* abans descrits permet l'ús de tècniques de genètica molecular per a l'estudi de processos fisiològics bàsics com el control de la conjugació sexual (Abraham et. al., 1984), la secreció de proteïnes (Schekman, 1985) o la regulació positiva i negativa de l'expressió genètica (Stanway et al., 1987). Així veiem com la tecnologia del DNA recombinant desenvolupada a *S. cerevisiae*, donada la facilitat de maneig d'aquest organisme, reverteix cap a un millor coneixement d'aquest.

Expressió de proteïnes heteròlogues a microorganismes

La biotecnologia és l'explotació industrial de sistemes o processos biològics, activitat en la qual conflueixen una varietat d'àrees científiques i tecnològiques (Higgins et al., 1985). Una d'aquestes és la genètica: des de fa anys, les tècniques genètiques clàssiques s'han anat utilitzant per a millorar soques microbianes útils a la indústria (producció d'antibiòtics i altres molècules orgàniques, transformació d'aliments i begudes, etc.).

El desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinant bacteris i llevats ha obert la porta d'un control més fi dels canvis genètics introduïts a les soques i, allò que tal vegada és més important, permet que els microorganismes sintetitzen substàncies útils per a l'home, les quals originalment eren produïdes en d'altres éssers virus amb l'avantatge obvi que s'obtenen aquestes substàncies en major quantitat i a cost més baix.

Inicialment es va fer ús, amb èxit, d'*E. coli* com a organisme hoste per l'expressió de proteïnes heteròlogues (Old i Primrose, 1985). Cal citar el cas de la somatostatina i insulina humana, els gens de les quals es varen sintetitzar químicament i després es varen clonar, i s'expressaren en *E. coli* ja el 1977 i el 1979, respectivament. Tanmateix, aquestes molècules concretes són hormones peptídiques de petita llargària que no tenen molècules glicídiques. Els problemes amb l'ús d'*E. coli* sorgeixen quan s'intenten expressar molècules heteròlogues de més grandària i, en molts casos, de naturalesa glicoproteica. Aquests problemes són de diversos tipus:

- I) *E. coli* no és un organisme amb una alta capacitat secretora, a més de no reconèixer eficientment les seqüències dintre de la cadena polipeptídica que han d'interaccionar amb la maquinària secretora de la cèl·lula i que estan presents a la majoria de proteïnes de secreció d'eucariotes superiors. Açò fa que moltes proteïnes heteròlogues formades a partir de vectors d'expressió d'*E. coli* s'acumulen en altes concentracions al citoplasma, i arribin a cristal·litzar. Això pot ésser un avantatge pel que fa a la puresa de les proteïnes constituents dels cristalls, però n'alenteix i encareix el procés de recuperació a partir dels cultius bacterians a escala industrial.
- II) *E. coli* no és capaç de glicosilar les proteïnes, cosa que podria afectar l'eficàcia biològica (per canvis a l'antigenicitat, menor estabilitat, etc.) de les molècules originalment glicoproteiques sintetitzades en aquest sistema i destinades a ús farmacològic; per exemple, l'interferó, antigens vírics usats com a vaccins, etc.

Aquests problemes es resolten amb l'ús de *vectors de secreció* de *S. cerevisiae*, és a dir, vectors que permeten no sols la inserció i expressió de gens de proteïnes heteròlogues en el llevat, sinó també la seva secreció al medi de cultiu. Per això s'usen les seqüències aminoterminals (pèptid senyal) de proteïnes de secreció pròpies de llevat, com la invertasa o el factor sexual. Aquest pèptid senyal, fusionat en fase amb el polipèptid heteròleg, és l'encarregat de la interacció inicial de la proteïna híbrida naixent amb el reticle endoplasmic; el pèptid senyal és processat i eliminat, i la proteïna madura és transportada a través de la ruta secretora convencional (complex de Golgi i vesícules secretores) fins a l'espai extracitoplasmàtic. Al mateix temps, aquesta proteïna és glicosilada utilitzant les pròpies glicosilases de *S. cerevisiae* en cas que el polipèptid posseeixca les seqüències diana adequades, que són les mateixes en eucariotes inferiors i en mamífers. Així s'assegura la similitud (no sempre la igualtat) entre el producte natural i l'obtingut per enginyeria genètica.

El Quadre 1 indica una llista no exhaustiva de proteïnes de mamífer que són expressades en *S. cerevisiae* mitjançant vectors d'aquest tipus (Kingsman et al., 1987).

No obstant això, els llevats no són el vehicle idoni per a l'alliberament de proteïnes, donada la seva baixa capacitat secretora, cosa que fa que les vesícules membranoses implicades en el procés d'exportació resten fàcilment saturades quan les proteïnes es sintetitzen a alts nivells.

Els fongs filamentosos posseeixen, a més dels avantatges inherents a *S. cerevisiae* ja citats, una capacitat secretora natural força més gran. La genètica molecular d'espècies com *Aspergillus nidulans* ja és bastant coneguda i s'han construït diversos vectors de clonació en aquesta espècie (Cullen i Leong, 1986) que la converteixen en una «tercera generació» de microorganismes hostatjadors per a la síntesi i secreció de proteïnes foranes.

QUADRE 1. *Algunes proteïnes de mamífers expressades en Saccharomyces cerevisiae mitjançant la tecnologia del DNA recombinant.*

Factors reguladors del metabolisme

Insulina
 β -endorfina
Hormona del creixement
Factor del creixement epidèrmic
Activador del plasminogen de teixits
Factor del creixement I del tipus de la insulina
Factor del creixement II del tipus de la insulina
Factor natriurètic atrial

Limfoquines

Interferons α , β , γ
Interleucines 1 i 2

Enzims

Quimosina
Carboxipeptidasa
Lisozima

Antígens vírics

Antigen de superfície del virus de l'hepatitis B
Hemoaglutinina del virus de la grip

Altres

α_1 antitripsina
Receptor de l'acetilcolina
Albumina de sèrum humà

Bibliografia

1. ABRAHAM J, NASMYTH KA, STRATHERN JN, KLAR JAS, HICKS JB. (1984). Regulation of mating type information in yeast. *J. Mol. Biol.* 176: 307-331.
2. BATT CA, FOLLETTIE MT, SHIN HK, YEH P, SINSKEY A. (1984). Genetic engineering of coryneform bacteria. *Trends Biotechnol.* 3: 305-310.
3. COLLINS J, HOHN B. (1979). Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packagable *in vitro* in bacteriophage heads. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75: 4242-4246.
4. CULLEN D, LEONG S. (1986) Recent advances in the molecular genetics of filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* 4: 285-288.

5. FAYERMAN JT. (1986). New developments in gene-cloning in antibiotic producing microorganisms. *Bio/Technology* 4: 786-789.
6. HIGGINS IJ, BEST DJ, JONES J. (1985). Biotechnology: principles and applications. *Blackwell Sci. Publ.*, Oxford.
7. KREFT J, HUGHES C. (1982). Cloning vectors derived from plasmids and phage of *Bacillus*. *Current topics Microbiol. Immunol.* 96: 1-17.
8. KINGSMAN SM, KINGSMAN AJ, MELLOR J. (1987). The production of mammalian proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biotechnol.* 5: 53-57.
9. OLD RW, PRIMROSE SB. (1985). Principles of gene manipulation (3^a ed.) *Blackwell Sci. Publ.*, Oxford.
10. SCHEKMAN, R. (1985). Protein localization and membrane traffic in yeast. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 115-143.
11. STANWAY C, KINGSMAN AJ, KINGSMAN SM. (1987). The control of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio Essays* 7: 62-67.
12. STRATHERN JN, JONES EW, BROACH JR. (1982). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor*.
13. STRUHL K. (1983). The new yeast genetics. *Nature* 305: 391-396.
14. WATSON JD, HOPKINS NH, ROBERTS JW, STEITZ JA, WEINER AM. (1987). Molecular biology of the gene, 4^a ed. Benjamin-Cummings Publ. Menlo Park, California.
15. WINNACKER EL. (1987). From genes to clones: introduction to gene technology. VCH Publishers, Nova York.
16. YANISCH-PERRON C, VIEIRA J, MESSING J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.