

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO**



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE GENES DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE IMPLICADOS EN LA
TOLERANCIA A FRÍO**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

ISABEL VICENT GONZÁLEZ

DIRIGIDA POR:

Dr. ALFONSO NAVARRO MARZAL

Dr. RAMÓN SERRANO SALOM

VALENCIA 2009

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE GENES DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE IMPLICADOS EN LA
TOLERANCIA A FRÍO**

MEMORIA

**Presentada por:
ISABEL VICENT GONZÁLEZ**

**DIRIGIDA POR:
Dr. ALFONSO NAVARRO MARZAL
Dr. RAMÓN SERRANO SALOM**

Para optar al título de

DOCTOR EN FARMACIA

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
PARA EL DESARROLLO**

a mis padres y mi hermano,

a Jose.

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a las personas que, de una manera u otra, han contribuido a que este trabajo llegara a buen fin y que me han mostrado su apoyo durante todos estos años.

A mis directores el Dr. Alfonso Navarro Marzal y el Dr. Ramón Serrano Salom por su dedicación y apoyo, así como por transmitirme sus conocimientos.

Al Dr. Pedro.Fito por su confianza y por ofrecerme la posibilidad de incorporarme a su grupo de trabajo en el Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD)

A los evaluadores del borrador de esta tesis por el interés mostrado y el tiempo dedicado. Sus correcciones y sugerencias contribuyeron en la mejora de la calidad de la presente tesis.

A los compañeros del laboratorio del Dr. Ramón Serrano del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) porque sin su colaboración la realización de esta tesis no habría sido posible. Muy especialmente a Mariche por su constante preocupación y por hacerme sentir un miembro más del laboratorio. Gracias a todos (JM, Lynne, Santiago, Regina, Rosa, Eduardo, Stephanie, Gaetano, etc.) por sus consejos y sugerencias ofrecidos durante los seminarios. A Lola por estar siempre dispuesta a ayudarme. A JM por sus recomendaciones, sus palabras de ánimo y su gran ayuda en algún experimento.

A mis compañeros y amigos del IU-IAD: Ana, Mario, Virginia (gracias por la ayuda con la portada), Pepe, Rebeca, Rosario, Chus, Raúl, Carolina, Irene, Estela, Celia, Esther B., Elisa... no sé si me dejo a alguien pero también debería estar ahí. A todos os tengo que agradecer muchas cosas, especialmente el haberme rodeado de un ambiente de amistad, alegría y buen humor que ha hecho que el trabajo fuera más ligero.

A Dani por ser un excelente compañero de laboratorio y todavía mejor amigo. A Milagro por su cariño y sus consejos A Ester por escucharme, por su apoyo en momentos difíciles y por las risas.

A mi familia, en especial a mis padres por su apoyo incondicional en todo momento y por creer siempre que podía hacerlo. A mi hermano por estar siempre tan cerca de mí animándome pese a los muchos kilómetros que nos separan.

A Jose por todo su amor, comprensión y amistad. Por tener siempre palabras de aliento, por sus consejos y por su ayuda. Es imposible agradecerle con palabras todo el apoyo que me ha dado.

¡Gracias a todos!

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca predoctoral Beca para la Formación del Personal Investigador Modalidad A de la Conselleria de Empresa, Universidad y Ciencia de la Generalitat Valenciana (CTBRPRA/2003/47).

RESUMEN

Las levaduras del género *Saccharomyces* se encuentran entre los primeros microorganismos que fueron explotados por el hombre. Su capacidad para transformar diferentes azúcares en etanol y CO₂, ha sido utilizada en la producción de bebidas alcohólicas y en la elaboración de alimentos como el pan, constituyendo así uno de los primeros ejemplos de la aplicación biotecnológica de un microorganismo. En los últimos años la levadura se ha revelado como el microorganismo eucariótico más útil para estudios biológicos y para los nuevos desarrollos en el campo de la Biotecnología.

Las razones que justifican el uso continuado en la producción de bebidas alcohólicas y en la elaboración de alimentos de cepas industriales de *S. cerevisiae* son su capacidad para transformar eficazmente azúcares en etanol, dióxido de carbono y numerosos metabolitos secundarios que dan lugar al sabor y aroma característico de cada producto y su capacidad para soportar el estrés causado principalmente por la temperatura, la presión osmótica, la presión hidrostática, alta densidad celular, el etanol y la competición con bacterias y otras levaduras silvestres. No obstante, se puede mejorar su tolerancia al estrés consiguiendo así beneficios potenciales en los procesos de producción de alimentos y bebidas alcohólicas. La fermentación a bajas temperaturas resulta clave en los procesos de elaboración de determinadas bebidas alcohólicas con características organolépticas que se ajusten a los perfiles de calidad sensorial y de preferencia del consumidor.

La respuesta celular que se desencadena tras someter las células a bajas temperaturas no está bien caracterizada, pues aunque se sabe que tiene como consecuencia la síntesis de una serie de proteínas, éstas no están conservadas en un rango tan amplio de organismos como las sintetizadas como respuesta al choque térmico por calor (HSPs, por sus siglas en inglés Heat Shock Protein).

El objetivo de la presente Tesis es la identificación y caracterización de aquellos genes que por un aumento de su expresión, confieran una mayor capacidad de crecimiento a temperaturas bajas en cepas de *S. cerevisiae*. Así, demostramos que los efectos del frío se ven atenuados mediante la prototrofia a triptófano. En cepas auxótrofas para triptófano los efectos del frío se mitigan mediante la adición de un exceso de triptófano en el medio o mediante la sobreexpresión del gen *TRP1* (codifica la fosforibosil

antranilato isomerasa que cataliza el 3^{er} paso en la biosíntesis de triptófano) o de aquellos genes que codifican transportadores de triptófano *Tat2p* y *Tat1p*. La sobreexpresión de los genes *NSG2* (codifica la proteína implicada en la regulación de la biosíntesis de esteroides que estabiliza a una de las dos isoenzimas HMG-CoA), *PCK1* (codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzima clave en la gluconeogénesis) o *PRO2* (codifica la gamma-glutamil-fosfato reductasa que cataliza el 2^o paso en la biosíntesis de prolina) provoca una mejoría en el crecimiento a 10° C tanto en cepas auxótrofas para triptófano como en cepas protótrofas lo que se traduce en una cinética de crecimiento con menor tiempo de latencia y menor tiempo de generación.

La sobreexpresión en una cepa TRP⁺ (RS-452) de genes relacionados con el transporte de fosfato (*PHO84*, *PHO87*, *PHO90* y *GTR1*) así como la adición al medio de fosfato inorgánico para lograr una elevada concentración del mismo mejora considerablemente su crecimiento.

Más recientemente hemos centrado nuestro trabajo en establecer los efectos de las bajas temperaturas sobre el transporte de triptófano a través de la membrana plasmática. A bajas temperaturas el transporte de triptófano se halla seriamente comprometido tanto en la cepa de laboratorio W303 como en las cepas industriales estudiadas. Al sobreexpresar de forma individual los genes *TAT2* y *TAT1* se obtiene un notable aumento en el transporte de triptófano a 10° C, el cual se correlaciona con un considerable incremento en el crecimiento a dicha temperatura. Así el transporte de triptófano es un punto clave en la fisiología de la levadura, convirtiéndose en factor limitante del crecimiento bajo una gran variedad de condiciones estresantes.

RESUM

Els llevats del gènere *Saccharomyces* es troben entre els primers microorganismes que van ser explotats per l'home. La seua capacitat per a transformar diferents sucres en etanol i CO₂, ha sigut utilitzada en la producció de begudes alcohòliques i en l'elaboració d'aliments com el pa, constituint així un dels primers exemples de l'aplicació biotecnològica d'un microorganisme. En els últims anys el llevat s'ha revelat com el microorganisme eucariòtic més útil per a estudis biològics i per als nous desenvolupaments en el camp de la Biotecnologia.

Les raons que justifiquen l'ús continuat en la producció de begudes alcohòliques i en l'elaboració d'aliments de soques industrials de *S. cerevisiae* són la seua capacitat per a transformar eficaçment sucres en etanol, diòxid de carboni i nombrosos metabòlits secundaris que donen lloc al sabor i l'aroma característica de cada producte i la seua capacitat per a suportar l'estrés causat principalment per la temperatura, la pressió osmòtica, la pressió hidrostàtica, l'alta densitat cel·lular, l'etanol i la competició amb bacteries i altres llevats silvestres. No obstant això, es pot millorar la seua tolerància a l'estrés aconseguint així beneficis potencials en els processos de producció d'aliments i begudes alcohòliques. La fermentació a baixes temperatures resulta clau en els processos d'elaboració de determinades begudes alcohòliques amb característiques organolèptiques que s'ajusten als perfils de qualitat sensorial i de preferència del consumidor.

La resposta cel·lular que es desencadena després de sotmetre les cèl·lules a baixes temperatures no s'està ben caracteritzada, encara que se sap que té com a conseqüència la síntesi d'una sèrie de proteïnes, estes no estan conservades en un rang tan ampli d'organismes com les sintetitzades com a resposta al xoc tèrmic per calor (HSPs, per les seues sigles en anglés Heat Shock Protein).

L'objectiu de la present Tesi és la identificació i caracterització d'aquells gens que per un augment de la seua expressió, conferisquen una major capacitat de creixement a temperatures baixes en soques de *S. cerevisiae*. Així, demostrem que els efectes del fred es veuen atenuats per mitjà de la prototrofia a triptòfan. En soques auxòtrofes per a triptòfan els efectes del fred es mitiguen per mitjà de l'addició d'un excés de triptòfan en el medi o per mitjà de la sobreexpressió del gen *TRP1* (codifica la fosforibosil

antranilato isomerasa que catalitza el tercer pas en la biosíntesi de triptòfan) o d'aquells gens que codifiquen transportadors de triptòfan Tat2p i Tat1p. La sobreexpressió dels gens *NSG2* (codifica la proteïna implicada en la regulació de la biosíntesi d'esterols que estableix a una de les dos isoenzimes HMG-CoA), *PCK1* (codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzim clau en la gluconeogènesi) o *PRO2* (codifica la gamma-glutamil-fosfato reductasa que catalitza el segon pas en la biosíntesi de prolina) provoca una millora en el creixement a 10° C tant en soques auxòtrofes per a triptòfan com en soques protòtrofes el que es tradueix en una cinètica de creixement amb menor temps de latència i menor temps de generació.

La sobreexpressió en un soca TRP⁺ (RS-452) de gens relacionats amb el transport de fosfat (*PHO84*, *PHO87*, *PHO90* i *GTR1*) així com l'addició al medi de fosfat inorgànic per aconseguir una elevada concentració del mateix millora considerablement el seu creixement.

Més recentment hem centrat el nostre treball a establir els efectes de les baixes temperatures sobre el transport de triptòfan a través de la membrana plasmàtica. A baixes temperatures el transport de triptòfan es troba seriosament compromès tant en la soca de laboratori W303 com en les soques industrials estudiats. Al sobreexpressar de forma individual els gens *TAT2* i *TAT1* s'obté un notable augment en el transport de triptòfan a 10° C, el qual es correlaciona amb un considerable increment en el creixement a la temperatura mencionada. Així el transport de triptòfan és un punt clau en la fisiologia del llevat, convertint-se en factor limitant del creixement sota una gran varietat de condicions estressants.

SUMMARY

Yeasts of *Saccharomyces* genus have long been associated with human beings. Their ability to convert different sugars into ethanol and CO₂ has been used for making alcoholic beverages and food such as bread, setting the first example of a biotechnological application of a microorganism. In recent years, yeast has played an important role as the most useful eukaryotic microorganism for biological analyses as well as for new developments in the field of Biotechnology.

The continued use for making alcoholic beverages and food of industrial strains of *S.cerevisiae* is justified by their ability to efficiently convert sugars into ethanol, carbon dioxide and many secondary metabolites that leads to balanced flavour and aroma in the final product and their ability to cope with stress caused mainly by temperature, osmotic pressure, hydrostatic pressure, high cellular density, ethanol and sharing with bacteria and other wild yeasts. However, we can improve stress tolerance achieving potential benefits in food and alcoholic beverages manufacturing processes. Fermentation at low temperature is proved to be a key factor in alcoholic beverages production with organoleptic characteristics that fit with sensory quality and consumer's preference profiles.

Cellular response to downshift in temperature is not well characterized, and although is followed by the synthesis of a group of cold-inducible proteins, they are neither conserved nor shared by such a wide range of organisms as the heat shock proteins (HSPs).

The objective of the present Thesis is the identification and characterization of those genes that through overexpression confer to *S.cerevisiae* strains a competitive advantage to grow at low temperatures. Thus, we demonstrate that tryptophan prototrophy attenuates cold effects. In tryptophan auxotrophic strains, cold effects are mitigated with the addition of excess of tryptophan or with the overexpression of *TRP1* (encodes phosphoribosylanthranilate isomerase that catalyzes the third step in tryptophan biosynthesis) or those genes that encode tryptophan transporters Tat2p and Tat1p. The overexpression of *NSG2* (encodes a protein involved in regulation of sterol biosynthesis that stabilizes one of the two HMG-CoA isoenzymes), *PCK1* (encodes phosphoenolpyruvate carboxykinase, key enzyme in gluconeogenesis) or *PRO2*

(encodes gamma-glutamyl phosphate reductase, catalyzes the second step in proline biosynthesis) cause an improvement in growth at 10° C in both tryptophan auxotrophic and tryptophan prototrophic strains, what means shorter lag phase and doubling time.

The overexpression in a prototrophic strain (RS-452) of genes related to phosphate transport (*PHO84*, *PHO87*, *PHO90* y *GTR1*) as well as the addition of inorganic phosphate, in order to attain a high phosphate concentration, improves its growth considerably.

Finally, we investigated the effects of low temperatures on tryptophan uptake through plasmatic membrane. At low temperatures tryptophan uptake is impaired both in laboratory strain W303 and the studied industrial strains. Individual overexpression of *TAT2* and *TAT1* causes a notable increase in tryptophan uptake at 10° C, which is correlated with an increased growth at that temperature. Taken together, these results suggest that tryptophan uptake is a key factor in yeast physiology, since under a variety of stress conditions it becomes a limiting factor for cell growth.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

• ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
• ABREVIATURAS	7
• INTRODUCCIÓN	11
1. BIOTECNOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN	13
1.1. La fermentación como un antiguo arte	
1.2. Levadura y ciencia	
1.3. Innovaciones biotecnológicas en los procesos fermentativos en la producción de bebidas alcohólicas y productos panaderos	
1.3.1. Principales dificultades biotecnológicas en la mejora genética de levaduras industriales	
1.3.2. Levaduras genéticamente modificadas para la mejora de los procesos industriales y la calidad de los productos	
2. LEVADURA, ESTRÉS Y FERMENTACIÓN A BAJA TEMPERATURA	25
2.1. Importancia del control de la temperatura durante la fermentación en la producción de bebidas alcohólicas	
3. RESPUESTA MOLECULAR A BAJAS TEMPERATURAS	28
3.1. Principales efectos adversos causados por las bajas temperaturas	
3.2. Principios generales de adaptación al frío	
3.3. Mecanismos de adaptación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a bajas temperaturas	
3.3.1. Respuesta temprana	
3.3.2. Respuesta tardía	
3.4. Mecanismos sensores de bajas temperaturas	
4. PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA APLICACIONES INDUSTRIALES A BAJAS TEMPERATURAS	48
• OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	49

• MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	57
1.1. Reactivos	
1.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
1.3. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	
2. MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y DE CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	58
2.1. Medios de cultivo de levaduras	
2.2. Medios de cultivo de bacterias	
2.3. Conservación de las diferentes cepas utilizadas	
2.4. Ensayos de crecimiento en medio líquido y sólido	
2.5. Determinación de la resistencia a la congelación	
3. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS	66
3.1. Transformación de levaduras	
3.2. Transformación de <i>E.coli</i>	
4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	67
4.1. Obtención de DNA genómico de levadura	
4.2. Obtención de DNA plasmídico de levadura	
4.3. Obtención de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	
4.4. Obtención de RNA total de levadura	
4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
4.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	
4.7. Cuantificación de DNA	
4.8. Clonaje a partir de productos amplificados	
4.9. Secuenciación y análisis de las secuencias	
5. AMPLIFICACIÓN Y CRIBADO DE UNA GENOTECA DE <i>S.CEREVISIAE</i>	76
5.1. Amplificación de la genoteca de <i>S. cerevisiae</i>	
5.2. Condiciones de transformación de la genoteca	
5.3. Condiciones de cribado de la genoteca	
5.3.1. Cribado de la genoteca a 10° C	
5.3.2. Cribado de la genoteca a 8° C	
5.4. Análisis de los clones seleccionados	
5.5. Subclonaje de los genes candidatos	
5.6. Hibridación con sondas de DNA marcadas con quimioluminiscencia	

6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>TAT2</i> , <i>TAT1</i> Y <i>PHO90</i>	81
7. ENSAYO DE TRANSPORTE DE TRIPTÓFANO.....	83
• RESULTADOS	85
1. SELECCIÓN DE CLONES QUE MEJORAN LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO A 10° Y 8° C.....	87
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES RESPONSABLES DEL FENOTIPO DE TOLERANCIA A FRÍO.....	88
2.1. Confirmación del fenotipo de los clones seleccionados	
2.2. Verificación de la relación biunívoca entre presencia de plásmido y fenotipo de tolerancia a frío	
2.3. Resultados de secuenciación y análisis de los insertos	
2.4. Sobreexpresión de los genes candidatos. Estudio de la tolerancia a frío	
2.4.1. La sobreexpresión de <i>TAT2</i> , <i>TAT1</i> , <i>TRP1</i> , <i>PRO2</i> , <i>PCK1</i> o <i>NSG2</i> en W303 mejora su crecimiento a 10° C	
2.4.2. La sobreexpresión de <i>PHO84</i> , <i>GTR1</i> , <i>PHO87</i> , <i>PHO90</i> o <i>YCR015C</i> en W303 mejora su crecimiento a 8° C en medio rico con exceso de triptófano	
3. LA PROTOTROFÍA AL TRIPTÓFANO O EL EXCESO DE TRIPTÓFANO Y LA TOLERANCIA A FRÍO.....	106
3.1. Sobreexpresión de los genes identificados en una cepa protótrofa para triptófano	
4. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>TAT2</i> , <i>TAT1</i> Y <i>PHO90</i> A BAJAS TEMPERATURAS	109
5. POSIBLE PAPEL DE LOS GENES IDENTIFICADOS POR MEJORAR EL CRECIMIENTO EN FRÍO, EN LA SUPERVIVENCIA A LA CONGELACIÓN.....	112
6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS BAJAS TEMPERATURAS SOBRE EL TRANSPORTE DE TRIPTÓFANO	113
6.1. La sobreexpresión de los genes <i>TAT2</i> y <i>TAT1</i> confiere mayor capacidad de transporte de triptófano	
6.2. La sobreexpresión del gen <i>YCR015C</i> no confiere mayor capacidad de transporte de triptófano	
6.3. Las cepas de levaduras industriales presentan la misma velocidad inicial de transporte que la cepa de laboratorio W303	

6.4. Comparativa de las velocidades iniciales de transporte de triptófano en las distintas cepas estudiadas

• DISCUSIÓN	121
• CONCLUSIONES	141
• BIBLIOGRAFÍA	145
• ANEXO: Reactivos químicos	165

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Breve descripción de las principales manipulaciones genéticas realizadas en <i>S. cerevisiae</i> en el ámbito de la industria alimentaria	21-24
2	Resumen de los principales mecanismos de adaptación de <i>S.cerevisiae</i> a las bajas temperaturas	43-44
3	Cepas de levadura utilizadas en este trabajo	57
4	Secuencia de los cebadores y condiciones de amplificación para cada construcción que se ha realizado por PCR	71
5	Plásmidos recombinantes construidos para el subclonaje individual de los genes seleccionados	74-75
6	Parejas de cebadores utilizados en las reacciones de cuantificación relativa por y condiciones para cada amplificación PCR en tiempo real	82
7	Clones seleccionados a 10° C en los diferentes medios utilizados	88
8	Resultados secuenciación de los insertos contenidos en los plásmidos aislados de los clones seleccionados a 10° C	92-93
9	Resultados secuenciación de los insertos contenidos en los plásmidos aislados de los clones seleccionados a 8° C	94
10	Resumen de los resultados de los niveles de expresión de los genes identificados en el presente trabajo procedente estudios independientes de la respuesta transcripcional tras “cold shock”	111
11	Supervivencia (%) tras 5 y 10 días de congelación de la cepa de <i>S.cerevisiae</i> W303 y la misma sobreexpresando los diferentes genes que confieren tolerancia al frío identificados en el presente trabajo	112
12	Velocidad inicial de transporte de triptófano de las distintas cepas ensayadas a 10 ° y 28° C	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estatuilla de una mujer fabricando cerveza (V Dinastía)	13
2	Principales hitos científicos relacionados con <i>Saccharomyces</i> sp	15
3	Carta de Antonie van Leeuwenhoek describiendo la apariencia de las células de levadura	16
4	Evolución con el tiempo de un proceso de fermentación tradicional de cerveza “lager”	27
5	Crecimiento a 28° y 10° C de la cepa parental comparada con clones candidatos	90
6	Crecimiento a 28° y 8° C de la cepa parental comparada con clones candidatos	91
7	Crecimiento a 28° y 10° C de los clones candidatos comparados con los clonajes individuales de los genes <i>TAT2</i> , <i>TRP1</i> , <i>TAT1</i> , <i>BAP2</i> y <i>TIP1</i>	96
8	Curvas de crecimiento a 10° C de al cepa parental W303 y de la misma sobreexpresando los genes <i>TAT2</i> , <i>TRP1</i> y <i>TAT1</i>	97
9	Crecimiento a 28° y 10° C de los clones candidatos comparados con los clonajes individuales de los genes <i>NSG2</i> , <i>PGAI</i> , <i>ASI2</i> , <i>PCK1</i> , <i>UBP11</i> , <i>YKR096W</i> y <i>PRO2</i>	99
10	Curvas de crecimiento a 10° C de al cepa parental W303 y de la misma sobreexpresando los genes <i>NSG2</i> , <i>PCK1</i> y <i>PRO2</i>	101
11	Densidad óptica tras incubación a 10° C durante 6 días de la cepa W303 y la misma sobreexpresando los genes <i>TAT2</i> , <i>TAT1</i> , <i>TRP1</i> , <i>PCK1</i> , <i>NSG2</i> y <i>PRO2</i>	102
12	Crecimiento a 28° y 8° C de los clones candidatos comparados con los clonajes individuales de los genes <i>PHO84</i> , <i>GTR1</i> , <i>PHO87</i> , <i>PHO90</i> , <i>YCR015C</i> y <i>SNR33</i>	104
13	Curvas de crecimiento a 8° C de al cepa parental W303 y de la misma sobreexpresando los genes <i>PHO84</i> , <i>GTR1</i> , <i>PHO87</i> , <i>PHO90</i> e <i>YCR015C</i>	105

14	Densidad óptica tras incubación a 8° C durante 6 días de la cepa W303 y la misma sobreexpresando los genes <i>PHO84.GTR1</i> y <i>PHO87, PHO90</i> e YCR015C	106
15	Crecimiento de la cepa W303 y la cepa RS-452 en medio YPDA, YPDAT, YPDA con fosfato inorgánico e YPDAT con fosfato inorgánico	107
16	Sobreexpresión de los genes identificados en el cribado a 10° C en la cepa RS-452	108
17	Sobreexpresión de los genes identificados en el cribado a 8° C en la cepa RS-452	108
18	Expresión relativa de los genes <i>TAT2, TAT1</i> y <i>PHO90</i> en cultivos de W303 a 28° y 10° C	110
19	Ensayo de incorporación de triptófano de la cepa parental W303 a 28° y 10° C	113
20	Ensayo de incorporación de triptófano de la cepa parental W303 comparado con la misma sobreexpresando <i>TAT2</i> a 28° y 10° C	114
21	Ensayo de incorporación de triptófano de la cepa parental W303 comparado con la misma sobreexpresando <i>TAT1</i> a 28° y 10° C	115
22	Ensayo de incorporación de triptófano de la cepa parental W303 comparado con la misma sobreexpresando YCR015C a 28° y 10° C	116
23	Resistencia al frío (8° C) de las cepas industriales CECT 1990, W34/70 y CECT 1462	117
24	Curva de crecimiento a 10° C de las cepas industriales CECT 1990, W34/70 y CECT 1462	117
25	Ensayo de incorporación de triptófano de las cepas industriales CECT 1990, W34/70 y CECT 1462 a 28° y 10° C	118

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A	Adenina
cAMP	Adenosil monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
C	Citosina
CECT	Colección española de cultivos tipo
CSP	del inglés “ <i>Cold shock protein</i> ”
Ct	del inglés “ <i>Threshold cycle</i> ”
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario
ddNTP	Dideoxinucleótido trifosfato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGO/GSE	del inglés “ <i>Exit from rapamycin-induced growth arrest/Gap1 sorting in the endosome</i> ”
ERAD	del inglés “ <i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i> ”
EUROSCARF	del inglés “ <i>European saccharomyces cerevisiae archive for functional analysis</i> ”
FDA	del inglés “ <i>Food and drug administratrion</i> ”
G	Guanina
GRAS	del inglés “ <i>Generally recognised as safe</i> ”
γ -GK	Gamma-glutamil quinasa
γ -GPR	Gamma-glutamil-fosfato reductasa
GDP	Guanosín difosfato
GTP	Guanosin trifosfato
HOG	del inglés “ <i>High osmolarity glycerol</i> ”
K_m	Constante de Michaelis
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani para bacterias
MIPS-CYGD	del inglés “ <i>Munich information center for protein sequences - comprehensive yeast genome database</i> ”
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
OGM	Organismo genéticamente modificado
ORF	Pauta de lectura abierta (del inglés “ <i>Open reading frame</i> ”)
pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
PROPHECY	del inglés “ <i>Profiling of phenotypic characteristics in yeast</i> ”
p/v	Peso/volumen
RNA	Ácido ribonucleico
tRNA	RNA transferente
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosomal
ROS	del inglés “ <i>Reactive oxygen species</i> ”
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RUP	del inglés “ <i>Regulated ubiquitin/proteasome</i> ”
SD	Medio mínimo sintético definido para levaduras

SDS	Dodecil sulfato sódico
SGD	del inglés “ <i>Saccharomyces genome database</i> ”
STRE	del inglés “ <i>Stress responsive element</i> ”
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Medio “terrific-broth”
TBE	Tampón Tris- Borato-EDTA
TE	Tampón Tris-EDTA
TOR	del inglés “ <i>Target of rapamycin</i> ”
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TRP	del inglés “ <i>Transient receptor potential</i> ”
t-SNARE	del inglés “ <i>Target of SNAP receptors</i> ”
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPL	del inglés “ <i>Universal probe library</i> ”
UV	ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
YCT	Yeast cold tolerance
YNB	Yeast nitrogen base
YPD	Medio de cultivo “ <i>yeast extract peptone dextrose</i> ”
YPD	Yeast proteome database
YPDT	Medio “ <i>yeast extract peptone dextrose</i> ” con triptófano añadido 0,2% (p/v)

INTRODUCCIÓN

1 Biotecnología de la fermentación

Las levaduras del género *Saccharomyces* se encuentran entre los primeros microorganismos que fueron explotados por el hombre. Su habilidad para transformar diferentes azúcares en etanol y CO₂, ha sido utilizada en la producción de bebidas alcohólicas y en la elaboración de alimentos como el pan, constituyendo así uno de los primeros ejemplos de la aplicación biotecnológica de un microorganismo.

1.1 La fermentación como un antiguo arte

El arte de fabricar cerveza y vino se ha ido desarrollando a lo largo de 5.000-8.000 años. Pero explicar cómo sucede la fermentación no fue posible hasta el siglo XIX, lo que no impidió que se fueran introduciendo sucesivas mejoras en las técnicas de elaboración. Existen ilustraciones de la elaboración de cerveza y restos arqueológicos que pertenecen al apogeo de la civilización egipcia y babilónica. Hacia el año 4.000 a.C. los egipcios ya utilizaban las levaduras de cerveza para la producción de dióxido de carbono para el hinchamiento de la masa panadera (Samuel, 1996).



Figura 1. Estatuilla de una mujer fabricando cerveza (V Dinastía). Se dejaba germinar la cebada en vasijas de barro y después la estrujaban, amasaban y remojan en agua para obtener la bebida.

Durante la civilización griega y más tarde durante la romana, el dominio del mercado internacional del vino se convirtió en una cuestión de importancia no sólo económica. Las bebidas alcohólicas resultaban particularmente beneficiosas ya que mejoraban relativamente la dudosa calidad microbiológica del agua, en virtud de su bajo pH y de su contenido alcohólico, así como por su valor nutritivo pues, además de su elevado valor calórico y de su riqueza en sustancias nitrogenadas asimilables, al contener levaduras también proporcionaban vitaminas del grupo B. En la Edad Media, la elaboración de cerveza fue considerada un arte o un misterio, cuyos detalles eran celosamente guardados por los maestros cerveceros y sus gremios. Y ciertamente era un misterio, porque se desconocían las razones que justificaban las diversas etapas del proceso de elaboración, la mayor parte de las cuales, como la fermentación, habían sido

descubiertas por casualidad. Hasta la Edad Moderna la producción doméstica de cerveza era habitual y sólo se producía en volúmenes apreciables en abadías y monasterios.

1.2 Levadura y ciencia

El siglo de oro de la cerveza comienza a finales del s. XVIII con la incorporación a la industria cervecera de la máquina de vapor y las nuevas formas de producción en frío y culmina en el último tercio del s. XIX con los hallazgos de Pasteur publicados en el año 1857 relativos a los procesos de fermentación que demuestran que es el metabolismo de la levadura el responsable de la desaparición de los azúcares de los medios de cultivo y la producción de etanol y dióxido de carbono, fenómenos que caracterizan a los procesos de fermentación en los que participa (Boulton y Quain, 2001). El primer cultivo puro de levadura cervecera fue obtenido por Emil Christian Hansen de la cervecería Carlsberg (Dinamarca) en 1881. Poco después, en 1890, Hermann Müller-Thurgau (Alemania) introdujo la idea de realizar un inóculo inicial de cultivos puros de levadura en las fermentaciones enológicas, práctica que se extendió rápidamente por las bodegas de la época (Dequin, 2001).

Nuestro conocimiento y comprensión acerca de las levaduras del género *Saccharomyces* ha aumentado de forma espectacular durante los últimos 150 años tal y como se ve reflejado en la figura 2. En los últimos años, la levadura ha desempeñado un papel fundamental como organismo modelo en bioquímica, genética y biología molecular. La transformación genética de levadura se consiguió en 1978 (Hinnen *et al.*, 1978; Beggs 1978). Desde entonces, la levadura se ha revelado como el más útil microorganismo eucariótico, tanto en su uso como modelo para estudios biológicos, como en su papel de biofactoría en los nuevos desarrollos en el campo de la Biotecnología. En 1996, se publicó la secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996; Goffeau, 2000) y en la actualidad hay muchas bases de datos accesibles tales como Saccharomyces Genome Database (SGD), Munich Information Center for Protein Sequences - Comprehensive Yeast Genome Database (MIPS-CYGD), Yeast Proteome Database (YPD), European Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional analysis (EUROSCARF), Profiling of Phenotypic Characteristics in Yeast (PROPHECY), etc., que contienen una enorme cantidad de información acerca de los aproximadamente 6.000 genes de dicha levadura y sobre las funciones de las proteínas a las que codifican, sus estructuras e interacciones (Cherry *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 2001).

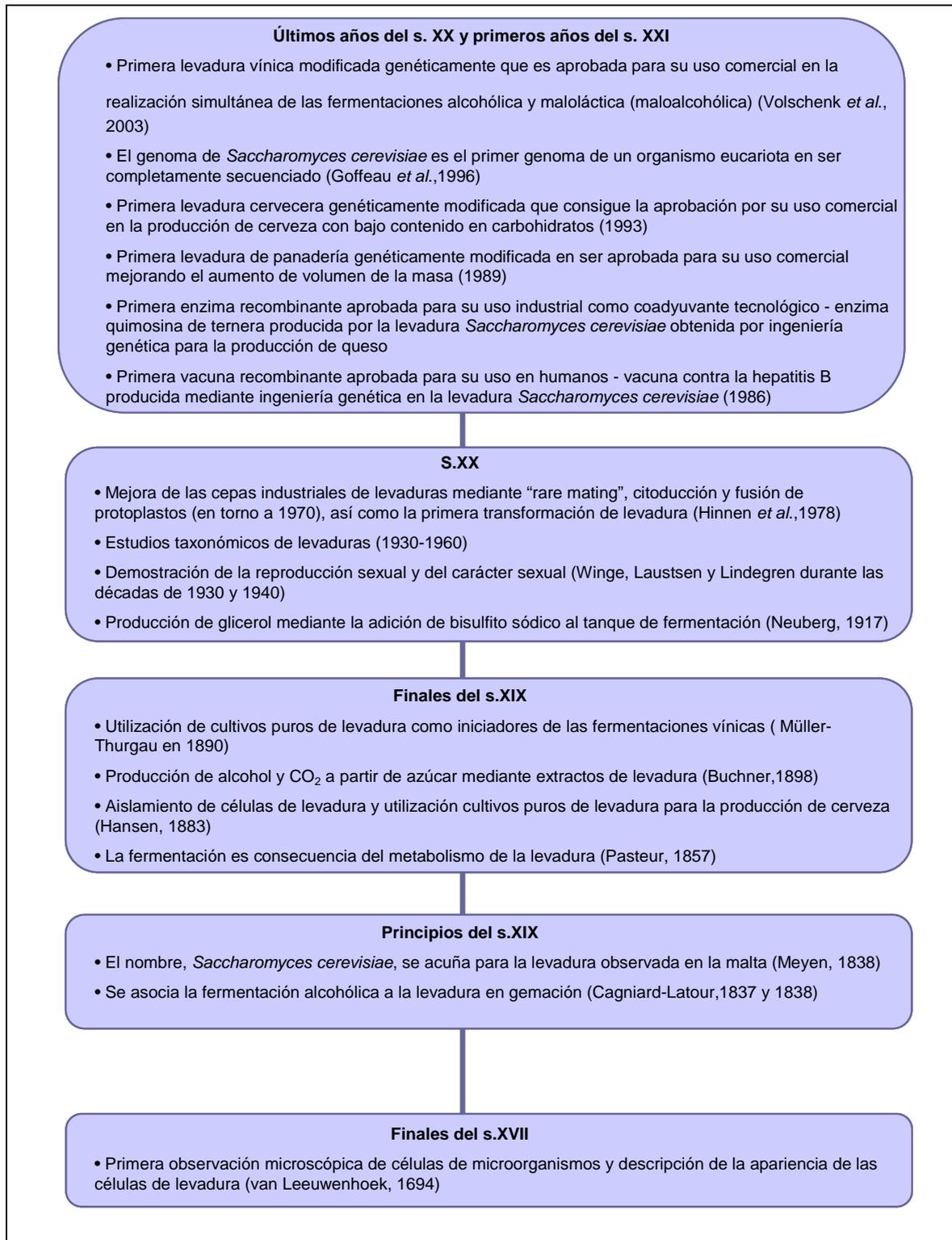


Figura 2. Principales hitos científicos relacionados con *Saccharomyces* sp.

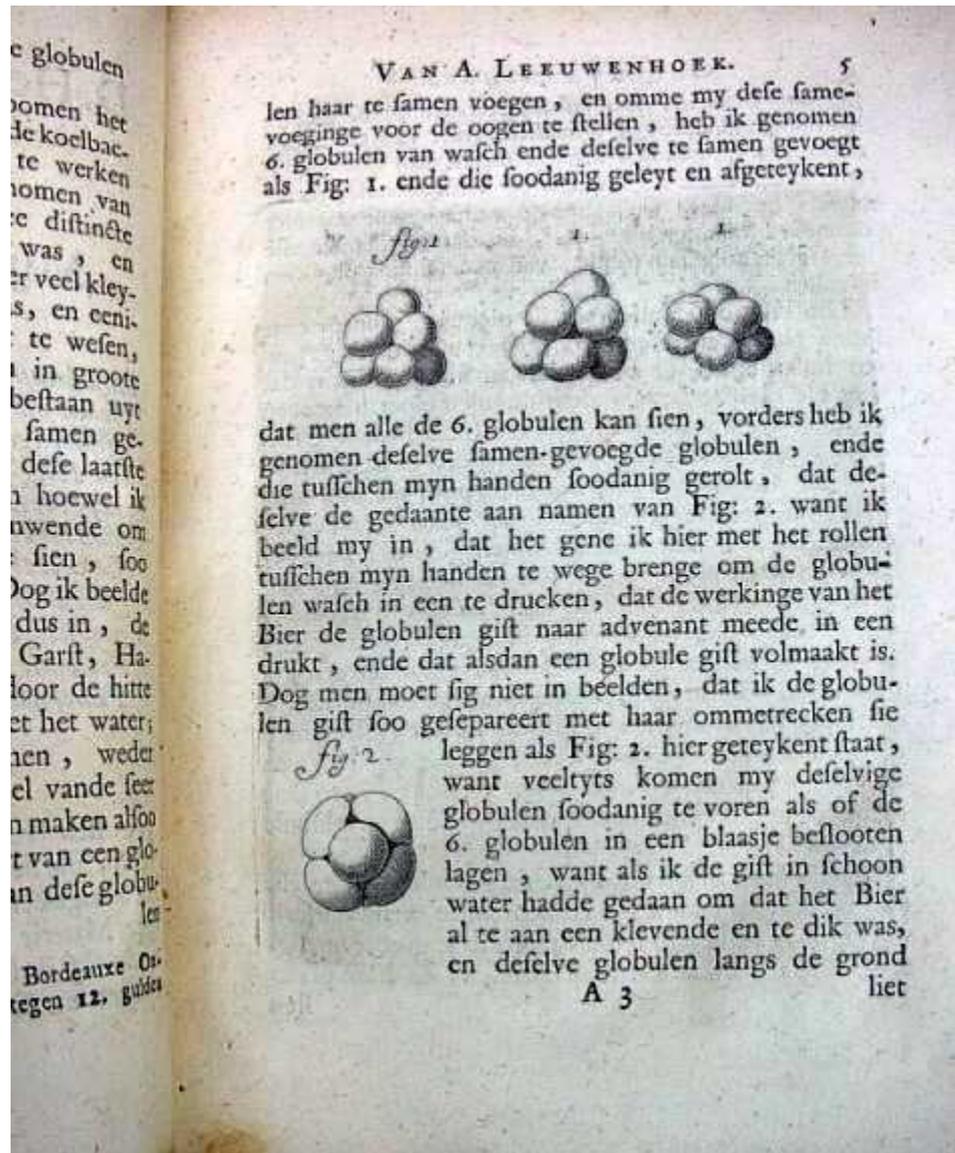


Figura 3. En una carta (14 de junio de 1680) a Thomas Gales, Antonie van Leeuwenhoek describe las células de levadura (“gist”) utilizando un modelo de cera de 6 glóbulos. Esta podría ser la primera vez en la historia de la biología que un científico utiliza un modelo para ilustrar al lector. Leeuwenhoek afirma que la levadura estaba compuesta de minúsculos organismos vivientes más pequeños que los protozoos. En la misma carta de 1680 Leeuwenhoek describe el proceso de elaboración de cerveza y la participación de los glóbulos de levadura (páginas 7-10) siendo uno de los experimentos más notables de todo su trabajo (<http://www.euronet.nl/users/warnar/leeuwenhoek.html#yeast>).

Además, no sólo es eficiente en la fermentación sino que presenta una larga trayectoria en la producción de alimentos y bebidas con una probada seguridad, lo que le hace ser considerado como un organismo “GRAS” (por sus siglas en ingles, “Generally Recognised As Safe) por la FDA (Food and Drug Administration, USA).

1.3 Innovaciones biotecnológicas en los procesos fermentativos en la producción de bebidas alcohólicas y productos panaderos

Las bebidas alcohólicas se producen a partir de diversas materias primas, pero especialmente a partir de cereales, frutas y productos azucarados. Entre ellas hay bebidas no destiladas, como la cerveza, el vino, la sidra y el sake, y las destiladas, como el whisky y el ron, que se obtienen a partir de cereales y melazas fermentadas, respectivamente, en tanto que el brandy se obtiene por destilación del vino. En el caso del pan, la levadura produce el gas que esponja la masa panaria y produce la miga.

Desde los tiempos de Pasteur se han producido muchos avances en la industria de las bebidas alcohólicas. La pasteurización ha permitido que la cerveza haya pasado de una escala de producción local a nacional e internacional. Las industrias cerveceras y de fabricación de vinos y licores han pasado rápidamente de ser unidades artesanales a grandes complejos productivos cuyo objetivo es mantener un producto de características uniformes aún cuando las materias primas, el equipamiento y la escala de operación estén cambiando continuamente. Para conseguir un producto reproducible, el proceso de fermentación se ha normalizado mediante el control de parámetros tales como la tasa de inoculación, la viabilidad y las condiciones de almacenamientos de las levaduras, las concentraciones de oxígeno disuelto, los contenidos de nitrógeno soluble y de azúcares fermentables del mosto y la temperatura del proceso. Se han llevado a cabo innovaciones como el uso de procesos de fermentación continuos, la elaboración de cerveza a partir de mostos de elevado extracto seco primitivo, el empleo de cereales no malteados junto con, según los casos, enzimas microbianos, o la producción de cervezas bajas en carbohidratos, obteniéndose diversos niveles de éxito. Pero, curiosamente, al intentar mejorar procesos industriales protagonizados por la levadura, las soluciones han ido encaminadas al refinamiento tecnológico de equipos y a la optimización de los parámetros de producción. Hasta hace relativamente poco tiempo no se había propuesto la modificación de la levadura para la mejora de tales procesos. Esto se debe al hecho de que las técnicas clásicas para la mejora genética de las cepas (por ejemplo, mutagénesis, o cruzamiento y selección) son lentos, inespecíficos y no siempre aplicables a las cepas de las levaduras industriales. Sin embargo, las modernas técnicas de la Biología Molecular por fin permiten crear nuevas cepas de levadura que desempeñen

óptimamente su trabajo en las industrias actuales. La principal ventaja con la que cuenta la ingeniería genética, es que se puede modificar con precisión una característica en concreto, sin afectar a otras propiedades que sí son deseables. Sin embargo, pese a este inmenso progreso en el conocimiento de la biología de la levadura, todavía no ha sido comercializado ningún alimento ni bebida en el que se hayan utilizado levaduras recombinantes, aún cuando sí que existen ejemplos de levaduras modificadas genéticamente que han superado todos los requisitos exigidos por las correspondientes legislaciones y que se encuentran a disposición de la industria.

1.3.1 Principales dificultades biotecnológicas en la mejora genética de levaduras industriales

Uno de los principales problemas que se debe afrontar es la necesidad de trabajar con cepas industriales. Aunque las cepas de las levaduras de laboratorio derivan de cepas de levaduras industriales, entre ellas existen marcadas diferencias que hacen que las técnicas de genética clásica desarrolladas con las levaduras de laboratorio no puedan ser aplicadas directamente en el estudio de cepas de levaduras industriales (Hammond, 1995). Las levaduras de laboratorio son normalmente isogénicas, haploides del tipo de conjugación sexual “*a*” o “*α*”, cuando son diploides presentan capacidad de esporulación y contienen múltiples mutaciones auxotróficas. Por el contrario, las cepas de las levaduras industriales son prototróficas, genéticamente diversas, bien pueden ser diploides, poliploides o aneuploides e incluso aloaneuploides, con poca o ninguna capacidad para esporular, y las cepas que lo hacen presentan una baja viabilidad de esporas; además, muchas de las cepas son homotálicas y los segregantes meióticos diploidizan rápidamente.

Los transformantes de las levaduras de laboratorio se seleccionan por complementación de alguna de sus auxotrofías. Sin embargo, cuando se trata de transformar levaduras industriales, los marcadores auxotróficos carecen de utilidad debido a la prototrofia de estas estirpes. Para estas cepas, se necesita recurrir al uso de marcadores dominantes que, generalmente, confieran resistencia a determinadas drogas o compuestos químicos. Mientras que la transformación de cepas de levaduras de laboratorio es un procedimiento común, las cepas de levaduras industriales se muestran recalcitrantes a la transformación. No obstante, se ha descrito en la bibliografía la obtención de

transformantes a partir de cepas industriales por los tres procedimientos más habitualmente empleados: formación de esferoplastos (Spencer *et al.*, 1993), tratamiento con sales de litio (Gietz y Woods, 2002) y la biobalística (Johnston y De Vit, 1996).

Un sistema ideal de modificación genética para las cepas de levaduras industriales requiere, entre otras cosas, el uso de un marcador dominante de selección y disponer de metodologías que proporcionen una alta eficiencia de transformación que permita la construcción de cepas estables por integración cromosómica (Puig *et al.*, 1998).

Por razones comerciales, los transformantes deben de mantener las mismas propiedades útiles de la cepa parental, estar libres de DNA foráneo que no resulte esencial como, por ejemplo, genes que confieran resistencia a antibióticos o de fragmentos de DNA sintetizados para actuar como nexos de unión entre diversos fragmentos de DNA, y no expresar ninguna proteína de fusión que pueda surgir como consecuencia de los eventos de integración genómica (Linko *et al.*, 1997).

1.3.2 Levaduras genéticamente modificadas para la mejora de los procesos industriales y de la calidad de los productos

Como ya hemos visto la utilización de la levadura *S. cerevisiae* para la elaboración de pan y bebidas alcohólicas se remonta a hace más de 6.000 años. Las razones que justifican el uso continuado de cepas industriales de *S. cerevisiae* son su habilidad para transformar eficazmente azúcares en etanol, dióxido de carbono y numerosos metabolitos secundarios que dan lugar al sabor y aroma característico de cada producto y su capacidad para soportar el estrés causado principalmente por la temperatura, la presión osmótica, la presión hidrostática, la alta densidad celular, el etanol y la competición con bacterias y otras levaduras salvajes. No obstante, se puede mejorar su tolerancia al estrés consiguiendo así beneficios potenciales en los procesos de producción de alimentos y bebidas alcohólicas.

En 1989 la primera levadura genéticamente modificada obtuvo su aprobación, por parte de las autoridades del Reino Unido, para su utilización en la producción de alimentos. Se trataba de una levadura de panadería que constitutivamente expresaba los genes correspondientes a la maltosa permeasa y la maltasa, lo que provoca un aumento de la

rapidez con que se produce el levantamiento de la masa panadera (Osinga *et al.*, 1988). En 1993 fue igualmente aprobada una levadura cervecera que expresa el gen de la glucoamilasa de *S. diastaticus*, lo que permite la fermentación parcial de las dextrinas (Perry y Meaden, 1988). Sin embargo, es interesante resaltar que pese a que sí que se utilizan levaduras genéticamente modificadas para la producción de enzimas y aditivos utilizados en la producción de alimentos (Walker, 1998) y pese a que la levadura es considerada un organismo “GRAS”, ninguna levadura genéticamente modificada se utiliza actualmente en la producción de alimentos. Este hecho puede ser atribuido a dos factores: la complejidad de las regulaciones en materia de uso de organismos genéticamente modificados en la producción de alimentos y, en mayor grado, a la percepción negativa por parte del consumidor de las modificaciones genéticas.

En la Tabla 1 se describe brevemente las principales manipulaciones genéticas que se han realizado en levaduras en el ámbito de la industria alimentaria. En la misma se pone de manifiesto el potencial de la ingeniería genética en levaduras para desarrollar nuevas características fenotípicas de gran utilidad y valor para la industria alimentaria. En el presente clima socio-cultural, el uso de estas levaduras para la fabricación de alimentos o bebidas es poco probable, pero proporcionan una idea del potencial futuro de los OGM.

Objetivo	Modificación	Resultado	Referencia
Aumento de la velocidad de fermentación	Sobreexpresión de genes que codifican enzimas clave de la glucólisis	No se aumentó de forma significativa la velocidad de formación de etanol	Schaaff <i>et al.</i> , 1989
Aumento de la velocidad de fermentación de mostos cerveceros de elevado extracto seco primitivo	Sobreexpresión del gen <i>MAL61</i> , codifica un transportador de maltosa	Aumento de la velocidad de fermentación de mostos cerveceros de elevado extracto seco primitivo	Kodama <i>et al.</i> , 1995
Obtención de cerveza baja en carbohidratos, con menor coste económico	Sobreexpresión de los genes <i>STA2</i> y <i>STA1</i> de <i>S.diastaticus</i> que codifica glucoamilasa extracelular (hidroliza dextrinas)	Aumento contenido alcohólico 1% (v/v) y disminución contenido energético	Vakeria <i>et al.</i> , 1996 Sakai <i>et al.</i> , 1989
Aumento de la degradación de dextrinas	Sobreexpresión de enzima amiloglicosidasa de <i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Degradación de dextrinas con la ventaja de que es termolábil por lo que es inactivada durante la pasteurización	Lancashire <i>et al.</i> , 1989
Degradación de β -glucanos para evitar la turbidez en cerveza	Expresión gen <i>EGI</i> de <i>Trichoderma reesei</i> que codifica para una β -glucanasa	Reducción de viscosidad de cerveza	Pentillä <i>et al.</i> , 1987
Mejora de la estabilidad de la espuma y del sabor en cerveza	Disrupción gen <i>PEP4</i> (para aumentar la estabilidad de la espuma) y sobreexpresión <i>GSH1</i> , enzima clave en la síntesis de glutatión (previene oxidación)	Aumento en el contenido de glutatión en mosto cervecero y disminución actividad proteinasa	Wang <i>et al.</i> , 2007
Mejora y control de la floculación	Expresión del gen <i>FLO1</i> bajo control del promotor de <i>HSP30</i> (sólo se activa al final de la fermentación cuando aumenta etanol y disminuyen carbohidratos)	Fermentación y floculación correcta a escala laboratorio, falta estudio a escala industrial	Verstrepen <i>et al.</i> , 2001
Reducción de formación de diacetilo en la producción de bebidas alcohólicas	Sobreexpresión genes <i>ILV3</i> y <i>ILV5</i> que codifican enzimas de la ruta biosintética de valina	Disminución niveles de diacetilo sin comprometer la síntesis de valina	Villa <i>et al.</i> , 1995
	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen de la α -acetolactato decarboxilasa de <i>Acetobacter aceti</i> ssp. <i>xylum</i>	Obtención de cerveza de elevada calidad con reducción drástica de los niveles de diacetilo en experiencias piloto	Yamano <i>et al.</i> , 1995
Reducción de la formación de diacetilo y disminución del contenido calórico	Disrupción del gen codifica α -acetohidroxiácido sintasa, <i>ILV2</i> , mediante integración del gen que codifica dextranasa <i>LSD1</i> de <i>Lipomyces starkeyi</i>	Disminución del contenido de diacetilo 35-40% y del contenido de azúcar 20-25%	Zhang <i>et al.</i> , 2008
Obtención de levadura capaz de producir mayor cantidad de ésteres de acetato	Sobreexpresión genes <i>ATF1</i> y <i>ATF2</i> que codifican alcohol acetiltransferasas	Aumento significativo de ésteres de acetato en cepas vínicas y cerveceras	Lilly <i>et al.</i> , 2000 Verstrepen <i>et al.</i> , 2003

Tabla 1. Breve descripción de las principales manipulaciones genéticas que se han realizado en *Saccharomyces cerevisiae* en el ámbito de la industria alimentaria

Objetivo	Modificación	Resultado	Referencia
Obtención cerveza y vino con mayor contenido en glicerol y menor grado alcohólico	Sobreexpresión genes <i>GPD1</i> , <i>GPD2</i> que codifican isoenzimas glicerol-3-fosfato deshidrogenasa Sobreexpresión <i>FPS1</i> que codifica transportador de membrana	Reducción etanol 2% (v/v) y aumento entre 1,5 y 4 veces la producción de glicerol	Remize <i>et al.</i> , 1999
Diminución del contenido en ácido acético en vinos	Delección del gen <i>ALD6</i> que codifica aldehído deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i> y sobreexpresión de <i>GPD2</i> que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de <i>S. cerevisiae</i>	Disminución del contenido en ácido acético 4 veces, mayor contenido de glicerol y menor grado alcohólico	Eglinton <i>et al.</i> , 2002
Hidrólisis de las proteínas que participan en la turbidez del vino	Sobreexpresión del gen <i>PEP4</i> que codifica una proteasa vacuolar de <i>S. cerevisiae</i> junto con señal de secreción del factor α	Insuficiente proteólisis	Pretorius, 2000
Mejora del comportamiento fermentativo mediante aumento de la resistencia al estrés provocado por la vinificación	Aumento de la expresión de <i>MSN2</i> , factor de transcripción de <i>S. cerevisiae</i> que controla la expresión de genes importantes para sobrevivir en condiciones estresantes	Mejora en el comportamiento fermentativo de la cepa recombinante debido a su incrementada resistencia al estrés	Cardona <i>et al.</i> , 2007
Construcción levadura vínica capaz de realizar fermentación maloláctica para disminuir el contenido de malato que proporciona sabor ácido y picado	Coexpresión de los genes <i>mleS</i> (codifica una enzima maloláctica) de <i>Oenococcus oeni</i> y gen <i>mae1</i> (codifica malato permeasa) de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Conversión de hasta 7g de malato/l en 4 días sin afectar a la fermentación alcohólica Cepa ML01 ha sido reconocida como "GRAS" en Estados Unidos	Volschenk, <i>et al.</i> , 2003 Husnik <i>et al.</i> , 2006
Aumento del contenido de ácido en mostos con déficit	Expresión gen <i>LDH</i> , codifica una lactato deshidrogenasa, de <i>Lactobacillus casei</i>	Producción lactato 5 g/l	Dequin <i>et al.</i> , 1999
Disminución de liberación sulfuro de hidrógeno por levadura aumentando producción aminoácidos azufrados	Sobreexpresión <i>NHS5</i> , codifica cistationina - β -sintasa Sobreexpresión <i>MET25</i> ; codifica metionina y cisteína sintasa	Disminución acumulación H ₂ S sin afectar a fermentación	Tezuka <i>et al.</i> , 1992 Omura <i>et al.</i> , 1995 Spiropoulos y Bisson, 2000
Aumento del contenido de sulfito en vinos blancos para su estabilidad y prevención de oxidación	Sobreexpresión <i>MET3</i> y <i>MET14</i> , codifican enzimas implicadas en biosíntesis aminoácidos azufrados Disminución nivel expresión <i>MET2</i> , codifica serina acetiltransferasa	Aumento producción sulfito en levadura	Korch <i>et al.</i> , 1991 Hansen y Kielland-Brandt, 1996

Tabla 1. (Continuación)

Objetivo	Modificación	Resultado	Referencia
Disminución de formación de etilcarbamato mediante la disminución de los niveles de urea	Disrupción gen <i>CARI</i> , codifica enzima arginasa (responsable de formación de urea)	Disminución de urea y consecuentemente de etilcarbamato pero crecimiento defectuoso por no metabolizar arginina	Kitamoto <i>et al.</i> , 1991
	Expresión operon ureasa de <i>Lactobacillus fermentum</i>	Niveles de expresión de ureasa adecuados, pero ausencia de actividad presumiblemente debido a la falta de proteínas esenciales auxiliares	Visser <i>et al.</i> , 1997
Disminución de formación de etilcarbamato mediante la disminución de los niveles de urea en vino	Expresión del gen <i>DURI,2</i> (codifica ATP-urea amidoliasa, que degrada la urea) bajo el control del promotor <i>PGK1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	Reducción de etilcarbamato en 89,1%. La cepa resultante no se considera OGM y ha sido reconocida como GRAS en EE.UU	Coulon <i>et al.</i> , 2006
Mejora del sabor y aroma del vino al aumentar su contenido en monoterpenos	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen de S-linalool sintasa de la planta <i>Clarkia breweri</i>	En condiciones de microvinificación aumento de linalool excretado por encima del umbral de percepción humana	Herrero <i>et al.</i> , 2008
Aumento del contenido en resveratrol (actividad anticancerígena) en vino	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen de la resveratrol sintasa de álamo y del gen de la coenzima-A ligasa de vid	Producción de resveratrol por <i>S. cerevisiae</i>	Becker <i>et al.</i> , 2003
	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen de 4-cumarato:coenzimaA ligasa de <i>Nicotiana tabacum</i> y del gen de la estilbeno sintasa de <i>Vitis vinifera</i>		Beekwilder <i>et al.</i> , 2006
Facilitar proceso de filtración de los vinos	Expresión gen <i>PGUI</i> de <i>S. cerevisiae</i> , codifica endopoligalacturonasa	Expresión eficiente enzima endopoligalacturosa. Actividad semejante a la obtenida al añadir enzimas pectinolíticas comerciales con lo que se facilita la filtración	Vilanova <i>et al.</i> , 2000
Mejora de la capacidad para levantar la masa panadera	Sobreexpresión de maltosa permeasa y maltasa	Aumenta hinchamiento de la masa panadera	Osinga <i>et al.</i> , 1988
Aumento de la resistencia a congelación-descongelación de la levadura para su uso en masas congeladas	Sobreexpresión aquaporinas <i>AQY1</i> y <i>AQY2</i>	Al aumentar salida de agua de la célula durante congelación se previene daño celular provocado por cristales de hielo	Tanghe <i>et al.</i> , 2002
Aumento de la resistencia a congelación-descongelación de la levadura para su uso en masas congeladas	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del péptido GS-5 (péptido anticongelante) de <i>Myoxocephalus aeneus</i> , pez que habita en zonas polares	Aumento de la resistencia a congelación y de la producción de CO ₂	Panadero <i>et al.</i> , 2005

Tabla 1. (Continuación)

Objetivo	Modificación	Resultado	Referencia
Aumento de la resistencia a congelación-descongelación de la levadura para su uso en masas congeladas	Sobreexpresión del gen <i>CRZI</i> (codifica factor de transcripción dependiente calcineurina que activa la transcripción de genes relacionados con el estrés) en la cepa industrial HS13	Aumento de la tolerancia a congelación y salinidad. Aumento capacidad de levantamiento en masas dulces	Panadero <i>et al.</i> , 2007
Aumento de la resistencia a congelación-descongelación de la levadura para su uso en masas congeladas	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> de <i>FAD2-1</i> y <i>FAD2-3</i> (codifican a oleato $\Delta 12$ - desaturasa) de <i>Helianthus annuus</i>	Aumento de la fluidez de la membrana y con ello mejora de la tolerancia a la congelación	Rodríguez-Vargas <i>et al.</i> , 2007
Producción de biotecnológica de xilitol para su uso como edulcorante artificial	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen de la xilosa reductasa (<i>XYL1</i>) de <i>Candida shehatae</i> y <i>Pichia stipitis</i>	Conversión de xilosa a xilitol con rendimientos cercanos al máximo teórico	Govinden <i>et al.</i> , 1999
Producción de etanol a partir de D-xilosa en condiciones anaeróbicas	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> de enzima NADP-GAPDH (NADP ⁺ -dependiente D-gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) de <i>Kluyveromyces lactis</i> y delección del gen <i>ZWF1</i> (codifica a glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) de <i>S. cerevisiae</i>	Transformación de una cepa productora principalmente de xilitol y CO ₂ en una cepa productora de etanol	Verho <i>et al.</i> , 2003
Aumento de la fermentación de maltotriosa en cepas industriales de <i>S. cerevisiae</i>	Sobreexpresión del gen <i>AGTI</i> (permeasa para azúcares)	Aumento del consumo de maltotriosa a escala de laboratorio	Stambuk <i>et al.</i> , 2006
Aumento del contenido de sulfito en cepas de laboratorio de <i>S. cerevisiae</i>	Sobreexpresión de los genes <i>MET14</i> (codifica enzima implicada en biosíntesis aminoácidos azufrados) y <i>SSUI</i> (codifica bomba que expulsa sulfito al exterior)	Aumento 10 veces de producción sulfito sin producir interferencias graves con el metabolismo de aminoácidos azufrados	Donalies y Stahl, 2002
Producción de bacteriocinas para evitar la contaminación bacteriana	Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen <i>pedA</i> de <i>Pediococcus acidilactici</i>	Presencia de pediocinas biológicamente activas en el medio de cultivo	Schoeman <i>et al.</i> , 1999
Desarrollo de cepas industriales enológicas con producción de ésteres optimizada	Sobreexpresión del gen <i>ATF1</i> , que codifica alcohol acetiltransferasa, en la cepa industrial VIN13	Aumento del contenido de acetato de etilo, acetato de isoamilo (aroma a plátano), acetato de 2-feniletilo (aroma floral), y caproato de etilo (aroma a manzana)	Lilly <i>et al.</i> , 2006
	Sobreexpresión del gen <i>EHT1</i> , que codifica etanol hexanoil transferasa, en la cepa industrial VIN13	Aumento marcado del contenido de caproato de etilo (aroma a manzana)	
	Sobreexpresión del gen <i>IAH1</i> , que codifica esterasa, en la cepa industrial VIN13	Disminución en el contenido de ésteres de acetato	

Tabla 1. (Continuación)

2 Levadura, estrés y fermentación a baja temperatura

Como cualquier organismo vivo, *S. cerevisiae*, presenta unos parámetros óptimos de crecimiento en lo que se refiere a requerimientos nutricionales y condiciones medioambientales. Las cepas de *S. cerevisiae* empleadas, tanto en la industria como en el laboratorio de investigación, crecen más rápidamente por fermentación, incluso bajo condiciones aeróbicas, de monosacáridos o disacáridos como glucosa, sacarosa o fructosa, aunque la eficacia en la transformación del sustrato en material celular sea menor que por respiración. El crecimiento también se ve favorecido por valores del pH del medio de cultivo en torno a 5 y la temperatura óptima de crecimiento se sitúa en el intervalo 26-28° C. El uso industrial de la levadura implica unas condiciones muy diferentes a las de su hábitat natural, por lo que las cepas industriales deben ser capaces de adaptarse a ambientes cambiantes, así como resistir distintos tipos de estrés tales como el estrés oxidativo, el osmótico, el causado por las bajas temperaturas, por la presión hidrostática, por el etanol o por la limitación de nutrientes, entre otros. Como veremos a continuación, la fermentación a bajas temperaturas resulta clave en los procesos de elaboración de determinadas bebidas alcohólicas con características organolépticas que se ajusten a los perfiles de calidad sensorial y de preferencia del consumidor. Por ello, en los siguientes apartados realizaremos una detallada revisión bibliográfica de la respuesta a nivel molecular desencadenada por las bajas temperaturas.

2.1 Importancia del control de la temperatura durante la fermentación en la producción de bebidas alcohólicas

En cuanto a la calidad de las bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación, hay que destacar el papel que la temperatura de fermentación desempeña (Attfield, 1997) pues tiene una gran influencia en la producción de aromas y compuestos volátiles, sobre todo, en la obtención de una relación de concentraciones entre todos ellos que dé lugar a un producto con aroma y sabor equilibrados.

La velocidad de fermentación aumenta generalmente con la temperatura entre los 15 y los 35° C y los niveles de glicerol, acetaldehído, piruvato y α -cetoglutarato de los caldos de fermentación también aumentan conforme lo hace la temperatura. La formación de niveles elevados de alcohol también depende de la temperatura. En los vinos, la menor

temperatura de fermentación da lugar a vinos más frescos y afrutados mientras que al incrementar la temperatura de fermentación predominan los aromas florales (Molina *et al.*, 2007). A bajas temperaturas el riesgo de infección bacteriana y de producción de ácidos volátiles se reduce. En los procesos de fermentación actuales que utilizan fermentadores cilindrocónicos para obtener cerveza de tipo “lager”, la temperatura inicial es aproximadamente de unos 10° C. Para el control de la temperatura se hace necesario el uso de equipos de frío, ya que parte de la energía liberada por el metabolismo celular se disipa en forma de calor. Si la temperatura se mantiene entre 10 y 14° C, la fermentación dura entre 10 y 6 días. En la figura 4 se muestra el curso de una fermentación de cerveza “lager” llevada a cabo según los métodos e instalaciones tradicionales que se utilizaban hasta el último tercio del siglo pasado.

El frío, o la exposición a temperaturas significativamente por debajo del valor óptimo para su crecimiento, es una más de las situaciones de estrés que deben superar las levaduras industriales para la mejora de su capacidad fermentativa. Sin embargo, si somos capaces de mejorar el crecimiento de la levadura a las bajas temperaturas empleadas en las industrias cervecera y enológica (obviamente, sólo en el caso de las producciones de vinos rosados, blancos y en la de cavas y vinos espumosos) e incluso en la fabricación de sidra, podríamos mejorar muchos de los aspectos tecnológicos que se ven afectados por la necesidad de fermentar a bajas temperaturas. Así, el control de la temperatura de fermentación es un parámetro del proceso muy importante que representa un coste significativo del mismo, limita la capacidad de utilización de las instalaciones al alargar el tiempo de fermentación y tiene una gran incidencia en la producción de aromas y compuestos volátiles, sobre todo, en la obtención de una relación de concentraciones entre todos ellos que dé lugar a un producto con sabor y aroma equilibrados. Una mayor temperatura de fermentación aunque provoca una pérdida acusada de volátiles conlleva un ahorro energético al acortar el tiempo de residencia en el fermentador (por ejemplo, el coste energético de producción de 1 litro de cerveza sólo en lo que se refiere al frío que es necesario generar es de 100.000 calorías). Otra faceta importante derivada del control de la temperatura se refiere al mayor o menor aprovechamiento de la capacidad de los tanques de fermentación. En primer lugar, si el tiempo de fermentación es menor, se aumenta la capacidad nominal (expresada en litros/año) de una determinada instalación. En segundo lugar, el volumen máximo de llenado de los tanques de fermentación es función de la temperatura a la que

se opere en ellos, debido al fenómeno de desbordamiento del fermentador por la producción de espuma durante el proceso fermentativo como consecuencia del CO_2 desprendido. También cabe resaltar las pérdidas económicas que se derivan de las fermentaciones que se detienen y no llegan a la atenuación o contenido residual en azúcares requeridos para el producto en cuestión.

Además, la cerveza recién fermentada debe someterse a diversos tratamientos antes de ser envasada finalmente para su distribución. La maduración implica una fermentación secundaria llevada a cabo por las levaduras residuales que pasan a la cerveza desde el fermentador primario. Este proceso cambia y determina el carácter de una cerveza pues se asimila el diacetilo y la concentración de algunos ésteres aumenta. El dióxido de carbono, producido en la fermentación secundaria, o añadido, ayuda a purgar la cerveza de oxígeno, H_2S y compuestos volátiles no deseados. Los tiempos y las temperaturas utilizadas varían de una cervecería a otra, el periodo de almacenamiento oscila entre 4 días y 4 semanas y la temperatura de almacenamiento oscila en un rango de temperaturas que abarca desde 7°C hasta -4°C .

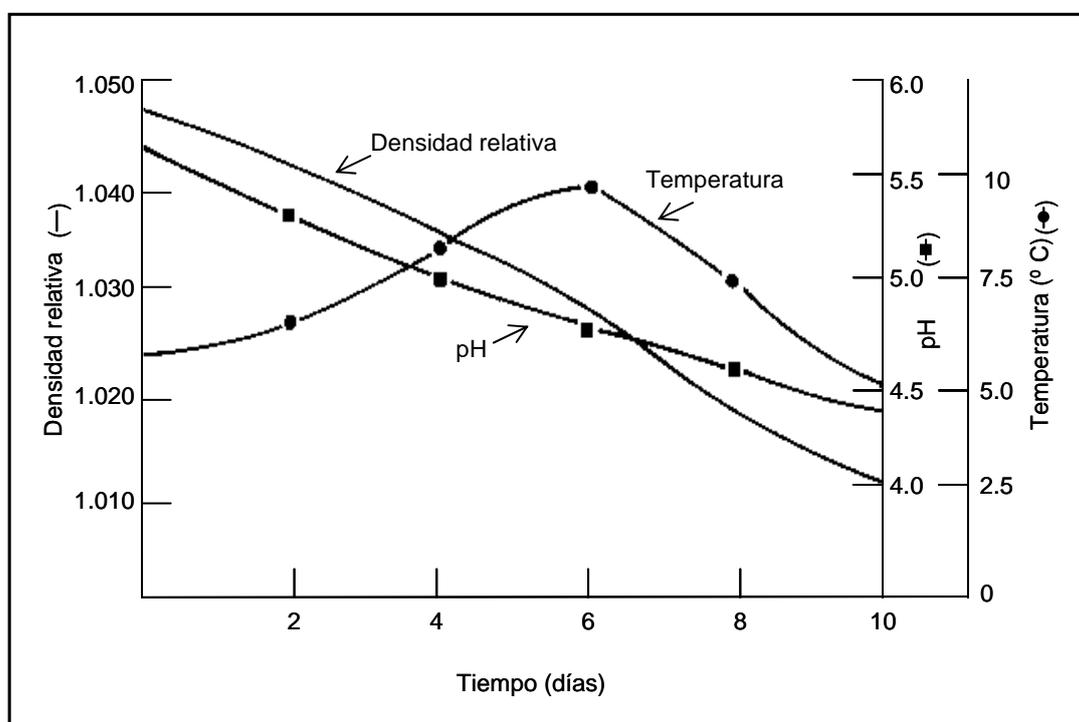


Figura 4. Evolución con el tiempo de un proceso de fermentación tradicional de cerveza “lager” (Hough *et al*, 1982).

Para lograr un producto de calidad y a un coste competitivo, el fabricante de bebidas alcohólicas busca una solución de compromiso; bajando la temperatura mejora la calidad del producto en cuanto a la producción de aromas, pero si disminuye en exceso esa temperatura ralentiza el crecimiento de la levadura, alargando la duración del proceso de fermentación y el coste del mismo. Así, en el caso concreto de la elaboración de cervezas tipo “lager”, la temperatura idónea de fermentación es de unos 10° C, aunque industrialmente es frecuente fermentar entre 14 y 16° C. Si las levaduras creciesen mejor a baja temperatura, el proceso de fermentación duraría menos, y esto, además de representar un ahorro energético, permitiría un mejor aprovechamiento de las instalaciones y un aumento de la capacidad de producción anual de las mismas. Como vemos, la fermentación a bajas temperaturas resulta crucial en la obtención de diferentes bebidas alcohólicas, por ello en los siguientes apartados realizaremos un detallado estudio de la respuesta a nivel molecular desencadenada por las bajas temperaturas.

3 Respuesta molecular a las bajas temperaturas

Las células de levadura se ven sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, tanto en situaciones naturales como durante los procesos industriales. El daño provocado por el estrés y la respuesta de la levadura al mismo, depende del tipo y grado del estrés, y del estado fisiológico y de la etapa de crecimiento en la que se encuentre la levadura en el momento en el que ocurre el estímulo. Entre estos estreses, la respuesta al choque térmico por calor ha sido ampliamente investigada (Lindquist y Craig, 1988; Schlesinger, 1990), revelando que se induce la expresión de un grupo de proteínas (HSP, por sus siglas en inglés Heat Shock Protein) muchas de las cuales funcionan como chaperonas moleculares para el correcto plegamiento de las proteínas. Sin embargo, la respuesta celular que se desencadena tras someter a las células a bajas temperaturas no está tan bien caracterizada, pues aunque se sabe que tiene como consecuencia la síntesis de una serie de proteínas, éstas no están tan conservadas en un rango tan amplio de organismos como las HSP. Esta falta de conocimiento respecto a la respuesta celular frente a las bajas temperaturas resulta sorprendente, ya que un cambio en la temperatura ambiental es probablemente la forma más común de estrés. Además, las bajas temperaturas se utilizan en la industria biotecnológica para el cultivo y preservación de las células y en el campo de la medicina para la conservación de tejidos y tratamiento de daño cerebral sin

necesariamente entender la respuesta al choque por bajas temperaturas y los mecanismos aprovechados para tales usos.

3.1 Principales efectos adversos causados por las bajas temperaturas

El frío provoca alteraciones de carácter bioquímico y fisiológico en la célula tales como:

- a) Baja eficiencia en la traducción de proteínas: la transcripción y la traducción de proteínas son etapas muy sensibles a la temperatura. El frío provoca el fortalecimiento de las interacciones entre las hebras del DNA en la doble hélice y en el estado de superenrollamiento, con lo que se impide la separación de las hebras y el acceso de la RNA polimerasa. Por otro lado, las bajas temperaturas afectan a la estabilidad de la estructura secundaria del RNA mensajero, por lo que la iniciación de la traducción se ve limitada (Jones y Inouye, 1996; Farewell y Neidhardt, 1998; Thieringer *et al.*, 1998).
- b) Baja fluidez de la membrana celular: Las membranas presentan un estado líquido cristalino y al caer la temperatura sufren una transición hacia una fase gel (Thieringer *et al.*, 1998), lo que provoca un aumento en el ordenamiento molecular de los lípidos de la membrana, incrementando la rigidez de la misma (Vigh *et al.*, 1998). Esta escasa fluidez de la membrana celular genera una disminución en la capacidad de difusión de las proteínas de membrana, un descenso en la actividad de las enzimas asociadas a la membrana y una notable reducción en el transporte a través de la membrana (Los y Murata, 2004), así como un aumento de la permeabilidad pasiva (Hoekstra *et al.*, 2001).
- c) Disminución en la velocidad de plegamiento de proteínas e inestabilidad conformacional de las mismas. La entropía, a temperaturas normales, favorece el plegamiento pues al desnaturalizarse una proteína y exponer el interior hidrofóbico al agua se ordena esta y ello compensa el aumento de desorden de la cadena polipeptídica. Sin embargo, al aumentar la temperatura, la entropía pasa a favorecer la desnaturalización porque aumenta mucho el desorden de la cadena polipeptídica no plegada. La desnaturalización de proteínas está siempre contrarrestada por el aumento de entalpía que ocurre durante la misma, porque hay que romper enlaces en la estructura compacta de una proteína para pasar a la

forma desordenada. Asimismo, al aumentar la temperatura, la entalpía favorece aún más a la forma nativa, porque hay que romper más enlaces para desnaturalizarla ya que el agua que rodea a los grupos hidrofóbicos expuestos (“icebergs”) tiene menos enlaces por puentes de hidrógeno. Al disminuir la temperatura, esta agua de los icebergs tiene más enlaces por puentes de hidrógeno y, por tanto, se gana menos entalpía rompiendo enlaces durante la desnaturalización y la entalpía favorece menos la forma nativa. En la mayoría de los casos, la temperatura que hace falta para la desnaturalización por frío está por debajo del punto de congelación, pero en algunas proteínas está por encima y, por tanto, a bajas temperaturas algunas proteínas celulares se desnaturalizan y ello explica que se induzcan chaperonas (HSPs) por frío (Fersht, 1999).

- d) Disminución generalizada de la actividad enzimática celular. La temperatura es uno de los factores medioambientales más importantes para la vida, ya que influye en la mayoría de las reacciones bioquímicas. Las bajas temperaturas enlentecen fuertemente las velocidades de reacción catalizadas por enzimas. El efecto de la temperatura sobre las reacciones químicas está descrita de forma básica por la ecuación de Arrhenius: $k = Ae^{-Ea/RT}$, donde k representa la constante cinética, A es un factor preexponencial que depende de la reacción, Ea es la energía de activación, R es la constante universal de los gases ($8,31 \text{ kJ mol}^{-1}$) y T es la temperatura absoluta expresada en grados K. Teniendo en cuenta dicha ecuación, cualquier disminución en la temperatura supone una disminución exponencial en la velocidad de reacción, cuya magnitud dependerá del valor de la energía de activación. Al disminuir la temperatura las proteínas tienden a ser más compactas, por lo que pierden la movilidad requerida para su actividad catalítica. La hipótesis aceptada sugiere que los organismos adaptados a las bajas temperaturas presentan enzimas con mayor plasticidad, lo que lleva consigo una pérdida de estabilidad de la estructura proteínica. Este equilibrio entre flexibilidad y estabilidad representa uno de los puntos cruciales en la adaptación de una proteína a la temperatura ambiental (Gerday *et al.*, 1997).

3.2 Principios generales de adaptación al frío

La adaptación celular a los diferentes estreses medioambientales es esencial para la supervivencia de todos los seres vivos, desde procariontes a eucariontes. A excepción de

los animales homeotermos, que pueden mantener su temperatura corporal ante el frío, la mayoría de los peces, plantas y todos los invertebrados y los microorganismos (arqueas, bacterias, levaduras, algas, hongos y protozoos) están en completo equilibrio térmico con el medio ambiente que les rodea.

Frente a esta alteración causada por la disminución en la temperatura ambiental se desencadena una respuesta celular a nivel molecular que persigue la adaptación. Recientes estudios procedentes del campo de la proteómica han demostrado que la respuesta adaptativa microbiana a las bajas temperaturas ocurre en dos fases (Phadtare y Inouye, 2004; Schade *et al.*, 2004; Weinberg *et al.*, 2005). Se observa una respuesta inmediata al choque térmico por exposición a bajas temperaturas y posteriormente, tras mantener este estrés durante un periodo de tiempo, se observa una respuesta de aclimatación a dicha condición. De forma general, en la respuesta inmediata están implicados cambios en la fluidez de la membrana y en el metabolismo del RNA, mientras que la respuesta tardía incluye modificaciones que protegen a las células frente a diferentes tipos de estreses ambientales.

En el caso de arqueas psicrófilas, estudios recientes han establecido (Cavicchioli, 2006) una relación directa entre la aclimatación tras la exposición a 4° C y determinadas modificaciones en componentes estructurales y funcionales de la célula. En el caso de la membrana citoplasmática, la composición lipídica parece jugar un papel fundamental ya que una mayor insaturación lipídica conduce a una mayor fluidez en la membrana y, por lo tanto, a una mejora del funcionamiento de la misma a bajas temperaturas. Otras modificaciones que llevan a la adaptación al frío consisten en cambios en la composición de las proteínas (se ha visto que las proteínas presentes en arqueas psicrófilas aclimatadas al frío presentan mayor contenido en aminoácidos polares sin carga, particularmente glutamina y treonina, y menor contenido en aminoácidos hidrofóbicos, particularmente leucina) que provocan un aumento en su flexibilidad mejorando así su eficiencia catalítica, modificaciones en la composición de los tRNAs (el contenido de GC del tRNA afecta adversamente a la flexibilidad del mismo en condiciones de bajas temperaturas) y alteraciones en los niveles de determinadas proteínas y solutos que se regulan térmicamente. Por todo ello, es importante considerar el contexto celular cuando se estudia la adaptación de un componente individual.

En procariotas los estudios más exhaustivos de la adaptación a bajas temperaturas se han llevado a cabo en *E. coli*. De forma resumida, una caída en la temperatura provoca una reducida fluidez de la membrana y una inhibición transitoria en la síntesis de la mayoría de proteínas, provocando una ralentización en el crecimiento conocida como fase de aclimatación. Durante esta fase existe un aumento en la expresión de los genes que codifican para las proteínas de respuesta al estrés por frío (CSP, por sus siglas en inglés: Cold Shock Protein) (Thieringer *et al.*, 1998). Estas proteínas, que están muy conservadas y siempre presentan capacidad de unión a ácidos nucleicos de cadena simple, participan en procesos de iniciación de la traducción y transcripción (Jiang *et al.*, 1997; Ermolenko y Makhatadze, 2002) actuando como proteínas asociadas al ribosoma, factores de iniciación de la traducción, helicasas y RNA/DNA chaperonas, consiguiendo una eficiente actividad ribosomal a bajas temperaturas (Fang *et al.*, 1998; Phadtare *et al.*, 2004b). La importancia de las chaperoninas para el crecimiento de *E. coli* a bajas temperaturas quedó confirmada tras el aislamiento e identificación de dos chaperoninas adaptadas a las bajas temperaturas, Cpn60p y Cpn10p de la bacteria psicrófila *Oleispira antarctica* y expresarlas en *E. coli* bajo el control del promotor P_{lac}. Las velocidades de crecimiento obtenidas para la nueva cepa recombinante llegaron a multiplicarse por 36 a 10° C y por 141 a 8° C. En este mismo trabajo descartaron la posibilidad de que el aumento del crecimiento a bajas temperaturas se debiera a un cambio cuantitativo en el nivel de chaperoninas, mediante la sobreexpresión de las propias chaperoninas de *E. coli*, GroEL y GRoES (Ferrer *et al.*, 2003).

En lo que respecta a la membrana citoplasmática, *E. coli* ha desarrollado mecanismos para compensar la transición de líquido cristalino a fase de gel cambiando el grado de saturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos de dicha membrana. Los fosfolípidos con ácidos grasos insaturados tienen mayor grado de flexibilidad que los que contienen ácidos grasos saturados. Este tipo de respuesta, conocida como adaptación homeoviscosa, fue demostrada por primera vez en *E. coli* (Sinensky, 1974). Por otro lado, la adaptación de *E. coli* al frío (10-16° C) también supone la producción de grandes cantidades del disacárido trehalosa (α -D-glucopiranosil-1,1- α -glucopiranosido), mediante la inducción de la expresión de las enzimas biosintéticas OtsAp y OtsBp. Además la acumulación de este disacárido resulta crítica al disminuir la temperatura entre 0° C y 4° C, lo cual no ocurre con la mayoría de las CSPs (Kandror *et al.* 2002).

Tanto en el género *Bacillus* como en las cianobacterias, se ha visto que al exponer las células a bajas temperaturas se produce un aumento en la síntesis de enzimas desaturadas, con el consecuente aumento de la insaturación de los ácidos grasos de membrana (Aguilar *et al.*, 1999; Inaba *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2001).

En el caso de *Yersinia pestis*, se ha descrito que tras una brusca exposición a temperaturas de 10° C durante 1 hora, se producen cambios en la transcripción de 28 genes relacionados con la membrana plasmática, lo que provoca una alteración en la composición de la misma (Han *et al.*, 2005).

En organismos eucariotas, se ha descrito que tras un descenso pronunciado en la temperatura se produce un aumento en la actividad de las enzimas desaturadas debido a la inducción transcripcional de su nivel de expresión y a otros mecanismos post-traduccionales. Como consecuencia, se aumenta la proporción de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de la membrana plasmática (Cossins *et al.*, 2002).

3.3 Mecanismos de adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a bajas temperaturas

La respuesta celular de *Saccharomyces cerevisiae* tras la exposición a bajas temperaturas afecta a determinados grupos de genes (Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2003; Kandror *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006). Mediante el análisis por hibridación diferencial de una genoteca de levadura, se identificó a un pequeño grupo de genes cuyo nivel de expresión se halla inducido a bajas temperaturas (Kondo e Inouye, 1991). Entre este grupo destacan *TIP1/YBR067C* (Temperature shock-Inducible Protein), cuya expresión se induce tanto por altas como por bajas temperaturas, y sus dos homólogos *TIR1/YER011W*, *TIR2/YOR010C*, que codifican proteínas de la pared celular ricas en serina y alanina. Todas ellas podrían estar implicadas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular durante condiciones de estrés. Sin embargo, sus funciones y modo de regulación se desconocen (Kowalski *et al.*, 1995). Posteriormente, mediante el análisis de patrones de la expresión génica de *S. cerevisiae* tras un descenso en la temperatura, se ha visto que los genes que codifican los siguientes miembros de esta familia: *TIR1/YER011W*, *TIR2/YOR010C* y *TIR4/YOR009W*, se hallan inducidos a 10° C, 4° C (Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*

2003; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006; Panadero *et al.*, 2006) e incluso a 0° C (Kandror *et al.*, 2004), aunque también se inducen por otros tipos de estrés como las altas presiones o la hipoxia (Abe y Minegishi, 2008).

De forma análoga, los genes *PAU1/YJL223C*, *PAU2/YEL049W*, *PAU4/YLR461W*, *PAU5/YFL020C*, *PAU6/YNR076W*, *PAU7/YAR020C* que codifican proteínas cuyo contenido en serina es bajo en relación con las proteínas TIR y comparten con éstas cierta homología en la región N-terminal (Viswanathan *et al.*, 1994), se encuentran también inducidas tras ser expuestas durante 6-48 horas a 4° C (Homma *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2006) y también durante anaerobiosis (Rachidi *et al.*, 2000). La función de estas proteínas se desconoce, pero se sabe que los genes de la familia de seripauperinas (*PAU*) están presentes en los 16 cromosomas de la levadura y que componen la familia de genes más extensa en *S. cerevisiae*. Esta multiplicidad sugiere que realizan una importante función en las células de levadura (Rachidi *et al.*, 2000).

Dejando a un lado los grupos de genes mencionados anteriormente, el análisis de los diferentes estudios de la expresión génica tras la exposición a 10° C mediante micromatrices de DNA, pone de manifiesto que la respuesta a dicha temperatura atraviesa secuencialmente diferentes perfiles transcripcionales. Hay autores que apuntan dos (Schade *et al.*, 2004) o incluso tres (Sahara *et al.*, 2002) fases dentro de dicha respuesta, dependiendo de la duración del estrés. Nosotros consideraremos que la respuesta adaptativa de *Saccharomyces cerevisiae* a las bajas temperaturas se puede agrupar en dos fases, temprana y tardía.

3.3.1 Respuesta temprana

Durante esta fase la célula persigue aumentar la eficiencia del complejo ribosomal para compensar la reducida capacidad de la traducción a bajas temperaturas. Para ello, en primer lugar, recluta la maquinaria necesaria para sintetizar los RNA ribosomales aumentando la expresión de los componentes de la RNA polimerasa I y de proteínas implicadas en el procesamiento del RNA ribosomal.

En uno de los primeros estudios, llevado a cabo mediante hibridación diferencial, se identificó al gen *NSR1/YGR159C*, que codifica una proteína nucleolar que está implicada en el procesamiento del precursor del RNA ribosomal y en la biogénesis del

ribosoma (Kondo e Inouye, 1992). Además, la delección *nsr1* produjo una inhibición en el procesamiento del precursor del RNA ribosomal, especialmente tras disminuir la temperatura a 10° C, indicando el requerimiento de Nsr1p para el procesamiento normal del precursor del RNA ribosomal en condiciones de estrés por un descenso brusco de la temperatura (Kondo *et al.*, 1992b). Diversos estudios más recientes confirman la inducción a bajas temperaturas de la transcripción de este gen junto con los genes *HRP1/YOL123W*, *NRD1/YNL125C*, *STP4/YDL048C*, *NOG2/YNR053C* y *HUL5/YGL141W*, que codifican otras proteínas implicadas en el procesamiento del RNA ribosomal y con las RNA helicasas *DED1/YOR204W* y *DBP2/YNL112W* (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004). Además, mutaciones en dichos genes o en algunos otros (*DRS1/YLL008W*, *MPP10/YJR002W*, *RPS11A/YDR025W*, *RPS11B/YBR048W*) que codifican proteínas ribosomales y proteínas implicadas en el procesamiento del RNA ribosomal, también producen un fenotipo de sensibilidad al frío (Winzeler *et al.*, 1999).

A través de análisis mediante substracción de cDNAs, se identificaron en *S. cerevisiae* cinco genes denominados genéricamente *LOT1-5* (Low Temperature-responsive) cuyo nivel de expresión aumentaba cuando la temperatura del cultivo pasaba de 30° C a 10° C (Zhang *et al.*, 2001). Entre dichos genes se encuentran *RPL2B/YIL018W*, que codifica una proteína ribosomal y *NOPI/YDL014W* que da lugar a una proteína que forma parte del complejo ribonucleoproteico nucleolar pequeño. Además, la mutación del primero de dichos genes provoca un aumento de la sensibilidad al frío.

Otro aspecto importante en esta fase temprana del proceso de adaptación es el control de la fluidez de la membrana mediante la alteración de la concentración de ácidos grasos insaturados en las membranas lipídicas. En diferentes estudios de transcriptómica donde se analiza los patrones de expresión génica durante la exposición a bajas temperaturas (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004) y situación de hipoxia (Nakagawa *et al.*, 2002), se ha puesto de manifiesto un aumento inmediato en el nivel de transcripción del gen *OLE1/YGL055W*. Este gen codifica la única enzima desaturasa conocida en levadura, se trata de una $\Delta 9$ -desaturasa de ácidos grasos que convierte palmitoil-CoA (C16:0) y estearil-CoA (C18:0) a sus equivalentes monoinsaturados mediante la introducción de un doble enlace entre los carbonos noveno y décimo (Stukey *et al.*, 1990). Como consecuencia del aumento en la expresión del gen *OLE1* al variar la

temperatura de incubación de 30° C a 10° C, se produce un aumento en el grado de insaturación del total de ácidos grasos de las células de levadura (Nakagawa *et al.*, 2002). Sin embargo, *OLE1* no parece desempeñar un papel esencial en la aclimatación a bajas temperaturas ya que su sobreexpresión no proporciona mayor tasa de crecimiento a 10° C (Kajiwara *et al.*, 2000). Contrastando con este hecho, la producción de enzimas desaturasas recombinantes aumenta el índice de insaturación y la fluidez de la membrana de las células, lo que provoca una mejora en la tolerancia a la congelación en levadura (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007).

Paralelamente, diversos componentes implicados en la regulación de la expresión del gen *OLE1* (tales como el factor de transcripción codificado por el gen *MGA2/YIR033W*) también presentaban aumentos en sus niveles de expresión a bajas temperaturas (Schade *et al.*, 2004). Por otro lado, Nakagawa *et al.* (2002) apuntaron la importancia de la activación de Mga2p, mediante su procesamiento por el sistema de la ubiquitina/proteosoma 26S, en la inducción de la transcripción del gen *OLE1*, por lo que concluyeron que Mga2p es un sensor para bajas temperaturas en la levadura.

También se ha visto que, en general, existe una activación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de fosfolípidos, en concreto de los genes *INO1/YJL153C* y *OPI3/YJR073C*, lo que sugiere la estimulación de la biogénesis de la membrana (Murata *et al.*, 2006). Otros autores (Stolz *et al.*, 1998) han descrito un aumento en la tolerancia al frío del mutante *inp51*. El gen *INP51/YIL002C* codifica una enzima inositol polifosfato 5-fosfatasa, implicada en la homeostasis del inositol 4, 5-difosfato, y cuya pérdida de función provoca la acumulación de dicho metabolito. El mutante *inp51* presenta una mayor velocidad de incorporación de triptófano que la cepa parental. El mecanismo por el cual dicha mutación confiere mayor capacidad de crecimiento a bajas temperaturas se desconoce. Resulta poco probable que se deba directamente al aumento de fosfolípidos totales de la levadura, ya que el inositol 4,5-difosfato representa una fracción minoritaria (0,01%). Los autores postulan que el mecanismo por el que la eliminación de este gen confiere mejor crecimiento a bajas temperaturas presenta muchas analogías con el caso de *Arabidopsis* y su tolerancia al frío a través de cambios en la fluidez y/o permeabilidad de las membranas (Miquel *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 1992).

Por otro lado, la presencia de esteroides en la membrana plasmática también podría constituir un punto de control de la fluidez de la membrana a bajas temperaturas. En este sentido, un estudio sobre la expresión génica en levadura bajo condiciones tanto de “cold shock” (al someter a crecimiento a 10° C) como de estrés por congelación, mediante el análisis de las poblaciones de RNA mensajeros por la técnica conocida como “differential display” (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2002), demostró un aumento en los niveles de expresión de tres genes, entre los que se encuentra *ERG10/ YPL028W*. Este gen codifica una enzima acetoacetyl-Coa tiolasa, implicada en la biosíntesis de ergosterol (Hiser *et al.*, 1994). La sobreexpresión de *ERG10* no produjo ningún efecto sobre el crecimiento a bajas temperaturas, pero sí que confirió una mayor protección frente a la congelación.

Recientes estudios (Loertscher *et al.*, 2006) han puesto de manifiesto la importancia en la respuesta al frío de una correcta regulación de la biosíntesis de ergosterol, puesto que es una adaptación fisiológica esencial que permite a la célula sobrevivir a bajas temperaturas. En dicho estudio se demuestra que la mutación en cualquiera de estas tres enzimas: Ubc7p, Cue1p y Doa10p, pertenecientes al sistema de degradación asociado al retículo endoplasmático (ERAD, por sus siglas en inglés: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation), produce una reducción en la tasa de crecimiento a 10° C. Además, demostraron que a 16° C estos mutantes presentan una merma en la capacidad de crecimiento de células con elevada actividad de Hmg1p, enzima que cataliza la formación de mevalonato, que es el paso limitante en la síntesis de isoprenoides en animales y hongos (Edwards y Ericsson, 1999). Los autores postulan que la inhibición en el crecimiento de los mutantes $\Delta ubc7$, $\Delta cue1$ y $\Delta doa10$ a 16° C que expresan niveles anormales y elevados de Hmg1p se asemeja la sensibilidad al frío de estos mutantes a 10° C con niveles normales de Hmg1p. Basándose en estos resultados, presentan la hipótesis de que la sobreexpresión de la enzima Hmg1p imita las consecuencias fisiológicas de las bajas temperaturas. Todo ello, junto con la alteración en la composición de esteroides que presentan los mutantes, sugiere que el sistema ERAD es un regulador de la ruta biosintética de esteroles a bajas temperaturas.

3.3.2 Respuesta tardía

En esta fase operan tanto mecanismos específicos como los de la respuesta general a cualquier tipo de estrés medioambiental y es, presumiblemente, consecuencia de la

alteración en el estado fisiológico de la célula causada por la disminución en el transporte a través de la membrana, la reducida actividad enzimática y la acumulación de proteínas con conformaciones anómalas.

La mayoría de las proteínas implicadas en la respuesta tardía a las bajas temperaturas son proteasas y chaperonas moleculares que están involucradas en impedir la desnaturalización o inducir la renaturalización de proteínas, la degradación de proteínas mal plegadas y la disgregación de agregados proteínicos causados por desnaturalización. Se ha demostrado en diferentes organismos que la biosíntesis de las proteínas se ve afectada, no sólo por el estrés si no también por el frío (Jones e Inouye, 1994; Graumann *et al.*, 1996; Panoff *et al.*, 1998). En este sentido, estudios a nivel molecular demuestran que, tras la incubación a 10° C, existe un aumento en la transcripción de determinados genes de respuesta al estrés por calor (HSP, por sus siglas en inglés de Heat Shock Protein) tales como *HSP12/YFL014W*, *HSP26/YBR072W*, *HSP42/YDR171W* y *HSP104/YLL026W* (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004), indicando que la transcripción de estas cuatro proteínas está regulada de forma diferente a otras proteínas HSP. Además, los citados genes también se encuentran inducidos a 4° C (Homma *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2006). En particular los genes *HSP42* y *HSP104* también se encuentran altamente inducidos a temperaturas entorno a 0° C (Kandror *et al.*, 2004).

En células procariotas se ha visto que la transcripción de genes que codifican enzimas peptidil-prolil *cis/trans*-isomerasas está inducida a bajas temperaturas y se piensa que juegan un papel fundamental en el plegamiento de las proteínas a bajas temperaturas (Graumann *et al.*, 1996). Curiosamente, se ha visto que Hsp12p se asocia con Cpr1p, una peptidil-prolil *cis/trans*-isomerasa de levadura (Ho *et al.*, 2002). Además, la secuencia de aminoácidos de Hsp12p presenta cierta similitud con la de otra peptidil-prolil *cis/trans*-isomerasa, Fpr3p, de levadura. La función que desempeña Hsp12p no se conoce, aunque se localiza en la membrana plasmática y la protege frente a la desecación y el estrés inducido por etanol (Sales *et al.*, 2000), además de aumentar la barotolerancia en las células de levadura (Motshwene *et al.*, 2004).

Los genes *HSP26* y *HSP42* codifican sendas proteínas citosólicas que pertenecen a la familia de pequeñas HSP que actúan como chaperonas moleculares (Bentley *et al.*,

1992). Éstas se unen a proteínas que no han sido plegadas todavía, previniendo la formación irreversible de grandes agregados proteínicos. La expresión de ambos genes, *HSP26* y *HSP42*, se halla inducida tras 24 horas de exposición a 10° C (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004), 4° C (Homma *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2006), 0° C (Kandror *et al.*, 2004) e incluso a -80° C (Odani *et al.*, 2003).

Hsp104p es una chaperona que actúa, junto con otras proteínas, frente a cualquier tipo de estrés, desensamblando agregados proteínicos acumulados por dicha condición (Parsell *et al.*, 1994). El nivel de expresión de esta proteína en condiciones normales es muy bajo, pero se induce en situaciones de estrés (Sanchez *et al.*, 1990)

La disminución de la temperatura provoca cambios en el estado físico de la membrana plasmática que alteran significativamente la actividad de las enzimas asociadas a la misma y de los transportadores anclados en ella, produciendo un descenso en la adquisición de nutrientes. De hecho, en el caso de estrés por aumento de la temperatura, se ha descrito una severa disminución en la entrada de aminoácidos (Schmidt *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001) como consecuencia de la degradación vacuolar de permeasas de alta afinidad para aminoácidos, tales como Tat2p o Fur4p (Skrzypek *et al.*, 1998; Bultynck *et al.*, 2006), hecho que también se produce como consecuencia de una bajada en la temperatura ambiental (Abe y Horikoshi, 2000). Además, se ha visto que tras la exposición al frío se induce la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la degradación de proteínas (enzimas del sistema ubiquitina, componentes del proteosoma y otras proteasas), confirmando la necesidad de un eficiente sistema de degradación de proteínas desnaturalizadas o mal plegadas (Schade *et al.*, 2004).

En este sentido, se ha descrito que en condiciones de elevada presión hidrostática o baja temperatura, la delección de cualquiera de los genes *DOA4/YDR069C (UBP4)*, *UBP6/YFR010W* o *UBP14/YBR058C* (que codifican para proteasas específicas del sistema de degradación dependiente de la ubiquitina) aumenta la capacidad de crecimiento en cepas auxótrofas para triptófano, debido a que se estabiliza la permeasa de alta afinidad para triptófano Tat2p (Miura y Abe, 2004).

Las bajas temperaturas también activan el metabolismo de los carbohidratos de reserva. Se ha apuntado la posibilidad de que, en el caso del glucógeno, sea una respuesta a

diferentes tipos de estreses tales como, estrés térmico o estrés oxidativo, ya que se hallan inducidos simultáneamente genes relacionados con su síntesis (*GLG1/YKR058W*, que codifica un factor iniciador de la síntesis de glucógeno; *GLC3/YEL011W*, que codifica una enzima 1,4-glucano-6-(1,4-glucano) transferasa; *GAC1/YOR178C*, codifica una subunidad de una fosfoproteína fosfatasa que regula a la enzima glucógeno sintetasa) y con su degradación (*GPH1/YPR160W*, codifica una glucógeno fosforilasa) sin que exista acumulación neta de este polisacárido (Parrou *et al.*, 1997). Tras la exposición a bajas temperaturas, dichas enzimas presentan un perfil transcripcional similar al de los estreses mencionados anteriormente (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006). Sin embargo, en el caso de la exposición a bajas temperaturas se produce una acumulación significativa de glucógeno tras exponer a 10° C durante 12 horas, y de forma más marcada durante 60 horas (Schade *et al.*, 2004).

Como en el caso del glucógeno, la trehalosa comienza a acumularse después de 12 horas de incubación a 10, 4 ó 0° C, independientemente de que exista crecimiento o no (Kandror *et al.*, 2004, Schade *et al.*, 2004). En coherencia con lo anterior, los genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de este disacárido (*Tps1p*, trehalosa-6-fosfato sintetasa y *Tps2p*, trehalosa-6-fosfato fosfatasa) están inducidos tras 4-8 horas de incubación a 10° C. La misma activación ocurre a temperaturas más bajas presentando máximos niveles de inducción a 0° C (Sahara *et al.*, 2002; Kandror *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006). Por el contrario, la expresión de los genes que codifican enzimas implicadas en su degradación (*Nth1p*, enzima localizada en el citosol que cataliza la hidrólisis de la trehalosa) se halla reprimida a bajas temperaturas (Sahara *et al.*, 2002). La trehalosa se acumula en cantidades elevadas en respuesta a diferentes condiciones estresantes (Blomberg, 2000; Estruch, 2000) y se ha propuesto que su actividad protectora de la célula se debe a la estabilización de la membrana plasmática y de las proteínas (Singer y Lindquist, 1998; Elbein *et al.*, 2003; Gancedo y Flores, 2004). Se ha relacionado la acumulación de trehalosa con una mayor resistencia a la congelación e incluso, mediante mutación de los genes que codifican las enzimas responsables de su hidrólisis, se han conseguido cepas industriales panaderas con una mayor tolerancia a la congelación (Kim *et al.*, 1996; Shima *et al.*, 1999). Aunque la trehalosa no es necesaria para el crecimiento a 10° C (Schade *et al.*, 2004), los resultados obtenidos por Kandror *et al.* (2004) ponen de manifiesto que este

compuesto protege a la célula frente a bajas temperaturas. En el caso del glicerol, se ha observado un comportamiento semejante. *GPD1*, gen que codifica la principal enzima implicada en la síntesis de glicerol (Albertyn *et al.*, 1994), está activado tras un cambio a bajas temperaturas lo que lleva a la acumulación de este osmolito, que se produce en mayor medida a 4° C que a 12° C (Panadero *et al.*, 2006). El papel que ejerce el glicerol frente a la congelación se ha explicado en términos de prevención de la deshidratación osmótica resultante de los procesos de congelación/descongelación (Wolfe y Bryant, 1999; Panadero *et al.*, 2006).

Por otro lado, la tolerancia a la congelación se ha relacionado con la acumulación intracelular de determinados aminoácidos. Una mutación dominante en el gen *PRO1/YDR300C*, que codifica la enzima gamma-glutamil quinasa que cataliza el primer paso en la biosíntesis de L-prolina a partir de L-glutamato, provocó una acumulación intracelular de prolina lo que generó un aumento de la resistencia a la congelación (Morita *et al.*, 2003). Otra mutación que causa el mismo efecto es la del gen *CARI/YPL111W*, que codifica la enzima arginasa, y que tuvo como consecuencia el aumento de la concentración intracelular de arginina y/o glutamato (Shima *et al.*, 2003).

Hasta ahora hemos considerado que la disminución en la síntesis de proteínas y los defectos en el funcionamiento de la membrana debidos a su reducida fluidez, son los principales problemas que surgen tras la exposición a bajas temperaturas. Sin embargo, el estrés oxidativo es otra seria contrariedad a la que debe enfrentarse la levadura para sobrevivir en condiciones de frío. En este proceso adaptativo a las bajas temperaturas, se activan los mecanismos detoxificadores de especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species), producidas durante el metabolismo en *Saccharomyces cerevisiae*. Son moléculas altamente reactivas que pueden provocar la oxidación de proteínas (Storz *et al.*, 1987), peroxidación lipídica (Coyle y Puttfarcken, 1993) o daño en el DNA, generando roturas en la doble cadena y pérdida de las bases nitrogenadas (Storz *et al.*, 1987), lo que puede ocasionar daños de gravedad considerable e incluso producir la muerte celular. Así, se ha descrito un aumento en el nivel de expresión a 10° C de genes que codifican proteínas implicadas en procesos de detoxicación tales como Gtt2p, glutatión transferasa, Hyr1p y Gpx1p, isoformas de glutatión peroxidasa, Ttr1p, glutarredoxina y Prx1p, tiorredoxina peroxidasa (Schade *et*

al., 2004). El sistema glutatión/glutarredoxina se halla implicado en el plegamiento de proteínas, metabolismo del azufre y reparación de proteínas oxidadas (Grant, 2001). Diversos estudios en levaduras y plantas han descrito un aumento en la concentración de H₂O₂ y la inducción de genes que codifican tres enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, tales como Ctt1p, catalasa, Sod1p, superóxido dismutasa citosólica, y Gsh1p, γ -glutamylcisteina sintetasa, tras disminuir la temperatura de 30° C a 10° C. Además también se evidenció, en el caso de la catalasa y la superóxido dismutasa, un aumento de su actividad tras un periodo de incubación a 10° C durante dos horas (Zhang *et al.*, 2003). En este mismo estudio quedó demostrada una pérdida de viabilidad celular de cualquiera los mutantes $\Delta sod1$, $\Delta ctt1$ o $\Delta gsh1$ tras ser incubados a 10° C durante 7 días. Estudios más recientes (Murata *et al.*, 2006) llevados a cabo a temperaturas más extremas (4° C), indican que el número de genes que codifican enzimas implicadas en procesos detoxificadores de especies ROS que se hallan inducidos a esta temperatura es más amplio. Además de los genes citados anteriormente, también aumentan su nivel de expresión a 4° C *GTT2/YLL060C*, que codifica una enzima glutatión S-transferasa y que ejerce, junto con *GTT1/YIR038C*, un papel importante en la resistencia a diversas drogas y cuyas eliminaciones, para cada uno de los mutantes y también en el caso del doble mutante, provocan un aumento de la sensibilidad al calor (Choi *et al.*, 1998). Otros genes inducidos a 4° C son *TSA2/YDR453C* y *AHP1/YLR109W* que codifican enzimas tiorredoxina peroxidasas, *TRX3/YCR083W* que da lugar a una tiorredoxina mitocondrial y *MXR1/YER042W* que codifica una enzima sulfóxido reductasa que revierte la oxidación de los residuos de metionina.

Objetivo	Proteína: Función	Variación del nivel de expresión por estrés
Mantenimiento pared celular (no confirmado)	Tip1p: manoproteína pared celular	Aumento tras exposición a bajas y altas temperaturas (Kondo e Inouye, 1991)
	Tir1p, Tir2p y Tir4p: manoproteínas pared celular	Aumento a 10, 4 ó 0 ° C (Sahara <i>et al.</i> , 2002; Kandrór <i>et al.</i> , 2004) Aumento por altas presiones e hipoxia (Abe y Minegishi, 2008)
Desconocido	Pau1p, Pau2p, Pau4p, Pau5p, Pau6p, Pau7p : función desconocida	Aumento a 4° C Homma <i>et al.</i> , 2003; Murata <i>et al.</i> , 2006) Aumento en anaerobiosis (Rachidi <i>et al.</i> , 2000)
Aumento eficiencia complejo ribosomal	<u>Nsr1p</u> : implicada en el procesamiento del precursor del RNA ribosomal y en la biogénesis del ribosoma	Aumento 10° C (Kondo <i>et al.</i> , 1992; Sahara <i>et al.</i> , 2002)
	<u>Hrp1p</u> , <u>Nrd1p</u> , <u>Stp4p</u> , <u>Nog2p</u> , <u>Hul5p</u> : procesamiento ribosomal	Aumento tras exposición a bajas temperaturas (Sahara <i>et al.</i> , 2002; Schade <i>et al.</i> , 2004)
	<u>Ded1p</u> , <u>Dbp2p</u> : RNA helicasas	
	<u>Rpl2bp</u> : proteína ribosomal Nop1p: forma parte complejo ribonucleoproteico nucleolar	Aumento a 10° C (Zhang <i>et al.</i> , 2001)
Control de la fluidez de la membrana plasmática	<u>Ole1p</u> : $\Delta 9$ -desaturasa de ácidos grasos	Aumento a 10° C (Nakagawa <i>et al.</i> , 2002)
	<u>Mga2p</u> : factor de transcripción implicado en la regulación de <i>OLE1</i>	Aumento a 4° C (Schade <i>et al.</i> , 2004)
	<u>Ino1p</u> y <u>Opi3p</u> : enzimas biosintéticas de fosfolípidos	Aumento tras exposición a bajas temperaturas (Murata <i>et al.</i> , 2006)
	<u>Erg10p</u> : enzima acetoacetyl-Coa tiolasa, implicada en la biosíntesis de ergosterol	Aumento a 10° C (Rodríguez-Vargas <i>et al.</i> , 2002)

Tabla 2. Resumen de los principales mecanismos de adaptación de *S.cerevisiae* a las bajas temperaturas. La pérdida de función de las proteínas que aparecen subrayadas conlleva sensibilidad a las bajas temperaturas.

Objetivo	Proteína: Función	Variación del nivel de expresión por estrés
Disminución acumulación proteínas con conformaciones anómalas	Hsp12p: proteína de membrana plasmática de función desconocida	Aumento a 10 y 4° C (Sahara <i>et al.</i> , 2002; Schade <i>et al.</i> , 2004)
	Hsp26p y Hsp42p: chaperonas moleculares citosólicas que se unen a proteínas que no han sido plegadas todavía, previniendo la formación irreversible de grandes agregados proteínicos	Aumento 10° C (Sahara <i>et al.</i> , 2002; Schade <i>et al.</i> , 2004) 4° C (Homma <i>et al.</i> , 2003; Murata <i>et al.</i> , 2006), 0° C (Kandror <i>et al.</i> , 2004) y a -80° C (Odani <i>et al.</i> , 2003)
	Hsp104p: chaperona que actúa, junto con otras proteínas desensamblando agregados proteínicos acumulados	Aumento bajo condiciones de estrés (Sanchez <i>et al.</i> , 1990)
Activación de metabolismo de carbohidratos de reserva	Glg1p, Glc3p, Gac1p: enzimas implicadas en la biosíntesis de glucógeno	Inducción tras exposición prolongada a 10° C (Schade <i>et al.</i> , 2004)
	Tps1p, Tps2p: enzimas implicadas en biosíntesis de trehalosa	Aumento tras 4-8 horas de incubación a 10° C presentando máximos niveles de inducción a 0° C (Sahara <i>et al.</i> , 2002; Kandror <i>et al.</i> , 2004; Schade <i>et al.</i> , 2004; Murata <i>et al.</i> , 2006)
	Nth1p: enzima que hidroliza la trehalosa	Disminución a bajas temperaturas (Sahara <i>et al.</i> , 2002)
	Gpd1p: principal enzima implicada en la síntesis de glicerol	Aumento en mayor medida a 4° C que a 12° C (Panadero <i>et al.</i> , 2006)
Activación de los mecanismos detoxificadores de especies reactivas del oxígeno	Gtt2p: glutatión transferasa Hyr1p y Gpx1p: isoformas de glutatión peroxidasa Ttr1p: glutarredoxina Prx1p: tiorredoxina peroxidasa	Aumento a 10° C (Schade <i>et al.</i> , 2004)
	Ctt1p: catalasa Sod1p: superóxido dismutasa citosólica Gsh1p: γ -glutamylcisteina sintetasa	Aumento a 10° C (Zhang <i>et al.</i> , 2003)
	Gtt2p y Gtt1p: glutatión transferasas Tsa2p y Ahp1p: tiorredoxina peroxidadas Trx3p: tiorredoxina mitocondrial Mxr1p :sulfóxido reductasa	Aumento a 4° C (Murata <i>et al.</i> , 2006)

Tabla 2. (Continuación)

3.4 Mecanismos sensores de bajas temperaturas

Para que se desencadene la activación transcripcional en las células de levadura, éstas deben primero detectar el descenso de la temperatura. Diferentes estudios indican que son los cambios en el estado físico de la membrana los que actúan como primera señal de la variación de la temperatura. Este concepto fue demostrado al probar que la perturbación de los lípidos de membrana provoca una señal que acaba desencadenando un aumento de los niveles de transcripción de las proteínas HSP de levadura (Vigh *et al.*, 1998; Carratù *et al.*, 1996). Diversos estudios, llevados a cabo en la cianobacteria *Synechocystis*, han confirmado que un descenso en la temperatura provoca una reducción en la fluidez de la membrana, lo que juega un papel fundamental en la percepción de las bajas temperaturas y, consecuentemente, en la transducción de la señal (Inaba *et al.*, 2003; Los y Murata, 2004).

Tales resultados han llevado a la tentativa de identificación de los sensores de bajas temperaturas en diferentes organismos. De hecho, en *Synechocystis* la expresión de las enzimas desaturasas, tras el descenso de la temperatura, es controlada por la histidina quinasa Hik33 (Suzuki *et al.*, 2000, 2001), una proteína integral de membrana que actúa como sensor del frío. De forma similar, la histidina quinasa Desk en *B. subtilis* (Aguilar *et al.*, 2001) y los canales TRP (por sus siglas en inglés, Transient Receptor Potential) en el sistema nervioso de mamíferos (McKemy *et al.*, 2002), son proteínas integrales de membrana que actúan como sensores del frío. Análogamente a Hik33, se ha identificado a Sln1p, el único sensor histidina quinasa en levadura, como sensor de frío en levadura. Esta proteína pertenece al sistema que transmite la señal de estrés osmótico a través de diferentes elementos de la vía HOG (High Osmolarity Glycerol) (Panadero *et al.*, 2006).

Entre las vías que intervienen en la transmisión de la señal de frío en *S. cerevisiae*, también se encuentran los factores de transcripción *MOX*, que regulan la expresión de los genes *DAN/TIR* (Abramova *et al.* 2001). Otro sistema de regulación lo presenta el gen *OLE1* cuya expresión, como ya se ha mencionado anteriormente, está regulada por el factor de transcripción Mga2p, que se activa mediante su procesamiento por el sistema ubiquitina/proteosoma 26S, y que podría actuar como sensor de las bajas temperaturas y de situación de hipoxia debido a la alteración del estado físico de la membrana (Nakagawa *et al.*, 2003). Esta hipótesis está basada en la existencia de una

ruta de procesamiento en *S. cerevisiae* dependiente de ubiquitina/proteosoma 26S denominada RUP (por sus siglas en inglés, Regulated Ubiquitin/Proteasome) y que regula la activación de los factores de transcripción Mga2p y Spt23p que se produce por la carencia de ácidos grasos insaturados (Hoppe *et al.*, 2000). Dichos factores se sintetizan inicialmente como precursores inactivos, anclados al retículo endoplasmático o a la envoltura nuclear por sus extremos C-terminales. La escasez de ácidos grasos insaturados provoca la ubiquitinación de Mga2p y Spt23p, dando lugar a la liberación del dominio N-terminal del correspondiente factor de transcripción al citosol mediante el proteosoma 26S (Auld *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta este contexto, un cambio en el estado físico de la membrana debido a un descenso en la temperatura o a condiciones de hipoxia, podría activar a Mga2p mediante el procesamiento RUP.

Por otro lado, la ruta cAMP-PKA y Hog1p juegan un papel fundamental en el control, negativo y positivo, respectivamente, de la respuesta genética de *S. cerevisiae* frente a una variedad de estreses (Thevelein y Winde, 1999; Estruch, 2000) mediante la fosforilación de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p (Griffioen y Thevelein, 2002). Bajo condiciones estresantes, los factores de transcripción Msn2/4p (fosforilados en los sitios Hog1 y desfosforilados en los sitios PKA) migran hacia el núcleo y promueven la transcripción de un número importante de genes de respuesta al estrés que contienen la secuencia de reconocimiento STRE (por sus siglas en inglés, Stress Responsive Element) en su promotor (Martínez-Pastor *et al.*, 1990). Entre los genes regulados por esta vía, encontramos algunos que forman parte de la respuesta temprana a las bajas temperaturas (*DBP2*, *NSR1*, *OPI3*, *RPA49*, genes *PAU*) y que se mantienen inducidos mientras dura el frío (Wang *et al.*, 2004). Otros de los genes que están regulados de forma estrictamente dependiente de Msn2/4p forman parte de la respuesta tardía al frío. Entre ellos se encuentran genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno y la trehalosa, chaperonas como Hsp12p, Hsp26p y Hsp42p y varios miembros del sistema de defensa frente a especies del oxígeno reactivas, como Ctt1p, Prx1p y Ttr1p (Kandror *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2004). Por otro lado, tradicionalmente se aceptaba que el papel desempeñado por la vía HOG estaba centrado en la regulación genética de la respuesta celular al estrés hiperosmótico, pero recientes hallazgos han puesto de manifiesto su participación en la adaptación al estrés por ácido cítrico (Lawrence *et al.*, 2004), estrés por calor (Winkler *et al.*, 2002), resistencia a metilglioxal (Aguilera *et al.*, 2005) y mantenimiento de la pared celular (García-

Rodríguez *et al.*, 2000). Como ya hemos mencionado anteriormente, la histidina quinasa Sln1p dispara la señalización a través de la vía HOG en respuesta a una disminución de la temperatura. La transducción de la señal de frío a través de la ruta HOG provoca la activación de los genes *GPD1*, *GLO1*, *GRE1* y *HSP12* todos ellos implicados en la adaptación de *S. cerevisiae* al estrés (Panadero *et al.*, 2006).

Otra vía que también está relacionada con la activación de la respuesta génica tras el descenso de la temperatura es la vía TOR (por sus siglas en inglés, Target Of Rapamycin), que está involucrada en la respuesta al ayuno de nitrógeno (Cardenas *et al.*, 1999). Se ha visto que cambios en la fluidez de la membrana plasmática debido al descenso de la temperatura pueden alterar de forma significativa la actividad de las enzimas asociadas a la misma, tales como los transportadores y, como consecuencia, existe una disminución en la entrada de nutrientes en la célula, lo que provoca una activación de esta vía. Por ejemplo, se ha descrito que bajo condiciones de estrés por altas temperaturas se produce un descenso severo en la entrada de aminoácidos (Schmidt *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001). Este descenso es el resultado de la degradación vacuolar de permeasas de aminoácidos de alta afinidad tales como Tat2p y Fur4p (Skrzypek *et al.*, 1998; Bultynck *et al.*, 2006), un fenómeno que también ocurre tras un descenso en la temperatura ambiental (Abe y Horikoshi, 2000).

En conjunto, todas estas observaciones ponen de manifiesto que cambios en el estado físico de la membrana, causados por un descenso en la temperatura, son detectados por proteínas sensoras del frío que se hallan ancladas a la membrana y que generan una señal de activación de la respuesta celular a dicha temperatura. Hasta el momento, no ha sido identificada ninguna ruta de transducción que responda exclusivamente a las bajas temperaturas. No se puede descartar la existencia de tal ruta, pero los datos publicados apuntan a rutas de señalización conocidas que también trabajan bajo otros tipos de estímulos.

4 Perspectivas biotecnológicas para las aplicaciones industriales a bajas temperaturas

Como hemos visto en los apartados anteriores, en la última década se han desarrollado iniciativas importantes encaminadas a conocer en detalle los mecanismos que modulan la expresión génica en respuesta a las bajas temperaturas en diferentes modelos biológicos. Pero a pesar de estos estudios, nuestro entendimiento de las rutas y los procesos que controlan la respuesta al frío es rudimentario, en el mejor de los casos.

Sin embargo, este desconocimiento no ha impedido desarrollos biotecnológicos en los que la incubación a bajas temperaturas es la protagonista. De hecho, ya se han introducido en el mercado dos sistemas de expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* mediante la incubación en frío (Qing *et al.*, 2004). De esta manera se consiguen elevados rendimientos en la producción de proteínas y se impide el plegamiento incorrecto de las mismas, lo que genera problemas de insolubilidad. En este mismo sentido, la publicación de estudios que muestran que el cultivo de células de mamíferos a bajas temperaturas aumenta la producción de proteínas heterólogas, ha provocado un interés creciente por entender los mecanismos en juego a estas temperaturas para así poder identificar nuevas dianas celulares que, mediante el uso de la ingeniería genética, pudieran ser mejoradas para la producción de proteínas recombinantes complejas (Al-Fageeh *et al.*, 2006). Es por ello que la respuesta celular a las bajas temperaturas está siendo objeto de estudio como nunca anteriormente para: (i) mejorar nuestro entendimiento de la respuesta molecular que gobierna la adaptación celular a las bajas temperaturas en una gran variedad de organismos; (ii) elucidar los efectos y los mecanismos que determinan la producción de proteínas heterólogas en diferentes sistemas de expresión a temperaturas inferiores a la fisiológica, y (iii) identificar nuevas dianas celulares para que puedan, de forma razonada, ser sometidas a nuevas tecnologías de ingeniería genética para la expresión génica. Estos enfoques ayudan al desarrollo de un conocimiento detallado de los efectos de las bajas temperaturas en diversos organismos, y esto indudablemente proporcionará información útil en el desarrollo de nuevas estrategias de ingeniería celular, mejoras adicionales en el rendimiento de los cultivos celulares a bajas temperaturas, así como numerosas aplicaciones industriales de procesos biotecnológicos donde se realicen incubaciones a temperaturas inferiores a las óptimas.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo surge sobre la premisa que el desarrollo y aplicación de la biotecnología en el campo agroalimentario va a contribuir decisivamente en la implantación y mejora de la calidad de las nuevas generaciones de los alimentos que consumiremos. Este enfoque no sólo es coherente con las líneas prioritarias marcadas por los organismos nacionales y europeos que definen las políticas de investigación (descritas en el informe intermedio relativo a la estrategia en el ámbito de las ciencias de la vida y la biotecnología que ha redactado la Comisión de las Comunidades Europeas y las conclusiones del “Estudio Bio4EU” -The Biotechnology for Europe Study- en <http://ec.europa.eu/biotechnology>), sino que refleja las cada vez mayores implicaciones sociales y económicas que la aplicación de la biotecnología y la bioingeniería tienen y tendrán en un ámbito de tanta trascendencia como es el campo de la alimentación humana.

Las cuestiones que se abordan en esta Tesis giran en torno a dos temas de actualidad y relevancia. Primero, el estudio de la respuesta biológica al estrés (centrado en este caso en un microorganismo de gran interés e importancia en alimentación, las levaduras del género *Saccharomyces*). Segundo, la aplicación biotecnológica de los conocimientos que se obtengan en dicho estudio en procesos industriales agroalimentarios. Así pues, nuestra propuesta se encuadra en el marco de la biotecnología agroalimentaria, y asume que ésta será un objetivo prioritario de la investigación en este comienzo del siglo veintiuno.

En la revisión que se acaba de realizar en el apartado anterior, sobre los resultados publicados hasta la fecha por otros autores acerca de los mecanismos y la regulación de los procesos de adaptación a las bajas temperaturas en *Saccharomyces cerevisiae*, ha quedado patente el limitado y disperso conocimiento que se tiene actualmente sobre este tema. Más aún, resulta cuanto menos chocante, por lo inesperado después de los numerosos trabajos aparecidos en este campo, que todavía no se haya emprendido un estudio para identificar los pasos limitantes, o lo que más coloquialmente podríamos denominar “los cuellos de botella”, que puedan existir en la fisiología de *Saccharomyces cerevisiae* en relación con su capacidad de crecimiento a temperaturas claramente por debajo del valor óptimo, situación que, sin embargo, representa las

condiciones habituales de su utilización industrial y biotecnológica, que es donde más relevancia y aplicaciones puede tener la mejora de dicho fenotipo.

Por tanto, el objetivo primordial que nos proponemos alcanzar con esta tesis es el del aislamiento, identificación y caracterización de aquellos genes de las levaduras del género *Saccharomyces* que, por sobreexpresión, mediante su clonaje en plásmidos multicopia, confieran en dicha levadura una mayor tolerancia al frío. Esta aproximación experimental es totalmente novedosa y, tal y como se ha detallado en la revisión que sobre el tema se ha realizado en la Introducción, no ha sido abordada hasta este momento.

La hipótesis de partida sobre la que se apoya esta propuesta estriba en la presunción de que existen genes de levadura que, por un aumento de su nivel de expresión, pueden conferir una mayor resistencia al estrés causado por el “cold shock”. Esta hipótesis se ve avalada, por una parte por el éxito que dicho planteamiento ya ha tenido en la búsqueda de genes de plantas que por sobreexpresión en levadura confieran resistencia a determinadas condiciones de estrés, como la excesiva salinidad (Forment et al., 2002) o incluso el frío (Lee et al., 1999). Además, la misma estrategia y modelo experimental que se propone en este trabajo, ya se ha probado con excelentes resultados cuando se ha utilizado para identificar genes procedentes de *Beta vulgaris* que, por sobreexpresión en *S. cerevisiae*, permiten que dicha levadura pueda crecer a bajas temperaturas (Mulet et al., 2002). Por otro lado, también apoyan esta hipótesis los numerosos trabajos publicados y mencionados en la Introducción, que describen la inducción de diversos genes de levadura por una brusca bajada de la temperatura, e incluso cómo la sobreexpresión de algunos de ellos, bien exhibe el fenotipo perseguido (Abe y Horikoshi, 2000), o bien complementa, en una levadura industrial, una mutación que impedía el crecimiento a bajas temperaturas (Tokai et al., 2000).

La mejora de la capacidad fermentativa de las levaduras industriales tiene muchos aspectos, entre los que se encuentra la tolerancia al frío como una más de las situaciones de estrés a superar. Sin embargo, si fuésemos capaces de mejorar el crecimiento de la levadura a las bajas temperaturas empleadas en las industrias biotecnológicas del sector agroalimentario, podríamos mejorar muchos de los aspectos tecnológicos que se ven afectados por la necesidad de fermentar a bajas temperaturas. Obviamente, no resulta posible realizar una predicción realista de cómo se verán afectados los procesos

metabólicos y la fisiología de las levaduras si mejoramos su capacidad de crecimiento a bajas temperaturas por sobreexpresión de uno o varios genes que todavía desconocemos, sobre todo si consideramos la compleja red de rutas de transducción de señales que controlan los procesos adaptativos de respuesta a los cambios en las condiciones ambientales. El estudio de todos esos aspectos será, muy probablemente, una de las puertas que se abrirán para futuras actuaciones basadas en los resultados que se obtengan en esta Tesis. No obstante, la relevancia del tema propuesto y sus claras implicaciones tecnológicas, junto con la actual escasez de conocimientos sobre el mismo y la novedad en la aproximación metodológica planteada, creemos que constituyen suficiente justificación de la necesidad y prioridad que existe en abordarlo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Reactivos y material biológico

1.1 Reactivos

Los reactivos y kits específicos de biología molecular se hayan descritos junto con cada una de las técnicas o protocolos en los que se utilizan, mientras que los reactivos químicos generales se detallan en el anexo 1.

1.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas se encuentran descritas en la tabla que se presenta a continuación.

Cepa	Descripción/Genotipo	Referencia
W303	Levadura de laboratorio <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>MATa/MATα</i> { <i>leu2-3,112/leu2-3,112</i> , <i>trp1-1/trp1-1</i> , <i>can1-100/can1-100</i> , <i>ura3-1/ura3-1</i> , <i>ade2-1/ade2-1</i> <i>his3-11,15/his3-11,15</i> } [<i>PHI</i> ⁺] <i>GAL SUC2 mal0</i>	Thomas y Rothstein, 1989.
RS-452	Levadura de laboratorio <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>MATa/MATα</i> { <i>ade1-100/ade1-100</i> , <i>ura3-52/ura3-52</i> , <i>leu2-3,112/leu2-3,112</i> , <i>his4-519/his4-519</i> } <i>GAL</i>	Guarente y Mason, 1983.
CECT 1990	Levadura industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Meyen: E.C. Hansen, empleada para la fabricación de cerveza tipo lager.	DSM 1848
CECT 1462	Levadura industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Meyen: E.C. Hansen, empleada para la fabricación de cerveza tipo ale.	NCYC 963
W 34/70	Levadura industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Meyen: E.C. Hansen, empleada para la fabricación de cerveza tipo lager.	http://www.hefebank-weihenstephan.de

Tabla 3. Cepas de levadura utilizadas en este trabajo.

1.3 Cepas de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1*) (Hanahan, 1983) como huésped para realizar los diferentes clonajes que se presentan en esta Tesis.

2 Medios, condiciones de cultivo y de conservación de los microorganismos

Se prepararon 500 ml de medio de cultivo (suficiente para la preparación de 20-25 placas Petri) en un matraz Erlenmeyer de 1 litro donde se sometieron a un ciclo de esterilización usando un autoclave “Presoclave II” (J.P. Selecta, España) Las condiciones del ciclo de autoclave normalmente utilizadas (salvo aquellos casos en los que se indican otros parámetros) fueron: 20 minutos a 121° C y 1.05 Kg/cm². El agua utilizada para preparar los medios de cultivo es de calidad reactivo y libre de pirógenos y se obtuvo de un sistema de purificación “Elix 5” de la casa Millipore (USA). Para la preparación de medio líquido no se añadió agar a la mezcla de componentes.

A continuación, se presenta un listado de los diferentes medios de cultivo utilizados, así como las cantidades necesarias en gramos para preparar un litro de cada uno de dichos medios y, entre paréntesis, la concentración (en porcentaje peso/volumen) de cada componente en la mezcla final (Burke et al., 2000).

2.1 Medios de cultivo de levaduras

Los cultivos de *S. cerevisiae* se incubaron a 30° C. Los medios líquidos se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. en un agitador orbital “C25 Incubator Shaker” (New Brunswick Scientific, USA).

- Medio Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD): Este es un medio de uso rutinario que aporta todos los nutrientes necesarios para que la levadura crezca. Su composición es la siguiente:

Extracto de levadura	10 g	(1%, p/v)
Peptona	20 g	(2%, p/v)
Glucosa	20 g	(2%, p/v)

Agar bacteriológico	20 g	(2%, p/v)
H ₂ O bidestilada	c.s.p.	1 l

En algunos casos, tras autoclavarlo se añadió adenina (0,002%, p/v) y se denominó YPDA.

- Medio rico con triptófano (YPDT): Se trata del medio YPD ya descrito en el apartado anterior pero ajustando a un volumen final de 750 ml a los que, una vez esterilizados, se añadieron 250 ml de una solución de triptófano de 8 mg/ml preesterilizada mediante un sistema de filtración modelo “MF75” (0,45 µm de tamaño de poro) de la marca Nalgene® Labware (Thermo Fisher Scientific, USA). La cantidad final de triptófano añadido al medio fue de 0,2% (p/v).
- Medio rico con fosfato 10 mM: Se prepara del mismo modo que el YPD sólo que ajustando a un volumen final de 900 ml para, tras un ciclo de autoclave, adicionar 100 ml de una solución de tampón fosfato sódico a pH 5,8 y de concentración 100 mM, previamente esterilizado, con lo que la cantidad final añadida al medio es de 10 mM.
- Medio rico con triptófano 0,2% (p/v) y fosfato 10 mM: Se trata de medio YPD al que se le adicionó triptófano como en el medio YPDT y fosfato como en el medio anterior.
- Medio Mínimo (SD): Este medio utiliza el “Yeast Nitrogen Base (YNB) sin aminoácidos” como fuente de nitrógeno, fósforo, potasio, sulfato, magnesio, calcio, vitaminas y oligoelementos. El componente YNB sin aminoácidos puede esterilizarse en el autoclave, pero se preservan mejor las vitaminas si se esteriliza por filtración una solución acuosa 10 veces más concentrada (al 7%, p/v) de la que finalmente presenta en el medio SD. Dicha solución concentrada se almacena a 4° C. Además, al medio se le añadió glucosa para obtener una concentración final de la misma del 2%. El medio SD tiene muy poca capacidad tamponante y, aunque el pH inicial se encuentra alrededor de 5,5, el pH del medio va cayendo a lo largo del crecimiento. Por tanto, para obtener un crecimiento óptimo es aconsejable tamponarlo mediante la adición de un tampón ácido succínico-Tris 0,5 M pH 5,5 (59 g de ácido succínico en 1L de agua y se ajusta el pH a 5,5 con Tris), que se añade hasta una concentración final de 50 mM. A este medio mínimo se le añadieron los requerimientos auxotróficos propios de la cepa de levadura que se vaya a crecer en él, excepto el nutriente correspondiente a la auxotrofia que queda completada por la

presencia de un determinado plásmido. Así, en el caso de la selección de transformantes de la cepa W303 tras la introducción del plásmido YEp24, el medio mínimo se suplementa con adenina y los aminoácidos histidina, leucina y triptófano, y pasa a denominarse SD-Ura. La adenina y los aminoácidos leucina e histidina fueron esterilizados mediante un ciclo de autoclave, mientras que el triptófano fue preesterilizado por filtración, tal y como se ha descrito en la preparación del medio YPDT. En primer lugar se autoclavó el agua junto con el agar, en la siguiente proporción:

Agar bacteriológico	20 g	(2%, p/v)
H ₂ O bidestilada	674 ml	

Una vez esterilizado se añaden las siguientes soluciones preesterilizadas:

Glucosa	100 ml	(2%, p/v)
YNB 7% sin aminoácidos y con sulfato amónico	100 ml	(0,7%, p/v)
Tampón Ácido Succínico- Tris 0,5 M pH 5,5	100 ml	(10%, v/v)
Adenina sulfato	6,7 ml	(0,002%, p/v)
Histidina	6,7 ml	(0,002%, p/v)
Leucina	10 ml	(0,01%, p/v)
Triptófano	2,5 ml	(0,002%, p/v)

- Medio SG: Agar bacteriológico (2%, p/v), glucosa (2%, p/v), “dropout mix” (0,2%, p/v). Esta última mezcla es la combinación en seco de bases nitrogenadas, aminoácidos y vitaminas, excepto el suplemento adecuado en el caso de la selección de plásmidos. Se agregó al medio antes de esterilizarlo por autoclave. A continuación, se muestran los componentes del “dropout mix” y la cantidad correspondiente dentro de la mezcla (Burke *et al.*, 2000).

Componente	Cantidad (g)
Adenina sulfato	0,5 g
Alanina	2,0 g
Arginina	2,0 g
Asparragina	2,0 g

Ácido aspártico	2,0 g
Cisteína	2,0 g
Glutamina	2,0 g
Ácido glutámico	2,0 g
Glicina	2,0 g
Histidina	2,0 g
Inositol	2,0 g
Isoleucina	2,0 g
Leucina	10,0 g
Lisina	2,0 g
Metionina	2,0 g
Ácido p-aminobenzoico	0,2 g
Fenilalanina	2,0 g
Prolina	2,0 g
Serina	2,0 g
Treonina	2,0 g
Triptófano	2,0 g
Tirosina	2,0 g
Uracilo	2,0 g
Valina	2,0 g

- Medio mínimo 165: Se trata de un medio mínimo tamponado cuya composición ha sido ligeramente modificada respecto de la publicada por Ramos y Wiame (1979). Se preparó mezclando las cinco soluciones siguientes, previamente esterilizadas:
 - **Tampón 165**. Contiene: 0,7 g/l de $\text{MgSO}_4 (\times 7\text{H}_2\text{O})$, 1 g/l de KH_2PO_4 , 0,4 g/l de $\text{CaCl}_2 (\times 2\text{H}_2\text{O})$, 0,5 g/l de NaCl , 1 g/l de K_2SO_4 , 10,5 g/l de ácido cítrico ($\times \text{H}_2\text{O}$) y 16 ml/l de KOH 10 M. El pH de esta solución se ajustó a 6,1 con KOH 5M. Esta solución se esterilizó en el autoclave y se almacenó en oscuridad. Para preparar 1 l de medio mínimo 165 se utilizaron 919 ml de tampón 165.
 - **Solución concentrada (1000X) de metales-traza**. Se añadió 1 ml de esta solución a 1 l de medio mínimo 165. La solución de metales-traza contiene: 10 mg/l de H_3BO_3 , 1 mg/l de $\text{CuSO}_4 (\times 5\text{H}_2\text{O})$, 2 mg/l de KI , 4 mg/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 (\times 2\text{H}_2\text{O})$, 14 mg/l $\text{ZnSO}_4 (\times 7\text{H}_2\text{O})$, 10 g/l de ácido

cítrico ($\times H_2O$), 400 mg/l $MnSO_4$ ($\times H_2O$) y 5 g/l $FeCl_3$ ($\times 6 H_2O$). Esta solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 4° C durante un máximo de 3 meses.

- **Solución concentrada (100X) de vitaminas.** Se añadieron 10 ml de esta solución a 1 l de medio 165. Contiene: 0,25 mg/l de biotina, 100 mg/l de tiamina-HCl, 1 g/l de inositol, 200 mg/l de pantotenato de calcio, 100 mg/l de piridoxina-HCl. Esta solución se esterilizó en el autoclave (112° C, 20 min) y se almacenó a 4° C protegida de la luz.
- **Glucosa** hasta una concentración final del 3% (p/v), a partir de una solución más concentrada (50%, p/v) y esterilizada en el autoclave.
- **Sulfato amónico** como fuente de nitrógeno, que se adicionó hasta una concentración final del 0,5% (p/v) a partir de una solución más concentrada (50%, p/v) y esterilizada en el autoclave.
- Los nutrientes adicionales requeridos por la cepa en función de sus auxotrofías se añadieron en las concentraciones finales descritas para el medio mínimo SD.

2.2 Medios de cultivo de bacterias

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37° C. Cuando el crecimiento tuvo lugar en medio líquido, el cultivo se mantuvo en agitación a 200 r.p.m. en un agitador orbital. Los medios utilizados fueron:

- Medio Luria-Bertani (LB): Se trata de un medio rico utilizado para el crecimiento de *E. coli*. Tras disolver sus componentes se ajustó el pH a 7,0 con NaOH 5 N. Su composición es la siguiente:

Triptona	10 g	(1%, p/v)
Extracto de levadura	5 g	(0,5%, p/v)
NaCl	10 g	(1%, p/v)
Agar bacteriológico	20 g	(2%, p/v)
H ₂ O bidestilada	c.s.p.	1 l

- Medio Terrific-Broth (TB): Se utilizó este medio cuando interesaba obtener una mayor cantidad de biomasa de la que se obtiene partiendo del mismo volumen de

medio LB (como por ejemplo, para minipreparaciones de DNA plasmídico de *E. coli*). Su composición es la que sigue:

A 900 ml de H₂O bidestilada se le añade:

Triptona	12 g	(1,2%, p/v)
Extracto de levadura)	24 g	(2,4%, p/v)
Glicerol	4 ml	(0,4%, v/v)

Tras disolver los componentes y someterlos a un ciclo de autoclave, se dejó enfriar hasta 60° C aproximadamente, y se añadieron 100 ml de una solución estéril que era 0,17 M en KH₂PO₄, y 0,72 M en K₂HPO₄.

- Medio SOB: Éste fue el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* para la preparación de células competentes. Su composición se muestra a continuación:

A 950 ml de agua bidestilada se le añade:

Triptona	20 g	(2%, p/v)
Extracto de levadura	5 g	(0,5%, p/v)
NaCl	0,5 g	(0,05%, p/v)

Tras disolver los ingredientes anteriores, se añadieron 10 ml de una solución de KCl 250 mM. Se ajustó el pH del medio a 7,0 con NaOH 5 N y por último se llevó el volumen a 1 litro. Se autoclavó y se guardó hasta el momento de su utilización. Entonces se añadieron 5 ml de una solución estéril de MgCl₂ 2 M.

- Medio SOC: Éste medio es idéntico al medio SOB, excepto que contiene glucosa 20 mM. Se utilizó en la transformación de células de *E. coli*. Para su preparación, tras su esterilización en el autoclave, el medio SOB se dejó enfriar y se añadieron 20 ml de una solución estéril de glucosa 1 M. Se utilizó para facilitar la recuperación de las bacterias después de haber sido transformadas.
- Medios adicionados de antibiótico: Como antibiótico se utilizó ampicilina (cuya concentración final en el medio fue de 100 µg/ml). Se utilizó para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos que confieren resistencia a antibióticos de tipo beta-lactámico.

2.3 Conservación de las diferentes cepas utilizadas

Para su almacenamiento a largo plazo, las cepas se mantuvieron a -80°C en microviales estériles de 2 ml, con una concentración final de glicerol estéril al 15% (v/v). Para el uso diario y continuo de las cepas, se conservaron en medio sólido durante un mes.

2.4 Ensayos de crecimiento en medio líquido y sólido

Para los ensayos de crecimiento en medio sólido se realizaron diluciones decimales seriadas de cultivos líquidos de las cepas de interés, y se transfirieron aproximadamente 3 μl de cada dilución con la ayuda de un replicador (Sigma-Aldrich Co., USA) a placas de medio sólido con las condiciones diferenciales a estudiar. Posteriormente se incubaron las placas a 28° , 10° u 8°C durante el tiempo adecuado para cada temperatura y medio de cultivo. En el análisis del crecimiento se tuvo en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observaba crecimiento como el tamaño de las colonias.

Para la obtención de las curvas de crecimiento de las distintas cepas de levadura, se inocularon 50 ml de YPD o YPDT, dependiendo del caso, en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 10^4 UFC/ml en todos los casos. Se mantuvieron en agitación constante a 200 r.p.m. a una temperatura de 28° , 10° u 8°C . A determinados tiempos se extrajo muestra para medir la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro DU[®] 730 (Beckman Coulter, USA). En los resultados se muestra la media de 3 experiencias individuales con sus correspondientes desviaciones estándar. Se utilizó la medida de la densidad óptica como medida del crecimiento de la levadura ya que experimentalmente se obtuvo una correlación lineal entre la densidad óptica y unidades formadoras de colonias por mililitro. Los valores experimentales de las curvas de crecimiento obtenidas se ajustaron al modelo cinético de Gompertz (Gompertz, 1825) para poder determinar la duración de la fase de latencia y el tiempo de generación. El modelo cinético de Gompertz es uno de los más utilizados para describir el crecimiento microbiano y tal como refleja un estudio donde se comparan diferentes modelos cinéticos quedó demostrado que se trata de un función matemática adecuada para describir el crecimiento de *S. cerevisiae* hallando escasa diferencia con el resto de modelos analizados (López *et al.*, 2006). La ecuación utilizada es la siguiente:

$$N(t) = A + \{C [e^{-e^{-B(t-M)}}]\}$$

Donde N es la densidad óptica a 600 nm en un tiempo t , A es la carga microbiana inicial, C es la cantidad de crecimiento (densidad óptica a 600 nm) que se da al aumentar el tiempo indefinidamente, M es el tiempo al que la velocidad de crecimiento es máxima, B es la velocidad de crecimiento relativa en el tiempo M y t es el tiempo.

La duración de la fase de latencia y el tiempo de generación se definen como los puntos en los cuales la segunda y la primera derivada, respectivamente, obtienen su valor máximo. A partir de la ecuación de Gompertz (de sus derivadas analíticas) se calcularon los parámetros cinéticos mencionados haciendo uso de las siguientes fórmulas: duración de la fase de latencia (h) ($\lambda = M - 1/B$) y tiempo de generación (h) ($GT = \log_2 (e / B C)$).

2.5 Determinación de la resistencia a la congelación

Para determinar la tolerancia a la congelación de cada uno de los clones que sobreexpresaban los distintos genes identificados por conferir mejor tolerancia al frío, cada una de las cepas que se iban a someter al ensayo se inoculó en medio YPD líquido y se creció hasta alcanzar aproximadamente la mitad de la fase exponencial de crecimiento ($DO_{600} = 3$). Posteriormente, se recogieron las células por centrifugación (13.400 g durante 3 minutos), y luego se resuspendieron en el suficiente volumen de medio líquido YPD estéril como para lograr una $DO_{600} = 10$. De dicha suspensión se tomó una alícuota para realizar un recuento celular por crecimiento en medio YPD sólido, y el resto se congeló, en alícuotas de 100 μ l, a una temperatura de -20° C. Tras permanecer durante diferentes periodos de tiempo en el congelador, las muestras se fueron descongelando mediante incubación durante 10 minutos en un baño de agua calentado a 30° C. A continuación, se determinó la viabilidad mediante recuento celular en placas de medio YPD. La supervivencia de cada clon fue calculada como el porcentaje de las unidades formadoras de colonias/ml en las muestras congeladas con respecto a las unidades formadoras de colonias/ml del correspondiente control, es decir, de la misma muestra antes de congelar.

3 Técnicas de transformación de microorganismos

3.1 Transformación de levaduras

Se utilizó el método de transformación basado en el acetato de litio/ DNA monocatenario de alto peso molecular/polietilenglicol (LiAC/SS-Carrier DNA/PEG) y choque térmico a 42° C descrito por Gietz y Woods (2002). Es un método relativamente rápido y reproducible con el que se obtuvo una frecuencia de transformación entre 10^5 y 10^6 transformantes/ μg DNA plasmídico.

Para la preparación del acetato de litio 1.0 M se disolvieron 5,1 g de acetato de litio dihidratado en 50 ml de agua. Se esterilizó en autoclave durante 15 minutos y se almacenó a temperatura ambiente. Para la preparación de polietilenglicol 3350 (50%, p/v) se disolvieron 50 g de PEG 3350 en 30 ml de agua bidestilada mediante agitación con calor. Tras dejar enfriar se ajustó el volumen a 100 ml y, posteriormente, se esterilizó en el autoclave en botella de vidrio. Se guardó a temperatura ambiente bien cerrado ya que la evaporación de agua provoca el aumento de la concentración de PEG, lo que reduce considerablemente la frecuencia de transformación. Por último, el DNA monocatenario de alto peso molecular (2,0 mg/ml) fue preparado disolviendo 200 mg de DNA de esperma de salmón (Sigma-Aldrich Co. USA) en 100 ml de tampón TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na_2EDTA , pH 8,0) con agitación a 4° C durante 2 horas. Tras ser sonicado para fragmentarlo, se guardó en alícuotas de 1,0 ml a -20° C. Como paso previo a su utilización se hirvió durante 5 minutos y después se enfrió en un baño de hielo.

3.2 Transformación de *E. coli*

Se prepararon células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* mediante el método de Inoue (Inoue et al., 1990) y se conservaron a -80° C. Para la transformación se siguió el protocolo descrito por Hanahan (1983). Se añadieron hasta 25 ng de DNA por cada 50 μl de células competentes en un volumen que no excedió en más del 5% del volumen de células competentes. En cada transformación se incluyeron como controles sendos tubos con células competentes, a las que se les añadió, bien una concentración conocida de DNA plasmídico superenrollado disuelto en tampón TE, o bien el mismo volumen de tampón TE. Se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y posteriormente se incubaron a 42° C durante 90 segundos exactamente. Después se enfriaron las células en hielo

durante 1-2 minutos, se añadieron 800 µl de medio SOC y se incubaron a 37° C durante 45 minutos para permitir que las bacterias expresaran el marcador de resistencia al antibiótico codificado por el plásmido. Por último, se extendieron alícuotas de 100 µl de las células competentes transformadas sobre la superficie de placas Petri con medio LB suplementado con ampicilina.

4 Métodos de manipulación de ácidos nucleicos

4.1 Obtención de DNA genómico de levadura

Se partió de un cultivo de levadura en 8 ml de medio YPD, crecido durante 24 horas a 28° C en un agitador orbital operando a 240 r.p.m. Se siguió el protocolo descrito por Sherman et al. (1986), basado en la digestión de la pared celular con la enzima Zymoliasa 20T (Seikagaku Corporation, Japan), y una segunda lisis del esferoplasto resultante con dodecil sulfato sódico. Además, se han incorporado las modificaciones realizadas posteriormente por Lee (1992), para evitar que posibles inhibidores de enzimas se aislen junto con el DNA. Posteriormente se purificó el DNA aislado con el kit denominado “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche Diagnostics GmbH, Germany).

4.2 Obtención de DNA plasmídico de levadura

Para el aislamiento de los plásmidos contenidos en las células de levadura se siguió el protocolo descrito por Rose et al. (1990), partiendo de 5 ml de cultivo incubado durante 24 horas, prolongando a 5 minutos el tiempo de agitación mecánica del sedimento de células con 0.3g bolitas de vidrio (425-600 µm de diámetro), 0,2 ml del tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% (p/v) SDS, 2% (p/v) Triton X-100) y 0,2 ml de la mezcla fenol:cloroformo (1:1) para conseguir una eficiente lisis celular. Posteriormente se añadieron 0,2 ml de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) y se volvió a agitar. Tras centrifugar durante 5 minutos a velocidad máxima en una microcentrífuga, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se añadieron 2 volúmenes de etanol agitando vigorosamente. Se volvió a centrifugar, se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento con etanol al 70% (v/v).

4.3 Obtención de DNA plasmídico de *E. coli*

Dependiendo del propósito del aislamiento se utilizaron dos protocolos alternativos. En el caso de que el fin fuera la secuenciación del plásmido, se hizo uso del protocolo facilitado por el fabricante del kit, “Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep Kit” (Invitrogen Corporation, USA). Alternativamente, para utilizar el plásmido con otros propósitos tales como digestión con enzimas de restricción o para la transformación de células de levadura se realizaron las “minipreparaciones” del DNA plasmídico por el método de ebullición (Holmes y Quigley, 1981). Siguiendo este protocolo se resuspendieron las células en 0,5 ml de tampón STET (10% (p/v) sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 1% (p/v) Triton X-100) que se guardó congelado sin necesidad de esterilizarlo. Se procedió a la formación parcial de protoplastos por tratamiento con 5 µl lisozima 5% (p/v) (Merck KGaA, Germany), previamente preparada y guardada congelada en alícuotas de 200 µl. Posteriormente, se efectuó una rotura celular suave sumergiendo la suspensión de células en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos. De esta forma el DNA cromosómico queda agregado en un sedimento viscoso y el plásmido se extrae en el sobrenadante resultante de una centrifugación de la suspensión a 15.000 g durante 15 minutos. Basta una precipitación con un volumen de isopropanol y otra con 700 µl de etanol-acetato amónico (preparado con 6 partes de etanol absoluto y 1 parte de acetato amónico 7,5 M) para que sea posible digerir el plásmido con endonucleasas de restricción. Este método es el ideal para analizar las colonias bacterianas provenientes de una transformación. Si, además se incluyen tratamientos con RNasa (Roche Diagnostics GmbH, Germany) y fenol, el DNA plasmídico también es adecuado para llevar a cabo subclonajes.

4.4 Obtención del RNA total de levadura

El RNA total de *S. cerevisiae* se aisló y purificó siguiendo el método descrito en Burke et al. (2000), con algunas modificaciones. Todo el material utilizado para la obtención de RNA fue autoclavado a una sobrepresión de dos atmosferas con vapor de agua saturado y a 134° C de temperatura durante 1 hora para inactivar las RNasas. Se partió de 50 ml de cultivo en medio YPD a 10° ó 28° C, dependiendo de la muestra, en fase de crecimiento exponencial que fueron recogidas mediante centrifugación a 3.000 g durante 10 minutos. Las células se lavaron con agua destilada estéril y se congelaron inmediatamente a -80° C hasta su procesamiento posterior. Las

células se descongelaron entonces en hielo y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón LETS (0,1 M LiCl, 0,01 M EDTA, 0,01 M Tris-HCl pH 7,4, 0,2% (p/v) SDS). Se añadieron 0,5 ml de fenol ajustado a pH 4,3:cloroformo (5:1) y 0,5 ml de perlas de vidrio (425-600 micras de diámetro). La rotura celular se efectuó empleando un sistema comercial de agitación denominado FastPrep (Savant Instruments Inc. Farmingdale, USA) mediante 3 ciclos de 30 segundos a 5,5 de velocidad. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 13.400 g en una centrifuga refrigerada a 4° C. El sobrenadante se extrajo con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El RNA se precipitó por tratamiento del sobrenadante con un volumen de LiCl 5 M a -80° C durante al menos 3 horas, se recogió por centrifugación 13.400 g durante 15 minutos, se lavó con 200 µl de etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en agua MilliQ estéril. Se volvió a precipitar el RNA con acetato sódico a una concentración final de 0,3 M y dos volúmenes de etanol al 96% (v/v) frío. Después de 2 horas a -80° C se recogió el precipitado por centrifugación, se lavó con etanol al 70% (v/v) y se resuspendió en agua MilliQ estéril. Se tomó una alícuota de la solución de RNA extraído para verificar su pureza y estado de degradación. La integridad del RNA se comprobó mediante electroforesis en un gel TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) al 1% (p/v) de agarosa y aplicando un gradiente de campo eléctrico de 10 V/cm durante 10-15 minutos. Se cuantificó por medida de la absorbancia a 260 nm de un volumen de la muestra de 1 µl mediante un espectrofotómetro denominado NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). El cociente de los valores de la absorbancia a 260 y 280 nm se utilizó como indicativo de la pureza del RNA obtenido, siendo igual a 2,0 si está libre de impurezas que absorben en el ultravioleta. Un valor de dicho cociente inferior a 2,0 indica contaminación por proteínas, fenol o material insoluble.

4.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo según procedimientos estándares (Sambrook y Russell, 2001). Esta metodología se empleó para la clonación de genes y para la síntesis de sondas que más tarde se marcaron con digoxigenina. El volumen final de la reacción fue de 50 µl utilizando como molde 100 ng ó 10 ng de DNA genómico o plasmídico, respectivamente. Se utilizaron desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) PureExtreme™

dNTPs (Fermentas International Inc., Canada) cuya concentración final en el ensayo fue, para cada uno de ellos, de 200 μ M. La concentración final en el tubo de reacción de cada uno de los cebadores, directo y reverso, fue de 300 nM. Todos los cebadores se diseñaron mediante el programa informático “Primer Premier 5” (Premier Biosoft Internacional, USA) y su secuencia se muestra en la tabla 4. Se utilizaron 2,6 unidades de la mezcla de DNA Polimerasas termoestables denominada “Expand High Fidelity PCR System” (Roche Diagnostics GmbH, Germany), utilizando como tampón de reacción el proporcionado por el fabricante de dicho producto y añadiéndole cloruro magnésico hasta una concentración final de 1,5 mM. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf AG, Germany). En todos los casos el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94° C seguida de una repetición de ciclos, en número variable según el caso, y consistentes en un paso de desnaturalización de 30 segundos a 94° C, un paso de hibridación de los cebadores con el molde y un paso de extensión de la cadena naciente. Una vez completado el número necesario de ciclos, se realizó una extensión final a 72° C para, finalmente, enfriar y mantener la mezcla de reacción a 4° C hasta su posterior análisis mediante electroforesis en geles de agarosa. Las condiciones de hibridación y de extensión, el número de ciclos y la secuencia de los cebadores utilizados se especifican en la tabla 4.

Gen	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Hibridación	Extensión	Nº Ciclos
<i>TAT2</i>	D: <u>AGCAGATCT</u> ACAAATACCCTAAAGAAGCTACGG R: <u>AGCAGATC</u> TCGGTATTAACACCAGAAATGG	68° C, 30 s	72° C, 2 min	30
<i>TRP1</i>	D: <u>GTTAGATCT</u> GCAGCTTGGAGTATGTCTGT R: GTT <u>AGATCT</u> TTTATGCTTGCTTTTC	58° C, 30 s	72° C, 45 s	30
<i>TAT1</i>	D: <u>TGATCAGATCT</u> GTAAAGGATAATGCGACACCG R: <u>TGATCAGATCT</u> GAGTGGAACGAAAGCCCGAT	69° C, 30 s	69° C, 3 min	30
<i>BAP2</i>	D: <u>GATCAAGATCT</u> CACAAAGCTTCCACCTGCACC R: <u>GATCAAGATCT</u> CGCTGGAAGGGATAGGCAAGAA	64° C, 30 s	69° C, 3 min	30
<i>TIP1</i>	D: <u>TACATGGAT</u> CCCAAGCAACCGATACTCAACAC R: <u>TACATGGAT</u> CCGAAGAGGGTCTGGTCTGTCT	69° C, 30 s	69° C, 3 min	30
<i>ASI2</i>	D: <u>TCAGCGGAT</u> CCACGGGATACCTAGCC R: <u>TCAGCGGAT</u> CCATTTTGAAGAAGCCCA	60° C, 30 s	72° C, 3 min	35
<i>PGA1</i>	D: <u>TCAGCGGATCC</u> ATGCCTCGTTCCGATTCTTC R: <u>TCAGCGGATCC</u> AGCTTCATTCGTTGGGCG	66,4° C, 30 s	72° C, 1 min 20 s	40
<i>NSG2</i>	D: <u>TGATCAGATC</u> IGTTGTCACACTCCGCC R: <u>TGATCAGATC</u> TCGCTCAACCGCTGGTGTA	56,5° C, 30 s	72° C, 1 min 45 s	35
<i>PRO2</i>	D: <u>TCAGCGGATCC</u> GAAATGACCACCTGCGA R: <u>TCAGCGGATCC</u> CAACAGCGTTCTCTCCGA	60,5° C, 30 s	72° C, 4 min	35
<i>UBP11</i>	D: <u>TCAGCGGATCC</u> GAGCAAAAACGCTACAACA R: <u>TCAGCGGATCC</u> ATCAAGACAGAGCCACACC	56,5° C, 30 s	72° C, 3 min	35
<i>PCK1</i>	D: <u>TGATCCCGG</u> GAATATCGGGACGCTGACGG R: <u>TGATCCCGG</u> GCAAAACAGAAATGTCTAGCG	56,2° C, 30 s	69° C, 1 min 40 s	35
YKR096W	D: <u>TGATCCCGG</u> GCTAAATGTCCTGGGGTTGC R: <u>TGATCCCGG</u> GCGGTGAGTAGAATTGGTGT	58,9° C, 30 s	72° C, 4 min	35
<i>PHO84</i>	D: <u>TGATCGGATCC</u> TTGGCAGCATGATGCAACCACA R: <u>TGATCGGATCC</u> TGCTCTGCTCTGGCACCAGCCA	64,7° C, 30 s	72° C, 2 min 20 s	35
<i>GTR1</i>	D: <u>TGTACGGAT</u> CCGAGTCGTTTGAAGTCATCTCCG R: <u>TGTACGGATC</u> TTATGCCCGCAAAACTCAA	68,7° C, 30 s	72° C, 1 min 20 s	35
<i>PHO84:GTR1</i>	D: <u>TGTACGGATC</u> TTATGCCCGCAAAACTCAA R: <u>TGATCGGATCC</u> TGCTCTGCTCTGGCACCAGCCA	56° C, 30 s	68° C, 2 min 40 s	35
<i>PHO87</i>	D: <u>TGATCGGATC</u> CAAACTACGGTAAAGGCGGC R: <u>TGATCGGATC</u> CTTGGGTTGAGAGGGGTGC	64,7° C, 30 s	72° C, 3 min 30 s	35
<i>PHO90</i>	D: <u>TGTACGGATC</u> CGCCGAGCTACAGCCGTT R: <u>TGTACGGA</u> TCCACTCCAACCGATCACATG	65° C, 30 s	72° C, 3 min 30 s	35
YCR015C	D: <u>TGTACGGAT</u> CCGGTTGAGTCGGTTCCT R: <u>TGTACGGAT</u> CCGAGACCGATTACGGAGAT	63° C, 30 s	72° C, 1 min 25 s	35
<i>SNR33</i>	D: <u>TGTACGGATCC</u> GATCCGGGCTTGCGCAT R: <u>TGTACGGA</u> TCCCTCCACTGTTCGTTCTGG	68,7° C, 30 s	72° C 40 s	40

Tabla 4. Secuencia de los cebadores (D: directo, R: reverso) y condiciones de amplificación para cada fragmento amplificado por PCR. En rojo se indican los nucleótidos añadidos que no hibridan con el DNA molde y subrayados los nucleótidos que forman parte de los sitios de corte de las endonucleasas de restricción utilizadas en el clonaje.

4.6 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Tanto los productos de PCR como los plásmidos procedentes de diferentes subclonajes se analizaron mediante electroforesis horizontal sumergida, utilizando geles de agarosa al 1% (p/v). Los geles se prepararon en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) que también fue usado como tampón de electroforesis. Una vez terminada, bien la reacción de amplificación, o bien la digestión con enzimas de restricción, se tomó una alícuota de la mezcla de reacción y se le añadió el tampón de carga para ácidos nucleicos (30% (v/v) glicerol, 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 60 mM EDTA, 0,36% (p/v) Xileno cianol FF, 3,6% (p/v) Tartrazina) (Invitrogen Corporation, USA). Se usaron como patrones de tamaño molecular, bien los fragmentos generados al digerir el DNA del fago λ con la endonucleasa de restricción *HindIII* (TrackIt™ λ DNA/*HindIII* Fragments, Invitrogen Corporation, USA), o bien un patrón de pesos moleculares en escalera conteniendo fragmentos con diferencias entre sí de 100 pares de bases y que abarcan el intervalo desde 100 hasta 1500 pb (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder, Invitrogen Corporation, USA). Tras el proceso de separación electroforética, el gel fue sumergido durante 45 minutos en una solución conteniendo 0,5 μ g/ml del agente intercalante fluorescente bromuro de etidio en tampón TAE 1X, disolución que en todo momento se mantuvo preservada de la luz. Esta solución se preparó a partir de una solución madre concentrada de 10 mg/ml, que se conservó a 4° C y también siempre preservada de la luz. Los resultados fueron visualizados mediante un transiluminador de luz ultravioleta (Vilber Lourmat, France) operando a 365 nm. El sistema de documentación digital empleado para capturar la imagen del gel bajo la luz UV fue el denominado “Gel Logic 100” (Eastman Kodak Company, USA) junto con el programa informático “Kodak 1D Image Análisis Software, v3.6.1” (Eastman Kodak Company, USA).

4.7 Cuantificación de DNA

La cuantificación del contenido en DNA de las soluciones de los diversos fragmentos ya purificados, se realizó por espectrofotometría, analizando 1 μ l de muestra con el sistema “NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer” junto con el programa informático “ND-1000 3.2.0” (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.8 Clonaje a partir de productos amplificados

Para llevar a cabo el subclonaje de los diversos genes contenidos en los insertos procedentes de cada uno de los plásmidos aislados en los distintos cribados de la genoteca, se utilizó el vector episomal de expresión en levadura denominado YEp24 (New England Biolabs, USA), que también es capaz de replicarse en *E. coli*. Este vector lanzadera presenta como marcador auxotrófico para levadura el gen *URA3* y confiere resistencia a ampicilina en *E. coli* debido a la presencia del gen *bla*. Como consecuencia del diseño de los cebadores de cada una de las reacciones de PCR, los distintos productos que se obtienen contienen en sus extremos sitios de corte para diferentes endonucleasas de restricción, que sirven para clonarlos en el vector YEp24 digerido con la misma endonucleasa, o con una que genere extremos compatibles. Las enzimas utilizadas se detallan en la tabla 5, así como el tamaño del inserto y el análisis de los fragmentos de restricción del plásmido resultante del subclonaje. Todas las digestiones con las endonucleasas de restricción se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones proporcionadas por los respectivos fabricantes de cada enzima. Una vez comprobada la digestión, los fragmentos se purificaron con el kit comercial “UltraClean PCR Clean-up DNA Purification Kit” (MO BIO Laboratories Inc., USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se precipitaron de manera estándar con etanol.

Tras la digestión y purificación del vector, éste se trató con fosfatasa alcalina procedente de gamba (Roche Diagnostics GmbH, Germany) para desfosforilar sus extremos, añadiendo 1 unidad de enzima por cada μg de vector linearizado e incubando durante 1 hora a 37° C. De esta forma se intentó minimizar la recircularización del vector durante la ligación. La fosfatasa alcalina se inactivó calentando 10 minutos a 65° C. Previamente a la purificación final del vector con el mismo kit comercial anteriormente mencionado para el caso de la purificación de los fragmentos, se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), seguida de una precipitación estándar con etanol.

En la reacción de ligación se mezclaron 300 ng del vector linearizado y desfosforilado y la cantidad suficiente de inserto para alcanzar una proporción, en cuanto al número de moles, de 1:3 entre el vector y el inserto, junto con 0,3 unidades Weiss de la enzima DNA ligasa

Plásmido	Enzima restricción		Tamaño Inserto (pb)	Enzima	Análisis fragmentos restricción	
	Vector	Inserto			Fragmentos (pb)	
	YEp24				Orientación a	Orientación b
YEp24. <i>TAT2</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	2.281	<i>Pvu</i> I	3.469	5.531
					4.037	2.544
					2.544	1.975
YEp24. <i>TRP1</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	767	<i>Xba</i> I	4.790	5.353
					3.746	3.183
YEp24. <i>TAT1</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	2.435	<i>Nco</i> I	7.171	8.642
					3.033	1.562
YEp24. <i>BAP2</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	2.834	<i>Xba</i> I	3.757	5.364
					6.846	5.239
YEp24. <i>TIP1</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	1.613	<i>Xba</i> I	5.392	5.597
					3.990	3.785
YEp24. <i>ASI2</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	1.850	<i>Xba</i> I	5.533	5.693
					4.086	3.926
YEp24. <i>PGA1</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	1.225	<i>Nco</i> I	7.507	7.096
					1.487	1.898
YEp24. <i>NSG2</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bgl</i> II	1.739	<i>Eco</i> RV	8.002	7.075
					909	1.522
					595	909
YEp24. <i>PRO2</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	2.465	<i>Sph</i> I	9.222	8.407
					1.012	1.827
YEp24. <i>UBP11</i>	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	3.073	<i>Eco</i> RI	4.273	6.770
					4.328	2.241
					2.241	1.831
YEp24. <i>PCK1</i>	<i>Xma</i> I	<i>Xma</i> I	2.541	<i>Bam</i> HI	8.968	8.312
					1.348	2.004
YEp24.YKR096W	<i>Xma</i> I	<i>Xma</i> I	4.105	<i>Sal</i> I	7.356	10.922
					4.515	952

Tabla 5. Plásmidos recombinantes construidos para el subclonaje individual de los genes seleccionados. Se indican las enzimas de restricción utilizadas para la preparación del vector de clonaje y del inserto así como su tamaño tras la digestión. Por último se indica el análisis de restricción del plásmido resultante del subclonaje (Orientación a: cadena de Watson del inserto no coincide con el sentido de transcripción del gen *URA3* de YEp24; orientación b: cadena de Watson del inserto coincide con el sentido de transcripción del gen *URA3* de YEp24).

Plásmido	Enzima restricción		Tamaño Inserto (pb)	Enzima	Análisis fragmentos restricción	
	Vector	Inserto			Framentos (pb)	
	YEp24				Orientación a	Orientación b
YEp24.PHO84	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	2.164	<i>Nco</i> I	7.311	8.231
					2.622	1.702
YEp24.GTR1	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	1.281	<i>Eco</i> RV	7.705	6.916
					909	1.225
					436	909
YEp24.PHO84 :GTR1	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	4.076	<i>Nco</i> I	7.311	10.143
					4.534	1.702
YEp24.PHO87	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	3.189	<i>Sph</i> I	7.804	10.549
					3.154	409
YEp24.PHO90	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	3.242	<i>Nco</i> I	8.590	8.030
					2.421	2.981
YEp24.YCR015C	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	1.371	<i>Ssp</i> I	4.679	4.278
					3.462	3.863
					997	997
YEp24.SNR33	<i>Bam</i> HI	<i>Bam</i> HI	549	<i>Hind</i> III	4.268	4.461
					2.167	2.167
					1.166	1.166
					717	524

Tabla 5. (Continuación)

del bacteriófago T4 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) y el tampón suministrado por el propio fabricante, y todo ello en un volumen final de 10 μ l. La reacción se llevó a cabo a 16° C durante 16-18 horas. Como control de la capacidad de recircularización del vector se realizó una reacción de ligación paralela en la que el inserto se omitió.

A continuación se procedió a realizar la transformación de células competentes de *E. coli*, tal y como se indica en el apartado 3.2 del presente capítulo. Una vez recogidos los transformantes se aisló el DNA plasmídico por el método ya descrito en el apartado 4.3. Tras obtener los plásmidos, se comprobó la presencia del inserto mediante la digestión con las enzimas de restricción apropiadas, verificando en un gel de agarosa la presencia de las bandas de DNA con los pesos moleculares correspondientes que se indican en la

tabla 5. Para cada clonaje se llevaron a cabo una media de 30 “minipreparaciones” de DNA plasmídico con sus correspondientes digestiones.

4.9 Secuenciación y análisis de las secuencias

Los plásmidos seleccionados se secuenciaron en las dos hebras mediante una modificación del método enzimático de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) en la que la síntesis de las cadenas se lleva a cabo mediante una reacción de PCR y usando la Taq DNA polimerasa. Se trata de una síntesis controlada de DNA que genera fragmentos que terminan en puntos específicos de la secuencia diana cuando la polimerasa incorpora un dideoxidonucleótido trifosfato (ddNTP) marcado con un fluorocromo, que actúa como terminador. Se utilizó para ello, el kit comercial “Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1” (Applied Biosystems Corporate, USA), que contiene todos los componentes requeridos para la reacción de secuenciación; los cebadores YEp24Bd 5’-TCGCTACTTGGAGCCACTATC-3’ y YEp24Br 5’-CAGCAACCGCACCTGTGGC-3’ y el termociclador “ABI GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler” (Applied Biosystems Corporate, USA). La resolución y análisis de los productos marcados fue realizada con un equipo de secuenciación automática “ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems Corporate, USA). La secuenciación fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP).

El análisis y comprobación de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa informático “Chromas v2.31” (Technelysium Pty. Ltd., Australia). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos *Saccharomyces* Genome Database[™], a través de su página web (<http://www.yeastgenome.org/>) usando el programa BLAST.

5 Amplificación y cribado de una genoteca de *S. cerevisiae*

5.1 Amplificación de la genoteca de *S. cerevisiae*

En cuanto a la genoteca de *S. cerevisiae*, se amplificó una copia de la genoteca construida por M. Carlson en el laboratorio de D. Botstein (Carlson y Botstein, 1982), que contiene fragmentos genómicos de tamaño superior a 10 Kb, obtenidos tras una

digestión parcial con *Sau3AI* del DNA genómico de la cepa de *S. cerevisiae* S288C, y clonados en el sitio *BamHI* del vector multicopia YEp24. La genoteca consta de tres “pool”, cada uno de los cuales proviene de unos 7.000 transformantes de *E. coli*. Después de la amplificación de cada “pool” por separado mediante crecimiento sobre una membrana “Hybond-N+” (GE Healthcare UK Ltd, UK) circular colocada en la superficie de placas Petri con medio SOB conteniendo ampicilina, se recogieron las colonias. Se aislaron y purificaron los plásmidos portados en las células mediante el kit “Wizard® Plus Maxipreps DNA Purification System” (Promega Corporation, USA). Así pues, esta genoteca es la que se utilizó en los siguientes pasos para buscar los genes de levadura que por sobreexpresión den tolerancia a frío.

5.2 Condiciones de transformación de la genoteca

Antes de proceder al cribado y análisis de la genoteca, hubo que introducirla en levadura, por lo que cada una de las preparaciones de plásmidos procedentes de los distintos “pool” se empleó en la transformación de la cepa de laboratorio de *S. cerevisiae* W303 cuyo genotipo se haya descrito en la tabla 3. Como se puede observar, elegimos para la transformación una cepa diploide, evitando de esta forma la interferencia de mutaciones recesivas que pudieran afectar en el análisis del fenotipo buscado. La transformación se llevó a cabo mediante el protocolo descrito en el apartado 3.1. La selección de los transformantes se efectuó por crecimiento en medio SD-uracilo (medio mínimo adicionado de los requerimientos auxotróficos de la cepa a excepción de uracilo que es complementado por el gen *URA3* presente en el plásmido YEp 24) y a 28° C.

5.3 Condiciones de cribado de la genoteca

5.3.1 Cribado de la genoteca a 10° C

Una vez recogidos los transformantes, se efectuó la selección de aquellos clones que confirieron al diploide de la cepa W303 la capacidad de crecer a 10° C (la cepa prácticamente no crece a esa temperatura en los medios utilizados en este experimento) por incubación a dicha temperatura y en tres medios de cultivo distintos: YPD (medio completo y complejo), SG (medio completo sintético) y SD con adenina, histidina, leucina y triptófano (medio mínimo adicionado de los requerimientos autotróficos de la

cepa con la excepción del uracilo que es complementado por el gen *URA3* presente en el plásmido YEp24).

En primer lugar, se pusieron a punto las condiciones de análisis de la capacidad de crecimiento en frío en lo que se refiere al periodo de incubación necesario para cada uno de los medios. Las mejores condiciones resultaron ser de 10 días para YPD, y de 15 días para SG y SD con adenina, histidina, leucina y triptófano. En todos los análisis que realizamos siempre se incluyó un control negativo, que para el caso de crecimiento en YPD es la cepa W303, y para el medio SD es la misma cepa transformada con el vector YEp24.

5.3.2 Cribado de la genoteca a 8° C

Sobre los mismos transformantes que se obtuvieron al introducir la genoteca en levadura, se efectuó la selección de aquellos clones que confirieron a la cepa W303 la capacidad de crecer a 8° C por incubación a dicha temperatura en medio de cultivo YPDT (la cepa prácticamente no crece en ese medio a esa temperatura).

5.4 Análisis de los clones seleccionados

Este análisis consistió en dos experiencias paralelas para demostrar la asociación inequívoca entre presencia de plásmido y la adquisición del fenotipo estudiado. Por un lado, se comprobó que la eliminación del plásmido, mediante pases sucesivos en medio YPD, conlleva la pérdida de la capacidad de crecimiento en frío. Por otro lado, se evidenció que el plásmido es el responsable del fenotipo buscado al aislar y purificar el plásmido de cada clon seleccionado de levadura, rescatarlo en *E. coli* y reintroducirlo de nuevo en la cepa de levadura W303. De esta manera quedaron excluidos todos aquellos clones cuya mejora en el fenotipo se debía a una mutación cromosómica. Los clones en los que quedó demostrada la asociación biunívoca entre la presencia del plásmido y del fenotipo, fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se confrontaron con las depositadas en la base de datos del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org>), delimitando así los fragmentos genómicos contenidos en cada inserto.

5.5 Subclonaje de genes candidatos

Una vez identificados los fragmentos cromosómicos presentes en los distintos clones, se procedió al subclonaje de cada uno de los genes que, en función de los datos publicados y a tenor de lo expuesto en la Introducción sobre el conocimiento actual con respecto a la tolerancia al frío, “a priori” parecían tener más posibilidades de ser los responsables del fenotipo cuando se sobreexpresen. A partir de este momento nos referiremos a dichos genes como “genes candidatos”. Su subclonaje se efectuó en el mismo vector multicopia en el que se había construido la genoteca, el plásmido YEp24 y con las construcciones resultantes se volvió a transformar la cepa W303 para verificar si su sobreexpresión confiere a dicha levadura una mayor tolerancia al frío. Para ello se amplificó la región del cromosoma que comprende al promotor y a la pauta de lectura abierta de cada uno dichos genes candidatos partiendo del DNA genómico de la cepa W303 mediante la técnica de PCR (las condiciones para la amplificación de cada uno de los genes se describen en la tabla 4). Tras verificar por electroforesis la correcta amplificación, cada fragmento fue digerido con la correspondiente enzima de restricción cuya secuencia de corte se había incorporado en el diseño de los cebadores de la reacción de PCR para después ligarlo con el vector YEp24 que también había sido digerido adecuadamente y desfosforilado, tal y como se indica en el apartado 4.8 del presente capítulo y en la tabla 5. A continuación, se transformaron células de *Escherichia coli* con la mezcla de ligación. Entre los transformantes obtenidos se procedió a identificar aquellos que contenían la construcción correcta mediante el análisis de los fragmentos de restricción generados al digerir los plásmidos aislados de los transformantes, y su posterior verificación por secuenciación del inserto que contenían. Con los plásmidos positivamente identificados se transformó la cepa de levadura W303. Finalmente, los transformantes de levadura en los que se había subclonado de forma individual cada uno de los genes candidatos se sometieron a un ensayo de crecimiento a baja temperatura (8° ó 10° C) en medio YPD para determinar si su sobreexpresión era o no la responsable del aumento de la tasa de crecimiento a bajas temperaturas.

5.6 Hibridación con sondas de DNA marcadas con quimioluminiscencia

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el primer experimento de cribado de la genoteca se decidió identificar de entre los clones estudiados que confirieron a la cepa W303 la capacidad de crecer a 10° C, aquellos que presentaban un plásmido con un fragmento cromosómico que incluía o bien el gen *TAT2/YOL020W* o bien el gen *TRP1/YDR007W*. Para ello, se decidió proceder a la hibridación con sondas de DNA que contenían la región del cromosoma que comprende la pauta de lectura abierta de cada uno de dichos genes.

En primer lugar se procedió al aislamiento de los plásmidos de los clones de interés y su posterior introducción en células bacterianas siguiendo los protocolos descritos anteriormente para el aislamiento de DNA plasmídico de levadura (apartado 4.2) y transformación de *E. coli* (apartado 3.2), respectivamente. Se crecieron las colonias bacterianas en placas de agar de 140 mm para posteriormente colocar sobre las mismas una membrana cargada positivamente Hybond-N+ (GE Healthcare UK Ltd, UK). Se dejó crecer durante 4 horas y se procedió a la lisis celular y fijación del DNA, para lo cual se siguió el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001) y basado en el protocolo original de Grunstein y Hogness (1975).

A continuación se muestran los cebadores diseñados para la amplificación por PCR de un fragmento que sirviera de base para preparar una sonda homóloga a una secuencia interna de la pauta de lectura abierta del gen *TAT2*:

TAT2D: 5'-AGCAGATCTTACGCAACACACTCTCATATGAC-3'

TAT2R: 5'-AGCAGATCTCGGTATTAACACCAGAAATGG-3'

Análogamente, se diseñó otra sonda para el gen *TRP1* utilizando los cebadores citados en la tabla 4 del apartado 4.5 del presente capítulo. Las condiciones óptimas para la reacción de amplificación se describen en la misma tabla.

Una vez obtenidos los fragmentos de interés se procedió a realizar el experimento de hibridación Southern siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante del kit "Dig high

prime DNA labeling and detection starter kit II” (Roche Diagnostics GmbH, Germany), que utiliza un marcaje de la sonda con digoxigenina-11-dUTP en una reacción de síntesis del fragmento con cebadores que hibridan al azar y utilizando un sistema de detección inmunológico.

Por último, se secuenciaron los insertos contenidos en los plásmidos procedentes de los clones que no hibridaron con ninguna de las dos sondas y se procedió a identificar los genes responsables de la mejora del crecimiento a 10° C tal y como se describe en el apartado 5.5 del presente capítulo.

6 Cuantificación de la expresión de los genes *TAT2*, *TAT1* y *PHO90*

A partir de 50 µg del RNA total extraído de las células de levadura tras su crecimiento en las distintas condiciones en las que se quería comparar la expresión de los genes en cuestión, se sintetizaron los correspondientes cDNAs mediante transcripción reversa utilizando el sistema SuperScript II RT-PCR (Invitrogen Corporation, USA). El análisis de la expresión de los genes *TAT1*, *TAT2* y *PHO90* mediante PCR cuantitativa a tiempo real se llevó a cabo utilizando el programa “LightCycler Software v4.0” en el termociclador LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Germany). El gen *ACT1*, cuya expresión no se modifica por las bajas temperaturas (Homma *et al.*, 2003), se ha utilizado como control interno para normalizar los valores obtenidos respecto a la cantidad de cDNA sintetizado en cada muestra. En la reacción de amplificación se utilizaron 50 ng de cDNA , 4 µl de “LightCycler Taqman Master” (Roche Diagnostics GmbH, Germany), la sonda de hidrólisis Taqman diseñada para cada gen a una concentración final de 0,1 µM y los dos cebadores cuya concentración final para cada uno fue de 0,5 µM. Esta mezcla se transfirió a un capilar frío, se selló y centrifugó (utilizando adaptadores) muy brevemente. Se situaron los capilares en el carrusel del aparato previamente programado con los ciclos a los que iban a ser sometidas las muestras. Las sondas de hidrólisis Taqman utilizadas se componen de una secuencia de 8 ó 9 nucleótidos y pertenecen a la colección de sondas de “Universal Probe Library” (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Para la determinación de la sonda adecuada para cada gen, así como para el diseño de las parejas de cebadores se utilizó el software “ProbeFinder software v2.31” (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Las parejas de

cebadores utilizados, el número de la sonda utilizada, así como las condiciones de cada reacción se describen en la tabla 6.

La cuantificación mediante PCR cuantitativa se basa en la determinación del ciclo umbral (Ct, por su nomenclatura en inglés “threshold cycle”) para cada cDNA en cada experimento de PCR cuantitativa. El Ct para una muestra se define como el número de ciclos de PCR mínimos a partir del cual la señal de fluorescencia es mayor que un determinado valor de la intensidad de la fluorescencia que es estadísticamente distinto y superior al del ruido de fondo (que es el que hay en el capilar al principio del experimento), por lo que en realidad es el número de ciclos necesarios para detectar la formación del producto de la reacción de PCR (Scheffe *et al.*, 2006). Así los valores de Ct de diferentes muestras son usados para calcular la abundancia del cDNA molde en cada muestra, ya que el valor de Ct es directamente proporcional a la cantidad de cDNA inicial. La eficiencia de una reacción de PCR viene determinada por la naturaleza de los cebadores y el producto amplificado, y en segundo término por las condiciones de reacción (tiempos y temperaturas de hibridación y extensión, concentración de reactivos y enzima, etc.). La eficiencia de cada reacción fue calculada realizando reacciones de PCR cuantitativa a partir de diluciones seriadas del cDNA molde. A partir de los datos obtenidos en cada una de dichas amplificaciones, se representó el Ct frente al logaritmo de la cantidad de molde utilizado, donde la pendiente de la recta obtenida nos da la eficiencia de la reacción. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el módulo de cuantificación relativa del programa “LightCycler Software v4.0”.

Experimento	Secuencia del cebador (5' - 3')	Nº sonda “UPL”	Hibridación	Extensión	Nº Ciclos
<i>qTAT1</i>	D:GGTATACCGTATTCTGCTGATTTACA R:TGGAACAAGAAAGCAAACCA	157	60° C,,30 s	72° C, 1 s	45
<i>qTAT2</i>	D:GTACGAGGTTTTGGGGAAGC R:TCCGCAAAGTATTGCTTT	31	60° C, 30 s	72° C, 1 s	45
<i>qPHO90</i>	D:GAAGGTCGTCTTCCGCATC R:TGTCTAATTGCAGATTTTCGTTG	25	60° C, 30 s	72° C, 1 s	45
<i>qACT1</i>	D:GAAGATCTTGAGTGAACGTGGTT R:TCACGGACAATTTCTCTTTCAG	22	60° C, 30 s	72° C, 1 s	45

Tabla 6. Parejas de cebadores utilizados en las reacciones de cuantificación relativa, número de la sonda utilizada perteneciente a la colección “Universal Probe Library (UPL)” y condiciones para cada amplificación por PCR en tiempo real.

7 Ensayo de transporte de triptófano

Se midió a distintas temperaturas y para distintas cepas o clones, la velocidad inicial de transporte de triptófano marcado radiactivamente. La estirpe de levadura en cuestión se cultivó en agitación (200 r.p.m.) a la misma temperatura que después se realizaba el ensayo de transporte (28° ó 10° C) en 50 ml de medio mínimo 165 con los nutrientes adicionales requeridos, hasta la fase exponencial temprana de crecimiento ($DO_{600} = 0,4-0,6$). Posteriormente se resuspendieron las células en el mismo volumen en medio mínimo 165 con los nutrientes adicionales requeridos a excepción de triptófano. Se mantuvieron las células en agitación (200 r.p.m.) en este medio de ayuno de triptófano durante 2 horas para el caso del ensayo a 28° C, y durante 16 horas para el caso del ensayo a 10° C. Una vez concluida esta fase de ayuno se tomó una alícuota para realizar un recuento de unidades formadoras de colonias y se inició el ensayo de transporte mediante la adición 24 μ l de L-[5-H]Triptófano (29,0 Ci/mmol, 1.0 mCi/ml) (GE Healthcare UK limited, UK) junto con 30 μ l de triptófano frío (8 mg/ml) a 12 ml de cultivo.

La mezcla se incubó sumergida en un baño con agitación a la temperatura del ensayo, 28° ó 10° C y, a tiempos regulares comprendidos entre 0 y 20 min, se tomaron 11 muestras de 1 ml. Las células se recogieron por filtración a través de un filtro tipo HA de 0,45 μ m de diámetro de poro y 25 mm de diámetro (Millipore, USA). Cada filtro se lavó dos veces con 15 ml de una solución “fría” de triptófano 10 mM, es decir, no marcado radiactivamente y mantenido a una temperatura de 4° C. Se introdujo cada filtro en un vial con 10 ml de líquido de centelleo Filter Count (Perkin Elmer, USA), se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente hasta que el filtro se deshizo. Las muestras se midieron en un contador de centelleo Wallac 1409 (Perkin Elmer, USA). Como control de la radiactividad adsorbida inespecíficamente a las células, se tomó 1 ml del cultivo en el medio de ayuno de triptófano antes de añadir el triptófano marcado, se filtró, lavándose el filtro con una mezcla de 15 ml del triptófano frío y 2 μ l del triptófano marcado, seguido de otros 15 ml del triptófano frío.

Para el cálculo de la velocidad inicial se determinó el valor de la pendiente de la recta tangente en el origen a la curva obtenida a partir de la representación de las medidas de incorporación del triptófano marcado frente al tiempo.

Cada cepa fue ensayada a dos temperaturas, 28° y 10° C, y se realizaron dos repeticiones para cada temperatura y cepa.

RESULTADOS

1 Selección de clones que mejoran la capacidad de crecimiento a 10° y 8° C

Para proceder al cribado de la librería genómica de *S. cerevisiae*, primero había que introducirla en una cepa de levadura y para ello se eligió transformar, con el conjunto de plásmidos que forman la genoteca, al diploide de la cepa W303. Se utilizó dicha cepa por ser una cepa de levadura de laboratorio estándar y que presenta la ventaja de que es fácil de transformar. Para realizar el cribado de la librería genómica se siguió un diseño experimental similar, a excepción de la cepa de levadura, al utilizado para la identificación de los genes *HAL* de levadura implicados en la tolerancia a la salinidad (Gaxiola *et al.*, 1992). Además, la misma estrategia y modelo experimental se probó con excelentes resultados (comunicación personal del Prof. Ramón Serrano) cuando se utilizó para identificar genes procedentes de *Beta vulgaris* que, por sobreexpresión en la cepa W303 de *S. cerevisiae*, permiten que dicha levadura pueda crecer a 10° C, cuando normalmente no lo hace. En estos cribados se habían encontrado con la problemática de la gran cantidad de mutaciones recesivas que daban lugar a un elevado porcentaje de falsos positivos. Por eso, en este caso se decidió trabajar con la cepa diploide, para intentar minimizar la interferencia de mutaciones recesivas que pudieran afectar en el análisis del fenotipo buscado.

A continuación, hubo que efectuar la selección de aquellos clones que confiriesen al diploide de la cepa W303 la capacidad de crecer a 10° C (la cepa no crece a esa temperatura) por incubación a dicha temperatura y en tres medios de cultivo distintos: YPDA, SG y SD con adenina, histidina, leucina y triptófano, aislándose, para cada medio, el número de clones que se muestran en la tabla 7. Debido a los resultados obtenidos tras los análisis de los clones seleccionados a 10° C, que se describen en el siguiente apartado, se decidió realizar un segundo cribado de la genoteca sobre medio completo y complejo adicionado de triptófano 0,2% (p/v) y a una temperatura de incubación de 8° C durante 10 días. En estas condiciones fueron seleccionados 191 clones.

Medio de cultivo	Nº clones seleccionados
YPDA	1122
SG	561
SD-Ura	306

Tabla 7. Se muestra el número total de clones seleccionados en los diferentes medios utilizados: YPDA (medio completo y complejo), SG (medio completo sintético) y SD con adenina, histidina, leucina y triptófano (medio mínimo adicionado de los aminoácidos que completan las auxotrofías de la cepa a excepción del requerimiento de uracilo que es complementado por el plásmido YEp24) tras el primer cribado de la genoteca a 10° C.

2 Identificación de los genes responsables del fenotipo de tolerancia a frío

2.1 Confirmación del fenotipo de los clones seleccionados

Dada la elevada densidad de clones obtenida en el cribado de la genoteca a 10° C, 1989 clones en total, de entre todos ellos se seleccionaron 224 clones de forma aleatoria. Se comprobó de nuevo la tolerancia al frío por siembra y crecimiento a 4° y 10° C. En primer lugar se vio que aproximadamente el 15% (33 clones) de los clones no confirmaban o bien habían perdido la capacidad de crecimiento en frío. No se observaron diferencias significativas entre el crecimiento a 4° y 10° C, es decir, aquellos clones que presentaban mayor tasa de crecimiento a 10° C también lo hacían a 4° C.

De los 191 clones seleccionados en medio completo y complejo con triptófano añadido al medio 0,2% (p/v) e incubados a 8° C, el 55,5% (106 clones) no confirmaron la mayor tasa de crecimiento a 8° C.

2.2 Verificación de la relación biunívoca entre presencia de plásmido y fenotipo de tolerancia a frío

Este análisis consistió en dos experiencias paralelas para demostrar la asociación inequívoca entre presencia de plásmido y la adquisición del fenotipo estudiado. Por un lado, se comprobó que la eliminación del plásmido, mediante pases sucesivos en medio YPD, conlleva la pérdida de la capacidad de crecimiento en frío. Por otro lado, se evidenció que el plásmido es el responsable del fenotipo buscado al aislar y purificar el plásmido de cada clon seleccionado de levadura, rescatarlo en *E. coli* y reintroducirlo de

nuevo en la misma cepa de levadura que se había utilizado para el cribado de la librería genómica. De esta manera quedaron excluidos todos aquellos clones cuya mejora en el fenotipo se debía a una mutación cromosómica. Los resultados de los clones candidatos que sí confirmaron dicha asociación a 10° y 8° C se hallan reflejados en las figuras 5 y 6, respectivamente. Así fueron descartados 9 candidatos, en el caso del cribado a 10° C, y 20 candidatos, en el caso del cribado a 8° C con triptófano en exceso. En estos 29 clones descartados la mejora en el crecimiento a bajas temperaturas no se debía a la presencia de plásmido sino, presumiblemente, a mutaciones cromosómicas.

2.3 Resultados de secuenciación y análisis de los insertos

Los clones en los que quedó demostrada la asociación biunívoca entre la presencia del plásmido y la aparición del fenotipo de tolerancia a frío, fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se confrontaron con las depositadas en la base de datos del genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org>), delimitando así los fragmentos genómicos contenidos en cada inserto. Se identificaron 6 tipos distintos de insertos en los plásmidos contenidos en los clones candidatos. Una vez identificados los fragmentos cromosómicos presentes en los distintos clones, se procedió al subclonaje de cada uno de los genes que, en función de los datos publicados y a tenor de lo expuesto en la Introducción sobre el conocimiento actual con respecto a la tolerancia al frío, “a priori” parecían tener más posibilidades de ser responsables del fenotipo debido a un aumento en su nivel de expresión. A partir de este momento nos referiremos a dichos genes como “genes candidatos”. En la tabla 8 se muestra el número de clones que contienen el mismo inserto, las coordenadas y el tamaño del inserto y los genes incluidos en el mismo. Entre los genes presentes en el inserto se seleccionaron los genes candidatos que aparecen en negrita en la tabla 8.

Paralelamente se procedió de igual forma con los clones en los que quedó confirmada la relación biunívoca entre presencia de plásmido y mejora del crecimiento a 8° C. Se identificaron 4 tipos de insertos diferentes en los clones seleccionados a 8° C. En la tabla 9 se muestra el número de clones candidatos que contienen el mismo inserto y las coordenadas, el tamaño y los genes incluidos en el mismo. Entre los genes presentes en el inserto se seleccionaron aquellos que se consideraron los mejores candidatos para ser los responsables de la mayor capacidad de crecimiento de los clones a 8° C.

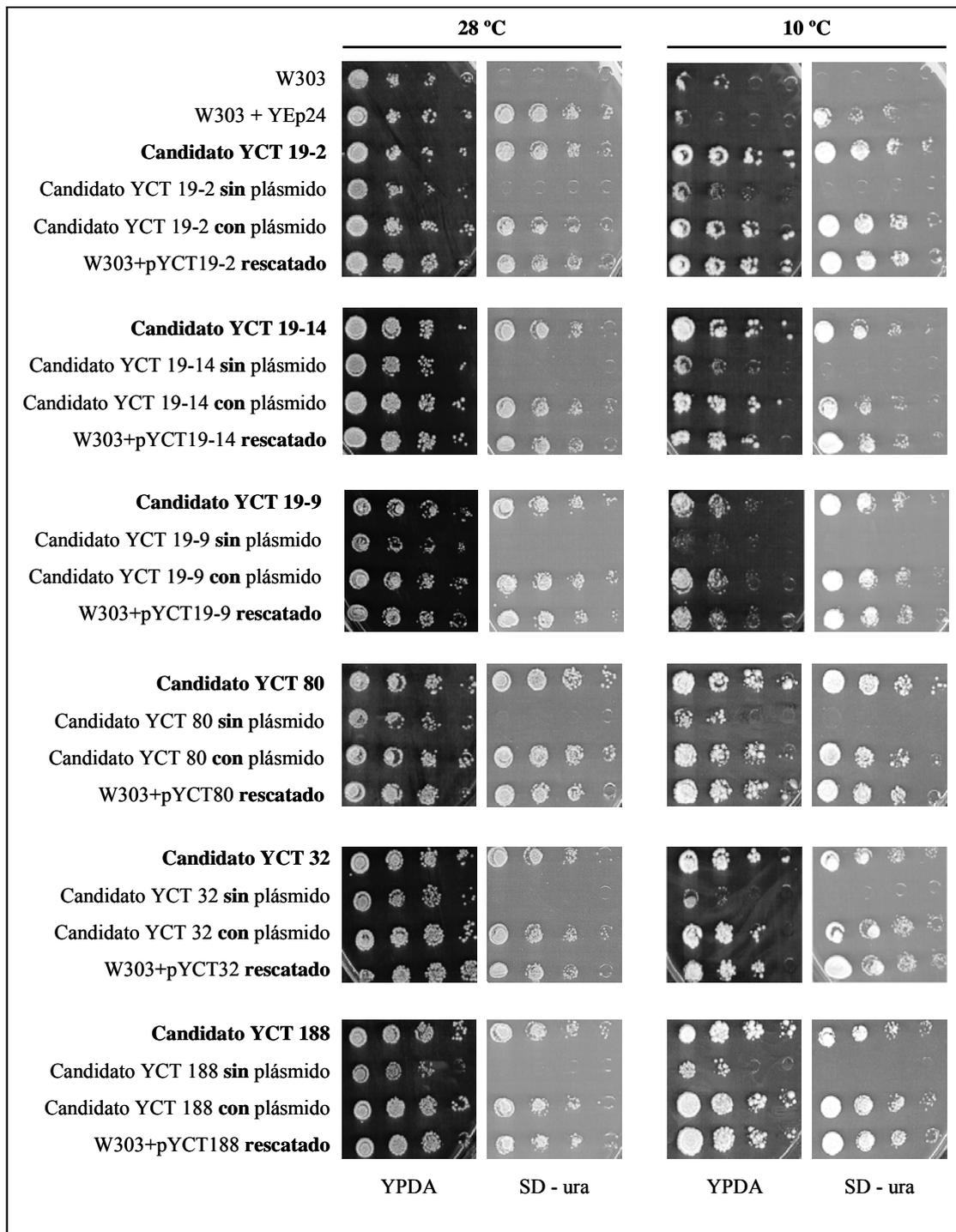


Figura 5. Comparación del crecimiento a 28° C (condiciones control) y 10° C entre la cepa W303, los clones candidatos aislados en el cribado de la genoteca por crecimiento a 10° C, los mismos clones en los que se ha forzado la pérdida de plásmido y otros nuevos obtenidos por transformación con el plásmido rescatado del clon original. Partiendo aproximadamente de 10^7 células/ml de cada uno, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} (de izquierda a derecha) que fueron sembradas sobre YPDA y SD sin uracilo. La incubación a 10° C se llevó a cabo durante 10 ó 15 días, según que se tratase de medio rico o mínimo, respectivamente.

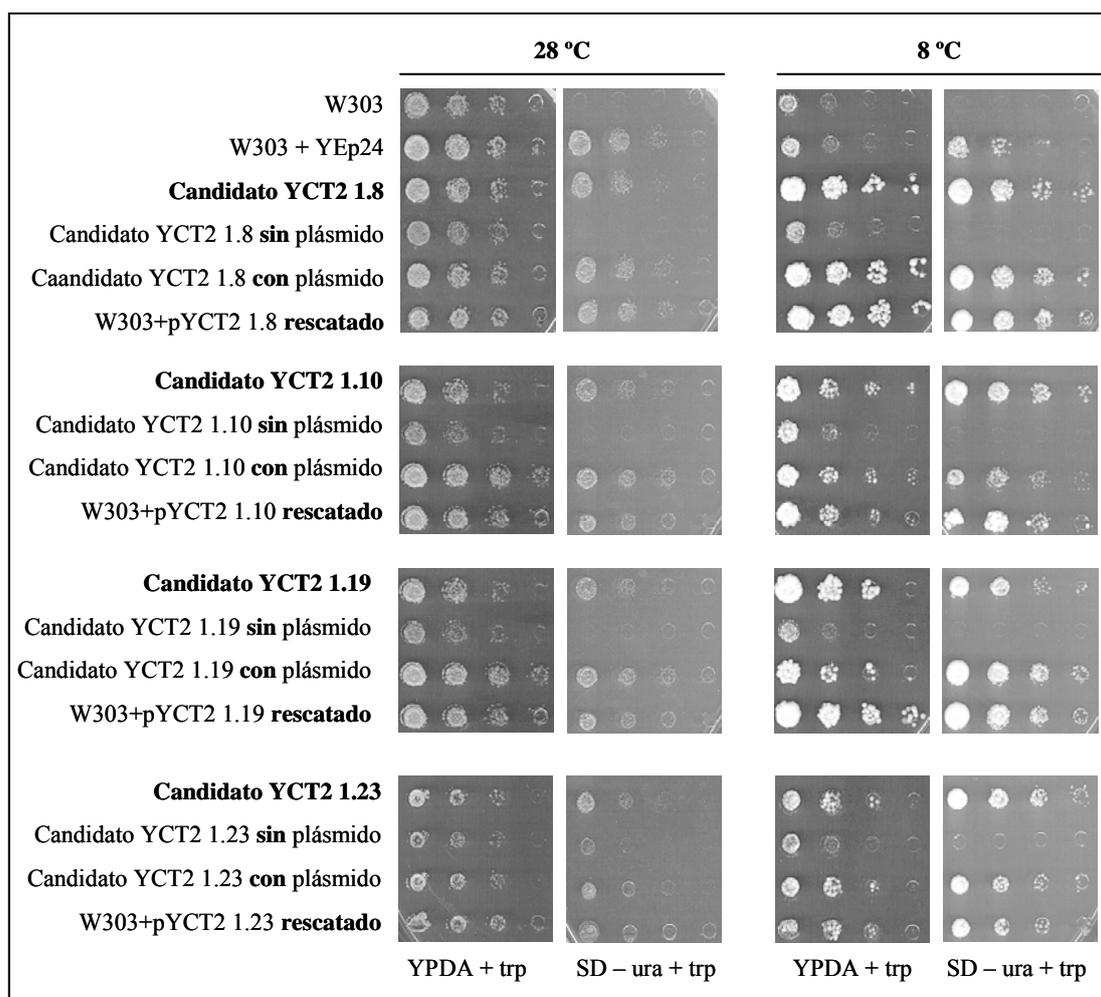


Figura 6. Comparación del crecimiento a 28° C (condiciones control) y 8° C entre la cepa W303, los clones candidatos aislados en el cribado de la genoteca por crecimiento a 8° C, los mismos clones en los que se ha forzado la pérdida de plásmido y otros nuevos obtenidos por transformación con el plásmido rescatado del clon original. Partiendo aproximadamente de 10^7 células/ml de cada uno, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} (de izquierda a derecha) que fueron sembradas sobre YPDA y SD sin uracilo, ambos con exceso de triptófano (2 mg/ml). La incubación a 8° C se llevó a cabo durante 10 ó 15 días, según que se tratase de medio rico o mínimo, respectivamente.

Clon tipo	N° clones	Cromosoma	Coordenadas	Tamaño (bp)	Inserto	
					Gen	Genes incluidos
YCT 19.2	129	XV	284.694 - 293.683	8.989	TAT2	Permeasa de alta afinidad para triptófano y tirosina (Schmidt <i>et al.</i> , 1994)
					YOL019W	Proteína de función desconocida
					YOL019W-A	Proteína hipotética de función desconocida
					<i>TLG2</i>	Miembro de la familia de sintaxinas que forman parte del complejo t-SNARE (Bryant y James, 2001)
YCT 19.14	46	IV	459.314 – 467.529	8.215	TRP1	Fosforibosil antranilato isomerasa, cataliza el 3 ^{er} paso en la biosíntesis de triptófano (Hommel <i>et al.</i> , 1995)
					YDR008C	Dudosa ORF, poco probable que codifique una proteína
					YDR010C	Proteína hipotética
					<i>GAL3</i>	Activador transcripcional implicado en la activación génica en respuesta a galactosa (Torchia y Hopper, 1986)
YCT 19.9	3	II	371.621 – 380.400	8.779	TIP1	Principal manoproteína de la pared celular, con actividad lipasa (Fujii <i>et al.</i> , 1999)
					BAP2	Permeasa de aminoácidos ramificados implicada en el transporte de leucina, isoleucina y valina (Grauslund <i>et al.</i> , 1995)
					TAT1	Permeasa para valina, leucina, isoleucina y tirosina y de baja afinidad para triptófano e histidina (Schmidt <i>et al.</i> , 1994)
					<i>ALG14</i>	Proteína integral del retículo endoplasmático que forma parte de glicosiltransferasa involucrada en la glicosilación de proteínas (Gao <i>et al.</i> , 2005)

Tabla 8. Resultados de secuenciación de los insertos contenidos en los plásmidos aislados de los clones seleccionados a 10° C. Las coordenadas indicadas corresponden a la zona representativa de cada tipo de clon, pudiendo variar ligeramente entre los clones. En negrita se muestran los genes considerados como mejores candidatos para ser los responsables de la mayor capacidad de crecimiento a 10° C.

Clon tipo	N° clones	Cromosoma	Coordenadas	Tamaño (bp)	Inserto	
					Gen	Genes incluidos
						Descripción
YCT 188	1	XV	915.000 – 924.527	9.527	<i>PMT3</i>	O-manosiltransferasa implicada en glicosilación de proteínas (Immervoll <i>et al.</i> , 1995)
					<i>LDB19</i>	Proteína de función desconocida involucrada en el mantenimiento de la apropiada longitud de los telómeros (Askree <i>et al.</i> , 2004)
					<i>PRO2</i>	Gamma-glutamyl-fosfato reductasa, cataliza el 2º paso en la biosíntesis de prolina (Tomenchok y Brandriss, 1987)
YCT 80	2	XI	627.388 – 635.542	8.154	<i>PCK1</i>	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, enzima clave en la gluconeogénesis (Valdés-Hevia <i>et al.</i> , 1989)
					<i>UBP11</i>	Proteasa específica de ubiquitina unida a proteínas (Layfield <i>et al.</i> , 1999)
					YKR096W	Proteína de función desconocida localizada en citoplasma y núcleo
YCT 32	1	XIV	338.060 – 344.598	6.538	<i>ASI2</i>	Proteína integral de la membrana nuclear interna relacionada con el mantenimiento del estado inactivo del sensor de aminoácidos, SPS, en ausencia de señales inductoras (Zargari <i>et al.</i> , 2007)
					<i>PGAI</i>	Proteína esencial localizada en el retículo endoplasmático y relacionada con el tráfico de proteínas (Yu <i>et al.</i> , 2006)
					<i>NSG2</i>	Proteína implicada en la regulación de la biosíntesis de esteroides, estabiliza a una de las dos isoenzimas HMG-CoA que cataliza el paso limitante en la síntesis de esteroides (Flury <i>et al.</i> , 2005)
					YNL155W	Proteína de función desconocida

Tabla 8. (Continuación)

Clon tipo	N° clones	Cromosoma	Coordenadas	Tamaño (bp)	Inserto	
					Gen	Genes incluidos
YCT2 1.8	24	XIII	23.733-31.368	7.635	PHO84	Permeasa de alta afinidad para fosfato inorgánico y de baja afinidad para manganeso (Bun-Ya <i>et al.</i> , 1991)
					YML122C	Dudosa ORF, poco probable que codifique una proteína
					GTR1	Proteína citoplasmática de unión a GTP involucrada en el transporte de fosfato inorgánico (Bun-Ya <i>et al.</i> , 1992)
					NDII	NADH-ubiquinona oxidorreductasa (Vries y Grivell, 1988)
					RRP43	Proteína implicada en el procesamiento del rRNA (Zanchin y Goldfarb, 1999)
YCT2 1.10	1	III	191.688-202.606	10.918	RBK1	Riboquinasa (Thierry <i>et al.</i> , 1990)
					PHO87	Permeasa de baja afinidad para fosfato inorgánico (Bun-Ya <i>et al.</i> , 1996)
					BUD5	Factor intercambiador de GTP/GDP implicado en la iniciación del proceso de gemación (Chant <i>et al.</i> , 1991)
					YCR038W-A	Dudosa ORF, poco probable que codifique una proteína
					MATALPHA2	Represor transcripcional implicado en la regulación del carácter sexual (Porter y Smith, 1986)
					MATALPHA1	Co-activador transcripcional implicado en la regulación del carácter sexual (Bender <i>et al.</i> , 1987)
					YCR041W	Dudosa ORF, poco probable que codifique una proteína
YCT2 1.19	1	X	58.443-66.673	8.230	PHO90	Permeasa de baja afinidad para fosfato inorgánico (Wykoff y O'Shea, 2001)
					MBB1	Dudosa ORF, poco probable que codifique una proteína
					YJL197C-A	Dudosa ORF, poco probable que codifique una proteína
YCT2 1.23	2	III	137.841-145.054	7.213	PGK1	Fosfoglicerato quinasa, enzima clave en glucólisis y gluconeogénesis (Hitzeman <i>et al.</i> , 1980)
					YCR013C	Dudosa ORF, poco probable que codifique una proteína
					POL4	DNA polimerasa IV (Prasad <i>et al.</i> , 1993)
					YCR015C	Proteína de función desconocida
					SNR33	Pequeño RNA nucleolar implicado en el procesamiento del rRNA (Samarsky y Fournier, 1999)
					YCR016W	Proteína de función desconocida localizada en núcleo y nucléolo

Tabla 9. Resultados de secuenciación de los insertos contenidos en los plásmidos aislados de los clones seleccionados a 8° C. Las coordenadas indicadas corresponden a la zona representativa de cada de cada tipo de clon, pudiendo variar ligeramente entre los clones. En negrita se muestran los genes considerados como mejores candidatos para ser los responsables de la mayor capacidad de crecimiento a 8° C.

2.4 Sobreexpresión de los genes candidatos. Estudio de la tolerancia a frío

2.4.1 La sobreexpresión de *TAT2*, *TAT1*, *TRP1*, *PRO2*, *PCK1* o *NSG2* en W303 mejora su crecimiento a 10° C

En la figura 7 se aprecia, por comparación de las cepas transformadas frente a diversos controles (la cepa sin transformar y la cepa transformada sólo con el vector), un incremento en la producción de biomasa a baja temperatura debido al aumento en la expresión de los genes *TAT2/YOL020W*, *TAT1/YBR069C* y *TRP1/YDR007W*. Estos 3 genes están relacionados con la disponibilidad intracelular de triptófano ya que el gen *TAT2* codifica una permeasa de alta afinidad para triptófano y tirosina mientras que el gen *TAT1* codifica una permeasa para valina, leucina, isoleucina y tirosina y de baja afinidad para triptófano e histidina (Schmidt *et al.*, 1994). El gen *TRP1* codifica la enzima fosforibosil antranilato isomerasa que cataliza el 3^{er} paso en la biosíntesis de triptófano (Hommel *et al.*, 1995). Sin embargo, los genes candidatos *BAP2/YBR068C* y *TIP1/YBR067C* no demostraron ser los responsables de la mejora del fenotipo que presenta el clon candidato YCT 19-09, tal y como se aprecia en la figura 7. El gen *BAP2*, que codifica una permeasa de alta afinidad para leucina que funciona como permeasa para aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) (Grauslund *et al.*, 1995), ha sido relacionado con la respuesta al estrés inducido por la carencia de nutrientes (Omura y Kodama, 2004). *TIP1*, que codifica la principal manoproteína de la pared celular con actividad lipasa (Fujii *et al.*, 1999), fue considerado como posible responsable ya, que se induce tanto por “cold shock” como por “heat shock”, además *TIP1* forma parte de un conjunto de manoproteínas, que presentan homología entre sí y que también son inducidas por “cold shock”, como *TIR1/YER011W*, *TIR2/YOR010C* y *TIR4/YOR009W* (Kowalski *et al.*, 1995).

En la figura 8 se aprecia que el tiempo de latencia en medio YPD en las cepas transformadas con los genes *TAT2* (115 h), *TRP1* (118 h) y *TAT1* (118 h) se reduce sustancialmente frente a la cepa parental W303 (260 h). No se obtuvo la disminución esperada para la cepa parental en el tiempo de generación lo que nos llevó a analizar el porcentaje de revertientes de la auxotrofia a triptófano. El porcentaje de revertientes al principio de la fase de latencia era del 0,7%, al iniciarse la fase exponencial era de 51,2% y al final de la misma de 70,5%. Por lo tanto, no es de extrañar que la cinética de

crecimiento sea semejante a las de las cepas que sobreexpresan genes que complementan la auxotrofia para triptófano.

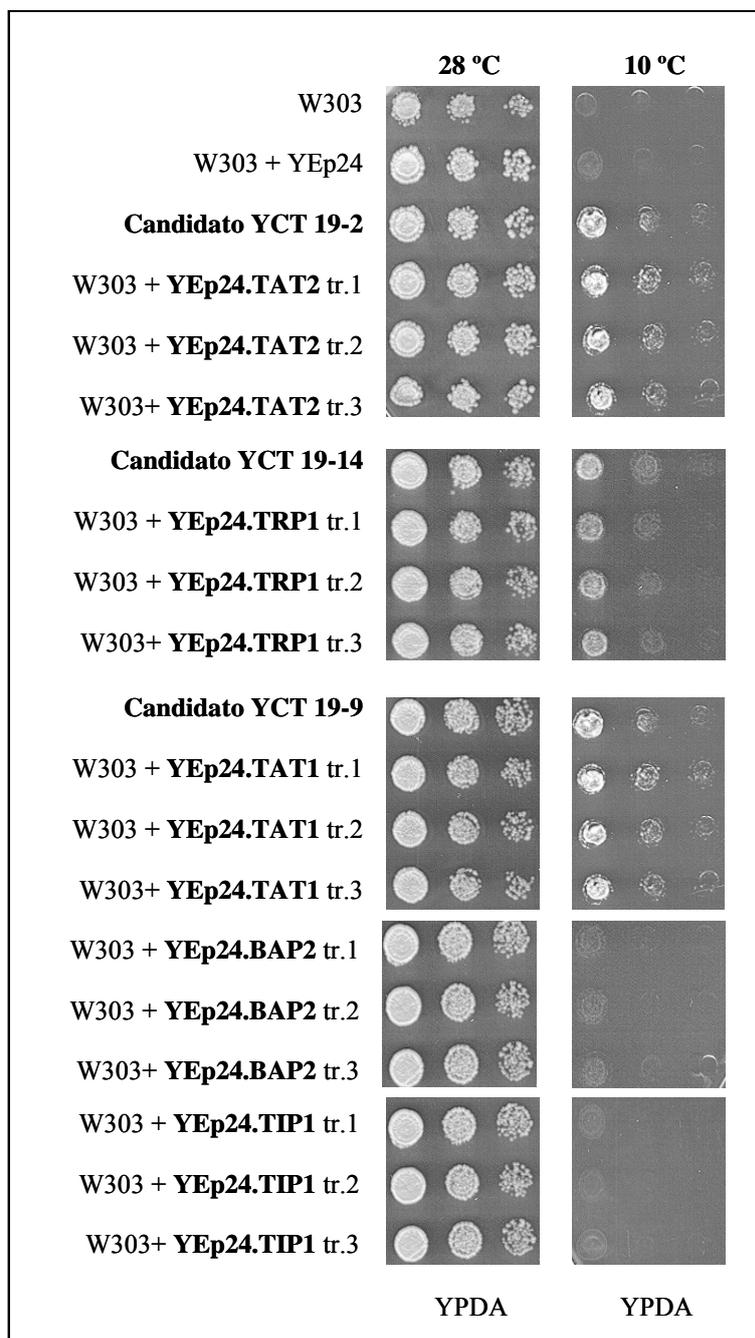


Figura 7. Crecimiento a 28° C (condiciones control) y 10° C de los clones candidatos comparados con los clonajes individuales de los genes *TAT2*, *TRP1*, *TAT1*, *BAP2* y *TIP1*. Las condiciones del experimento ya se han descrito en la figura 5.

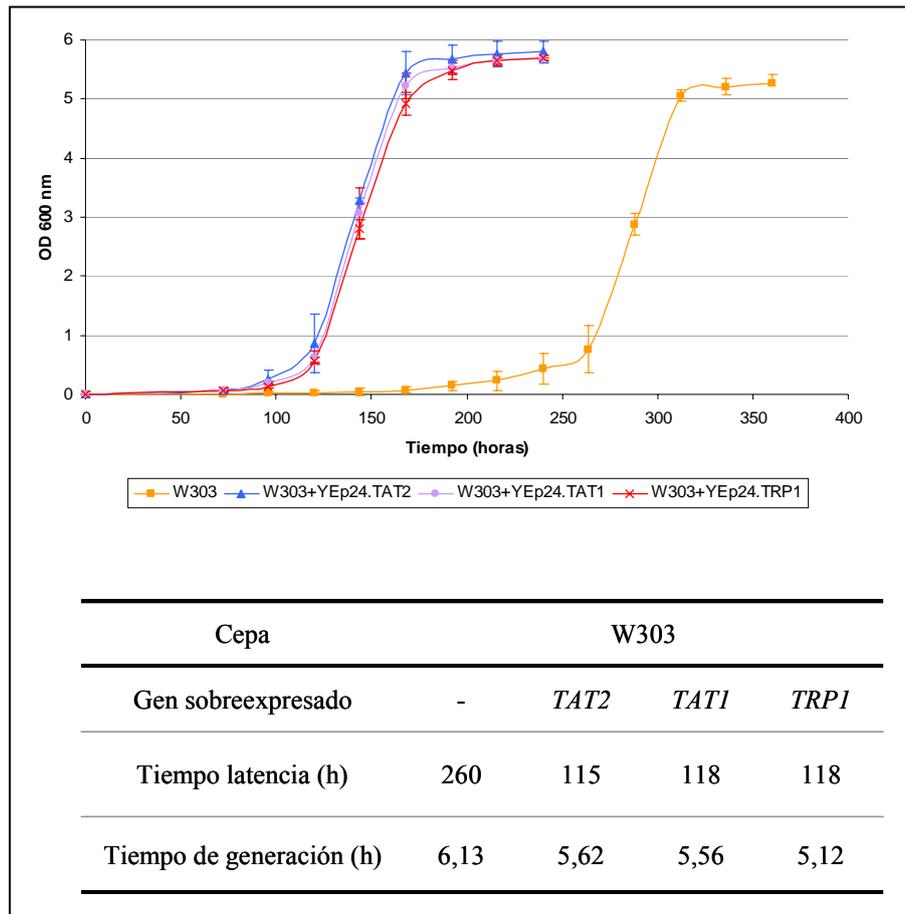


Figura 8. Curvas de crecimiento a 10° C en medio YPD de la cepa parental W303 y de la misma sobreexpresando los genes *TAT2*, *TAT1* y *TRP1*.

Para conseguir la identificación del gen responsable de la mayor capacidad de crecimiento en frío conferida por el plásmido YCT 32, en una primera aproximación se comprobó el gen *ASI2/YNL159C*, que codifica una proteína localizada en la membrana nuclear interna asociada a sistemas de regulación dependientes de ubiquitina que regulan negativamente la transcripción de genes de permeasas de aminoácidos (Forsberg *et al.*, 2001). De hecho, se ha visto que mutaciones recesivas en los genes *ASI* restauran el crecimiento en medio sintético complejo en cepas con mutaciones en uno de los componentes del sistema sensor de aminoácidos de la membrana plasmática, *Ssy1p*, produciendo un aumento en la transcripción de diversas permeasas de aminoácidos. Por tratarse de un componente implicado en la regulación de la expresión de permeasas de aminoácidos, se consideró conveniente someterlo al bioensayo en frío pero, tal y como era de esperar por ser un regulador negativo, se vio que su sobreexpresión no confiere una mayor capacidad de crecimiento a bajas temperaturas (figura 9), por lo que fue descartado.

Se procedió de idéntica manera con otro de los genes incluidos en el inserto: *PGAI*/YNL158W, que codifica una proteína esencial que, además, resulta ser una proteína integral de la membrana del retículo endoplasmático (Yu *et al.*, 2006) que participa en el procesamiento o transporte en el mismo de Gas1p, implicada en el ensamblaje de la pared celular. Recientes estudios consideran a Pga1p como una de las subunidades del complejo glicofosfatidilinositol-manosil transferasa II que resulta ser esencial para la maduración de Gas1p (Sato *et al.*, 2007). Al someter a la cepa W303 transformada con el plásmido YEp24.*PGAI* al bioensayo de crecimiento en frío, no se confirmó el fenotipo (figura 9) con lo que el gen *PGAI* quedó descartado.

Se estudió otro de los genes incluidos en el inserto que porta YCT32, el gen *NSG2*/YNL156C que resultó ser el responsable del fenotipo ya que su sobreexpresión provoca una mejora en el crecimiento a 10° C (figura 9). En la figura 10 se muestra la cinética de crecimiento en medio YPD al sobreexpresar *NSG2*, con un tiempo de latencia de 118 horas y un tiempo de generación en la fase exponencial de 5,62 horas. El gen *NSG2* codifica una chaperona selectiva que estabiliza a Hmg2p, una de las enzimas claves implicadas en la biosíntesis de ergosterol (Flury *et al.*, 2005).

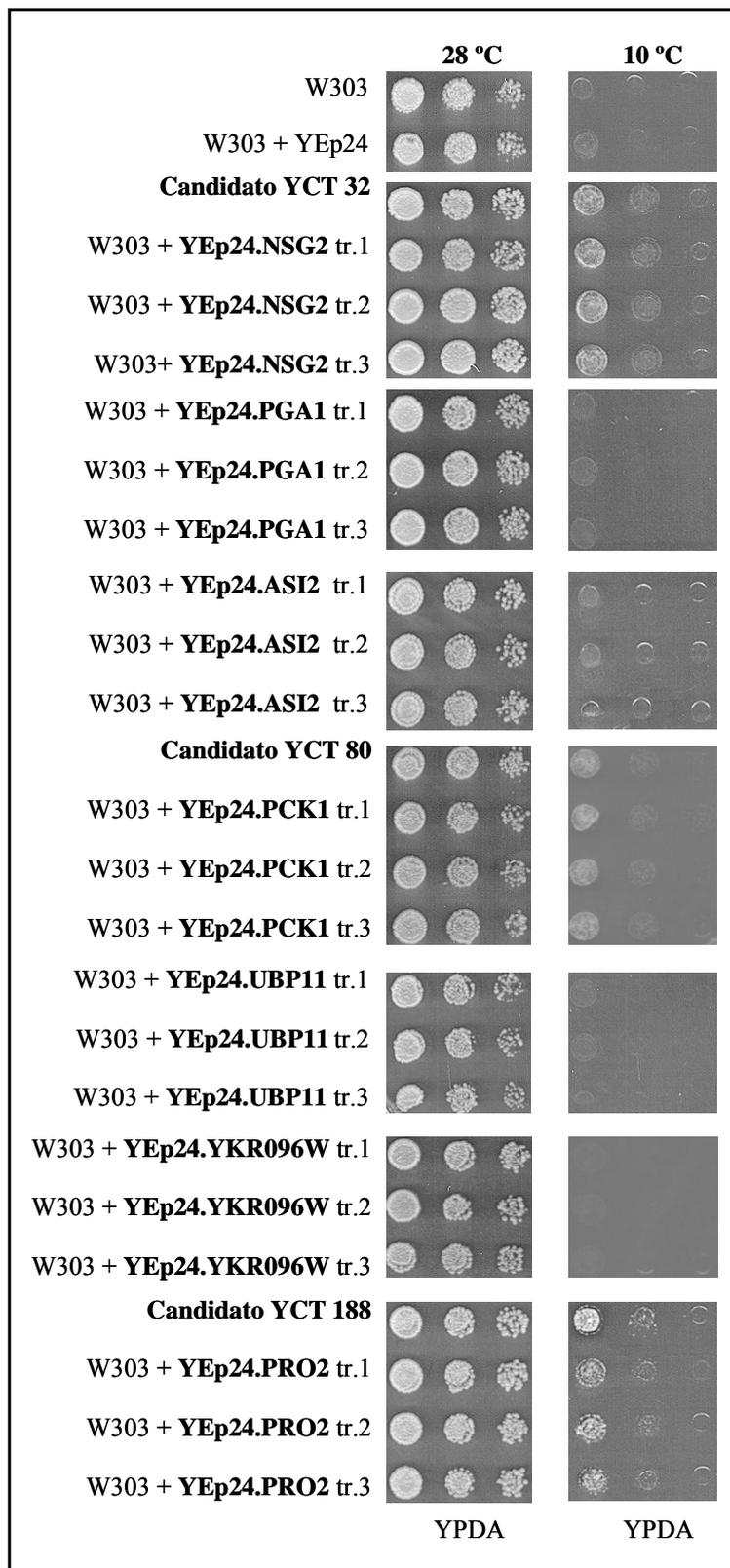


Figura 9. Crecimiento a 28° C (condiciones control) y 10° C de los clones candidatos comparados con los clonajes individuales de los genes *NSG2*, *PGA1*, *ASI2*, *PCK1*, *UBP11*, *YKR096W* y *PRO2*. Las condiciones del experimento ya se han descrito en la figura 5.

Para el plásmido YCT 80 se seleccionó al gen *UBP11/YKR098C* que codifica una proteasa del sistema proteolítico dependiente de ubiquitina y que, específicamente, libera a ésta de su unión con proteínas que han sido “ubiquitinadas”, es decir, modificadas por unión covalente de moléculas de ubiquitina. Este gen fue identificado en un cribado de genes que, mediante sobreexpresión, conferían resistencia al fármaco inmunosupresor FTY720. En este mismo estudio fueron identificados *TAT1* y *TAT2* (Welsch *et al.*, 2003). Ubp11p libera ubiquitina de proteínas “marcadas” para su degradación por el sistema proteolítico dependiente de dicha molécula, por lo que se ha propuesto que podría estabilizar a dichas proteínas. Contrariamente, también se ha propuesto que estas proteasas específicas para moléculas de ubiquitina unidas a proteínas, podrían favorecer la degradación de proteínas, ya que proveen a la célula de ubiquitina libre y reutilizable (Hershko y Ciechanover, 1998). Por todo lo expuesto, no parece que hayan quedado claramente establecidas las consecuencias, en relación con la estabilidad de las proteínas, de la sobreexpresión de *UBP11*. No obstante, y especialmente debido a la semejanza en el fenotipo frente al fármaco FTY720 que la sobreexpresión de éste gen presenta en relación con el de la sobreexpresión de las permeasas de triptófano, se decidió proceder al subclonaje del gen *UBP11* en YEp24 y su posterior introducción en células de levadura. Sin embargo, en este caso la sobreexpresión de *UBP11* no emula al efecto de la sobreexpresión de las permeasas de triptófano, por lo que dicho gen quedó descartado (figura 9).

Se procedió de forma similar con el gen *YKR096W*, que codifica una proteína de 1.195 aminoácidos cuya función se desconoce y que se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo. La sobreexpresión de este gen tampoco mejora la capacidad de crecimiento de la cepa parental a 10° C (figura 9).

Por último, se procedió al subclonaje de *PCK1/YKR097W* que codifica la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa que resulta clave en la gluconeogénesis para la formación de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato. Tal y como se observa en la figura 9, se trata de otro de los genes identificados como responsables de la mejoría en el crecimiento a 10° C. En la figura 10 se muestra la cinética de crecimiento en medio YPD al sobreexpresar *PCK1*, con un tiempo de latencia de 124 horas y un tiempo de generación en la fase exponencial de 5,47 horas.

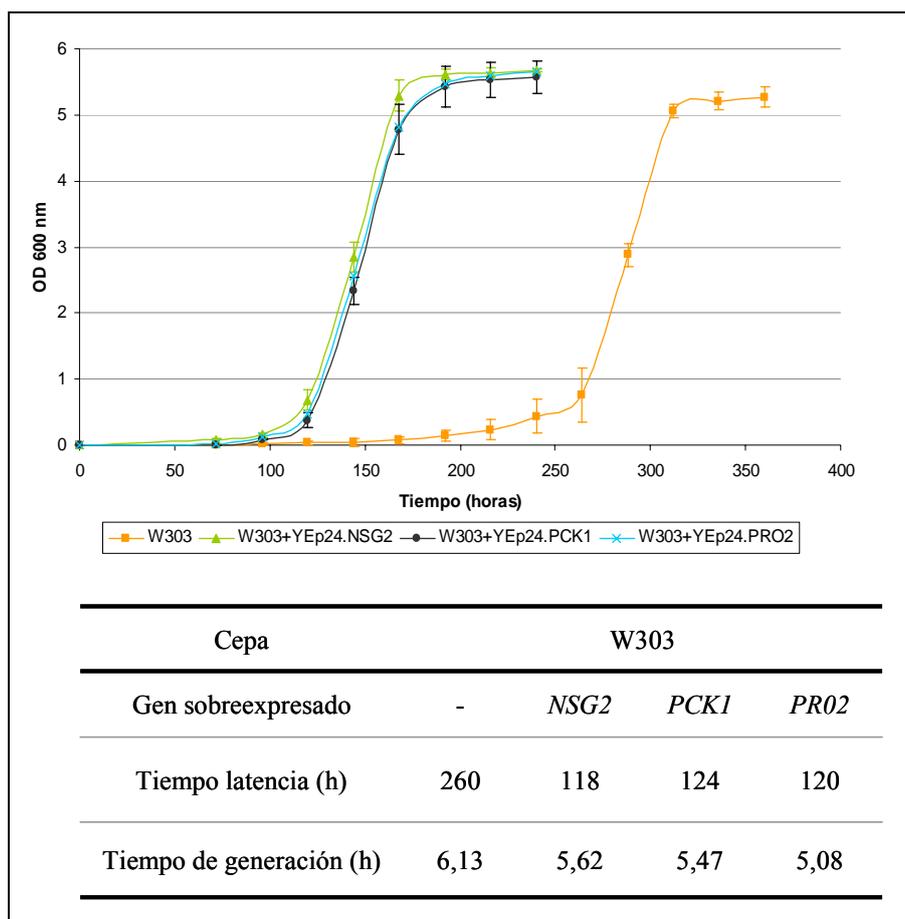


Figura 10. Curvas de crecimiento a 10° C en medio YPD de la cepa parental W303 y de la misma sobreexpresando los genes *NSG2*, *PCK1* y *PRO2*.

Asimismo, se identificó al gen *PRO2/YOR323C* como responsable del aumento de la capacidad de crecimiento a 10° C del clon seleccionado YCT 188 (figura 9). Dicho gen codifica una gamma-glutamil-fosfato reductasa (γ -GPR) que cataliza el segundo paso en la biosíntesis de prolina. En la figura 10 se muestra la cinética de crecimiento en medio YPD al sobreexpresar *PRO2*, con un tiempo de latencia de 120 horas y un tiempo de generación en la fase exponencial de 5,08 horas.

En la figura 11 se aprecia el crecimiento tras 6 días de incubación a 10° C de la cepa W303 y de la misma transformada con un plásmido consistente en el vector multicopia YEp24 portador de un inserto correspondiente a cada uno de los genes identificados como responsables de la mayor capacidad de crecimiento a dicha temperatura.

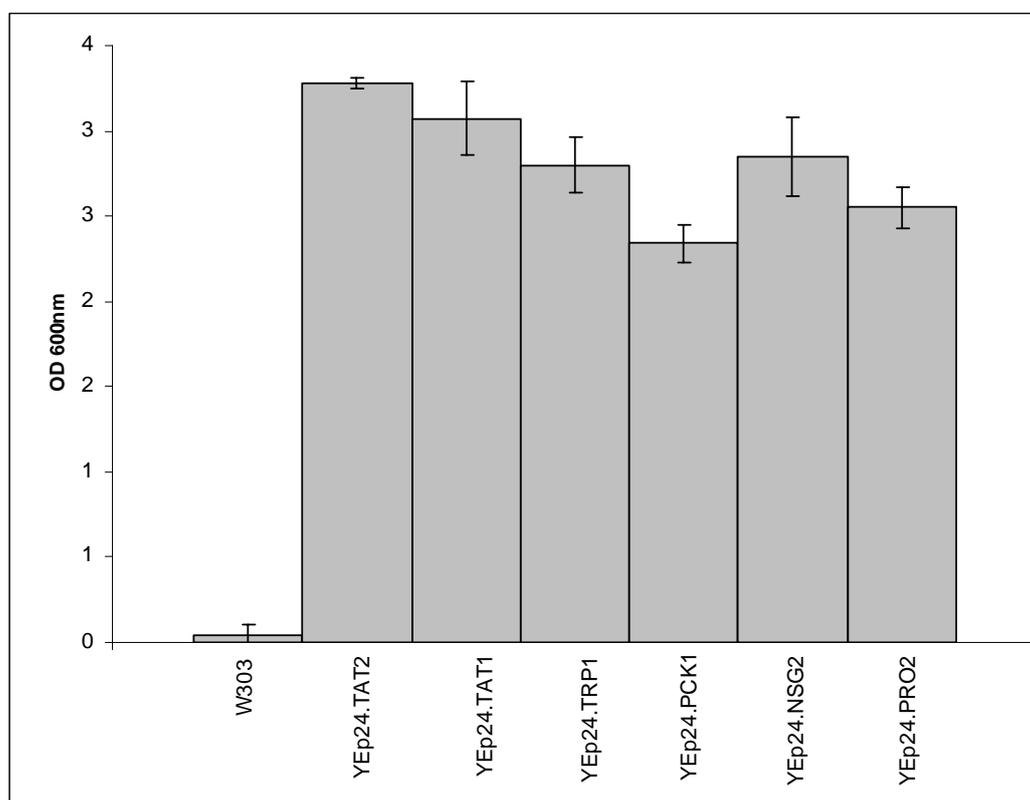


Figura 11. Crecimiento tras 6 días de incubación a 10° C y en medio rico de la cepa W303 y de la misma cepa sobreexpresando cada uno de los genes identificados como responsables de la mayor capacidad de crecimiento a dicha temperatura. Los datos mostrados representan la media de la medida de la densidad óptica de tres experimentos independientes con sus correspondientes desviaciones estándar.

2.4.2 La sobreexpresión de *PHO84*, *GTR1*, *PHO87*, *PHO90* o *YCR015C* en W303 mejora su crecimiento a 8° C en medio rico con exceso de triptófano

Dado que el 94% de los genes identificados en el cribado de la genoteca a 10° C se relacionaban con la biosíntesis o el transporte de triptófano, procedimos a estudiar otros genes cuya sobreexpresión pudiera dotar a la levadura de una mayor capacidad de crecimiento en frío en condiciones en las que la disponibilidad de triptófano no fuera un factor limitante. Tras este nuevo cribado de la genoteca, realizado a 8° C y en medio rico con triptófano en exceso (0,2% (p/v)), se identificaron 5 genes (*PHO84/YML123C*, *GTR1/YML121W*, *PHO87/YCR037C*, *PHO90/YJL198W* e *YCR015C*) cuya sobreexpresión confiere una mayor tasa de crecimiento a 8° C en comparación con la que presenta la cepa parental (figura 12).

El subclonaje de forma individual tanto de *PHO84* como de *GTR1* mejora el crecimiento a 8° C, pero ninguno de ellos por separado iguala el crecimiento del clon salvaje YCT2 1.8, por lo que se realizó el clonaje en YEp24 de los dos genes conjuntamente. También se observa la mejoría en la tasa de crecimiento de las construcciones que contienen los genes *PHO87*, *PHO90* y *YCR015C*, que igualan a los clones YCT2 1.10, YCT2 1.19 e YCT2 1.23, respectivamente. En la figura 13 se aprecia que el tiempo de latencia en las cepas transformadas con los genes *PHO84-GTR1* (120 h), *PHO87* (123 h), *PHO90* (118 h) e *YCR015C* (122 h) se reduce frente a la cepa parental W303 (161 h). El tiempo de generación de la cepa parental no presentaba la diferencia esperada frente a las cepas con los genes identificados, posiblemente debido al fenómeno de reversión del marcador auxotrófico de triptófano explicado en el apartado anterior. En cuanto al clon YCT2 1.23 finalmente *YCR015C* resultó ser el responsable del fenotipo estudiado como se aprecia en la figura 12. Dicho gen, del que sólo se sabe que no es esencial, codifica para una proteína de función desconocida que presenta homología de secuencia con diversas fosfoserina fosfatasas de origen bacteriano, y que en *Saccharomyces cerevisiae* interacciona con Gtr2p, homólogo de Gtr1p (Gavin et al., 2002). El gen *SNR33*, contenido en el mismo inserto que *YCR015* en el clon YCT 1.23, codifica un pequeño RNA nucleolar implicado en procesamiento rRNA (Samarsky y Fournier, 1999) fue descartado al no mejorar el crecimiento de la cepa salvaje a bajas temperaturas (figura 12).

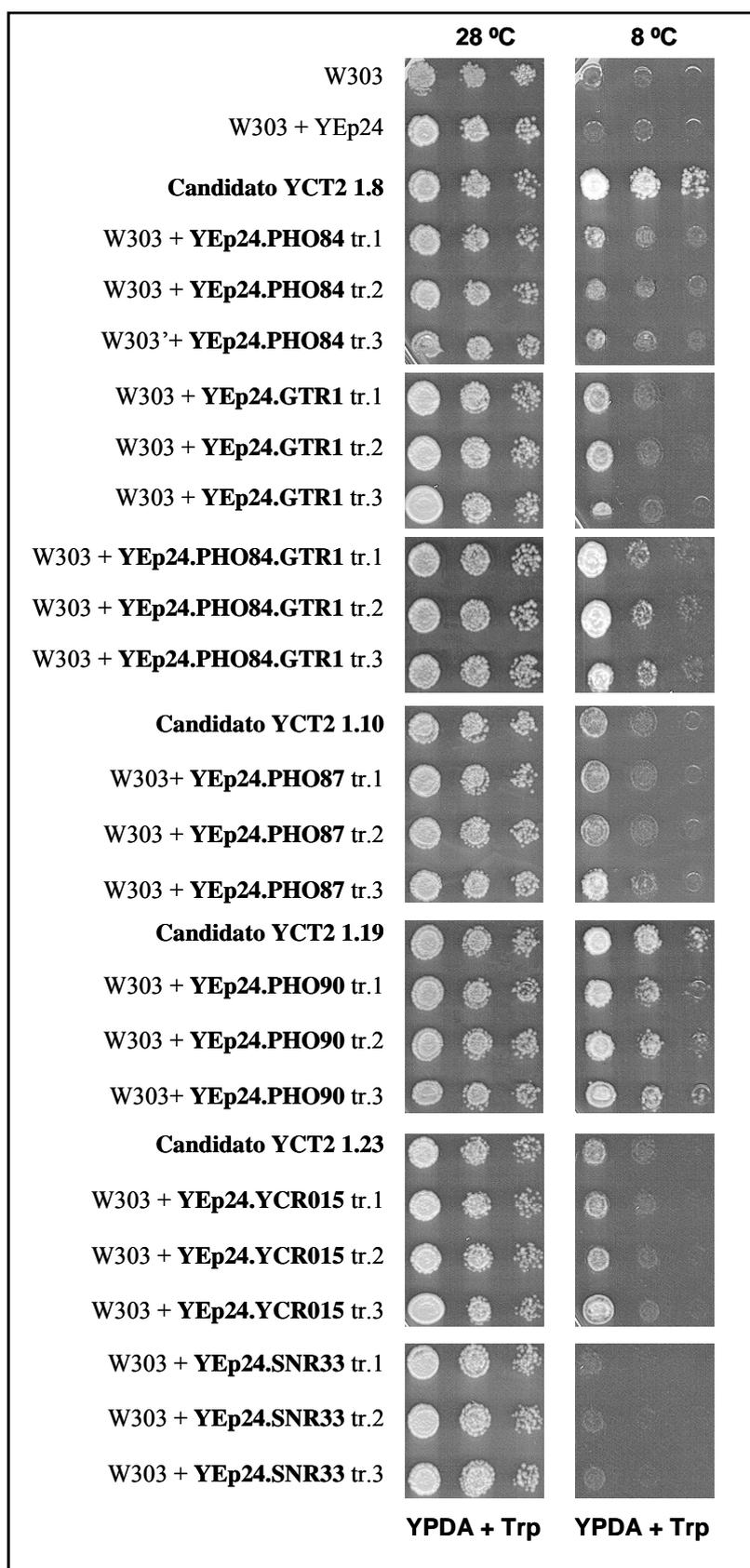


Figura 12. Crecimiento a 28° C (condiciones control) y 8° C de los clones candidatos comparados con los clonajes individuales de los genes *PHO84*, *GTR1*, *PHO87*, *PHO90*, *YCR015C* y *SNR33*. Las condiciones del experimento ya se han descrito en la figura 6.

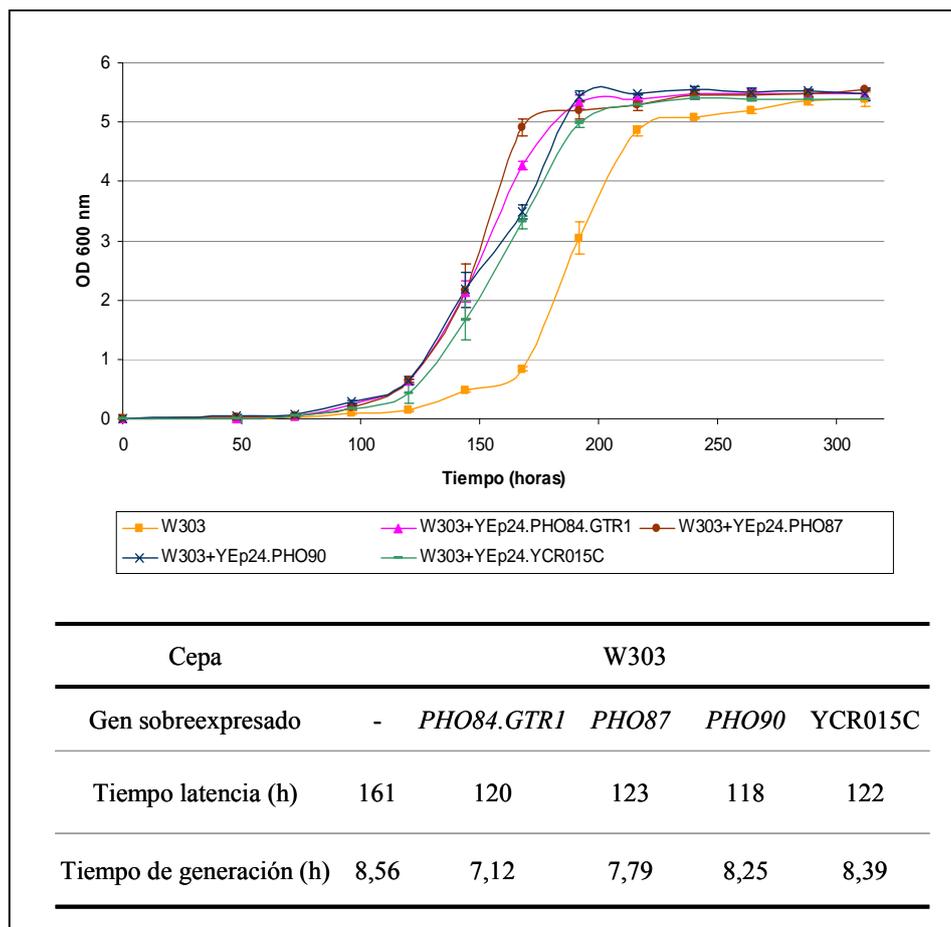


Figura 13. Curva de crecimiento a 8° C en medio YPDT de la cepa parental W303 y de la misma sobreexpresando los genes *PHO84*, *GTR1*, *PHO87*, *PHO90* e *YCR015C*.

En la figura 14 se aprecia el crecimiento, tras 6 días de incubación a 8° C y en medio rico con exceso de triptófano, de la cepa W303 y de la misma transformada con un plásmido multicopia que permite la sobreexpresión de cada uno de los genes identificados en el presente cribado como responsables de la mayor capacidad de crecimiento a 8° C.

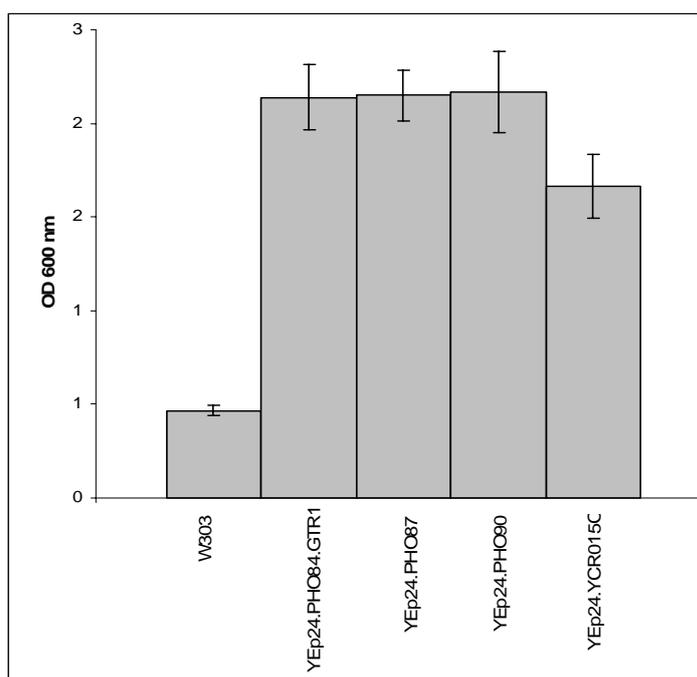


Figura 14. Crecimiento tras 6 días de incubación a 8° C y en medio rico con un exceso de triptófano (2 mg/ml) de la cepa W303 y de la misma cepa sobreexpresando cada uno de los genes identificados como responsables de la mayor capacidad de crecimiento a dicha temperatura. Los datos mostrados representan la media de la medida de la densidad óptica de tres experimentos independientes con sus correspondientes desviaciones estándar.

3 La prototrofia al triptófano o el exceso de triptófano y la tolerancia a frío

Como se ha visto, el evento más relevante que dispara la sensibilidad a las bajas temperaturas es la privación de triptófano. Los efectos del frío se ven atenuados mediante la adición de un exceso de triptófano, la prototrofia a triptófano (figura 15), la reversión de la auxotrofia mediante la sobreexpresión del gen *TRP1*, o también por la sobreexpresión de los genes que codifican para los transportadores de triptófano Tat2p y Tat1p (figura 7). Cabe comentar que la cepa RS-452, que es Trp^+ , crece mejor que W303 a 10° C, probablemente debido a su capacidad para sintetizar triptófano. De hecho, al suplementar el medio de cultivo con triptófano en exceso, el crecimiento de ambas cepas se iguala, ya que el comportamiento de la cepa RS-452 apenas varía y el de W303 mejora sustancialmente. En ambas cepas el crecimiento a

bajas temperaturas mejora al añadir simultáneamente en el medio de cultivo triptófano (0,2%, p/v) y fosfato inorgánico (10 mM) (figura 15).

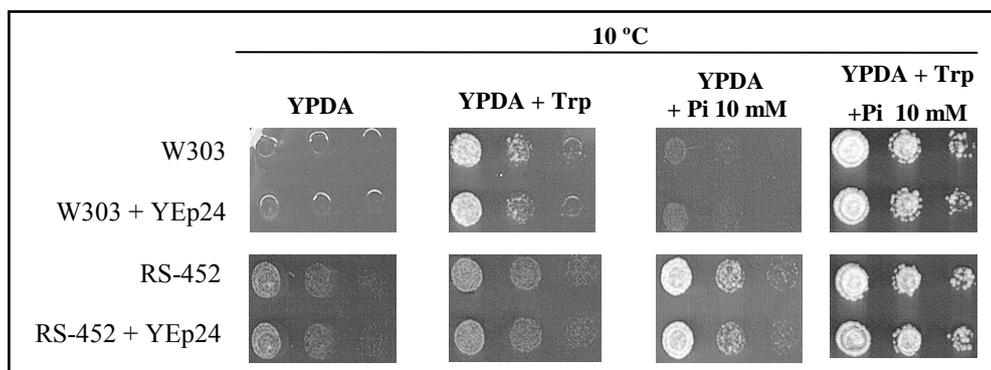


Figura 15. Crecimiento de la cepa W303 (auxótrofa para triptófano) y de la cepa RS-452 (protótrofa para triptófano) en YPDA y el mismo medio suplementado con triptófano (0,2%, p/v), fosfato inorgánico (10 mM) o ambos.

3.1 Sobreexpresión de los genes identificados en una cepa protótrofa para triptófano

Para explorar la posible mejora en la susceptibilidad a las bajas temperaturas de las cepas industriales (no presentan auxotrofias), se sobreexpresaron los genes identificados en el presente trabajo en una cepa de laboratorio protótrofa para el triptófano, RS-452. La sobreexpresión de los genes relacionados con el transporte de triptófano o con su biosíntesis (*TAT2*, *TAT1* y *TRP1*), en una cepa Trp^+ (RS-452) no mitiga su sensibilidad al frío. Sin embargo, ésta sí se vio ligeramente atenuada al sobreexpresar los genes *NSG2*, *PCK1* y *PRO2* (figura 16).

La sobreexpresión de los genes identificados en el cribado de la genoteca a 8° C y con exceso de triptófano (*PHO84*, *GTR1*, *PHO87*, *PHO90* e *YCR015C*) mejora el crecimiento de la cepa RS-452. Además, y análogamente a lo que ocurría con la cepa W303 cuando se cultivaba en un medio con triptófano en alta concentración, en el caso de RS-452 también se consigue mejorar su crecimiento a 8° C añadiendo fosfato inorgánico en alta concentración (10 mM) (figura 17).

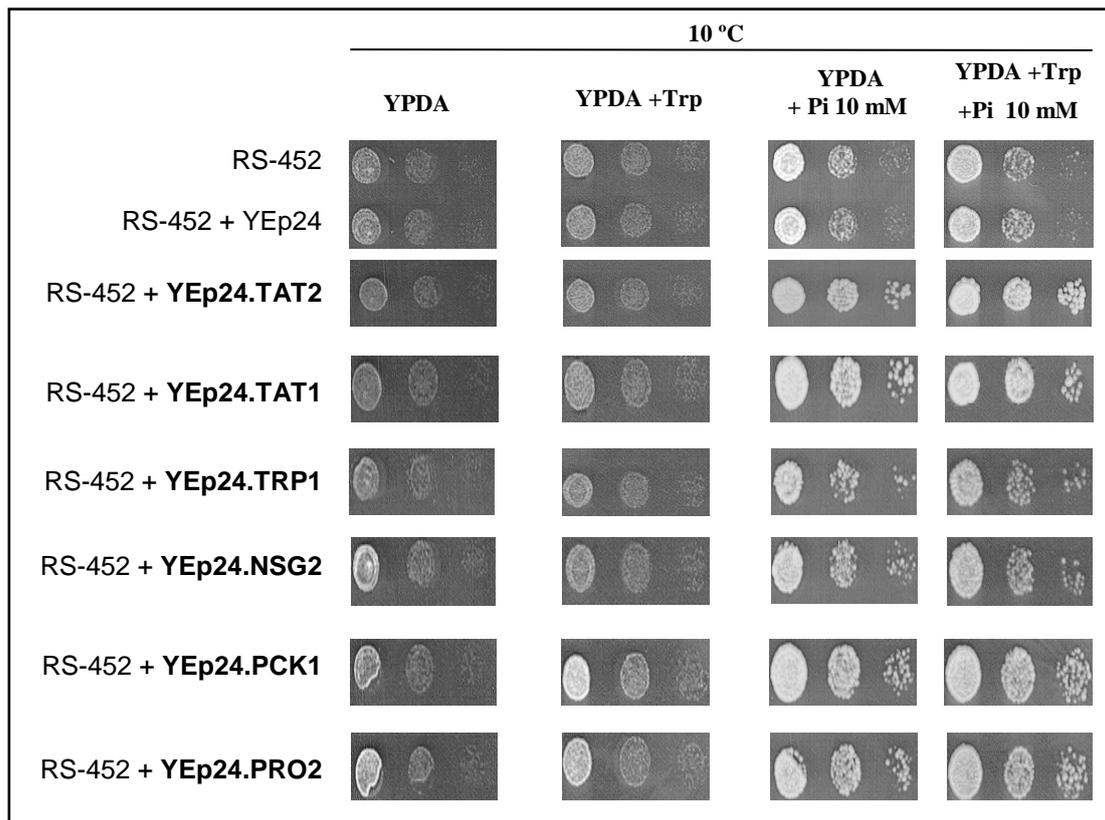


Figura 16. Sobreexpresión en la cepa RS-452 (que es Trp⁺) de los genes identificados en el cribado a 10° C en medio rico.

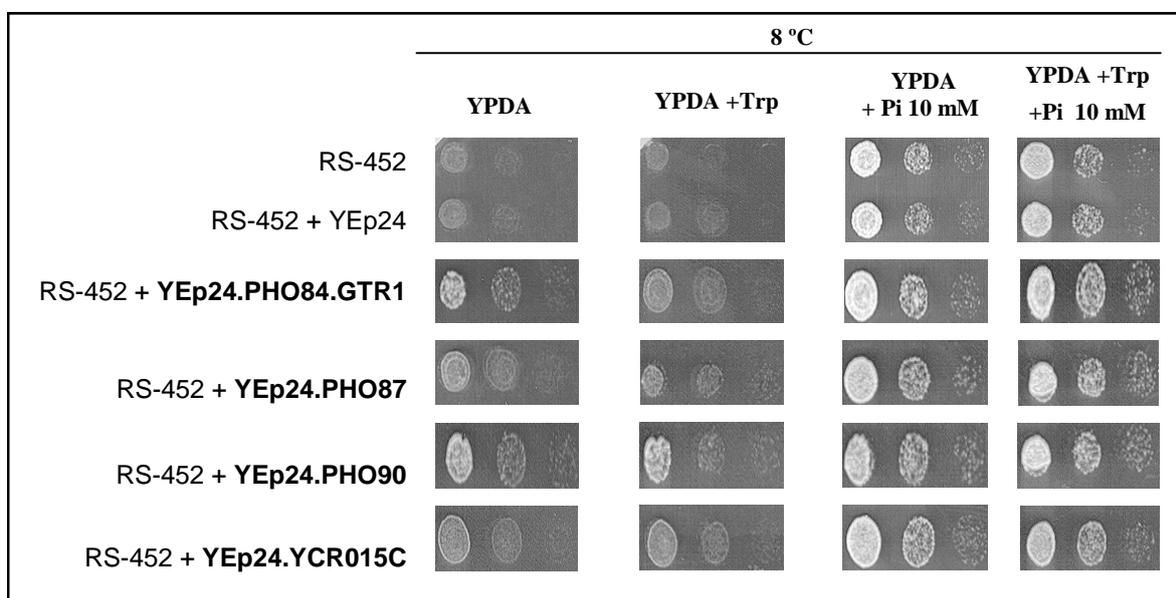


Figura 17. Sobreexpresión en la cepa RS-452 (que es Trp⁺) de los genes identificados en el cribado a 8° C en medio rico con triptófano en exceso.

4 Estudio de los niveles de expresión de *TAT2*, *TAT1* y *PHO90* a bajas temperaturas

Hasta el momento se han publicado diversos estudios que versan sobre la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* frente al frío. Los resultados más relevantes de los mismos ya fueron descritos en la Introducción de esta Tesis. No obstante, y a la luz de los resultados alcanzados en este trabajo hasta este momento, se quiso indagar cuáles eran los niveles de transcripción publicados en los distintos trabajos para cada uno de los genes para los que habíamos establecido una relación causa-efecto entre su sobreexpresión y una mayor capacidad de la levadura para crecer a bajas temperaturas (*TAT2*, *TAT1*, *TRP1*, *NSG2*, *PCK1*, *PRO2*, *PHO84*, *GTR1*, *PHO87*, *PHO90* e *YCR015C*). En primer lugar cabe destacar que las condiciones de crecimiento de las células de levadura seguidas en cada uno de los experimentos correspondientes a los estudios ya publicados, difieren bastante de la estrategia adoptada en este trabajo, ya que en la mayoría de ellos (Murata *et al.*, 2006; Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.* 2004) se crecen las células a la temperatura óptima de crecimiento para cada cepa y, una vez alcanzada la mitad de la fase exponencial, se disminuye bruscamente la temperatura a 4° ó 10° C, dependiendo del estudio. Esto se denomina “cold shock” y en esta Tesis el planteamiento experimental ha sido completamente diferente. En nuestro caso, el objetivo era identificar qué genes de la levadura le van a permitir crecer mejor al sobreexpresarse en una condición continuada de crecimiento a bajas temperaturas, situación que también impone un estrés sobre la levadura pero en un contexto y unas circunstancias distintas a las del “cold shock”. Además, en cada estudio se utilizaron cepas diferentes entre sí y también distintas de la empleada en este trabajo. Las diferencias más relevantes entre estos 4 estudios ya publicados quedan reflejadas en la tabla 10, así como los resultados correspondientes a los niveles de expresión de aquellos genes (de entre los 11 identificados en este trabajo) que presentaron variaciones significativas en su tasa transcripcional. Los resultados difieren mucho de un estudio a otro y tan sólo se aprecia cierta similitud en la inducción de *PCK1* desde una etapa temprana de la exposición al frío y en la ligera represión de los genes que codifican permeasas para triptófano, *TAT2* y *TAT1*.

Así pues, se decidió proceder a cuantificar, mediante la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena a tiempo real, el nivel de expresión de los genes *TAT2*, *TAT1* y

PHO90 en la cepa W303 cuando se encuentra creciendo a 28° ó 10° C. La elección de estos 3 genes entre los 11 que habíamos identificado previamente, se debió a que la sobreexpresión de manera individual de los mismos, daba lugar al mejor crecimiento y mayor producción de biomasa en la cepa W303. En la figura 18 se muestran los cocientes normalizados de la expresión a 28° y 10° C de estos tres genes. Al comparar el cociente normalizado del nivel de expresión a 10° C y el cociente normalizado del nivel de expresión a 28° C, se observa que a 10° C el gen *TAT2* está ligeramente inducido (2,3) *TAT1* está marcadamente inducido (5,5) y *PHO90* reprimido (0,18).

Los resultados obtenidos no coinciden con los publicados y obtenidos mediante el análisis de la expresión génica por micromatrices de cDNA comentados anteriormente. Las razones de estas discrepancias podrían deberse al conjunto de variables que presentan diferencias entre los distintos experimentos, tales como las condiciones de cultivo, el tiempo en el que se realiza el aislamiento de los mRNA, las cepas utilizadas en cada estudio o incluso las diferentes técnicas de cuantificación empleadas.

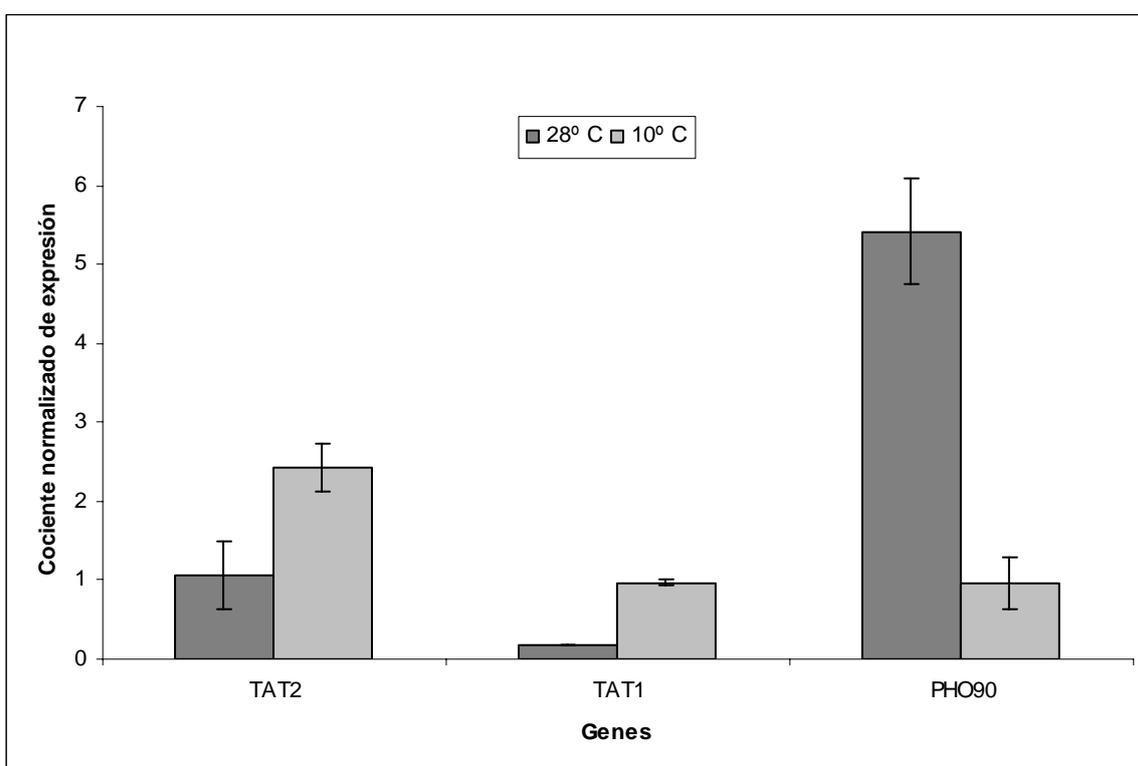


Figura 18. Expresión relativa de los genes *TAT2*, *TAT1* y *PHO90* en la cepa W303 crecida a 28° C ó 10° C. Los resultados mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes con sus correspondientes desviaciones estándar.

	Cepa (Genotipo)	Condiciones cultivo	Toma de muestra (h)	Genes inducidos	Genes reprimidos
Murata <i>et al.</i> , 2006	S288c (<i>MATα SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>)	25° C hasta OD (660 nm) 0,5 ↓ cambio a 4° C	6 / 12 / 24 / 48	<i>PCK1</i> ^b	<i>TAT1</i> ^c <i>TAT2</i> ^c a 48h
Schade <i>et al.</i> , 2004	BY4743 (<i>MATα/α, his3Δ1/his3Δ1, leu2Δ0/leu2Δ0,lys2Δ0/LYS2MET15/met15Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>)	30° C hasta mitad fase exponencial ↓ cambio a 10° C	0,17 / 0,5 / 2 / 12 / 60	<i>PHO84</i> ^b a 60h <i>PHO87</i> ^b a 12h	-
Sahara <i>et al.</i> , 2002	YPH500 (<i>MATα,ura3-52, lys2-801, ade2-101,trp1-Δ63, his3-Δ200, leu2-Δ1</i>)	30° C hasta OD (600 nm) 2,0 ↓ cambio a 10° C	0,25 / 0,5 / 2 / 4 / 8	<i>PCK1</i> ^b	<i>TAT1</i> ^c a 4 y 8h <i>TAT2</i> ^c a 4 y 8h <i>PHO84</i> ^d a 4 y 8h
Homma <i>et al.</i> , 2003	S288c (<i>MATα SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6</i>)	Crecimiento continuo a 4° C hasta mitad fase exponencial		<i>PCK1</i> ^a	<i>TAT2</i> ^c <i>PHO84</i> ^d
		Crecimiento continuo a 15° C hasta mitad fase exponencial		-	-

Tabla 10. Resumen de los resultados de los niveles de expresión de los genes identificados en el presente trabajo, correspondientes a datos ya publicados y procedentes de 4 estudios independientes de la respuesta transcripcional tras someter a las células de levadura a un “cold shock” (Murata *et al.*, 2006; Schade *et al.* 2004 y Sahara *et al.*, 2002) o a crecimiento continuo a 4° ó 15° C (Homma *et al.*, 2003). En las dos últimas columnas se muestran los genes inducidos y reprimidos y su expresión relativa: ^a inducción fuerte (>3), ^b inducción ligera (2-3), ^c represión ligera (0,5-0,3), ^d represión fuerte (<0,1). Los genes que no se mencionan de entre los 11 identificados en este trabajo, presentaban una expresión relativa entre 2,0 y 0,5.

5 Posible papel de los genes identificados por mejorar el crecimiento en frío, en la supervivencia a la congelación

Dado que previamente a la realización del presente estudio se habían descrito genes para los que, por una parte su nivel de expresión se veía aumentado frente a una bajada de la temperatura y, por otro lado, los efectos de dicho incremento, tales como el aumento de las concentraciones intracelulares de trehalosa o de glicerol, protegían frente al estrés por congelación, se decidió estudiar si la sobreexpresión de los genes identificados hasta el momento por dotar a la levadura de una mayor tasa de crecimiento a bajas temperaturas, también presentaba algún efecto sobre la resistencia a la congelación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11. Como puede apreciarse, en todos los casos la tasa de supervivencia es semejante para todos los clones y para el control, y no se obtiene una mejor resistencia a la congelación, a ninguno de los dos tiempos ensayados, por la sobreexpresión de ninguno de los genes, contrariamente a lo que sucede con la capacidad de crecimiento en frío.

Cepa	Plásmido	Supervivencia (%) a -20° C	
		5 días	10 días
W303	-	0,86 ± 0,06	0,080 ± 0,005
W303	YEp24.TAT2	0,86 ± 0,05	0,081 ± 0,005
W303	YEp24.TAT1	0,58 ± 0,03	0,044 ± 0,003
W303	YEp24.TRP1	0,45 ± 0,03	0,046 ± 0,003
W303	YEp24.NSG2	0,31 ± 0,02	0,033 ± 0,001
W303	YEp24.PCK1	0,37 ± 0,01	0,037 ± 0,002
W303	YEp24.PRO2	0,68 ± 0,04	0,065 ± 0,003
W303	YEp24.PHO84:GTR1	0,20 ± 0,01	0,038 ± 0,002
W303	YEp24.PHO87	0,33 ± 0,01	0,027 ± 0,002
W303	YEp24.PHO90	0,41 ± 0,02	0,039 ± 0,002
W303	YEp24.YCR015C	0,33 ± 0,01	0,029 ± 0,001

Tabla 11. Influencia de la sobreexpresión de los genes que confieren mayor capacidad de crecimiento en frío a la cepa W303, sobre su supervivencia a la congelación. La supervivencia se expresa como el porcentaje de las unidades formadoras de colonias/ml en las muestras congeladas con respecto a la misma muestra antes de congelar. Los datos mostrados en la tabla corresponden a la media de tres experimentos independientes ± la desviación estándar.

6 Estudio de la influencia de las bajas temperaturas sobre el transporte de triptófano

Debido a que la sobreexpresión de cualquiera de las dos permeasas para triptófano confiere resistencia a las bajas temperaturas, especulamos que las bajas temperaturas deberían estar afectando al transporte de triptófano. Para comprobarlo, se realizaron ensayos de transporte de triptófano radioactivo a 28° y 10° C (figura 19). La velocidad inicial de transporte a 28° C es de $11,309 \pm 0,211$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹ y a 10° C se reduce hasta $1,061 \pm 0,022$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹. La reducción del transporte hasta el 9,4% nos confirma que a bajas temperaturas el transporte de triptófano se halla seriamente comprometido.

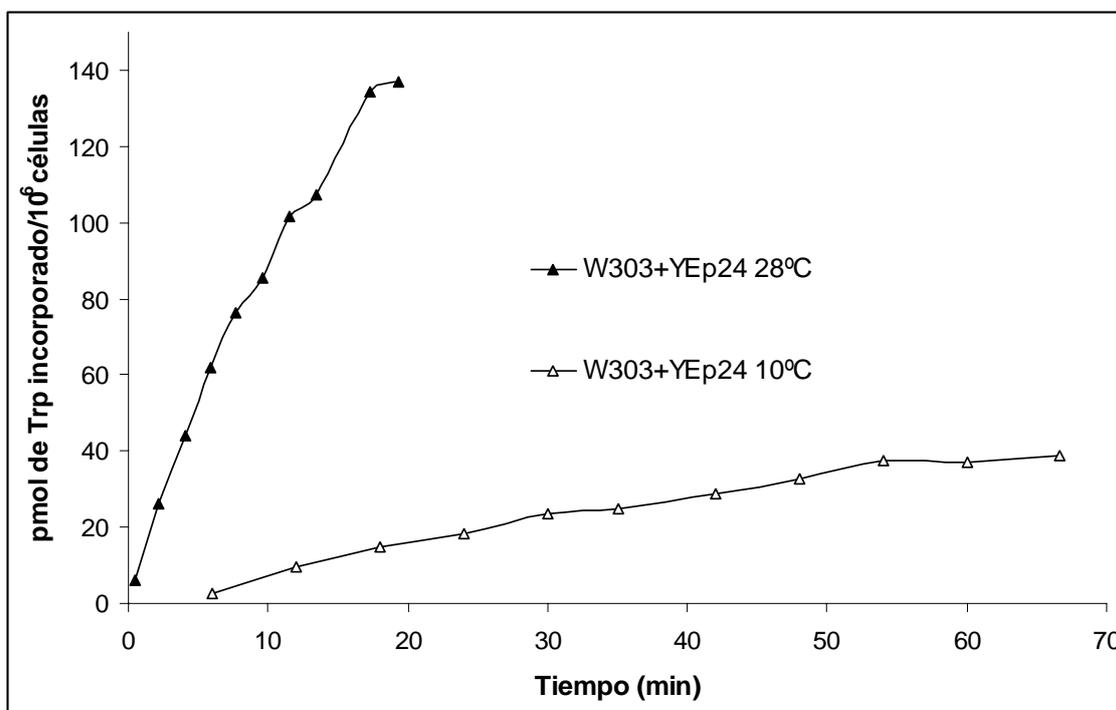


Figura 19. Cinética de incorporación de triptófano marcado radioactivamente por la cepa W303 a 28° C, y 10° C.

6.1 La sobreexpresión de los genes *TAT2* y *TAT1* confiere mayor capacidad de transporte de triptófano

También se decidió analizar la velocidad de incorporación de triptófano en los clones de la cepa W303 que sobreexpresaban *TAT2* ó *TAT1*. En ambos casos se obtuvo un notable aumento en la entrada de triptófano al incubar a las células a 10° C en comparación con la cepa parental, si bien este incremento fue más marcado para el caso de la

sobreexpresión de *TAT2*. La velocidad inicial de transporte al sobreexpresar *TAT2* a 28° C es de $33,504 \pm 0,425$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹ y a 10° C $9,210 \pm 0,022$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹. Ésta velocidad es 8,2 veces superior a la que presenta la cepa parental a 10° C. Además, si se compara la velocidad inicial de transporte de la cepa parental a 28° C ($11,309 \pm 0,211$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹) con la velocidad inicial de transporte a 10° C de la cepa que sobreexpresa *TAT2* se aprecia que a 10° C la velocidad inicial de transporte sólo decae un 20%, lo cual es una optimización significativa comparado con la reducción en el transporte de triptófano del 90% que presenta la cepa parental a 10° C (figura 20)

En el caso de la cepa que sobreexpresa *TAT1*, la velocidad inicial de transporte a 28° C es de $30,299 \pm 2,626$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹ y a 10° C $4,641 \pm 0,412$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹. Por lo tanto, a 10° C la velocidad inicial de transporte al sobreexpresar *TAT1* es 4,1 veces superior a la que presenta la cepa parental a la misma temperatura.

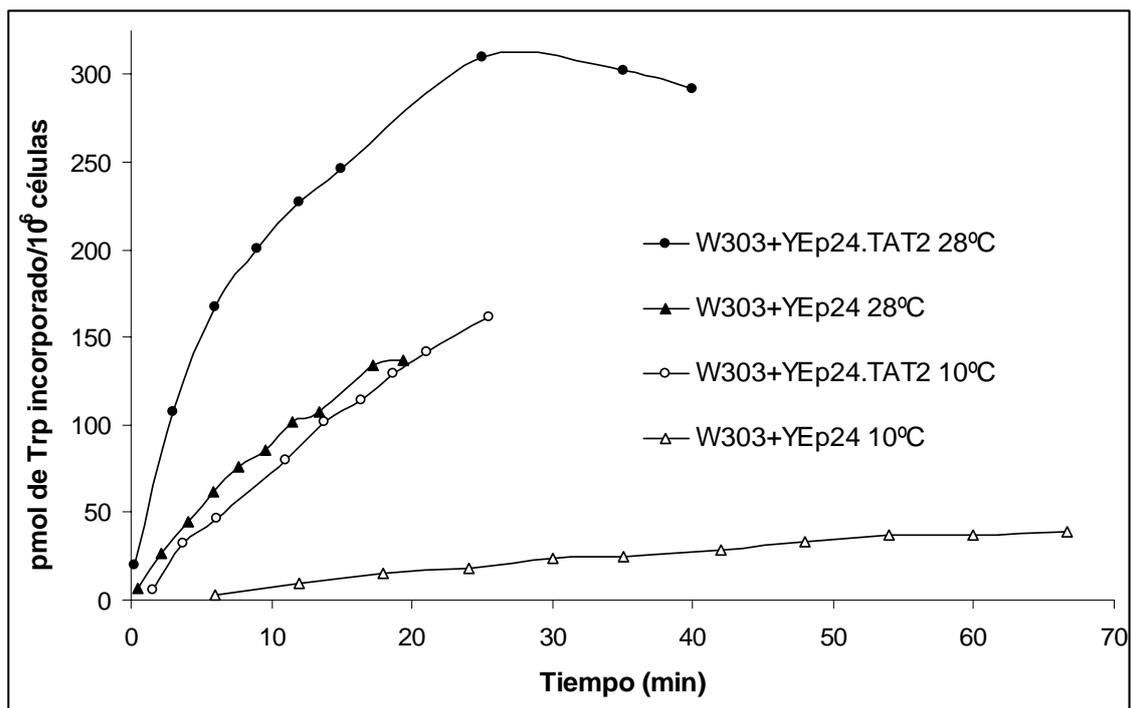


Figura 20. Cinética de incorporación de triptófano marcado radioactivamente por la cepa W303 a 28° C, y 10° C comparado con la misma cepa transformada con el plásmido YEp24.TAT2 a 28° C y 10° C.

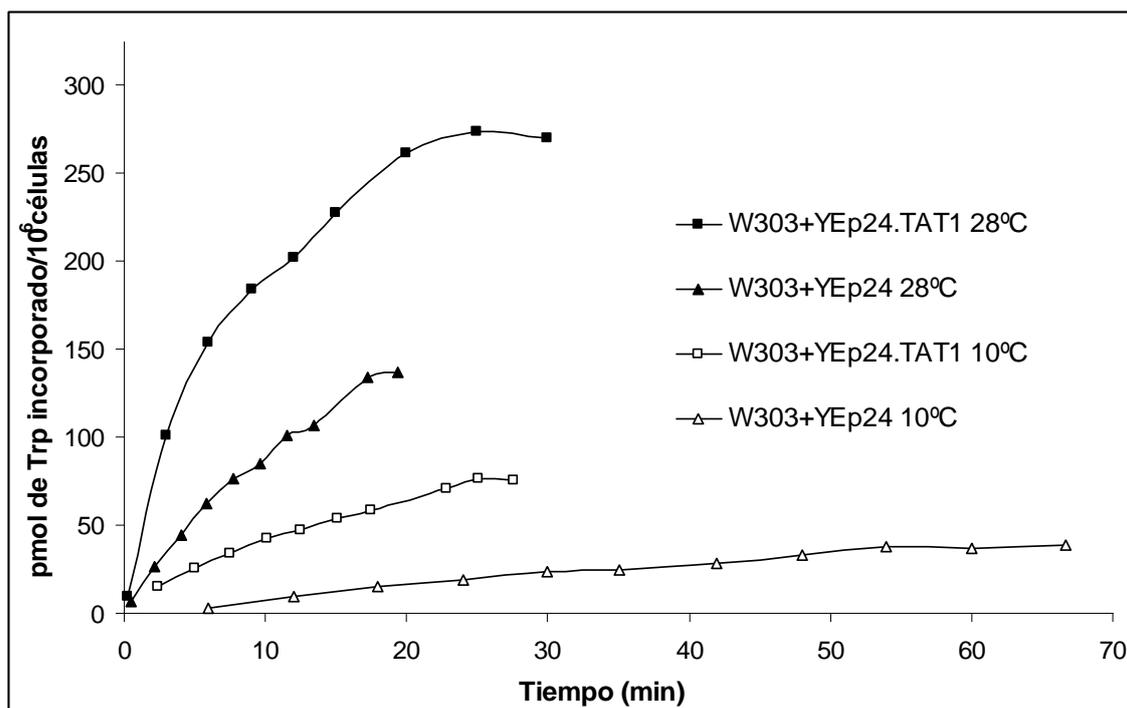


Figura 21. Cinética de incorporación de triptófano marcado radioactivamente por la cepa W303 a 28° C, y 10° C comparado con la misma cepa transformada con el plásmido YEp24.TAT1 a 28° C y 10° C.

6.2 La sobreexpresión del gen YCR015C no confiere mayor capacidad de transporte de triptófano

Dado que se desconoce la función de la proteína codificada por el gen YCR015C se exploró la posibilidad de que su sobreexpresión confiriera mayor capacidad de transporte a 10° C. Como se puede ver en la figura 22 la sobreexpresión del gen YCR015C no confiere mayor capacidad de transporte de triptófano. De hecho presenta una velocidad inicial de transporte a 10° C de $1,742 \pm 0,247$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹ semejante a la de la cepa parental transformada con el vector ($1,12 \pm 0,106$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹). Por lo tanto se desechó la posibilidad de que la sobreexpresión del gen YCR015C mejorara la capacidad de transporte de triptófano a 10° C.

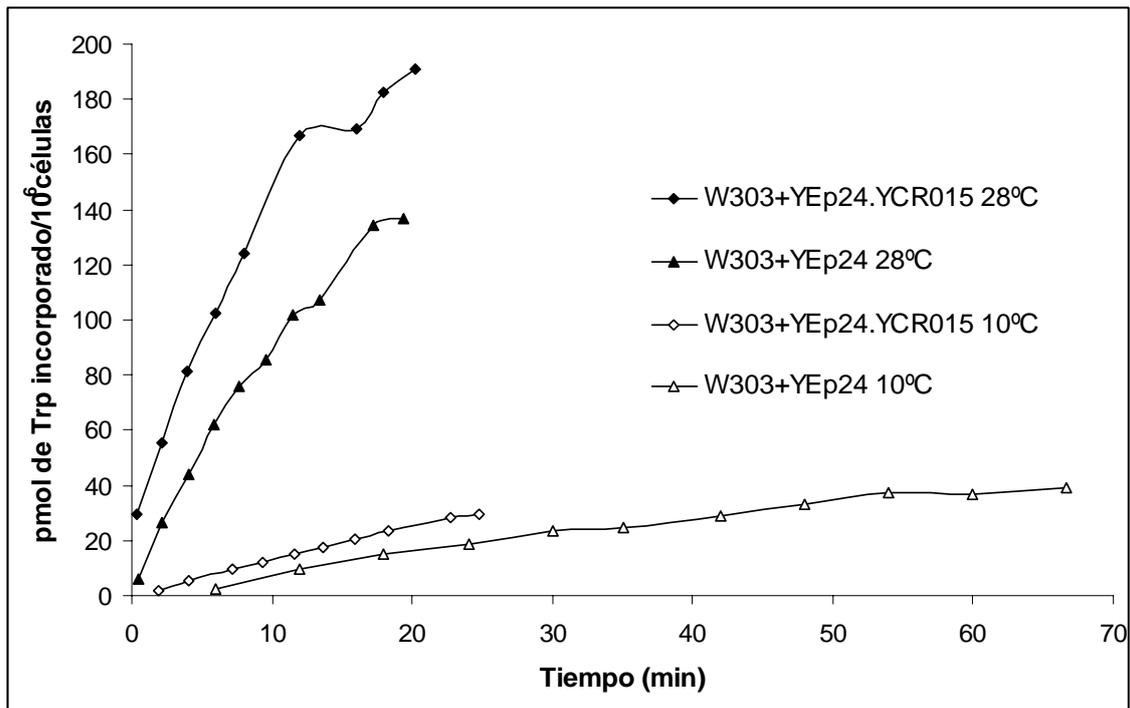


Figura 22. Cinética de incorporación de triptófano marcado radioactivamente por la cepa W303 a 28° C,y 10° C comparado con la misma cepa transformada con el plásmido YEp24.YCR015C a 28° C y 10° C.

6.3 Las cepas de levaduras industriales presentan la misma velocidad inicial de transporte que la cepa de laboratorio W303

Siguiendo el mismo razonamiento que en el caso de W303, primero se estudió la capacidad de crecimiento a bajas temperaturas de 20 cepas industriales. Entre ellas se seleccionó a la que presentaba mayor resistencia al frío: CECT 1990 (cepa de levadura cervecera *S. cerevisiae* de fermentación baja empleada para la fabricación de cerveza tipo “lager”). También se seleccionó la levadura cervecera que, bajo las condiciones del ensayo, parecía presentar menor resistencia al frío: W34/70. Adicionalmente, se ha incluido la levadura CECT 1462, una cepa de levadura cervecera *S. cerevisiae* de fermentación alta empleada para la fabricación de cerveza tipo “ale”, para comparar los resultados con la cepa CECT 1990 ya que las cepas “ale” crecen mejor a temperaturas más altas que las que precisan las cepas “lager”. Todas ellas presentan mayor tolerancia al frío que la cepa de laboratorio W303 e incluso que la misma sobreexpresando el gen *TAT2* a 8° C (figura 23).

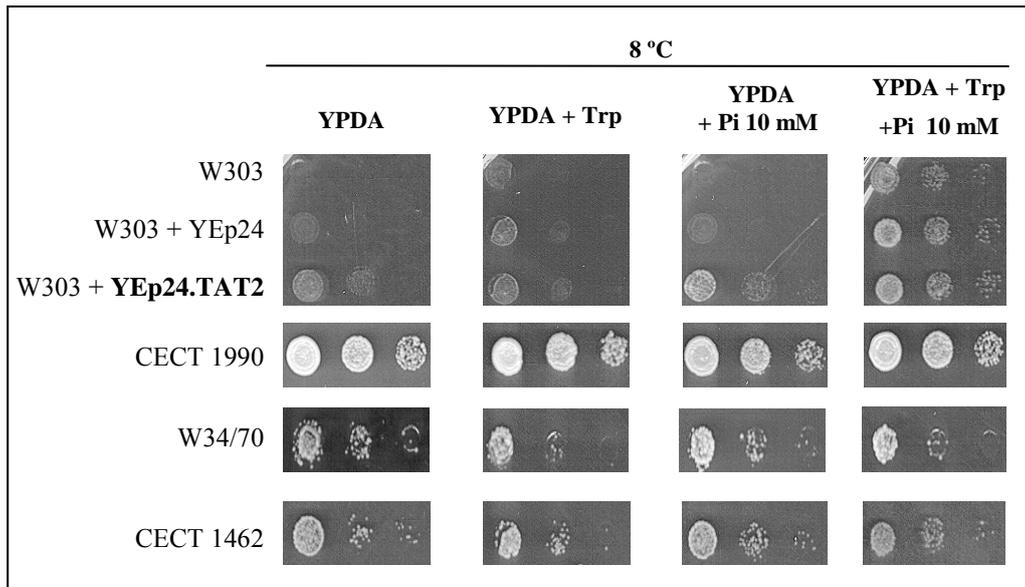


Figura 23. Resistencia al frío (8° C) de las cepas industriales CECT 1990, W34/70 y CECT 1462 comparadas con la cepa de laboratorio W303 y la misma sobreexpresando el gen *TAT2*.

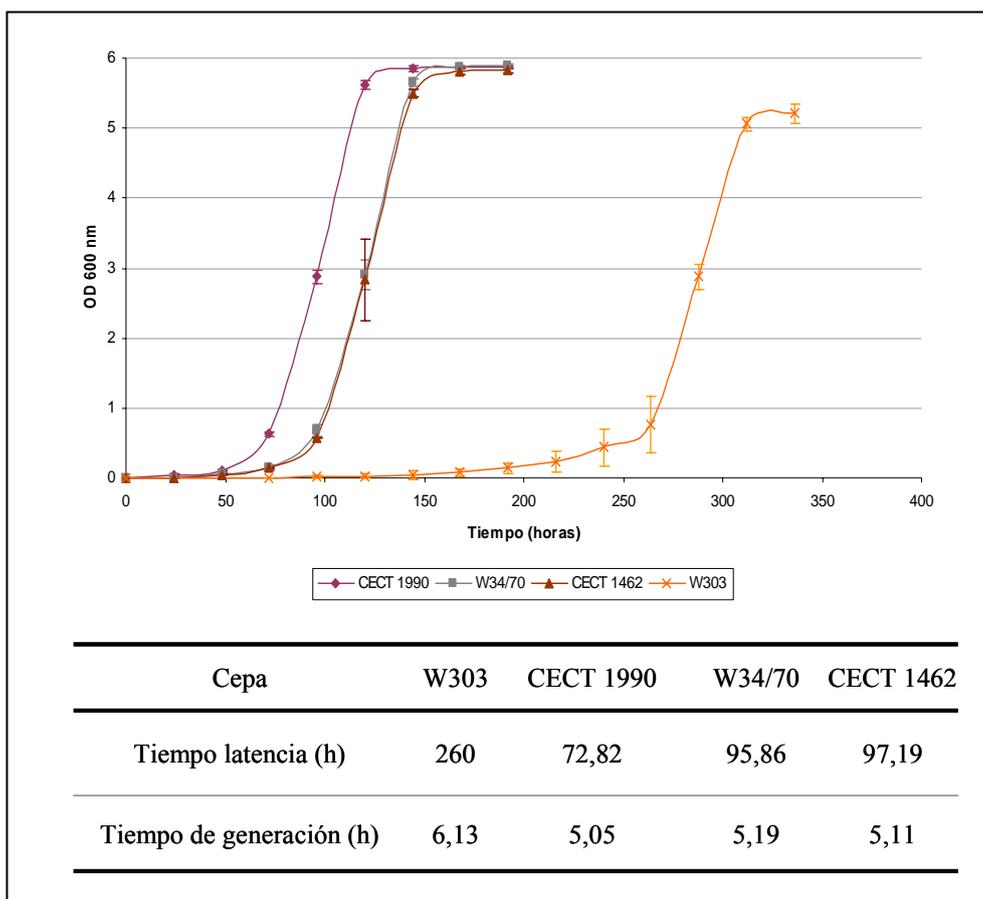


Figura 24. Curva de crecimiento a 10° C en medio YPD de la cepa de laboratorio W303 y las cepas industriales CECT 1990, W34/70 y CECT 1462.

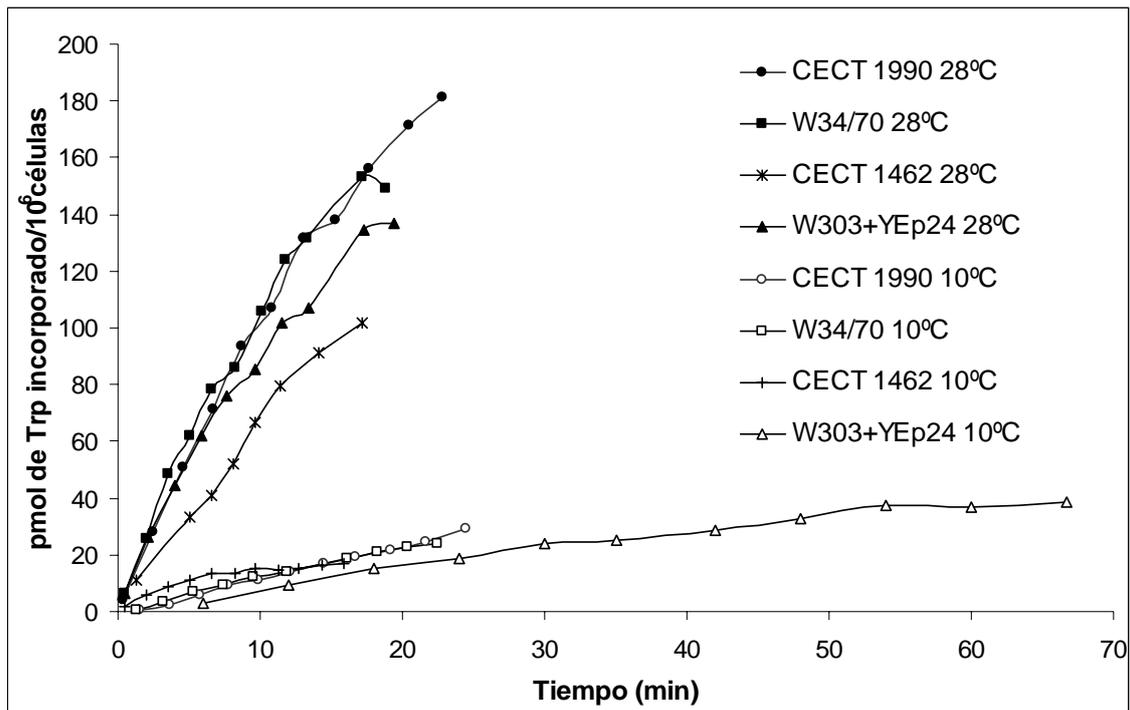


Figura 25. Cinética de incorporación de triptófano marcado radioactivamente por la cepa de laboratorio W303 y por tres cepas industriales CECT 1990, W34/70 y CECT 1462 a 28° C, y 10° C.

Por otro lado, en la figura 24 se muestran las curvas de crecimiento a 10° C de las cepas industriales estudiadas junto con la cepa de laboratorio W303. En la misma, se aprecia que el tiempo de latencia de las cepas industriales (CECT 1990 72,82 h, W34/70 95,86 h y CECT 1462 97,19 h) se reduce aproximadamente a la tercera parte del que presenta la cepa de laboratorio W303 (260 h). El tiempo de generación también se redujo en 1 h aproximadamente en las tres cepas industriales comparadas con la cepa de laboratorio W303.

Se planteó la posibilidad de que la resistencia a las bajas temperaturas estuviera relacionada con una menor disminución en la capacidad de transporte de triptófano a bajas temperaturas. Sin embargo, las tres cepas presentaron una merma en la velocidad inicial de transporte de triptófano similar a la observada para la cepa de laboratorio W303 (figura 25). En el caso de la cepa industrial CECT 1990 la velocidad inicial de transporte a 28° C es de $12,911 \pm 0,398$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹, y a 10° C de $1,265 \pm 0,078$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹.

De forma similar, la cepa industrial W34/70 presenta una velocidad inicial de transporte de triptófano a 28° C de $14,943 \pm 0,187$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹, y a 10° C de $1,554 \pm 0,124$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹.

Análogamente, la cepa industrial CECT 1462 presenta una velocidad inicial de transporte de triptófano a 28° C de $12,284 \pm 0,012$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹, y a 10° C de $1,099 \pm 0,057$ pmol triptófano 10^6 células⁻¹ min⁻¹.

Las cepas industriales no presentan ningún tipo de auxotrofia por lo que, aunque tengan disminuída la capacidad de incorporación de triptófano, como la cepa de laboratorio W303, ésta no repercute en el crecimiento celular ya que están dotadas de todos los genes que codifican las enzimas que permiten la biosíntesis de triptófano. Además el crecimiento de las cepas industriales no mejoró al crecer las células en un medio con triptófano en exceso. Por lo que se deduce que la disponibilidad intracelular de triptófano no parece ser un factor limitante para el crecimiento a bajas temperaturas en las levaduras industriales. Tampoco la adición de fosfato inorgánico en elevada concentración mejoró el crecimiento de las cepas industriales (figura 23).

6.4 Comparativa de las velocidades iniciales de transporte de triptófano en las distintas cepas estudiadas

En la tabla 12 se muestran las velocidades iniciales de transporte de triptófano de las distintas cepas ensayadas a 10° y 28° C. A 28° C todas ellas presentan velocidades iniciales de transporte de triptófano similares, a excepción de aquellas cepas que sobreexpresan los transportadores de triptófano TAT2p y TAT1p que aproximadamente triplican la velocidad inicial de incorporación de triptófano del resto. A 10° C la velocidad inicial de incorporación de triptófano se reduce a la décima parte, tanto en las cepas de laboratorio que no sobreexpresan los transportadores de triptófano como para las cepas industriales. Sin embargo, en las cepas que sobreexpresan TAT2p y TAT1p la merma en la capacidad inicial de incorporación de transporte a 10° C se reduce a 3,6 veces, en el caso de la sobreexpresión de *TAT2*, y a 6,5 veces en el caso de la sobreexpresión de *TAT1*.

Velocidad inicial de transporte de triptófano (pmol de triptófano incorporado 10^6 células ⁻¹ min ⁻¹)				
Cepa	Plasmido sobreexpresado	Media \pm SD		Cociente 28° C/10° C
		28° C	10° C	
W303	YEp24	11,309 \pm 0,211	1,061 \pm 0,022	10,66
W303	YEp24. <i>TAT2</i>	33,504 \pm 0,425	9,210 \pm 0,022	3,64
W303	YEp24. <i>TAT1</i>	30,299 \pm 2,626	4,641 \pm 0,412	6,53
W303	YEp24.YCR015	18,805 \pm 0,363	1,742 \pm 0,247	10,80
CECT 1990	-	12,911 \pm 0,398	1,265 \pm 0,078	10,20
W34/70	-	14,943 \pm 0,187	1,554 \pm 0,124	9,61
CECT 1462	-	12,284 \pm 0,012	1,099 \pm 0,057	11,18

Tabla 12. Velocidad inicial de transporte de triptófano de las distintas cepas ensayadas a 10 y 28° C y el cociente de las velocidades a ambas temperaturas.

DISCUSIÓN

Discusión

Como ha quedado constatado en el apartado de Resultados de la presente Tesis, el aumento en la expresión de los genes *TAT2/YOL020W*, *TAT1/YBR069C* y *TRP1/YDR007W* produce una mejoría en el crecimiento de las células de *S. cerevisiae* a 10° C. Estos 3 genes están relacionados con la disponibilidad intracelular de triptófano, ya que el gen *TAT2* codifica una permeasa de alta afinidad para triptófano y tirosina mientras que el gen *TAT1* codifica una permeasa para valina, leucina, isoleucina y tirosina y de baja afinidad para triptófano e histidina (Schmidt *et al.*, 1994). El gen *TRP1* codifica la enzima fosforibosil antranilato isomerasa que cataliza el 3^{er} paso en la biosíntesis de triptófano (Hommel *et al.*, 1995).

Recientemente ya se habían relacionado a *TAT2* y *TAT1* con el crecimiento a bajas temperaturas. La sobreexpresión de *TAT2* ó *TAT1*, aunque en el caso de *TAT1* en menor medida que para *TAT2*, confiere no sólo capacidad de crecimiento a temperaturas bajas (a 10° C ó a 15° C), sino también frente a elevadas presiones hidrostáticas en cepas auxótrofas para triptófano (Abe y Horikoshi, 2000; Abe e Iida, 2003). Resulta interesante prestar atención a los estudios llevados a cabo en condiciones de elevada presión hidrostática ya que, al igual que las bajas temperaturas, causa la disminución de la fluidez de la membrana y la restricción de movimientos de los fosfolípidos y proteínas de dicha membrana (Cossins y Macdonald, 1989). Además, ambos tipos de estreses se ha visto que ejercen un efecto similar sobre el transporte de triptófano a través de la membrana. La última parte de nuestro trabajo se centró en el estudio de la velocidad inicial de transporte de triptófano. La reducción del transporte hasta el 9,4 % nos confirma que a bajas temperaturas el transporte de triptófano en la cepa de laboratorio W303 se ve seriamente perjudicado. De forma similar, al someter a células de levadura a una incubación en condiciones de elevada presión hidrostática, se ha visto que se provoca una drástica disminución en el transporte de triptófano. Además, resulta que esta disminución depende del grado de aumento de la presión hidrostática (25 ó 50 MPa) y de la duración de la incubación (Abe y Horikoshi, 2000).

Por otra parte, la degradación de Tat2p en condiciones de elevada presión hidrostática y bajas temperaturas se inicia por la ubiquitinación mediada por la ubiquitina ligasa Rsp5p. Precisamente, se ha visto que mutaciones en los extremos N- y C-terminal de

Tat2p en cepas auxótrofas para triptófano, que impiden su ubiquitinación y posterior degradación, confieren a la célula una mayor capacidad de crecimiento a altas presiones hidrostáticas y bajas temperaturas (Nagayama *et al.*, 2004). Además, estas cepas mutantes presentan entre 2,5 y 4 veces más transporte de triptófano que la cepa parental en condiciones de elevada presión hidrostática. Las tres mutaciones estudiadas *HPG2-1*, *HPG2-2* y *HPG2-3* han sustituido un residuo de un aminoácido ácido por uno no polar, polar o básico, respectivamente. Esto sugiere que los aminoácidos cargados negativamente en el extremo N-terminal (*HPG2-1*) o en el extremo C-terminal (*HPG2-2* y *HPG2-3*) podrían tener importancia en la degradación de Tat2p a elevada presión hidrostática. Se han obtenido resultados similares en cuanto a la mejora en el transporte de triptófano bajo condiciones de elevada presión hidrostática, en cepas con mutaciones que afectan al dominio catalítico de la ubiquitina ligasa Rsp5p y cepas donde el gen *BUL1* (codifica la proteína de unión a Rsp5p) ha sido eliminado (Abe e Iida, 2003). En el mismo sentido, los mutantes de las proteasas específicas de ubiquitina *doa4Δ*, *ubp6Δ* ó *ubp14Δ* presentan mayor resistencia a elevada presión hidrostática y bajas temperaturas y un mayor transporte de triptófano comparado con la cepa parental al elevar la presión hidrostática (Miura y Abe, 2004). Los resultados obtenidos en los 3 estudios comentados anteriormente sugieren que en todos estos mutantes, el nivel de permeasa en estado estable se encuentra aumentado en condiciones de elevada presión hidrostática en comparación con la cepa parental, con lo que se consigue aumentar la actividad de transporte y su capacidad de crecimiento en condiciones de elevada presión hidrostática (Nagayama *et al.*, 2004).

En cuanto a los resultados que hemos obtenido en nuestros estudios a bajas temperaturas, al evaluar la capacidad de transporte de triptófano para dos cepas que sobreexpresan individualmente los genes *TAT2* y *TAT1* se obtuvo un notable aumento en la entrada de triptófano al someter a las células a 10° C comparado con la cepa parental, si bien éste fue más marcado para el caso de la sobreexpresión de *TAT2* (aumento del transporte de triptófano de 8,2 veces para el caso de la sobreexpresión de *TAT2* frente un aumento de 4,1 para el caso de *TAT1*). Las diferencias obtenidas en el grado de mejoría del transporte de triptófano son coherentes con el grado de afinidad de las dos permeasas por el triptófano, ya que en el caso de Tat2p se trata de una permeasa de alta afinidad para triptófano mientras que Tat1p es una permeasa de baja afinidad para triptófano y de alta afinidad para valina, isoleucina, tirosina y leucina Al

sobreexpresar *TAT2* ó *TAT1* en condiciones de baja temperatura se obtienen incrementos en el transporte de triptófano similares a los obtenidos para mutantes deficitarios en la degradación proteolítica de Tat2p sometidos a condiciones de elevada presión hidrostática (incremento del transporte de triptófano entre 4,3 y 2-5 veces dependiendo del mutante) (Nagayama *et al.*, 2004). De forma que, como ocurría con los mutantes deficitarios en la degradación proteolítica de Tat2p en condiciones de elevada presión hidrostática, al sobreexpresar individualmente los genes *TAT2* y *TAT1* posiblemente se logra aumentar los niveles de permeasa en estado estable en comparación con la cepa parental con lo que se consigue aumentar el transporte de triptófano a bajas temperaturas y con ello su capacidad de crecimiento en tales condiciones.

Asimismo, se ha identificado a *TRP1/YDR007W* como uno de los genes responsables del crecimiento en frío. Dicho gen codifica una fosforibosil antranilato isomerasa que cataliza el 3^{er} paso en la biosíntesis de triptófano. Su mutante nulo es sensible al frío (Hampsey, 1997). Recientemente, mediante un cribado de una genoteca de mutantes se ha identificado a *TRP1* como uno de los 20 genes más importantes para el crecimiento a 15° C (Abe y Minegishi, 2008). En el mismo trabajo también se señala la importancia de otras enzimas implicadas en la biosíntesis de triptófano (Trp4p, Trp5p y Trp2p) en la adaptación al frío. Por otra lado, se ha observado que en cepas auxótrofas para triptófano, como en el caso de W303, la sobreexpresión del gen *TRP1* tiene como consecuencia un crecimiento más eficiente a elevadas presiones hidrostáticas (Abe e Iida, 2003) y a bajas temperaturas (este trabajo).

Como ha quedado demostrado, los efectos del frío se ven atenuados mediante la adición de un exceso de triptófano, la prototrofia a triptófano y la sobreexpresión del gen *TRP1* o de aquellos genes que codifican para transportadores de triptófano, como *TAT2* y *TAT1*. Diversos trabajos han puesto de manifiesto fenotipos similares con respecto a la auxotrofia a triptófano y el rescate con exceso de triptófano o por sobreexpresión de los genes *TAT2*, *TAT1* o *TRP1*. Es el caso de perturbaciones en el metabolismo de esfingolípidos (Skrzypek *et al.*, 1998; Chung *et al.*, 2001b), anestésicos volátiles (Palmer *et al.*, 2002), el agente antitumoral 4-fenilbutirato (Liu *et al.*, 2004), el fármaco inmunosupresor FK506 (Schmidt *et al.*, 1994) y altas presiones (Abe y Horikoshi, 2000). En el caso del fármaco inmunosupresor FTY720, el comportamiento fenotípico fue similar a excepción de la adición al medio de un exceso de triptófano que no

produjo reversión de la sensibilidad (Welsch *et al.*, 2003). Además, mutantes de levadura por eliminación del gen *ERG6*, que codifica para una metiltransferasa que convierte zimosterol en fecosterol en la ruta de biosíntesis de ergosterol, presentan deficiencias en el transporte de triptófano. En este caso, las cepas $\Delta erg6$ son viables en fondos genéticos protótrofos para triptófano, pero no en fondos auxótrofos y, además, la letalidad de las cepas *erg6 trp1* se suprime mediante la adición de elevadas concentraciones de triptófano (Umebayashi y Nakano, 2003). Así, el transporte de triptófano es un punto clave en la fisiología de la levadura, convirtiéndose en factor limitante del crecimiento bajo una gran variedad de condiciones estresantes.

A la vista de los resultados obtenidos se plantea la duda de cuál es la localización de Tat2p en la célula durante las bajas temperaturas. En el caso de células crecidas a su temperatura óptima de crecimiento, la localización celular de Tat2p depende de la concentración de triptófano en el medio (Umebayashi y Nakano, 2003). Estos autores demuestran que cuando existe una elevada concentración de triptófano en el medio de cultivo, Tat2p se localiza en la vacuola o en compartimentos perivacuolares. Es más, señalan que dicha localización es consecuencia del envío directo de Tat2p desde el aparato de Golgi hasta los endosomas tardíos sin ser desviada a la membrana plasmática. El hecho de que la célula prescindiera del transportador de alta afinidad para triptófano puede deberse a que la concentración de triptófano en los medios de cultivo estándar sea lo suficientemente elevada como para que dicho aminoácido se incorpore a través de otras permeasas de aminoácidos, tales como Tat1p (Schmidt *et al.*, 1994). En cambio, cuando la concentración de triptófano en el medio de cultivo es baja, Tat2p se localiza en la membrana plasmática (Umebayashi y Nakano, 2003), lo que pone de manifiesto la necesidad de un eficiente sistema de incorporación de triptófano en tales condiciones. Recientemente, hemos llevado a cabo estudios preliminares sobre la localización de la proteína de fusión Tat2-GFP que apuntan a que, a 28° C y en medio mínimo adicionado con los requerimientos auxotróficos en concentraciones estándar, la cepa W303 presenta el mismo comportamiento descrito por Umebayashi y Nakano para células crecidas en un medio con elevada concentración de triptófano, es decir, Tat2p se localiza en la vacuola. Este hecho puede ser justificado argumentando una concentración de triptófano en el medio lo suficientemente elevada como para que dicho aminoácido sea incorporado a través de otras permeasas para aminoácidos. Sin embargo, al estudiar la localización celular de Tat2p a 10° C, y habiendo crecido las

células en el mismo medio de cultivo citado anteriormente, se vio que dicha proteína se hallaba en la membrana plasmática, lo que sugiere un comportamiento similar al ayuno de triptófano al incubar las células de levadura a bajas temperaturas.

No obstante, no se ha llegado a elucidar de forma clara cuál es el mecanismo mediante el cuál se produce esta disminución en el transporte de triptófano tras su exposición al frío. Sin embargo, sí se sabe que las bajas temperaturas aumentan el grado de ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo que produce una disminución en la fluidez de la membrana plasmática que provoca una reducida difusión lateral de las proteínas de la misma, una disminución de la actividad de las enzimas asociadas a dicha membrana y una mayor reducción en el transporte a través de esa membrana (Vigh *et al.*, 1998). Para intentar explicar por qué se produce esta disminución en el transporte de triptófano a bajas temperaturas, se podrían proponer varias hipótesis: por un lado podría suceder que al exponer las células a bajas temperaturas Tat2p y Tat1p fueran degradadas vía ubiquitinación o, por otro lado, que ambas permeasas no fueran enviadas a la membrana plasmática por ser el tráfico de las mismas muy sensible al frío. Sin embargo, ambas consideraciones parecen poco probables teniendo en cuenta: a) la localización celular de Tat2p en la membrana plasmática tras su incubación a 10° C, y b) que el defecto en el crecimiento es atenuado mediante un exceso de triptófano en el medio o mediante un aumento de la expresión de las permeasas Tat2p y Tat1p. Por lo tanto, en lo que a las bajas temperaturas se refiere, lo más probable es que las permeasas para triptófano, aún estando presentes en la membrana plasmática, no sean activas a causa de la marcada disminución de la fluidez de la misma.

Otro de los genes cuya sobreexpresión confiere mayor capacidad de crecimiento a 10° C es el gen *NSG2/YNL156C*, que codifica una chaperona selectiva que estabiliza a Hmg2p, una de las enzimas claves implicadas en la biosíntesis de ergosterol (Flury *et al.*, 2005). En dicho estudio quedó demostrado que, mediante la sobreexpresión del gen *NSG2*, se consigue incrementar de forma significativa la estabilidad de Hmg2p. Contrariamente a lo que cabría esperar, en el cribado llevado a cabo a 10° C no se ha aislado al gen *NSG1*, que codifica una proteína que cumple la misma función que Nsg2p. El esterol más importante en levadura es el ergosterol y es posible que, a través de la estabilización de Hmg2p, se consiga favorecer la biosíntesis de ergosterol

facilitando de esta manera la asociación de determinadas proteínas con los denominados “lipid rafts” ricos en ergosterol, donde se sabe que residen algunas proteínas de membrana como Can1p (permeasa para arginina), Fur4p (permeasa para uracilo), Sur7p (presumiblemente relacionada con la endocitosis) y Tat2p (permeasa para triptófano) (Grossmann *et al.* 2007). Los “lipid rafts” son microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol (Simons e Ikonen, 1997), cuya existencia en células de levadura ha quedado demostrada (Bagnat *et al.*, 2000). Se ha propuesto que estas estructuras actúan como plataformas de clasificación que emergen de la región trans-Golgi y se mueven hacia la membrana plasmática, participando en la localización de determinadas proteínas. Este razonamiento es coherente con el hecho de que mutantes $\Delta erg6$ presentan deficiencias en el transporte de triptófano, ya que la falta de ergosterol provoca un fallo en la asociación de Tat2p con los “lipid rafts” y es erróneamente enviado a la vacuola para su degradación (Umebayashi y Nakano, 2003). Incluso se ha descrito una disminución significativa en el transporte de glucosa a través de Hup1p (transportador de hexosas del alga verde *Chlorella kessleri*) en un mutante $\Delta erg6$ que presenta una distribución homogénea del transportador en la membrana (Grossmann *et al.*, 2006), lo que sugiere la importancia de la asociación de determinadas proteínas al ergosterol, no sólo para su correcto tráfico intracelular sino también para su actividad *in situ*.

Asimismo, ha quedado patente en el capítulo de Resultados que la sobreexpresión del gen *PCK1/YKR097W* aumenta la capacidad de crecimiento a 10° C. Dicho gen codifica la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que resulta clave en la gluconeogénesis para la formación de fosfoenolpiruvato a partir de oxalacetato. Diversos estudios que versan sobre la expresión génica a bajas temperaturas han descrito un aumento considerable en su nivel de transcripción (Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2006). Las razones que motivan la importancia de esta proteína en la adaptación al frío no resultan evidentes, pero podría contribuir a aumentar los niveles de glucosa para la biosíntesis de carbohidratos de reserva ya que, como se ha descrito en la Introducción, el metabolismo de los mismos se activa a bajas temperaturas así como frente a diferentes tipos de estreses tales como, estrés térmico o estrés oxidativo (Parrou *et al.*, 1997). Es posible que, al igual que ocurre en el caso del triptófano, el transporte de glucosa se vea muy afectado por la inactivación o el mal funcionamiento de los múltiples transportadores de glucosa como consecuencia de los cambios que el frío

induce en la membrana plasmática, o por los efectos que las bajas temperaturas puedan ejercer sobre la expresión, los mecanismos de regulación de la transcripción, la estabilidad de los mRNAs, el proceso de traducción o los mecanismos de regulación post-traduccionales del conjunto de miembros que forman la familia de transportadores de glucosa. Todo ello conduciría a un ayuno en dicho nutriente para la célula, razón por la que ésta pondría en marcha la correspondiente ruta biosintética. Además, la activación de la gluconeogénesis no sólo proporcionaría glucosa a la levadura, sino también fosfato, cuyo transporte y biodisponibilidad parecen ser el siguiente cuello de botella tras el del triptófano, a tenor de los resultados ya expuestos en relación con el cribado de la genoteca en condiciones de alta concentración de triptófano. Cabe resaltar que esta aparente activación de la gluconeogénesis se produce en presencia de una alta concentración de glucosa en el medio, por lo que no sólo el transporte de la misma debe de estar inactivado, sino también los mecanismos o las rutas de señalización que participan en la represión catabólica que la presencia de la glucosa desencadena. Así, los dos genes que codifican para enzimas clave de la gluconeogénesis, *FBPI* y *PCK1*, están sujetos, entre otros niveles y vías de regulación, a represión por catabolito (Zhikang *et al.*, 1996), mientras que el efecto de la sobreexpresión del gen sobre la capacidad de crecimiento a bajas temperaturas se observa estando bajo el control de su propio promotor, lo que apoyaría la sugerencia anterior de que el frío podría liberar a la célula, o al menos a la transcripción del gen, de la represión por glucosa. Esta hipótesis se ve apoyada por estudios de transcriptómica efectuados a bajas temperaturas que muestran elevados niveles de inducción de la transcripción tanto para *PCK1* como para *FBPI* (Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2006.)

Quizás la hipótesis más interesante con la que se puede especular viene dada por el hecho de que, de entre todos los genes que codifican para enzimas que participan en la gluconeogénesis, el único que en nuestro cribado de la genoteca mejora el crecimiento frente al frío por su sobreexpresión es *PCK1*, lo que parecería indicar que, al menos bajo dichas condiciones, el paso catalizado por Pck1p es el paso limitante y, quizás, sujeto a regulación, en dicha ruta.

En el presente trabajo también se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *PRO2/YOR323C* confiere mayor capacidad de crecimiento a 10° C. Dicho gen codifica una gamma-glutamil-fosfato reductasa (γ -GPR) que cataliza el segundo paso en la

biosíntesis de L-prolina. En primer lugar diversos autores esclarecieron que los mutantes *put1* con prolina oxidasa inactiva (implicada en la utilización de prolina como fuente de nitrógeno para su conversión en glutamato) acumulan mayores niveles de prolina intracelular, y esto se corresponde con una mayor resistencia a la congelación y deshidratación (Takagi *et al.*, 2000). Posteriormente publicaron que, en estos mismos mutantes, al sobreexpresar una mutación dominante del gen *PRO1* (codifica la gamma-glutamil quinasa (γ -GK) que cataliza el primer paso en la biosíntesis de L-prolina a partir de L-glutamato), se provocó un aumento en la estabilidad y en la actividad enzimática teniendo como consecuencia una mayor acumulación intracelular de prolina, lo que generó un aumento significativo en la resistencia a la congelación. Esta mutación consiste en la sustitución en la posición 154 de un residuo de ácido aspártico por una asparragina, y se ha comprobado que la misma facilita la interacción intramolecular entre γ -GK y γ -GPR lo que estabiliza al complejo (Morita *et al.*, 2003). Además, la sobreexpresión gen mutado *PRO1* conjuntamente con *PRO2* (sin mutación), aumentaba todavía más la acumulación de prolina y, por tanto, la resistencia a la congelación (Terao *et al.*, 2003). La actividad crioprotectora de la L-prolina se destaca tanto por su acción a nivel del estrés hídrico generado por el proceso de congelación-descongelación, como por su actividad como antioxidante (Rudolph y Crowe, 1985). Incluso se ha sugerido la actividad de la L-prolina como chaperona para el correcto plegamiento de las proteínas (Samuel *et al.* 2000). Por lo tanto, nuestros resultados corroboran en cierta forma las hipótesis anteriores y refuerzan las conjeturas sobre el potencial biotecnológico de L-prolina como agente protector de microorganismos y enzimas industriales.

Como ya hemos visto en el capítulo de Resultados, se investigaron los genes cuya sobreexpresión pudiera dotar a la levadura de una mayor capacidad de crecimiento en frío en condiciones en las que la disponibilidad de triptófano no fuera un factor limitante. En tales condiciones se identificaron a los genes *PHO84/YML123C*, *GTRI/YML121W*, *PHO87/YCR037C*, *PHO90/YJL198W* e *YCR015C*.

PHO84, *PHO87* y *PHO90* pertenecen a los dos sistemas de transporte de fosfato inorgánico a través de la membrana plasmática en levaduras: el sistema de alta afinidad (integrado por las proteínas Pho84p y Pho89p) y el sistema de baja afinidad (integrado por las proteínas Pho87p, Pho90p y Pho91p) (Persson *et al.*, 1999). Por otro lado,

YCR015C codifica una proteína de función desconocida que interacciona con Gtr2p, homólogo de Gtr1p (Gavin *et al.*, 2002).

El fosfato inorgánico es un nutriente esencial para todos los organismos, ya que es necesario en procesos tan diversos como la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y múltiples metabolitos celulares (implicados en procesos de fosforilación u obtención de energía) (Torriani-Gorini *et al.*, 1994). El sistema de baja afinidad se encuentra constitutivamente activo, presenta una K_m para el fosfato inorgánico de 770 μM y es el mayor responsable del transporte al interior de la célula de este metabolito en condiciones basales, es decir, cuando el medio extracelular es rico en fosfato. Cuando existe un déficit de fosfato se activa el transporte de alta afinidad, que presenta una K_m por fosfato inorgánico de 8,2 μM (Tamai *et al.*, 1985).

El sistema de alta afinidad se encuentra controlado estrictamente por el regulón PHO. Los miembros del sistema de baja afinidad están implicados en la activación de la ruta PHO y su expresión es independiente de la concentración de fosfato inorgánico y de la actividad del factor de transcripción Pho4p (Auesukaree *et al.*, 2003). Se ha comprobado que la eliminación simultánea de *PHO84*, *PHO87*, *PHO89*, *PHO90* y *PHO91* suprime completamente el transporte de fosfato y, por lo tanto, resulta letal (Wykoff y O'Shea, 2001). Más recientemente, al estudiar cómo afecta la pérdida individual de cada uno de estos 5 transportadores a la acumulación intracelular de fosfato inorgánico, se puso de manifiesto que la inactivación de *PHO84* provocó la disminución más notable (aproximadamente acumuló la mitad de fosfato que la cepa parental). Paralelamente al evaluar el contenido de fosfato inorgánico intracelular de los mutantes cuádruples (excluyendo en cada caso uno de los transportadores) se constató que tan sólo Pho84p (y ninguno de los otros transportadores) confería niveles normales de fosfato inorgánico (Hürlimann *et al.*, 2007). Todo ello pone de manifiesto la importancia de Pho84p para el metabolismo de fosfato inorgánico intracelular.

Hasta el momento no se ha descrito la relación de las permeasas para fosfato con la respuesta desencadenada tras la exposición a un estrés. Tan solo un estudio sobre la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a pH alcalino, ha descrito la inducción de *PHO84* junto con otros genes relacionados con el metabolismo del fosfato (*PHO89*,

PHO11/12) tras dicha exposición a un pH alcalino, lo que pone de manifiesto la alteración de la homeostasis de fosfato en tales condiciones (Serrano *et al.*, 2002).

Por otro lado, *GTR1* da lugar a una proteína de unión a GTP. La función celular que desempeña está siendo elucidada. *Gtr1p* parece ser una proteína multifuncional que está involucrada en el tráfico nuclear (Sekiguchi *et al.*, 2001), en la biogénesis de los ribosomas (Sekiguchi *et al.*, 2004) y en el sistema de incorporación de fosfato de alta afinidad (Bun-Ya *et al.*, 1992). Recientemente, mediante un cribado de una genoteca de mutantes, se ha identificado a *GTR1* como uno de los 40 genes más importantes para el crecimiento a 15° C (Abe y Minegishi, 2008). En el mismo trabajo también se señala que la eliminación de *GTR1* o de *GTR2* (homólogo de *GTR1*) provoca un crecimiento deficiente a elevadas presiones hidrostáticas y a bajas temperaturas, y que la introducción en una cepa *gtr1Δ* de un plásmido conteniendo *GTR1*, o de *GTR2* en una cepa *gtr2Δ*, igualaba al crecimiento de la cepa parental. Sin embargo, en el cribado que hemos llevado a cabo no se ha identificado a *GTR2* como uno de los genes cuya sobreexpresión provoque mejora en el crecimiento a baja temperatura. *GTR1* y *GTR2* están involucrados en el funcionamiento del complejo EGO/GSE (por sus siglas en inglés, Exit from rapamycin-induced Growth arrest/Gap1 Sorting in the Endosome) que participan en procesos de microautofagia y asociación con “rafts” de permeasas de aminoácidos. Además, a 15° C el transporte de aminoácidos para los que la cepa era auxótrofa (leucina, histidina y lisina), disminuía en los mutantes *gtr1Δ*. Al transformar este mutante con plásmidos que confieren prototrofia a los aminoácidos citados, se recupera el crecimiento de la cepa parental, lo que sugiere que la sensibilidad a las bajas temperaturas de los mutantes *gtrΔ* se debe a la deficiente incorporación de nutrientes. Por todo ello, el complejo EGO/GSE parece jugar un papel fundamental en la localización en la superficie de la célula de las permeasas de aminoácidos a bajas temperaturas. Esto podría explicar en parte el resultado que se obtiene al sobreexpresar el gen *GTR1* de manera individual, situación en la que se aprecia una ligera mejoría en la capacidad de crecimiento de la levadura frente a bajas temperaturas. Sin embargo, y dado que el efecto sobre dicha capacidad de crecimiento es mucho más acusado cuando se sobreexpresan conjuntamente *GTR1* y *PHO84*, todo parece indicar que *GTR1* también podría estar implicado en la localización o estabilización de esta proteína transportadora de fosfato. Esta posibilidad se apoya en estudios llevados a cabo en

cepas *gtr1Δ*, que presentan una disminución del 20% en la actividad transportadora de fosfato inorgánico por medio de Pho84p (Bun-Ya *et al.*, 1992). Sin embargo, en otro estudio la ausencia del gen *GTR1* no tuvo una consecuencia tan drástica en el transporte de fosfato inorgánico a través de Pho84p, aunque sí que se observó un retraso significativo en el mismo (Lagerstedt *et al.*, 2005). En este mismo trabajo los autores llevaron a cabo un análisis cualitativo de la localización celular de Pho84p en células *GTR1*⁺ y *gtr1Δ*, no observando cambios significativos entre ambos tipos de células. Alternativamente, también se podría especular con la hipótesis de que la disponibilidad intracelular de fosfato tuviera algún efecto sobre *GTR1* y que la sobreexpresión de *PHO84* restaurase la función o el papel de *GTR1* sobre el transporte de aminoácidos al aumentar dicha disponibilidad de fosfato, aunque no se dispone de ningún resultado experimental que pueda avalar esta última suposición.

En el presente trabajo también se ha demostrado que la sobreexpresión del gen YCR015C confiere mayor capacidad de crecimiento a 8° C en medio suplementado con exceso de triptófano. YCR015C codifica una proteína de función desconocida de la que se conoce muy poco, entre otras cosas que no es un gen esencial y que interactúa físicamente con Gtr2p, homólogo de Gtr1p. Aunque ya se ha mencionado anteriormente la aparente paradoja de no haber encontrado en el cribado de la genoteca ningún clon conteniendo el gen *GTR2*, y sí clones portadores de su homólogo *GTR1*, es posible que la identificación del gen YCR015C sea una manera, o una ruta indirecta, de haber identificado la posible participación de Gtr2p en la mejora de la capacidad de crecimiento de la levadura frente al frío, pues ambas proteínas parecen formar parte del mismo complejo proteico (Gavin *et al.*, 2002). Además, la ligera mejoría en el crecimiento frente a las bajas temperaturas aportada por la sobreexpresión de *GTR1* o de *PHO84* por separado, se ve muy reforzada, como vimos, por la sobreexpresión conjunta de ambos. Este resultado singular, que resalta que muy probablemente la tolerancia al frío sea un fenotipo dependiente de múltiples genes, se ha podido obtener mediante la aproximación experimental empleada en este trabajo gracias a la localización de ambos, no sólo en el mismo cromosoma, sino muy próximos ya que la distancia que separa las pautas de lectura abierta de ambos genes es de unos 1100 pb, mientras que Ycr015Cp se encuentra en el cromosoma III y *GTR2* en el cromosoma VII, lo que hace imposible la obtención de un clon conteniendo a ambos. Por otra parte, Ycr015Cp presenta homología con fosfoserinas fosfatasas de diversas especies bacterianas tales como

Halorhodospira halophila, *Chlorobium chlorochromatii* y *Pirellula* sp., por lo que contribuye a aumentar el fosfato intracelular. El hecho de que esta liberación de fosfato resulte positiva para la célula es coherente con las deficiencias en el transporte y biodisponibilidad de fosfato. Recientes estudios llevados a cabo para lograr la caracterización de un nuevo péptido antimicrobiano llamado kaliocina-1, que causa la muerte en células de levadura, han puesto de manifiesto que tiene como dianas el factor mitocondrial de iniciación 2 (requerido para obtener niveles normales de traducción mitocondrial y de respiración) y la proteína Ycr015Cp. Futuras investigaciones deberán esclarecer el papel que desempeña dicha proteína en la levadura y el mecanismo mediante el cual el agente antimicrobiano kaliocina-1 ejerce su actividad antimicrobiana.

Como ha sido demostrado en el capítulo de Resultados, la sobreexpresión de los genes relacionados con el transporte de triptófano o su biosíntesis, en una cepa Trp⁺ (RS-452) no mitiga la sensibilidad al frío. Sin embargo, la sobreexpresión en la misma de genes relacionados con el transporte de fosfato, así como la adición al medio de fosfato inorgánico para lograr una elevada concentración de fosfato (10 mM), sí que mejora considerablemente su crecimiento. Este mismo comportamiento se produce con W303 al añadir en el mismo medio triptófano y fosfato en alta concentración, por lo que una posible explicación es que las bajas temperaturas provoquen una deficiencia en la incorporación de fosfato debido a la pérdida de actividad de las permeasas, como en el caso de las permeasas de triptófano, a causa de la marcada disminución de la fluidez de la membrana, ya que al suplementar el medio de cultivo con una elevada concentración de fosfato inorgánico mejora el crecimiento en frío.

Se estudiaron los niveles de expresión de los genes *TAT2*, *TAT1* y *PHO90*, ya que las cepas que sobreexpresaban de forma individual cada uno de estos genes eran las que mejores resultados presentaban, en cuanto a crecimiento se refiere, tras su exposición a bajas temperaturas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden con los de análisis de micromatrices de cDNA publicados hasta la fecha. De hecho, tal como queda demostrado en una reciente publicación (Tai *et al.*, 2007), dichos estudios presentan resultados divergentes. Por ejemplo, entre los citados estudios existen contradicciones en lo que se refiere a los niveles de expresión de los genes que codifican proteínas ribosomales. Aunque Sahara *et al.* (2002) presentan un aumento en

la transcripción de muchos de estos genes tras una disminución de la temperatura a 10° C, en el trabajo realizado por Schade *et al.* (2004) una caída similar en la temperatura generó una respuesta transcripcional totalmente diferente. En segundo lugar, aunque la inducción de genes implicados en la reserva de carbohidratos es coherente con el choque térmico por bajas temperaturas, se ha visto que la acumulación de trehalosa sólo es indispensable para la supervivencia a temperaturas próximas a la congelación. Por encima de 10° C, el doble mutante nulo *tps1Δtps2Δ* no presentó defectos en su crecimiento ni pérdida de viabilidad (Kandror *et al.*, 2004; Panadero *et al.*, 2006). En tercer lugar, aunque se ha sugerido que el complejo Msn2p/Msn4p está implicado en la respuesta a las bajas temperaturas (Kandror *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2004) hasta el momento no se ha identificado una ruta transcripcional que se desencadene por las bajas temperaturas. Como ya hemos comentado, las discrepancias entre los diferentes estudios podrían deberse a las diferencias en las condiciones de cultivo, al tiempo en el que se realiza el aislamiento de los mRNA, a la cepa utilizada en cada estudio o incluso a las diferentes técnicas de cuantificación empleadas. No obstante, se ha visto que el nivel de expresión de un determinado gen no está necesariamente relacionado con la importancia del mismo para conseguir la adaptación frente a un determinado tipo de estrés (Giaever *et al.*, 2002). De hecho, hay genes que son absolutamente necesarios para el crecimiento bajo una determinada condición que no presentan cambios en el nivel de expresión, probablemente por que el cambio se produzca a nivel post-transcripcional o post-traducciona. La situación opuesta –un gen que presenta un gran aumento en su expresión, pero que no resulta necesario para el crecimiento- aunque conceptualmente resulta más difícil de justificar, es la circunstancia con la que nos hemos encontrado en este trabajo, donde ninguno de los genes que mejoran el crecimiento de la levadura frente al frío sufre, según los estudios de transcriptómica llevados a cabo por otros autores (Murata *et al.*, 2006; Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004; Homma *et al.*, 2003), espectaculares aumentos en su nivel de expresión cuando la temperatura ambiental desciende. Es posible que bajo condiciones estresantes, se expresen múltiples genes y sólo una pequeña fracción de los mismos sean esenciales para el crecimiento bajo dicha situación de estrés, mientras que el resto sirvan para preparar a la célula a superar un empeoramiento en las condiciones ambientales (en el caso del frío, proteger a la célula frente a una posible congelación posterior), o para adaptarse frente al estrés en cuestión y poder afrontar mejor una etapa de crecimiento posterior bajo las nuevas condiciones.

Por otro lado, en cuanto a la relación entre la mejora del crecimiento en frío mediante la sobreexpresión de los genes identificados y la resistencia a la congelación, los resultados obtenidos demuestran que la sobreexpresión de los genes que hemos identificado, tanto en el cribado llevado a cabo a 10° C en medio YPD (*TAT2*, *TAT1*, *TRP1*, *NSG2*, *PCK1* y *PRO2*), como en el cribado llevado a cabo a 8° C en medio YPD con exceso de triptófano (*PHO84.GTR1*, *PHO87*, *PHO90* e *YCR015C*), no confieren tolerancia a la congelación. Diversos trabajos ya han puesto de manifiesto ejemplos similares de comportamientos no relacionados en lo que respecta a la tolerancia a la congelación y al frío. Así, se han descrito genes cuya sobreexpresión confiere tolerancia a la congelación pero no lo hace con respecto al frío. Es el caso del gen *ERG10/YPL028W* (codifica una enzima acetoacetyl-Coa tiolasa, implicada en la biosíntesis de ergosterol) para el que, en un estudio llevado a cabo bajo condiciones tanto de “cold shock” (al someter las células a crecimiento a 10° C) como de estrés por congelación, se puso de manifiesto que su sobreexpresión no produjo ningún efecto sobre el crecimiento a bajas temperaturas, pero sí que confirió una mayor protección frente a la congelación (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2002). Del mismo modo, la producción de enzimas desaturasas recombinantes aumenta el índice de insaturación y fluidez de la membrana de las células, lo que provoca una mejora en la tolerancia a la congelación en levadura pero no en el crecimiento en frío (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2007).

Resulta obvio desde el punto de vista evolutivo que debe existir un punto de unión entre la respuesta a las bajas temperaturas y la desencadenada debido a la congelación ya que en los hábitats naturales las heladas se preceden de periodos de bajas temperaturas. Por ejemplo, la trehalosa comienza a acumularse después de 12 horas de incubación a 10°, 4° ó 0° C, independientemente de que exista crecimiento o no (Kandror *et al.*, 2004, Schade *et al.*, 2004). Dicho disacárido se acumula en cantidades elevadas en respuesta a diferentes condiciones estresantes (Blomberg, 2000; Estruch, 2000), y se ha propuesto que su actividad protectora de la célula se debe a la estabilización de la membrana plasmática y de las proteínas (Singer y Lindquist, 1998; Elbein *et al.*, 2003; Gancedo y Flores, 2004). También se ha relacionado la acumulación de trehalosa con una mayor resistencia a la congelación (Kim *et al.*, 1996). Aunque la trehalosa no es necesaria para el crecimiento a 10° C (Schade *et al.*, 2004), los resultados obtenidos por Kandror y colaboradores (2004) ponen de manifiesto que este compuesto protege a la célula frente

a bajas temperaturas. En el caso del glicerol, se ha observado una acumulación de este osmolito, que se produce en mayor medida a 4° C que a 12° C (Panadero *et al.*, 2006). El papel que ejerce el glicerol frente a la congelación se ha explicado en términos de prevención de la deshidratación osmótica resultante de los procesos de congelación/descongelación (Wolfe y Bryant, 1999), aunque se ha visto que no es necesario para el crecimiento a 12° C (Panadero *et al.*, 2006). En el caso del glucógeno se produce un reciclaje del mismo como respuesta a diferentes tipos de estrés, tales como choque térmico por calor, daño oxidativo o estrés por congelación porque los genes implicados tanto en su síntesis como en su degradación se encuentran inducidos, sin que exista una acumulación neta de este polisacárido (Parrou *et al.*, 1997). Sin embargo, en el caso de la exposición a bajas temperaturas no se da el reciclaje de este polisacárido de reserva comentado anteriormente para el caso de la congelación, si no que se produce una acumulación significativa de glucógeno tras exponer a 10° C durante 12 horas, y de forma más marcada durante 60 horas (Schade *et al.*, 2004).

Parecería factible suponer que la adaptación que persigue la levadura con el cambio transcripcional que se produce con el cold shock puede preparar mejor a las células para resistir la congelación pues, de hecho, el estímulo sensorial que advierte de una u otra situación es el mismo, una bajada de la temperatura, pero los determinantes genéticos de la capacidad de crecimiento en frío son distintos a los que desempeñan un papel en la resistencia a la congelación. Un estudio reciente (Amato *et al.*, 2008), llevado a cabo con levaduras aisladas de las vetas de agua del hielo antártico, ha puesto de manifiesto la existencia de actividad metabólica (medida como velocidad de incorporación de leucina a macromoléculas) a -15° C. El resultado más sorprendente del citado estudio fue la detección de incorporación de leucina en *S. cerevisiae* (microorganismo incorporado al estudio para compararlo con las levaduras psicrófilas halladas en el hielo antártico) a -15° C, lo que implica un nivel basal de metabolismo a una temperatura que dista mucho de la temperatura mínima de crecimiento. Los resultados presentados por estos autores son coherentes con la hipótesis de Price y Sowers (2004), quienes sugirieron que el metabolismo en condiciones de congelación está dirigido hacia el mantenimiento y la supervivencia y no hacia el crecimiento. Muy probablemente esta es la diferencia fundamental con la estrategia planteada por la célula frente a las bajas temperaturas, que persigue la adaptación a las mismas para, posteriormente, reanudar el crecimiento. Futuras investigaciones deberán contribuir a esclarecer los aspectos de la

respuesta al frío como un medio para sobrevivir, adaptarse y crecer a bajas temperaturas así como los posibles mecanismos que pudiera tener en común para proteger a las células frente a la congelación.

Los estudios de transporte de triptófano llevados a cabo en las cepas industriales (CECT 1990, W34/70 y CECT 1462) ponen de manifiesto la existencia de una disminución en la capacidad inicial de transporte de triptófano similar a la obtenida para la cepa de laboratorio W303. Sin embargo, al no presentar las cepas industriales ningún tipo de auxotrofia, esta merma de la capacidad de incorporación de triptófano no repercute en el crecimiento celular ya que las células están dotadas de todos los genes que codifican las enzimas que permiten la biosíntesis de triptófano. Además, el crecimiento de las cepas industriales no mejoró al crecer las células en un medio con triptófano en exceso. Por lo que se deduce que la disponibilidad intracelular de triptófano no parece ser un factor limitante para el crecimiento a bajas temperaturas de las levaduras industriales. Tampoco la adición de fosfato inorgánico en elevada concentración mejoró el crecimiento de las cepas industriales. Nuestros resultados se ven apoyados por un reciente trabajo, llevado a cabo en condiciones que pretenden imitar las fermentaciones vínicas, que compara el perfil transcripcional de una cepa de laboratorio y una cepa industrial donde se pone de manifiesto un mayor estado de ayuno de nitrógeno para la cepa de laboratorio que para la cepa industrial (Pizarro *et al.*, 2008). Por lo tanto, para lograr mejorar el comportamiento de las cepas industriales resultaría interesante construir y analizar una librería genómica de una cepa de levadura cervecera de fermentación baja (*S. carlsbergensis* o *S. pastorianus*, según autores). El motivo de construir y analizar dicha librería es que las levaduras cerveceras de fermentación baja se seleccionaron a lo largo de la historia por su mejor capacidad de fermentar a temperaturas más bajas que las levaduras de fermentación alta. Como es bien conocido, las levaduras industriales por una parte poseen un genoma más complejo (en el caso de las levaduras de cervecería de fermentación baja, son genomas híbridos que, además, presentan aneuploidías) que las cepas de laboratorio y, además, se han ido seleccionando empíricamente durante largo periodos de tiempo en los que se han ido adaptando a un determinado entorno medioambiental relacionado con las materias primas, el proceso industrial y el producto a fabricar (de nuevo para las levaduras de producción de cerveza tipo “lager”, por poseer mejores características en relación con su capacidad de fermentar a temperaturas más bajas y/o producir un perfil de aromas

más acorde con el resultado final que se quiere obtener). Por tanto, es muy posible que a partir de la dotación cromosómica de dichas cepas se puedan aislar otros genes, cuyas características en cuanto a conferir mayor capacidad de crecimiento frente a bajas temperaturas resulten más adecuadas.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los efectos del frío sobre la capacidad de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se ven atenuados mediante la prototrofia a triptófano. En cepas auxótrofas para triptófano (*trp1⁻*) el efecto de las bajas temperaturas se ve exacerbado, mientras que sus consecuencias sobre el crecimiento se pueden mitigar: a) mediante la adición al medio de cultivo de un exceso de triptófano; b) mediante la sobreexpresión de cualquiera de los dos genes, *TAT1* o *TAT2*, que codifican para proteínas de membrana transportadoras de triptófano, o c) mediante la complementación de la auxotrofia por sobreexpresión del gen *TRP1*.

2. La determinación de las velocidades iniciales de incorporación de triptófano muestra que, a bajas temperaturas, el transporte de triptófano se halla seriamente comprometido, tanto en la cepa de laboratorio W303 como en las distintas cepas industriales de fabricación de cerveza estudiadas. Para ambos casos, cepas de laboratorio e industriales, la reducción de la temperatura desde 28° a 10° C provoca una disminución de un orden de magnitud en las velocidades iniciales de incorporación de triptófano. Al sobreexpresar en la cepa de laboratorio W303 de forma individual los genes que codifican para los transportadores de triptófano *Tat2p* y *Tat1p*, se obtiene un notable aumento en el transporte de triptófano a 10° C, el cual se correlaciona con un considerable incremento de la tasa de crecimiento a dicha temperatura.

3. La sobreexpresión de cualquiera de los siguientes genes, *NSG2*, *PCK1* o *PRO2* provoca una mejoría en el crecimiento a 10° C, tanto en una cepa auxótrofa para triptófano como W303, como en una cepa protótrofa para dicho nutriente como RS-452, lo que se traduce en una disminución en el tiempo de latencia y en el tiempo de generación durante el crecimiento a dicha temperatura.

4. La sobreexpresión en una cepa protótrofa para triptófano como RS-452 de los siguientes genes, *PHO84*, *PHO87*, *PHO90* y *GTR1*, todos ellos relacionados con el transporte de fosfato, así como del gen *YCR015C*, o bien la adición al medio de cultivo de fosfato inorgánico para lograr una elevada disponibilidad del mismo, mejora considerablemente el crecimiento en frío de dicha cepa.

5. La disponibilidad de triptófano, de fosfato o de ambos conjuntamente, no presenta ningún efecto sobre la capacidad de las cepas de cervecería de crecer a bajas temperaturas.

6. La sobreexpresión de cualquiera de los genes que mejora la capacidad de crecimiento frente a las bajas temperaturas, no tiene ningún efecto sobre la resistencia a la congelación de la levadura, ni en cepas auxótrofas ni en cepas protótrofas para triptófano.

7. La determinación de los niveles de expresión de los genes *TAT2*, *TAT1* y *PHO90* en la cepa W303 y a dos temperaturas diferentes, 28° y 10° C, indica que a 10° C la transcripción del gen *TAT2* está ligeramente inducida (2,3 veces más que a 28° C), la de *TAT1* está marcadamente inducida (5,5 veces más que a 28° C) y la de *PHO90* claramente reprimida (5,6 veces menos que a 28° C).

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Abe, F. & Horikoshi, K. Tryptophan permease gene *TAT2* confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **20**, 8093-8102 (2000).

Abe, F. & Iida, H. Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7566-7584 (2003).

Abe, F. & Minegishi, H. Global screening of genes essential for growth in high-pressure and cold environments: searching for basic adaptative strategies using a yeast deletion library. *Genetics* **178**, 851-872 (2008).

Abramova, N., Cohen, B.D., Sertil, O., Kapoor, R., Davis, K.J.A. & Lowry, C.V. Regulatory mechanisms controlling expression of the *DAN/TIR* mannoprotein genes during anaerobic remodelling of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **157**, 1169-1177 (2001).

Aguilar, P.S., Lopez, P. & Mendoza, D. Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the delta5 desaturase of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **181**, 7028-7033 (1999).

Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C. & Mendoza, D. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *Embo J.* **20**, 1681-1691 (2001).

Aguilera, J., Rodriguez-Vargas, S., Prieto & J.A. The HOG MAP kinase pathway is required for the induction of methylglyoxal-responsive genes and determines methylglyoxal resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **56**, 228-239 (2005).

Aguilera, J., Rande-Gil, F. & Prieto, J.A. Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *Fems Microbiol. Rev.* **31**, 327-341 (2007).

Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M. & Prior, B.A. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell Biol.* **13**, 4135-4144 (1994).

Al-Fageeh, M.B., Marchant, R.J., Carden, M.J & Smales C.M. The cold-shock response in cultured mammalian cells: harnessing the response for the improvement of recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 829-835 (2006).

Amato, P., Doyle, S. & Christner, B.C. Macromolecular synthesis by yeasts under frozen conditions. *Environ. Microbiol.* DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01829.x (2009).

Askree, S.H., Yehuda, T., Smolikov, S., Gurevich, R., Hawk, J., Coker, C., Krauskopf, A., Kupiec, M., McEachern & M.J. A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants that affect telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8658-8663 (2004).

Attfeld, P.V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* **15**, 1351-1357 (1997).

- Auld, K.L., Brown, C.R., Casolari, J.M., Komili, S. & Silver, P.A. Genomic association of the proteasome demonstrates overlapping gene regulatory activity with transcription factors substrates. *Mol. Cell* **21**, 861-871 (2006).
- Auesukaree, Ch., Homma, T., Kaneko, Y. & Harashima, S. Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**, 843-850 (2003).
- Bagnat, M., Keränen, S., Shevchenko, A. & Simons, K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3254-3259 (2000).
- Ball, C.A., Jin, H., Sherlock, G., Weng, S., Matese, J.C., Andrada, R., Binkley, G., Dolinski, K., Dwight, S.S., Harris, M.A., Issel-Tarver, L., Schroeder, M., Botstein, D. & Cherry, J.M. *Saccharomyces* Genome Database provides tools to survey gene expression and functional analysis data. *Nucleic Acids Res.* **29**, 80-81 (2001).
- Beck, T., Schmidt, A. & Hall, M.N. Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.* **146**, 1227-1238 (1999).
- Becker, J.V.W., Armstrong, G.O., van der Merwe, M.J., Lambrechts, M.G., Vivier, M.A. & Pretorius, I.S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res.* **4**, 79-85 (2003).
- Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., de Vos, C.H.R. & Bovy, A. Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5670-5672 (2006).
- Beggs, J.D. Transformation of yeast by a replicating hybrid plasmid. *Nature* **257**, 104-108 (1978).
- Bender, A. & Sprague, G.F. Jr. MAT alpha 1 protein, a yeast transcription activator, binds synergistically with a second protein to a set of cell-type-specific genes. *Cell* **50**, 681-691 (1987).
- Bentley, N.J., Fitch, I.T. & Tuite, M.F. The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast* **8**, 95-106 (1992).
- Blomberg, A. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, answers and a model. *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 1-8 (2000).
- Boulton, C. & Quain, D. *Brewing yeast and fermentation* (Blackwell Science Ltd., Oxford, 2001).
- Bryant, N.J. & James, D.E. Vps45p stabilizes the syntaxin homologue Tlg2p and positively regulates SNARE complex formation. *Embo J.* **20**, 3380-3388 (2001).
- Buchner, E. Ueber zellenfreie gährung. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **31**, 568-574 (1898).
- Bultynck, G., Heath, V.L., Majeed, A.P., Galan, J.M., Haguenaer-Tsapis, R. & Cyert, M.S. Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol. Cell Biol.* **26**, 4729-4745 (2006).

- Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. & Oshima, Y. The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell Biol.* **11**, 3229-3238 (1991).
- Bun-Ya, M., Harashima, S. & Oshima, Y. Putative GTP-binding protein, Gtr1, associated with the function of the Pho84 inorganic phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **12**, 2958-2966 (1992).
- Bun-Ya, M., Shikata, K., Nakade, S., Yompakdee, C., Harashima, S. & Oshima, Y. Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**, 344-351 (1996).
- Burke, D., Dawson, D. & Stearns, T. *Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor laboratory course manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, 2000).
- Cagniard-Latour, C. Mémoire sur la fermentation vineuse. *Compt. Rend.* **4**, 905-906 (1837).
- Cagniard-Latour, C. Mémoire sur la fermentation vineuse. *Ann. Chim. Phys.* **68**, 206-222 (1838).
- Cardenas, M.E., Cutler, N.S., Lorenz, M.C., Di Como, C.J. & Heitman, J. The TOR signalling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* **13**, 3271-3272 (1999).
- Cardona, F., Carrasco, P., Perez-Ortin, J.E., Olmo, M. & Aranda, A. A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeast. *Int. J. Food. Microbiol.* **114**, 83-91 (2007).
- Carlson, M. & Botstein, D. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**, 145-154 (1982).
- Carratu, L., Franceschelli, S., Pardini, C.L., Kobayashi, G.S., Horvath, I., Vigh, L. & Maresca, B. Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3870-3875 (1996).
- Cavicchioli, R. Cold-adapted archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 331-343 (2006).
- Chant, J., Corrado, K., Pringle, J.R. & Herskowitz, I. Yeast *BUD5*, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene *BEM1*. *Cell* **65**, 1213-1224 (1991).
- Cherry, J.M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S.A., Dwight, S.S., Hester, E.T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., Weng, S. & Botstein, D. SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **26**, 73-79 (1998).
- Choi, J.H., Lou, W. & Vancura, A. A novel membrane-bound glutathion S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 29915-29922 (1998).
- Chung, N., Mao, C., Heitman, J., Hannun, Y.A. & Obeid, L.M. Induction and repression of *DANI* and the family of anaerobic mannoprotein genes in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through a complex array of regulatory sites. *Nucleic Acids Res.* **29**, 799-808 (2001).

- Chung, N., Mao, C., Heitman, J., Hannun, Y.A. & Obeid, L.M. Phytosphingosine as a specific inhibitor of growth and nutrient import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 35614-35621 (2001b).
- Cossins, A.R. & Macdonald, A.G. The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold. *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 115-135 (1989).
- Cossins, A.R., Murray, P.A., Gracey, A.Y., Loque, J., Polley, S., Caddick, M., Brooks, S., Postle, T. & Maclean, N. The role of desaturases in cold-induced lipid restructuring. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1082-1086 (2002).
- Coulon, J., Husnik, J.I., Inglis, D.L., van der Merwe, G.K., Lonvaud, A., Erasmus, D.J. & van Vuuren H.J.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Viticult.* **57**, 113-124 (2006).
- Coyle, J.T. & Puttfarcken, P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695 (1993).
- Dequin, S., Baptista, E. & Barre, P. Acidification of grape musts by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts strains genetically engineered to produce lactic acid. *Am. J. Enol. Viticult.* **50**, 45-50 (1999).
- Dequin, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking-yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 577-588 (2001).
- Donalies, U.E.B. & Stahl, U. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSU1*. *Yeast* **19**, 475-484 (2002).
- Edwards, P.A. & Ericsson, J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 157-185 (1999).
- Eglinton, J.M.; Heinrich, A.J., Pollnitz, A.P., Langridge, P., Henschke, P.A. & Barros Lopes, M. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast* **19**, 295-301.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. & Carroll, D. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**, 17-27 (2003).
- Ermolenko, D.N. & Makhataдзе, G.I. Bacterial cold-shock proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1902-1913 (2002).
- Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *Fems Microbiol. Rev.* **24**, 469-486 (2000).
- Fang, L., Hou, Y. & Inouye, M. Role of the cold-box region in the 5' untranslated region of the *cspA* mRNA in its transient expression at low temperature in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 90-95 (1998).
- Farewell, A. & Neidhardt, F.C. Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 4707-4710 (1998).
- Ferrer, M., Chernikova, T.N., Yakimov, M.M., Golyshin, P.N. & Timmis, K.N. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnol.* **21**, 1266-1267 (2003).

- Fersht, A. *Structure and mechanism in protein science* 510-512 (W.H.Freeman and Co., New York,1999).
- Flury, I., Garza, R., Shearer, A., Rosen, J., Cronin, S. & Hampton, R.Y. INSIG: a broadly conserved transmembrane chaperone for sterol-sensing domain proteins. *Embo J.* **24**, 3917-3926 (2005).
- Forment, J., Naranjo, M.A., Roldan, M., Serrano, R. & Vicente, O. Expression of Arabidopsis SR-like splicing proteins confers salt tolerance to yeast and transgenic plants. *Plant J.* **30**, 511-519 (2002).
- Forsberg, H., Hammar, M., Andreasson, C., Moliner, A. & Ljungdahl, P.O. Suppressors of *ssy1* and *ptr3* null mutations define novel amino acid sensor-independent genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **158**, 973-988 (2001).
- Fujii, T., Shimoi, H. & Iimura, Y. Structure of the glucan-binding sugar chain of Tip1p, a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1427**, 133-144 (1999).
- Gancedo, C. & Flores, C.L The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeast and fungi. *FEMS Yeast Res.* **4**, 351-359 (2004).
- Gao, X.D., Tachikawa, H., Sato, T., Jigami, Y. & Dean, N. Alg14 recruits Alg13 to the cytoplasmic face of the endoplasmic reticulum to form a novel bipartite UDP-N-acetylglucosamine transferase required for the second step of N-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* **280**, 36254-36262 (2005).
- Garcia-Rodriguez, L.J., Duran, A. & Roncero, C. Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J. Bacteriol.* **182**, 2428-2437 (2000).
- Gavin, A.C., Böche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A. & Cruciat, C. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147 (2002).
- Gaxiola, R., Larrinoa, I.F., Villalba, J.M. & Serrano, R. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *Embo J.* **11**, 3157-3164 (1992).
- Gerday, C., Aittaleb, M., Arpigny, J.L., Baise, E., Chessa, J.P., Garsoux, G., Petrescu, I. & Feller, G. Psychrophilic enzymes: a thermodynamic challenge. *Biochim. Biophys. Acta* **1342**, 119-131 (1997).
- Giaver, G., Chu, A.M., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A.P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R. *et al.* Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387-391 (2002).
- Gietz, R. D. & Woods, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**, 87-96 (2002).
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S.G. Life with 6000 genes. *Science* **274**, 563-567 (1996).

- Goffeau, A. Four years of post-genomic life with 6000 yeast genes. *FEBS Lett.* **480**, 37-41 (2000).
- Gompertz, B. On the nature of the function of the law of the human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philos. Trans. R. Soc. London* **115**, 513-585 (1825).
- Govinden, R., Pillay, B., van Zyl, W.H. & Pillay, D. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Pichia stipitis* and *Candida Shehatae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 76-80 (1999).
- Grant, C.M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxine systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol. Microbiol.* **39**, 533-541 (2001).
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R. & Marahiel, M. A. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**, 4611-4619 (1996).
- Grauslund, M., Didion, T., Kielland-Brandt, M.C. & Andersen, H.A. BAP2, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1269**, 275-280 (1995).
- Griffioen, G. & Thevelein, J.M. Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr. Genet.* **41**, 199-207 (2002).
- Grossmann, G., Opekarova, M., Novakova, L., Stolz, J. & Tanner, W. Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **5**, 945-953 (2006).
- Grossmann, G., Opekarova, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I. & Tanner, W. Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *Embo J.* **26**, 1-8 (2007).
- Grünstein, M. & Hogness D.S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 3961-3965 (1975).
- Guarente, L. & Mason, T. Heme regulates transcription of the *CYCI* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32**, 1279-1286 (1983).
- Hammond, J. R. Genetically-modified brewing yeast for the 21st century. Progress to date. *Yeast* **11**, 1613-1627 (1995).
- Hampsey, M. A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1099-1133 (1997).
- Han, Y., Zhou, D., Pang, X., Zhang, L., Song, Y., Tong, Z., Bao, J., Dai, E., Wang, J., Guo, Z., Zhai, J., Du, Z., Wang, X., Huang, P. & Yang, R. DNA microarray analysis of the heat- and cold-shock stimulons in *Yersinia pestis*. *Microbes Infect.* **7**, 335-348 (2005).
- Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580 (1983).
- Hansen, E.C. Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. *Résumé du Compte-Rendu des Travaux du Laboratoire de Carlsberg* **2**, 13-59 (1883).

- Hansen, J. & Kielland-Brandt, M.C. Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases the level of sulphite in beer. *J. Biotechnol.* **50**, 75-87 (1996).
- Heitman, J., Koller, A., Kunz, J., Henriquez, R., Schmidt, A., Movva, N.R. & Hall, M.N. The immunosuppressant FK506 inhibits amino acid import in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **13**, 5010-5019 (1993)
- Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425-479 (1998).
- Herrero, O., Ramon, D. & Orejas, M. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for *de novo* production of aromatic monoterpenes in wine. *Metab. Eng.* **10**, 78-86 (2008).
- Hinnen, A., Hicks, J.B. & Fink, G.R. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933 (1978).
- Hiser, L., Basson, M.E. & Rine, J. *ERG10* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes acetoacetyl-CoA thiolase. *J. Biol. Chem.* **269**, 31383-31389 (1994).
- Hitzeman, R.A., Clarke, L. & Carbon, J. Isolation and characterization of the yeast 3-phosphoglycerokinase gene (PGK) by an immunological screening technique. *J. Biol. Chem.* **255**, 12073-12080 (1980).
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A. *et al.* Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **425**, 180-183 (2002).
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. & Buitink, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**, 431-438 (2001).
- Holmes, D.S. & Quigley, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197 (1981).
- Homma, T., Iwahashi, H. & Komatsu, Y. Yeast gene expression during growth at low temperature. *Cryobiology* **46**, 230-237 (2003).
- Hommel, U., Eberhard, M. & Kirschner, K. Phosphoribosyl anthranilate isomerase catalyzes a reversible amidori reaction. *Biochemistry* **34**, 5429-5439 (1995).
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D. & Jentsch, S. Activation of membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell* **102**, 577-586 (2000).
- Hough, J.S., Briggs, D.E., Stevens, R. & Young, T.W. *Malting and brewing science* (Chapman & Hall, London, 1982).
- Hürlimann, H.C., Stadler-Waibel, M., Werner, T.P. & Freimoser, F.M. Pho91 is a vacuolar phosphate transporter that regulates phosphate and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4438-4445 (2007).
- Husnik, J.I., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z. & van Vuuren, H.J.J. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metab. Eng.* **8**, 315-323 (2006).
- Immervoll, T., Gentsch, M. & Tanner, W. *PMT3* and *PMT4*, two new members of the protein-O-mannosyltransferase gene family of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**, 1345-1351 (1995).

- Inaba, M., Suzuki, I., Szalontai, B., Kanesaki, Y., Los, D.A., Hayashi, H. & Murata, N. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **278**, 12191–12198 (2003).
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
- Izawa, S., Ikeda, K., Takahashi, N. & Inoue, Y. Improvement of tolerance to freeze-thaw stress of baker's yeast by cultivation with soy peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 533-537 (2007).
- Jiang, W., Hou, Y. & Inouye, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is a RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* **272**, 196-202 (1997).
- Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E. & Goldberg, M.A. MGA2 is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6161-6169 (2001).
- Jiang, Y., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Gilooly, L., McDaid, K., Oh, C.S., Martin, C.E. & Goldberg, M.A. Mga2p processing by hypoxia and unsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*: impact on LORE-dependent gene expression. *Eukaryot. Cell* **1**, 481-490 (2002).
- Johnston, S.A. & De Vit, M.J. Biolistic transformation of yeast. *Methods Mol. Biol.* **53**, 147-153 (1996).
- Jones, P.G. & Inouye, M. The cold shock response—a hot topic. *Mol. Microbiol.* **11**, 811–818 (1994).
- Jones, P.G. & Inouye, M. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.* **21**, 1207-1218 (1996).
- Kajiwara, S., Aritomi, T., Suga, K., Ohtaguchi, K. & Kobayashi, O. Overexpression of the *OLE1* gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 568-574 (2000).
- Kandror, O., DeLeon, A. & Goldberg, A.L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9727-9732 (2002).
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D. & Goldberg, A. Yeast adapt to near-freezing temperatures by *STRE/Msn2,4*-dependent induction of trehalose and certain molecular chaperones. *Mol. Cell* **13**, 771-781 (2004).
- Kim, J., Alizadeh, P., Harding, T., Hefner-Gravink, A. & Klionsky, D.J. Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival dehydration, freezing and ethanol shock: potential commercial applications. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1563-1569 (1996).
- Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K. & Takahashi, K. Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 301-306 (1991).
- Kodama, Y., Fukui, N., Ashikari, T. Shibano, Y., Moriokafujimoto, K., Hiraki, Y. & Nakatani, K. Improvement of maltose fermentation efficiency- constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. *J.Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 24-29 (1995).

- Kondo, K. & Inouye, M. *TIP1*, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**, 17537–17544 (1991).
- Kondo, K. & Inouye, M. Yeast *NSR1* protein that has structural similarity to mammalian nucleolin is involved in pre-rRNA processing. *J. Biol. Chem.* **267**, 16252–16258 (1992).
- Kondo, K., Kowalski, L.R. & Inouye, M. Cold shock induction of yeast nsr1 protein and its role in pre- rRNA processing. *J. Biol. Chem.* **267**, 16259–16265 (1992b).
- Korch, C., Moutain, H.A., Gyllang, H., Winge, M. & Brehmer, P. A mechanism for sulphite production in beer and how to increase sulphite levels by recombinant genetics. *Eur. Brew. Conv. Proc. Congr.* **23**, 201–208 (1991).
- Kowalski, L.R., Kondo, K., & Inouye, M. Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **15**, 341–353 (1995).
- Lagerstedt, J.O., Reeve, I., Voss, J.C. & Persson, B.L. Structure and function of the GTP binding protein Gtr1 and its role in phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **44**, 511–517 (2005).
- Lancashire, W.E., Carter, A.T., Howard, J.J. & Wilde, R.J. Super-attenuating brewing yeast. *Eur. Brew. Conv. Proc. Congr.* **22**, 491–498 (1989).
- Lawrence, C.L., Botting, C.H., Antrobus, R. & Coote, P.J. Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol. Cell Biol.* **24**, 3307–3323 (2004).
- Layfield, R., Franklin, K., Landon, M., Walker, G., Wang, P., Ramage, R., Brown, A., Love, S., Urquhart, K., Muir, T., Baker, R. & Mayer, R.J. Chemically synthesized ubiquitin extension proteins detect distinct catalytic capacities of deubiquitinating enzymes. *Anal. Biochem.* **274**, 40–49 (1999).
- Lee, F.J. Modified protocol for yeast DNA mini-preparation. *Biotechniques* **12**, 677 (1992).
- Lee, J.H., Montagu, M.V. & Verbruggen, N. A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5873–5877 (1999).
- Leeuwenhoek, A. *Ondervindingen en Beschouwingen der onsigtbare Geschapene Waarheden*. Delft (1694).
- Lilly, M., Lambrechts, M.G. & Pretorius, I.S. Effect of increased yeast alcohol acetyl transferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 744–753 (2000).
- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D. & Pretorius, I.S. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* **23**, 641–659 (2006).
- Lindquist, S. & Craig, E.A. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* **22**, 631–677 (1988).
- Linko, Y., Javanainen, P. & Linko, S. Biotechnology of bread baking. *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 339–344 (1997).

- Liu, M., Bruwilow, W. & Needleman, R. Activity of the yeast Tat2p tryptophan permease is sensitive to the anti-tumor agent 4-phenylbutyrate. *Curr. Genet.* **46**, 256-268 (2004).
- Loertscher, J., Larson, L., Matson, C.K, Parrish, M.L., Felthauer, A., Sturm, A., Tachibana, C., Bard, M. & Wright, R. Endoplasmic reticulum-associated degradation is required for cold adaptation and regulation of sterol biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **5**, 712-722 (2006).
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S. & France, J. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 289-300 (2006).
- Los, D.A. & Murata, N. Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochem. Biophys. Acta* **1666**, 142-157 (2004).
- Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. & Estruch, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *Embo J.* **15**, 2227-2235 (1996).
- McKemy, D.D., Neuhausser, W.M. & Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52-58 (2002).
- Meyen, J. Jahresbericht über die resultate der arbeiten im felde der physiologischen botanik von dem jahre 1837. *Archiv für Naturgeschichte* **4**, 1-186 (1838).
- Miquel, M., James Jr., D., Dooner, H. & Browse, J. *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6208-6212 (1993).
- Miura, T. & Abe, F. (2004) Multiple ubiquitin-specific protease genes are involved in degradation of yeast tryptophan permease Tat2 at high pressure. *FEMS Microbiol. Lett.* **239**, 171-179 (1993).
- Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S. & Agosin, E. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **77**, 675-687 (2007).
- Morita, Y., Nakamori, S. & Takagi, H. L-Proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding gamma-glutamyl kinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 212 – 219 (2003).
- Motshwene, P., Karreman, R., Kgari, G., Brandt, W. & Lindsey, G. LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **377**, 769-774 (2004).
- Mulet, J.M., Alemany, B., Ros, R. & Serrano, R. Isolation and characterization of two cDNA from *Beta vulgaris* conferring osmotic tolerance in yeast. Gordon Research Conference on Salt and Water Stress in Plants (2002)
- Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y. & Nishida, I. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* **356**, 710-713 (1993).

- Murata, Y., Homma, T., Kitagawa, E. *et al.* Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4° C. *Extremophiles* **10**,117-128 (2006).
- Nagayama, A., Kato, Ch. & Abe, F. The N- and C- terminal mutations in tryptophan permease Tat2 confer cell growth in *Saccharomyces cerevisiae* under high-pressure and low temperature conditions. *Extremophiles* **8**, 143-149 (2004).
- Nakagawa, Y., Sakumoto, N., Kaneko, Y. & Harashima, S. Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 707-713 (2002).
- Nakagawa, Y., Ueda, A., Kaneko, Y. & Harashima, S. Merging of multiple signals regulatin delta9 fatty acid desaturase gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **269**, 370-380 (2003).
- Neuberg, C. & Reinfurth, E. About the process of the alcoholic fermentation with alkaline reaction. I. Cellfree fermentation in alkaline solutions. *Biochem. Z.* **78**, 238-263 (1917).
- Odani, M., Komatsu, Y., Oka, S. & Iwahashi, H. Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. *Criobiology* **47**, 155-164 (2003).
- Omura, F., Shibano, Y., Fukui, N. & Nakatani, K. Reduction of hydrogen sulfide production in brewing yeast by constitutive expression of *MET25* gene. *J. Am. Soc. Brew. Chem* **53**, 58-62 (1995).
- Omura, F. & Kodama, Y. The N-terminal domain of yeast Bap2 permease is phosphorylated dependently on the Npr1 kinase in response to starvation. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**, 227-234 (2004).
- Osinga, K.A., Beudeker, R.F., van der Plaat, J.B. & de Hollander, J.A. New yeast strains providing for an enhanced rate of the fermentation of sugars, a process to obtain such yeasts and the use of these yeasts. Eur. Patent 0306107B1 (1988).
- Palmer, L.K., Wolfe, D., Keeley, J.L. & Keil, R.L. Volatile anesthetics affect nutrient availability in yeast. *Genetics* **161**, 563-574 (2002).
- Panadero, J., Rande-Gil, F. & Prieto, J.A. Heterologous expression of type I antifreeze peptide GS-5 in baker's yeast increase freeze tolerance and provides enhanced gas production in frozen dough. *J. Agric. Food Chem* **53**, 9966-9970 (2005).
- Panadero, J., Pallotti, C., Rodriguez-Vargas, S., Rande-Gil, F. & Prieto J.A, A downshift in temperatura activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**, 4638-4645 (2006).
- Panadero, J., Hernandez-Lopez M.J., Prieto, J.A. & Rande-Gil, F. Overexpression of the calcineurin target *CRZI* provides freeze tolerance and enhances the fermentative capacity of baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4824-4831 (2007).
- Panoff, J.M., Thammavongs, B., Gueguen, M. & Boutibonnes P. Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* **36**, 75-83 (1998).
- Parrou, J.L., Teste, M.A. & François, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for

- stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* **143**, 1891-1900 (1997).
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A. & Lindquist, S. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* **372**, 475-478 (1994).
- Pasteur, L. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Compt. Rend.* **45**, 1032-1036 (1857).
- Penttillä, M, André, L., Saloheimo, M., Lehtovaara, P. & Knowles, J.K.C. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3**, 175-185 (1987).
- Perry, C. & Meaden, P. Properties of a genetically-engineered dextrin-fermenting strain of brewers' yeast. *J. Inst. Brew. London* **94**, 64-67 (1988).
- Persson, B.L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A. & Pattison, J. Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**, 255-272 (1999).
- Phadtare, S. & Inouye, M. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 7007-7014 (2004).
- Phadtare, S., Inouye, M. & Severinov, K. The mechanism of nucleic acid melting by a CspA family protein. *J. Mol. Biol.* **337**, 147-155 (2004b).
- Pizarro, F.J., Jewett, M.C., Nielsen, J. & Agosin, E. Growth temperature exerts differential physiological and transcriptional responses in laboratory and wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 6358-6368 (2008).
- Porter, S.D. & Smith, M. Homeo-domain homology in yeast MAT alpha 2 is essential for repressor activity. *Nature* **320**, 766-768 (1986).
- Prasad, R., Widen, S.G., Singhal, R.K., Watkins, J., Prakash, L. & Wilson, S.H. Yeast open reading frame YCR14C encodes a DNA beta-polymerase-like enzyme. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5301-5307 (1993).
- Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729 (2000).
- Price, B. & Sowers, T. Temperature dependence of metabolic rates for microbial growth, maintenance and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4631-4636 (2004).
- Puig, S., Ramon, D. & Perez, J.E. Optimized method to obtain stable food-safe recombinant wine yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1689-1693 (1998).
- Qing, G., Ma, L.C., Khorchid, A., Swapna, G.V.T., Mal, T.K., Takayama, M.M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H., Acton, T., Montelione, G.T., Ikura, M. & Inouye, M. Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 877-882 (2004).
- Rachidi, N., Martinez, M.J., Barre, P. & Blondin, B. *Saccharomyces cerevisiae* PAU genes are induced by anaerobiosis. *Mol. Microbiol.* **35**, 1421-1430 (2000).
- Ramos, F. & Wiame, J.M. Synthesis and activation of asparagine in asparagine auxotrophs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **94**, 409-417 (1979).

- Remize, F., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., Barre, P. & Dequin, S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 143–149 (1999).
- Rodriguez-Vargas, S., Estruch, F. & Randez-Gil, F. Gene expression analysis of cold and freeze stress in baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3024-3030 (2002).
- Rodriguez-Vargas, S., Sanchez-Garcia, A., Martinez-Rivas, J.M., Prieto, J.A. & Randez-Gil, F. Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 110-116 (2007).
- Rudolph, A.S. & Crowe, J.H. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* **22**, 367–377 (1985).
- Sahara, T., Goda, T. & Ohgiya, S. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol. Chem.* **277**, 50015-50021 (2002).
- Sakai, K., Fukui, S., Yabuuchi, S. Aoyagi, S. & Tsumura, Y. Expression of the *Saccharomyces diastaticus* *STAI* gene in brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem* **47**, 87-91 (1989).
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E. & Lindsey, G. The LEA-like protein HSP12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim. Biophys. Acta* **1463**, 267-278 (2000).
- Samarsky, D.A. & Fournier, M.J. A comprehensive database for the small nucleolar RNAs from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **27**, 161-164 (1999).
- Sambrook, J. & Russell, D.W. *Molecular cloning. A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).
- Samuel, D. Investigation of ancient egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science* **273**, 488-490 (1996).
- Samuel, D., Kumar, T.K.S., Ganesh, G., Jayaraman, G., Yang, P.W., Chang, M.M., Trivedi, V.D., Wang, S.L., Hwang, K.C., Chang, D.K. & Yu, C. Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci.* **9**, 344–352 (2000).
- Sanchez, Y. & Lindquist, S.L. *HSP104* required for induced thermotolerance. *Science* **248**, 1112-1115 (1990).
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson & A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467 (1977).
- Sato, K., Noda, Y. & Yoda, K. Pgal is an essential component of Glycosylphosphatidylinositol-mannosyltransferase II of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3472-3485 (2007).
- Schaaff, I., Heinisch, J. & Zimmerman, F.K. Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast* **5**, 285-290 (1989).
- Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., Entian, K.D. & Thomas D.Y. Cold adaptation in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5492-5502 (2004).

- Schefe, J.H., Kerstin, E., Lehmann, E., Buschmann, I.R., Unger, T. & Funke-Kaiser, H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s C_T difference” formula. *J. Mol. Med.* **84**, 901-910 (2006).
- Schlesinger, M.J. Heat Shock Proteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 12111-12114 (1990).
- Schmidt, A., Hall, M.N. & Koller, A. Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *TAT1* and *TAT2*, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol. Cell Biol.* **14**, 6597-6606 (1994).
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J. & Hall, M.N. The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *Embo J.* **17**, 6924-6931 (1998).
- Schoeman, H., Vivier, M.A., Du Toit, M., Dicks, L.M. & Pretorius, I.S. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 647-656(1999).
- Sekiguchi, T., Hirose, E., Nakashima, N., Ii, M., Nishimoto, T. Novel G proteins, Rag C and RagD, interact with GTP-binding proteins Rag A and Rag B. *J. Biol. Chem.* **276**, 7246-7257 (2001).
- Sekiguchi, T., Todaka, Y., Wang, Y., Hirose, E., Nakashima, N. & Nishimoto, T. A novel human nucleolar protein Nop 132, binds to the G proteins RRAG A/C/D. *J. Biol. Chem.* **279**, 8343-8350 (2004).
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J.R. & Ariño, J. The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.* **46**, 1319-1333 (2002).
- Sherman, F., Fink, G.R. & Hicks J.B. *Methods in yeast genetics: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1986).
- Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori & K., Takano, H. Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial baker’s yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2841–2846 (1999).
- Shima, J., Sakata-Tsuda, Y., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Kawamoto, S. & Takano, H. Disruption of the *CARI* gene encoding arginase enhances freeze tolerance of the comercial baker’s yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 715-718 (2003).
- Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997).
- Sinensky, M. Homeoviscous adaptation- A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipid in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 522-525 (1974).
- Singer, M.A. & Lindquist, S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* **16**, 460-468 (1998).
- Skrzypek, M.S., Nagiec, M.M, Lester, R.L. & Dickson, R.C. Inhibition of amino acid transport by sphingoid long chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 2829-2834 (1998).

- Spencer, F., Ketner, G., Connelly, C. & Hieter, P. Targeted recombination-based cloning and manipulation of large DNA segments in yeast. *Methods* **5**, 161-165 (1993).
- Spiropoulos, A. & Bisson, L.F. *MET17* and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4421-4426 (2000).
- Stambuk, B.U, Alves Jr, S.L., Hollatz, C. & Zastrow, C.R. Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1-7 (2006).
- Stolz, L.E., Kuo, W.J., Longchamps, J., Sekhon, M.K. & York, J.D. *INP51*, a yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase required for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis and whose absence confers a cold-resistant phenotype. *J. Biol. Chem.* **273**, 11852-11861 (1998).
- Storz, G., Christman, M.F., Sies, H. & Ames, B.N. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 8917-8921 (1987).
- Stukey, J.E., McDonough, V.M. & Martin, C.E. The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* **265**, 20144-20149 (1990).
- Suzuki, I., Los, D.A., Kanesaki, Y., Mikami, K. & Murata, N. The pathway for perception and transduction of low temperature signals in *Synechocystis*. *Embo J.* **19**, 1327-1334 (2000).
- Suzuki, I., Kanesaki, Y., Mikami, K., Kanehisa, M. & Murata, N. Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol. Microbiol.* **40**, 235-244 (2001).
- Tai, S.L., Daran-Lapujade, P., Walsh, M.C., Pronk, J.T., Daran & J.M. Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature: a chemostat-based transcriptome analysis. *Mol. Biol. Cell* **18**, 5100-5112 (2007).
- Tamai, Y., Toh-e, A. & Oshima, Y. Regulation of inorganic phosphate transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **164**, 964-968 (1985).
- Tanghe, A., Van Dijck, P., Dumortier, F., Teunissen, A.W.R.H., Hohmann, S. & Thevelein, J.M. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5981-5989 (2002).
- Terao, Y., Nakamori, S. & Takagi, H. Gene dosage effect of L-proline biosynthetic enzymes on L-proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6527-6532 (2003).
- Tezuka, H., Mori, T., Okumura, Y., Kitabatake, K. & Tsumura, Y. Cloning of a gene suppressing hydrogen sulfide production by *Saccharomyces cerevisiae* and its expression in a brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50**, 130-133 (1992).
- Thevelein, J.M. & de Winde, J.H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **33**, 904-918 (1999).
- Thieringer, H.A., Jones, P.G. & Inouye, M. Cold shock and adaptation. *Bioessays* **20**, 49-57 (1998).

- Thierry, A., Fairhead, C. & Dujon, B. The complete sequence of the 8.2 kb segment left of *MAT* on chromosome III reveals five ORFs, including a gene for a yeast ribokinase. *Yeast* **6**, 521-534 (1990).
- Thomas, B.J & Rothstein, R. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619-630 (1989).
- Tokai, M., Kawasaki, H., Kikuchi, Y. & Ouchi, K. Cloning and characterization of the *CSF1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which is required for nutrient uptake at low temperature. *J. Bacteriol.* **182**, 2865-2868 (2000).
- Tomenchok, D.M. & Brandriss, M.C Gene-enzyme relationships in the proline biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**, 5364-5372 (1987).
- Tomishige, N., Noda, Y., Adachi, H., Shimoi, H., Takatsuki, A. & Yoda, K. Mutations that are synthetically lethal with a *gas1Delta* allele cause defects in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics* **269**, 562-573 (2003).
- Torchia, T.E. & Hopper, J.E. Genetic and molecular analysis of the *GAL3* gene in the expression of the galactose/melibiose regulon of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **113**, 229-246 (1986).
- Torriani- Gorini, A., Silver, S. & Yagil, E. *Phosphate in microorganisms: Cellular and molecular biology* (American Society for Microbiology, Washington D.C, 1994).
- Umebayashi, K. & Nakano, A. Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* **161**, 1117-1131 (2003).
- Vakeria, D., Box, W., Bird., L. & Mellor, J. Characterisation of amylolytic brewing yeast *J. Inst. Brew.* **102**, 27-32 (1996).
- Valdes-Hevia, M.D., de la Guerra, R. & Gancedo, C. Isolation and characterization of the gene encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **258**, 313-316 (1989).
- Verho, R., Londesborough, J., Penttilä, M. & Richard, P. Engineering redox cofactor regeneration for improved pentose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5892-5897 (2003).
- Verstrepen, K.J., Derdelinchx, G., Delvaux, F.R., Winderichx, J., Thevelein, J.M., Bauer, F.F. & Pretorius, I.S. Late fermentation expression of *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59**, 69-76 (2001).
- Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D.M., Vanderhaegen, B.M.P., Dufour, J.P., Pretorius, I.S., Winderickx, J., Thevelein, J.M. & Delvaux, F.R. The expression levels of the yeast alcohol acetyl transferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1* and *ATF2*, control the formation of a broad range of different volatile esters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5228-5237 (2003).
- Vigh, L., Maresca, B. & Harwood, J.L. Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 369-374 (1998).
- Vilanova, M., Blanco, P., Cortes, S., Castro, M., Villa, T.G. & Sieiro, C. Use of a *PGUI* recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 876-883 (2000).

- Villa, K.D., Lee, S., Goossens, E., Debourg, A. & Masschelein, C.A. Control of vicinal diketone production by brewer's yeast: Effect of *ILV5* and *ILV3* amplification of vicinal diketone production and ILV enzyme activity. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 49-53 (1995).
- Visser, J.J., Coton, E.P.N., Bauer, F.F., Viljoen, M. & van Vuuren, H.H.J. Engineering an acid urease for heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet* **35**, 321(1997).
- Viswanathan, M., Muthukumar, G., Cong, Y.S. & Lenard, J. Seripauperins of *Saccharomyces cerevisiae*: a new multigene family encoding serine-poor relatives of serine-rich proteins. *Gene* **148**, 149-153 (1994).
- Volschenk, H., van Vuuren, H.J. & Viljoen-Bloom, M. Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr. Genet.* **43**, 379-391 (2003).
- Vries, S. & Grivell, L.A. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **176**, 377-384 (1988).
- Walker, G.M. *Yeast physiology and biotechnology* (Wiley & Sons, New York, 1998).
- Wang, Y., Pierce, M., Schneper, L., Guldal, C.G., Zhang, X., Tavazoie, S. & Broach, J.R. Ras and Gpa2 mediate one branch of a redundant glucose signaling pathway in yeast. *PLoS Biol.* **2**, 610-622 (2004).
- Weinberg, M.V., Schut, G.J, Brehm, S., Adams, M.W.W. & Datta, S. Cold shock of a hyperthermophilic archaeon: *Pyrococcus furiosus* exhibits multiple responses to a suboptimal growth temperature with a key role for membrane-bound glycoproteins. *J. Bacteriol.* **187**, 336-348 (2005).
- Welsch, C.A., Hagiwara, S., Goetschy, J.F. & Movva, N.R. Ubiquitin pathway proteins influence the mechanism of action of the novel immunosuppressive drug FTY720 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**, 26976-26982 (2003).
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C.P., Burkholder, A., Knoche, K. & Ota, I. Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot. Cell* **1**, 163-173 (2002).
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D. & Astromoff, A. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**, 901-906 (1999).
- Wolfe, J. & Bryant, G. Freezing, crying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* **39**, 103-129 (1999).
- Wykoff, D.D. & O'Shea, E.K. Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**, 1491-1499 (2001).
- Yamano, S., Tomizuka, K., Sone, H., Imura, M., Takeuchi, T., Tanaka, J. & Inoue, T. Brewing performance of a brewers yeast having alpha-acetolactate decarboxylase from *Acetobacter aceti* subsp *xylinum*. *J. Biotechnol.* **39**, 21-26 (1995).
- Yu, L., Peña-Castillo, L., Mnaimneh, S., Hughes, T.R. & Brown, G.W. A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4736-4747 (2006).

- Zanchin, N.I. & Goldfarb, D.S. The exosoma subunit Rrp43p is required for the efficient maturation of 5.8S, 18S and 25S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1283-1288 (1999).
- Zargari, A., Boban, M., Heessen, S., Andreasson, C., Thyberg, J. & Ljungdahl, P.O. Inner nuclear membrane proteins Asi1, Asi2 and Asi3 function in concert to maintain the latent properties of transcription factors Stp1 and Stp2. *J. Biol. Chem.* **282**, 594-605 (2007).
- Zhang, L., Ohta, A., Horiuchi, H., Takagi, M. & Imai, R. Multiple mechanisms regulate expression of low temperature responsive (*LOT*) genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 531-535 (2001).
- Zhang, L., Ohda, K., Imai, R., Fukuda, R., Horiuchi, H. & Ohta, A. Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 308-314 (2003).
- Zhang, Y., Wang, Z.Y., He, X.P., Liu, N. & Zhang, B.R. New industrial brewing yeast strains with *ILV2* disruption and *LSD1* expression. *Int. J. Food Microbiol.* **123**, 18-24 (2008).
- Zhikang, Y., Smith, R.J. & Brown, A.J.P. Multiple signalling pathways trigger the exquisite sensitivity of yeast gluconeogenic mRNAs to glucose. *Mol. Microbiol.* **20**, 751-764 (1996).

ANEXO:

REACTIVOS QUÍMICOS

Anexo: Reactivos químicos

Agar Bacteriológico, Pronadisa, España

Agarosa, Pronadisa España

Bolas de vidrio 425-600 μm , Sigma-Aldrich Co. USA

Extracto de levadura, Pronadisa, España

Peptona, Pronadisa, España

Triptona, Pronadisa, España

“Yeast Nitrogen Base” sin aminoácidos y sin sulfato amónico, Pronadisa, España

ORGÁNICOS

Ácido p-aminobenzoico (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

Ácido L-aspartico (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

Ácido cítrico monohidrato (99,5-100, 5%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Acido L-glutámico (98,5-100,5%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

Ácido succínico (min 99,0%, p.a.), Sigma-Aldrich Co., USA

Adenina (min. 98,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

L-Alanina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

Alcohol isoamílico, Sigma-Aldrich Co., USA

Ampicilina sódica (biotechnology performance certified) , Sigma-Aldrich Co., USA

L- Arginina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

L- Asparragina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

D-Biotina (para bioquímica), Sigma-Aldrich Co., USA

Bromuro de etidio (para bioquímica), Merck KGaA, Germany

L- Cisteína (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

Cloroformo (p.a.), Merck KGaA, Germany

Dodecil sulfato sódico (mín 99,0%, para bioquímica), Merck KGaA, Germany

Etanol absoluto (min. 99,5%, p.a.) Panreac Quimica SA, España

Etanol 96° (min. 96,0 %) Panreac Quimicia SA, España

L- Fenilalanina (min. 99,0%) Merck KGaA, Germany

Fenol (p.a.), Merck KGaA, Germany

Glicerol (min. 99,5%, p.a.), Merck KGaA, Germany

Glicina (min. 99,0%, para biología molecular) Merck KGaA, Germany

D(+)-Glucosa anhidra, J.T Baker, Holland

L- Glutamina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
L-Histidina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
L- Isoleucina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
L-Leucina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
L- Metionina(min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
Myo-Inositol (min. 99,0 %, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
Pantotenato de calcio (min.98%, para bioquímica) Sigma-Aldrich Co., USA
PIPES (Piperazina-N,N'-bis[2-ácido etanosulfónico])(min 99,0%, biotechnology performance certified) Sigma-Aldrich Co., USA
Piridoxina-HCl (min. 99%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
Polietilenglicol 3350, Sigma-Aldrich Co., USA
L- Prolina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
2-Propanol (min. 99,8%, p.a.) Scharlau Chemie S.A, España
Sacarosa (para bioquímica), Merck KGaA, Germany
L- Serina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
D(-)-Sorbitol (para fines bioquímicos), Merck KGaA, Germany
Tiamina-HCl (min. 98%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
L- Tirosina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
L- Treonina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
L-Triptófano (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
Tris(hidroximetil)aminometano (99,8-100,1%, p.a.), Merck KGaA, Germany
Triton X-100 (para biología molecular), Sigma-Aldrich Co., USA
Titriplex ® III (ácido etilendiaminotetraacético disódico dihidratado) (99,8-101,1%, p.a.), Merck KGaA, Germany
L- Valina (min. 99,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany
Uracilo (min. 98,0%, para bioquímica) Merck KGaA, Germany

INORGÁNICOS

Acetato sódico anhidro (min. 99,5%, p.a.) Merck KGaA, Germany
Acetato amónico (min. 98%, p.a.) Scharlau Chemie S.A., España
Acetato de litio dihidrato (min 97%, p.a.) Sigma-Aldrich Co., USA
Ácido acético (glacial) (min. 99,8%, p.a.) Merck
Ácido clorhídrico (min. 32%, p.a.) Merck KGaA, Germany
Ácido bórico (min. 99,8%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Cloruro cálcico dihidrato (min. 99,0%, para biología molecular) Sigma-Aldrich Co. USA

Cloruro de litio (min. 99,0%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Cloruro férrico hexahidrato (99,0-102,0%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Cloruro magnésico hexahidrato (min 99,0%, calidad biología molecular) Merck KGaA, Germany

Cloruro potásico (99,5-100,5%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Cloruro sódico (min. 99,5%, p.a.) Merck KgaA, Germany

Potasio dihidrogenofosfato (min. 99,5%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Di-potasio hidrogenofosfato trihidrato (min. 99,0%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Di-sodio hidrogenofosfato dihidrato (min. 99,5%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Sodio dihidrogenofosfato monohidrato (min. 99,0-102,0%,p.a.) Merck KGaA, Germany

Hidróxido potásico (min. 85,0%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Hidróxido sódico (min. 99,0%, p.a.) Merck KgaA, Germany

Ioduro potásico (min. 99,0%, p.a.) J.T. Baker, Holland

Molibdato sódico dihidrato (min. 99,0%, p.a.) Scharlau Chemie S.A., España

Sulfato cúprico pentahidrato (99,0-100,5%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Sulfato potásico (min. 98,0%, p.a.) Panreac Quimica SA, España

Sulfato magnésico heptahidrato (min. 99,5%, p.a.) Merck KGaA, Germany

Sulfato de manganeso (II) monohidrato (98,0-101,0%, p.a.) Merck

Sulfato amónico (min. 99,5%, p.a.), Merck KgaA, Germany

Sulfato de zinc heptahidrato (99,0-103,0%, p.a.) Panreac Quimica SA, España

