

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Aumento de dosis génica de los genes *DPL1*, *SSD1* y *SRP101* en *Saccharomyces cerevisiae* y fenotipo de tolerancia a acidificación intracelular

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Manuel Bernabeu Lorenzo

DIRECTOR: Prof. Ramón Serrano Salom

CO-DIRECTORA: Consuelo Montesinos de Lago

Curso 2014-2015

Valencia, Julio de 2015





Datos personales

Nombre y apellidos: Manuel Bernabeu Lorenzo

Datos del trabajo fin de grado

Título: Aumento de dosis génica de los genes *DPL1*, *SSD1* y *SRP101* en *Saccharomyces cerevisiae* y fenotipo de tolerancia a acidificación intracelular.

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor/a: Ramón Serrano Salom

Cotutor/a: Consuelo Montesinos de Lago

Fecha de lectura: Julio 2015

Resumen

El pH alto intracelular es una señal promotora del crecimiento y proliferación de las células pero sus mecanismos no son bien conocidos. En un trabajo previo se había identificado una región genómica de levadura que al ser transformada en plásmido de copia simple aumenta el crecimiento de la levadura en condiciones de acidificación intracelular. Esta región contiene tres genes, *DPL1*, *SSD1* y *SRP101* y en este trabajo hemos identificado el gen *SSD1* como el responsable del fenotipo de pH. Este gen codifica un regulador del crecimiento de la levadura que coopera con otros reguladores importantes como la proteína quinasa TORC1 y la proteína fosfatasa Sit4. El mecanismo de *Ssd1* se basa en unir y estabilizar RNA mensajeros de ciclinas y el alelo clonado es la forma activa del gen presente en levaduras silvestres, mientras que las cepas de laboratorio poseen una forma truncada inactiva. *Ssd1* también mejora el crecimiento en condiciones normales, sin estrés ácido, en medio con amonio pero no en medio con aminoácidos como fuente de nitrógeno. Como los aminoácidos y el pH alto activan TORC1, podemos sugerir que *Ssd1* aumenta la expresión de ciclinas cuando TORC1 no está completamente activado por pH alto o por aminoácidos.

Palabras clave

pH intracelular, plásmido centromérico, ácido acético, DNA polimerasa



Abstract

Intracellular pH is a signal promoting cell growth and proliferation by poorly known mechanisms. In previous work, a yeast genomic region was identified that by transformation in single copy plasmid improves yeast growth under conditions of intracellular acidification. This region contains three genes, *DPL1*, *SSD1* and *SRP101*, and in the present work we have identified *SSD1* as the one responsible of the pH phenotype. This gene encodes a regulator of yeast growth that cooperates with other important regulators such as the protein kinase TORC1 and the protein phosphatase Sit4. The mechanism of Ssd1 consists on binding and stabilizing of cyclin mRNAs and the cloned allele is the active form present in wild yeast while laboratory strains express a truncated, inactive form. Ssd1 also improves growth under normal conditions, without pH stress, in media with ammonia but not in media with amino acids as nitrogen source. As amino acids and high pH activate TORC1, it may be suggested that Ssd1 increases cyclin expression when TORC1 is not fully activated by either high pH or amino acids.

Key words

Intracellular pH, centromeric plasmid, acetic acid, DNA polymerase

AGRADECIMIENTOS

Con estas palabras quiero dar las gracias en primer lugar a Ramón Serrano y a Mariche por permitirme realizar prácticas en su laboratorio y llevar a cabo este trabajo. Es aquí donde de verdad he aprendido la constancia y esfuerzo que conlleva la investigación y, por supuesto, la satisfacción al obtener buenos resultados. Esta satisfacción no sería igual si no se pudiera compartir y tengo que agradecer a todo el grupo del laboratorio que me han acogido como uno más desde el primer día, en especial a Jesús Muñoz por su interés y ayuda cuando la he necesitado.

No me puedo olvidar de mis compañeros del día a día, mis amigos, los xixos. Antón, Luis, Sergio, Bea, Sara, Aroa y Magda, estos años se han convertido en únicos gracias a vosotros. Es inolvidable cada momento que hemos tenido juntos, nuestras historias y anécdotas que nos sacan una sonrisa hasta en los momentos más crudos cuando no podíamos más. A partir de aquí vamos a seguir cada uno nuestro camino, pero con la promesa de que esto ha sido solo el principio y no el final.

Dar las gracias a Cris por sacarme una sonrisa cada día, por cuidarme y saber lo que pienso antes de que lo diga. Ningún obstáculo te va a impedir conseguir lo que quieres, porque ser cabezona es un don, eres capaz de todo.

Por último, y no menos importante, a mi familia por el apoyo que me ha dado en cada momento. A mis padres por seguir mis pasos pese a la distancia, a mi hermano por ser capaz de hacerme reír con una simple mirada y, de forma especial, a mis abuelos por ser un ejemplo a seguir.

Gracias a todos por vuestro tiempo

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	La homeostasis de pH intracelular	1
1.2.	Antecedentes al presente TFG	3
1.3.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> como sistema modelo.....	4
1.4.	Plásmidos de levadura.....	4
1.5.	Aumento de dosis génica	5
1.6.	Genes <i>SRP101</i> , <i>DPL1</i> y <i>SSD1</i>	5
2.	OBJETIVOS	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1.	Cepa de <i>Escherichia coli</i>	9
3.2.	Medio LB (Luria-Bertani) para bacterias	9
3.3.	Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
3.4.	Medio mínimo SD (Synthetic-Dextrose) para levadura	9
3.5.	Medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) para levadura.....	10
3.6.	Medio SOB (Super Optimal Broth)	10
3.7.	Condiciones de cultivo	10
3.8.	Plásmido pRS416	10
3.9.	Amplificación y precipitación	11
3.10.	Digestión.....	13
3.11.	Ligamiento	13
3.12.	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	14
3.13.	Transformación de <i>E. coli</i>	14
3.14.	Minipreparación del plásmido	14
3.15.	Digestión y electroforesis	15
3.16.	Preparación de células competentes de levadura	15
3.17.	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	16
3.18.	Selección del gen de resistencia a pH ácido.....	16

3.19.	Comprobación de fenotipos con ácidos débiles y cationes tóxicos.....	16
3.20.	Curva de crecimiento mediante análisis con Bioscreen.....	17
4.	RESULTADOS	20
4.1.	Subclonación de los tres genes de levadura presente en el plásmido p7	20
4.2.	El gen <i>SSD1</i> es responsable de la tolerancia a ácido acético que confiere el plásmido p7	21
4.3.	Fenotipos obtenidos en los ensayos en tubo.....	22
4.4.	Análisis mediante Bioscreen del fenotipo de crecimiento de la duplicación génica de <i>SSD1</i>	24
5.	DISCUSIÓN	29
5.1.	Información sobre el gen <i>SSD1</i> de levadura	29
5.2.	Mecanismo de tolerancia a ácido acético del gen <i>SSD1</i>	31
6.	CONCLUSIONES	34
7.	BIBLIOGRAFÍA	35

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características del plásmido pRS416	11
Tabla 2. Características de los primers de los 3 genes. Tm es el punto de fusión del híbrido	12
Tabla 3. Absorbancias a distintas concentraciones de ácido acético.....	22
Tabla 4. Absorbancias a distintas concentraciones de ácido sórbico	22
Tabla 5. Absorbancias medidas de higromicina B y norespermidina en medio SD y YPDA	23
Tabla 6. Absorbancias obtenidas con las 3 cepas en las distintas condiciones	23
Figura 1. Componentes de la homeostasis de pH en levadura	2
Figura 2. Acidificación celular por entrada de ácidos débiles.	2
Figura 3. Inserto del plásmido p7.	6
Figura 4. Ruta metabólica de esfingolípidos.	6
Figura 5. Mapa de restricción del plásmido pRS416.	11
Figura 6. Amplificación de los genes <i>DPL1</i> , <i>SRP101</i> y <i>SSD1</i>	20
Figura 7. Análisis de la subclonación de los tres genes en el plásmido pRS416.	21
Figura 8. Comprobación de tolerancia a ácido acético por crecimiento de gotas de levadura transformada.	22
Figura 9. Curva de crecimiento en medio mínimo SD control o suplementado con ácido acético 60 mM.....	25
Figura 10. Curva de crecimiento en medio mínimo SD control o suplementado con ácido sórbico 0,45 mM.....	25
Figura 11. Curva de crecimiento en medio YPDA control o suplementado con higromicina B 30 ug/mL.....	26
Figura 12. Curva de crecimiento en medio YPDA control o suplementado con norespermidina 3 mM.	26
Figura 13. Curvas de crecimiento en medio YPDA control o suplementado con ácido acético a distintas concentraciones.....	27
Figura 14. Parámetros de crecimiento en medio SD y medio YPDA suplementados con distintos ácidos.	28
Figura 15. Modelo propuesto para la función de <i>SSD1</i> y <i>Cbk1</i>	29

Figura 16. Blastp de la secuencia de la proteína Ssd1 frente a la base de datos del NCBI.	30
Figura 17. Modelo del efecto de Ssd1 sobre el crecimiento y tolerancia a acético de la levadura en medio mínimo SD.....	31
Figura 18. Modelo del efecto de Ssd1 sobre el crecimiento y tolerancia a acético de la levadura en medio rico YPD.....	32
Figura 19. Regulación de pHi y de aminoácidos relacionados con el crecimiento y proliferación celular.	33

ABREVIATURAS

AcH: ácido acético	PCI: fenol-cloroformo-etanol isoamílico
cAMP: adenosín monofosfato cíclico	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
ARS: Secuencias de replicación autónomas	pHi: pH intracelular
ATP: adenosín trifosfato	PIPES: piperazina-N,N'-bis (ácido 2-etanol sulfónico)
Blastp: alineamiento básico local de proteínas	Pma1: H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de levadura
BSA: Albúmina de suero bovino	RNA: ácido ribonucleico
CEN: secuencias centroméricas	rpm: revoluciones por minuto
DNA: ácido desoxirribonucleico	<i>S. cerevisiae</i> : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DNAsa: DNA endonucleasa	SD: dextrosa sintética. Medio de cultivo mínimo para levadura
dNTP: desoxinucleótido	SOB: medio de cultivo súper óptimo para bacterias
<i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i>	ssDNA: DNA de cadena simple
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	TB: tampón de transformación
Hyg B: higromicina B	TE: Tris-EDTA
IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	Tris: 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
KAB: tampón de acetato de potasio para enzimas de restricción	tRNA: RNA transferente
kb: kilobases	VMA: H ⁺ -ATPasa de la membrana vacuolar
lag: tiempo de latencia	X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
LB: medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani	YAC: cromosoma artificial de levadura
LiTE: tampón con acetato de litio-Tris-EDTA para hacer levadura competente	YCp: plásmido de levadura centromérico
mRNA: RNA mensajero	YEpl: plásmido de levadura episomal
NCBI: centro nacional de información biotecnológica de EEUU	YIp: plásmido de levadura integrativo
NE: noespermidina	YPD: extracto de levadura-peptona-dextrosa. Medio de cultivo rico para levadura
N-terminal: amino-terminal	YPDA: Extracto de levadura-peptona-dextrosa-adenina. Medio rico suplementado con adenina para levadura

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La homeostasis de pH intracelular

La Biología Molecular ha hecho que el protagonismo en el funcionamiento de las células se atribuya a genes y proteínas, pasando a segundo lugar otros factores cruciales que la Bioquímica había puesto de manifiesto en el pasado, tales como la homeostasis del pH intracelular (pHi). Aunque es obvio que genes y proteínas dirigen los procesos bioquímicos, la importancia reguladora del pHi no puede olvidarse, como ocurre muchas veces en la actualidad. Un ejemplo relevante es el papel del pHi como regulador del crecimiento (aumento en masa y volumen) y proliferación (división) de las células. La evidencia acumulada (Gillies, 1982; Parks *et al.*, 2013; Reshkin *et al.*, 2014) indica que las células cancerosas, al igual que todas las células cuando crecen activamente, tienen un pHi más alto que las células normales (del orden de 7,4 frente 7,0) y esta alteración probablemente es causa, y no efecto, del crecimiento rápido (Perona y Serrano, 1988; Perona *et al.*, 1990). Sin embargo, sorprendentemente, el pHi no se menciona en el libro de referencia sobre cáncer de Robert A. Weinberg (Weinberg, 2014).

En el mantenimiento de la homeostasis se encuentran implicados todos los canales de iones y bombas presentes en las membranas plasmática y vacuolar, siendo de vital importancia las H⁺-ATPasas que se encargan de expulsar protones del citoplasma mediante la hidrólisis de ATP. En levadura las H⁺-ATPasas de las membranas plasmáticas y vacuolares son Pma1 y VMA, respectivamente. Además, como estas H⁺-ATPasas son electrogénicas, la expulsión de protones conlleva la formación de un potencial eléctrico positivo en el exterior y por tanto es necesario un balance eléctrico que generalmente ocurre mediante entrada de K⁺. El gradiente electroquímico de protones (diferencias de potencial eléctrico y de pH) permite la entrada de nutrientes al interior celular (Serrano, 1991) y la salida de aniones y de iones de sodio, tóxicos para la célula (véase Figura 1).

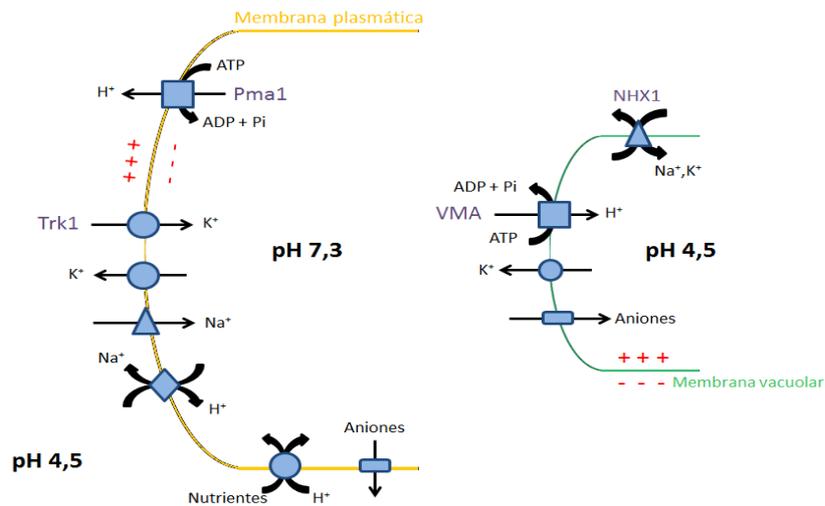


Figura 1. Componentes implicados en la homeostasis de pH en levadura. En la membrana plasmática se encuentra la H⁺-ATPasa (Pma1), el canal de K⁺(Trk1) y los co-transportadores y simportadores de protones. En la membrana vacuolar se encuentra la H⁺-ATPasa (VMA) y canales de K⁺ y de aniones.

El pHi es importante no sólo para regular el crecimiento y proliferación celular (activados por pHi alto) sino también para regular la muerte celular (activada por pHi bajo; Gottlieb *et al.*, 1996; Ludovico *et al.*, 2001). En relación con este último proceso, el mecanismo de acción de los ácidos débiles preservantes de alimentos se basa en inducir acidificación intracelular y desencadenar muerte celular (Ludovico *et al.*, 2001). Hay que añadir que muchas enzimas del metabolismo como la fosfofructoquinasa reguladora de la glicólisis se inhiben a pHi ácido (Krebs *et al.*, 1983).

Estos ácidos en medios con un pH entre 4 y 5 se encuentran en gran parte en su forma no disociada, de manera que pueden difundir hacia el interior celular gracias a las porinas (Mollapour *et al.*, 2007). En el interior celular, al ser el pH mayor, se disocian y provocan una bajada del pH (Figura 2).

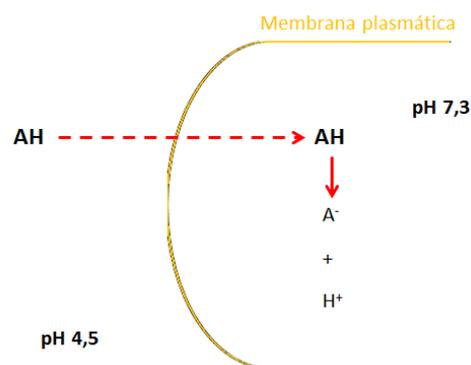


Figura 2. Acidificación celular inducida por entrada de ácidos débiles. Los ácidos difunden al interior a través de las porinas y se disocian, lo que provoca una bajada del pH.

Las dos lagunas más importantes de conocimiento en este campo son:

(a) mecanismos de regulación del pHi mediante sensores intracelulares de pH y efectores que modulen el transporte de H⁺ y de K⁺.

(b) sistemas de control del crecimiento y proliferación celular dependientes del pHi

1.2. Antecedentes al presente TFG

Este trabajo se ha realizado en el laboratorio del profesor Ramón Serrano, que investiga los mecanismos de homeostasis del pHi y su función reguladora en el crecimiento y proliferación celular. Existen evidencias de que bajadas modestas del pHi no desencadenan muerte celular pero inhiben el crecimiento y proliferación celular, probablemente por afectar sistemas reguladores que precisan valores de pHi relativamente altos. Por ello se diseñaron estrategias en levadura y en la planta *Arabidopsis thaliana* basada en un rastreo de colecciones de mutantes de ganancia de función seleccionando aquellos tolerantes a acidificación intracelular provocada por ácidos débiles como el acético. Se esperaba obtener dos tipos de genes: a) genes relacionados con el bombeo de protones al exterior para contrarrestar la acidificación intracelular; b) genes codificadores de reguladores del crecimiento y proliferación, sensores de dicha acidificación y que por ganancia de función mejorasen estos procesos. Hasta ahora estos estudios han identificado en levadura genes relacionados con el transporte de aminoácidos, que se inhibe por acidificación intracelular (Hueso *et al.*, 2012) y en *Arabidopsis* genes que aumentan el bombeo de protones al exterior de la célula por activación del transporte de potasio para balance eléctrico (Bissoli *et al.*, 2012, Niños *et al.*, 2013). La importancia de la H⁺-ATPasa bombeadora de protones y del transporte de potasio para tolerar ácidos débiles que hacen caer el pHi había sido descrita en levadura (Holyoak *et al.*, 1996; McPherson *et al.*, 2005). No se obtuvieron genes relacionados con el crecimiento y proliferación celular y ello llevó a replantear la estrategia del rastreo de mutantes tolerantes a ácidos débiles, comenzando por la levadura.

En lugar de utilizar sobre-expresión masiva (promotores fuertes en *Arabidopsis* o gran aumento de dosis génica en levadura), la utilización de sobreexpresión modesta (duplicación de dosis génica) permitiría detectar componentes sensibles a pHi de la maquinaria de regulación del crecimiento y proliferación celular. La sobreexpresión masiva de estos genes reguladores probablemente sería tóxica por desencadenar crecimiento desregulado. Este abordaje permitió identificar un plásmido centromérico de levadura (p7) que mejoraba enormemente el crecimiento en presencia de ácido acético. Este plásmido permitía duplicar la dosis de tres genes: *DPL1*, *SSD1* y *SRP101*, ninguno de ellos relacionado con transporte de aminoácidos ni con transporte de potasio o con la H⁺-ATPasa de membrana plasmática. Estos resultados fueron presentados en el TFG de Amparo Martín (2014).

1.3. *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo

Esta levadura representa un sistema modelo eucariota simple cuyo genoma es fácilmente manipulable y no mucho más complejo que el de bacterias. Comparte las ventajas técnicas de estas últimas que permiten un progreso rápido en la biología molecular como son un crecimiento rápido, fácil aislamiento de mutantes, réplica en placa, genoma secuenciado y anotado y un buen sistema de transformación de DNA. Además la levadura se puede encontrar en estado haploide o diploide de manera estable. Contiene 16 cromosomas caracterizados genética y físicamente con un tamaño entre 200 y 2000 kilobases que en total suman 14000 kb. El tiempo de duplicación celular es aproximadamente 90 minutos en medio rico complejo y 140 minutos en medio sintético pobre, siendo las células diploides elipsoides mientras que las haploides son esféricas. La temperatura de crecimiento normalmente es de 28-30 °C y, al no ser patogénica, no es necesario tener precauciones excesivas con su manipulación.

La ingeniería genética y la clonación génica se han visto favorecidas por el desarrollo de las técnicas de transformación de DNA en levadura. Los genes estructurales para diversas funciones pueden ser identificados por complementación de mutantes con bibliotecas de plásmidos, los cuales se pueden introducir en las levaduras, replicarse y segregarse de manera autónoma o si carecen de secuencias necesarias para ello pueden insertarse en el genoma por recombinación homóloga (Sherman, 2002).

La altísima frecuencia de recombinación homóloga en levadura ha permitido la sustitución dirigida de secuencias de DNA en los cromosomas. De esta manera es posible sustituir los genes normales por alelos alterados con el objetivo de conocer la función de las proteínas codificadas *in vivo*. Es así como se ha construido una colección de mutantes nulos de todos los genes de este organismo (Winzeler *et al.*, 1999; Giaever *et al.*, 2002). Además de pérdida de función (mutantes nulos) se han construido también colecciones de mutantes de ganancia de función en todos los genes de la levadura por aumento de dosis génica en plásmidos (Sopko *et al.*, 2006).

1.4. Plásmidos de levadura

En levadura existen hasta 4 tipos diferentes de plásmidos que se utilizan para obtener transformantes construidos a partir de vectores bacterianos. Estos son: YIp (Yeast Integrative plasmid), YEp (Yeast Episomal plasmid), YCp (Yeast Centromeric plasmid) y YAC (Yeast Artificial Chromosome). Como método de selección se utilizan genes que corrigen auxotrofías, siendo las más comunes *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*.

Los plásmidos YIp son los únicos que se integran en el genoma, generalmente en una única copia por recombinación homóloga. Los vectores YEp contienen el origen de replicación del plásmido natural de 2 μ de levadura, lo que le permite la replicación autónoma y un alto número de copias (hasta 20), aunque son bastante inestables incluso con presión selectiva. Por último, los vectores YCp son de replicación autónoma y contienen secuencias propias de cromosomas de levadura como son las CEN (secuencias centroméricas) que permiten anclarse

al huso mitótico y ARS (Autonomous Replicating Sequences) que dan estabilidad y fijan el número de copias, lo que conlleva que el número de copias por célula sea de 1 ó 2 copias. Además, se ha visto que con la presencia de estas secuencias ARS aumenta la tasa de transformación y que la estabilidad aumenta a medida que el tamaño de los mismos es mayor (Rose y Broach, 1991).

Por otra parte, los YAC se encuentran en la célula de forma lineal como un cromosoma más. Contienen secuencias para la replicación y preservación del vector como ARS, centrómero y telómeros, por lo que son muy estables y son idóneos para el clonaje de grandes fragmentos de DNA (100 kb). Tienen el problema de que se pierden fragmentos genómicos por recombinación homóloga interna ya que en levadura no existen mutantes sin recombinación homóloga como en *Escherichia coli*.

1.5. Aumento de dosis génica

El estudio del efecto que tiene una perturbación genética en la célula u organismo ha sido una estrategia ampliamente utilizada en investigación biológica. La accesibilidad del genoma de levadura permitió la construcción de colecciones de mutantes con pérdida de función por delección de genes. A partir de estas colecciones se definieron relaciones complejas entre genes y un mapa funcional, sin embargo, una buena parte de los genes seguían sin tener su función caracterizada (Hughes *et al.*, 2004) por lo que se desarrollaron nuevas estrategias para dilucidar estas incógnitas. Es aquí donde aparecen las colecciones de mutantes de ganancia de función (Sopko *et al.*, 2006) como herramienta para el análisis funcional. Consisten en la introducción de plásmidos con parte del genoma de levadura con lo que se eleva el número de copias de esos genes dentro de la levadura.

La ganancia de función realizada con plásmidos multicopia YEp puede ser tóxica por la presencia masiva de una proteína que a niveles normales no tuviera efectos deletéreos. Estos efectos tóxicos pueden deberse a interacciones con otras proteínas. Es por ello que se ha escogido en este proyecto un plásmido centromérico, ya que además de evitar la posible toxicidad, permite la selección del gen implicado en la tolerancia a ácidos débiles por una mejora del fenotipo debida a un modesto aumento de dosis génica (1-2 copias).

1.6. Genes *SRP101*, *DPL1* y *SSD1*

En este proyecto se ha investigado cuál de los tres genes presentes en el plásmido p7 confiere el fenotipo de tolerancia a acidificación intracelular. El plásmido p7 proviene de la biblioteca genómica de la cepa S288C construida en el plásmido centromérico YCp50 por Rose y Broach (1991) y fue identificado en el TFG de Martín (2014). El inserto de este plásmido ($\approx 11,5$ Kb; Figura 3) contiene los genes *SRP101*, *DPL1* y *SSD1* presentes en el cromosoma 4 entre las posiciones 1040808 y 1052287 (Martín, 2014), los cuales se describen a continuación.

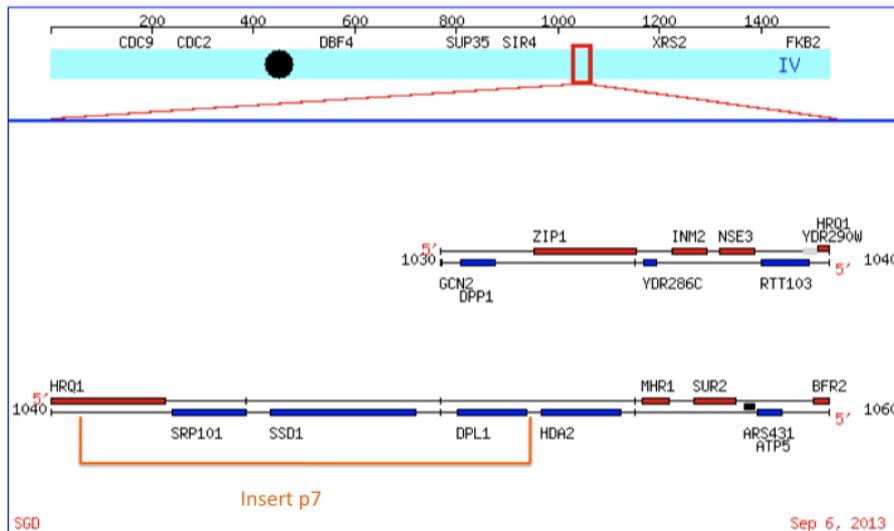


Figura 3. Inserto del plásmido p7. Los genes *SRP101* y *SSD1* están completos mientras que el gen *DPL1* está truncado por su promotor y *HRQ1* en su ORF.

El gen *SRP101* tiene un tamaño de 2,6 kb y codifica la subunidad alfa del receptor SRP (“Signal Recognition Particle”) que reconoce al péptido señal de las proteínas secretadas en el retículo endoplásmico. Contiene un dominio GTPasa e interactúa con la subunidad beta del receptor *Srp102* (Ogg *et al.*, 1992).

El gen *DPL1* tiene una longitud de 2,3 kb y codifica una dihidroesfingosina fosfato liasa que regula los niveles intracelulares de esfingolípidos de cadena larga mediante la degradación de los mismos (Figura 4). Además, se ha visto que tiene otro papel importante en la coordinación de esta ruta con la de glicerolípidos y otras rutas metabólicas (Dickson y Lester, 2002).

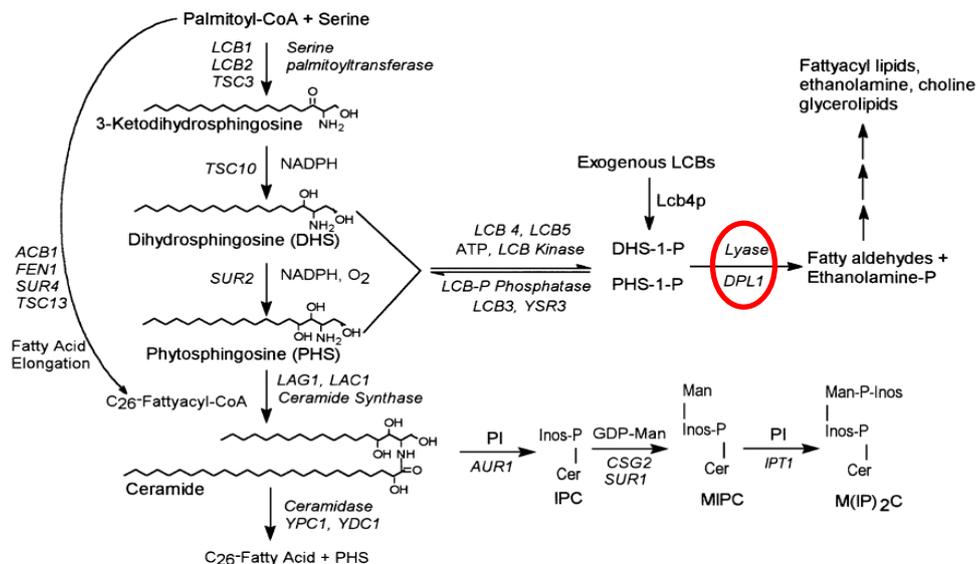


Figura 4. Ruta metabólica de esfingolípidos. La liasa *DPL1* que se muestra en el círculo se encarga de catabolizar LCB y LCBPs (lípidos de cubierta) en etanolamina y aldehídos.

Por último, *SSD1* es el gen de mayor tamaño con una longitud de 4,9 kb. Codifica un supresor de la mutación en *sit4* y represor transcripcional implicado en el crecimiento polar y la integridad de la pared celular. Regula la localización de mRNAs específicos e interactúa con la ruta metabólica de la proteína kinasa TOR. En cuanto a su estructura, contiene un extremo N-terminal que determina su localización, hecho que es crítico para el buen funcionamiento de la proteína.

DPL1 y *SSD1* son los mejores candidatos para explicar el fenotipo de tolerancia a acidificación intracelular porque tienen actividad reguladora.

2. OBJETIVOS

El objetivo general es dilucidar cuál de los tres genes presentes en el plásmido p7 caracterizado previamente en el laboratorio del profesor Ramón Serrano (*DPL1*, *SSD1* y *SRP101*) es el responsable del fenotipo de tolerancia a acidificación intracelular previamente descrito. Asimismo se investigará el mecanismo de acción del gen en cuestión. Los objetivos específicos son:

1. Construcción de plásmidos recombinantes centroméricos con cada uno de los tres genes presentes en el plásmido p7 y transformación en levadura para dilucidar cuál de ellos confiere tolerancia a acidificación intracelular provocada por ácido acético.
2. Estudio de fenotipos de crecimiento en presencia de ácidos débiles y de cationes tóxicos conferidos por el gen identificado en el apartado 1.
3. Análisis de la información bibliográfica disponible sobre el gen identificado en el apartado 1.
4. Formular un posible mecanismo de acción en base a los apartados 2 y 3.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepa de *Escherichia coli*

Se ha utilizado la cepa DH5 α que deriva de DH5 por introducción de una delección que incluye el operón lactosa, $\Delta(lacZYA-argF)$, y la integración de un profago que expresa el fragmento Ω de la β -galactosidasa (*lacZ Δ M15*), con lo que puede hacerse la complementación α con plásmidos que expresen el fragmento α . Además contiene los marcadores *RecA* y *EndA*, por lo que es perfecta para la propagación de plásmidos recombinantes.

3.2. Medio LB (Luria-Bertani) para bacterias

Se trata de un medio estándar complejo para bacterias compuesto por un 1 % de Triptona, 0,5 % de extracto de levadura y 0,5 % de NaCl, llevado a pH 7,0 con NaOH. Para solidificar el medio se adiciona un 2% de agar.

Para la selección de colonias mediante la complementación α de la cepa se suplementan las placas con 0,04 mg/mL de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) y 0,04 mg/mL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). Además se adiciona 0,1 mg/mL de ampicilina para la selección de colonias resistentes.

3.3. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa con la que se ha trabajado en este trabajo se encuentra designada en la colección del profesor Ramón Serrano como RS-132. Esta cepa deriva de la BWG1-7A (Guarente *et al.*, 1982) y su genotipo es *MATa ade1-100 his4-519 URA3-52 leu2-3,112::LEU2*. Esta cepa se ha transformado con un fragmento que contiene el gen *LEU2* para evitar que el requerimiento de leucina condicione la tolerancia a acidificación intracelular debido a la inhibición del transporte de este aminoácido en esas condiciones (Hueso *et al.*, 2012).

3.4. Medio mínimo SD (Synthetic-Dextrose) para levadura

Está compuesto por un 2 % de glucosa, 0,7 % de YNB ("Yeast Nitrogen Base without amino acids", un conjunto de minerales requeridos con amonio como fuente de nitrógeno) y tamponado con ácido succínico 50 mM ajustado a pH 5,5 con Tris base. Se suplementa con los requerimientos nutricionales (auxotrofías) de cada cepa con los aminoácidos y bases nitrogenadas correspondientes a una concentración de 30 μ g/mL y se añade un 2 % de agar

para solidificar el medio. En nuestro caso, los medios se han suplementado con adenina e histidina (con o sin uracilo, ver abajo) por las características de la cepa RS-132 empleada.

En los ensayos en los que es necesario un pH ácido el medio se tampona con ácido succínico 50 mM ajustado a pH 3,7 con Tris base.

3.5. Medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) para levadura

Este medio complejo contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las levaduras. Está compuesto por 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona bacteriológica y 2 % de glucosa; añadiendo un 2 % de agar en el caso que se quiera solidificar el medio.

Para inhibir la reversión de las mutaciones *ade1* y *ade2* que provocan la aparición de un color rosado en las colonias se puede añadir 30 µg/mL de sulfato de adenina, llamándose el medio YPDA.

3.6. Medio SOB (Super Optimal Broth) para bacterias

Este medio se utiliza para la preparación de células competentes de *E. coli*. Su composición es un 2 % de triptona, 0,5 % de extracto de levadura, NaCl 10 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM

3.7. Condiciones de cultivo

Durante el desarrollo de los experimentos se han hecho crecer las levaduras a temperaturas entre 28 y 30 °C, tanto en medio completo YPD como en medio sintético SD (Sherman, 2002). Los medios utilizados se esterilizan en el autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 1 atmósfera de presión.

Por otra parte, *E. coli* ha crecido a una temperatura de 37 °C y los medios se han esterilizado de la misma manera.

3.8. Plásmido pRS416

La cepa RS-132 se ha transformado con el plásmido centromérico pRS416 de la casa Stratagene. Su mapa de restricción aparece en la Figura 5 y sus características en la Tabla 1.

La inserción de los genes *SSD1* y *SRP101* se realiza en el sitio *BamH* I del vector, mientras que la inserción del gen *DPL1* se realiza entre los sitios de corte *EcoR* I y *Xba* I.

Tabla 1. Características del plásmido pRS416

Marcador para seleccionar en levadura	Marcador para seleccionar en <i>E. coli</i>	Plásmido parental	CEN	Otro DNA	Tamaño (kb)
<i>URA3</i>	<i>Amp</i>	pBluescript	<i>CEN6</i>	ARS4	4,9

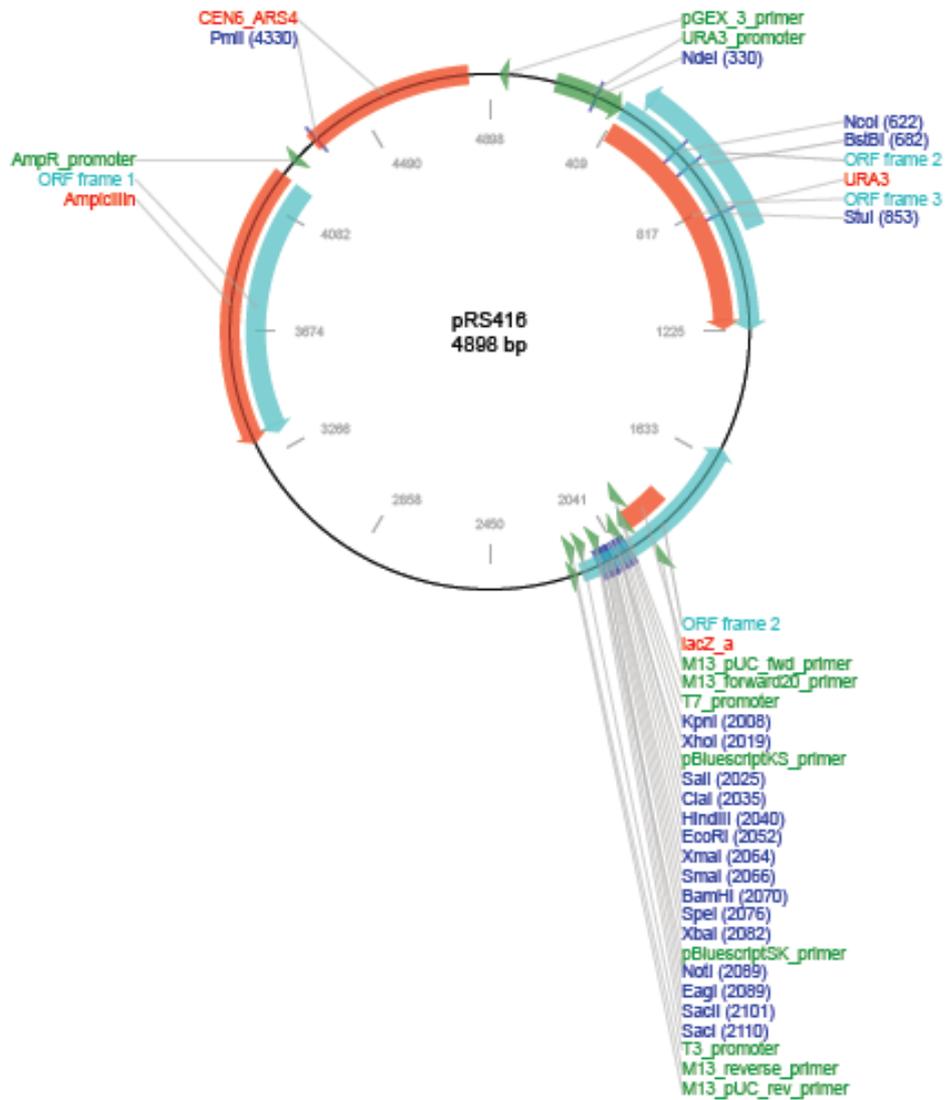


Figura 5. Mapa de restricción del plásmido pRS416. Se indica el gen de resistencia a ampicilina y lacZ para la selección en bacterias, el centrómero de levadura y el gen *URA3* para la selección en levadura en rojo. Los sitios de corte únicos aparecen en azul.

3.9. Amplificación y precipitación

Se diseñan “primers” (cebadores) específicos para los tres genes presentes en el plásmido p7 para poder trabajar con ellos por separado. Las características de cada uno se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los “primers” de los 3 genes. Tm es la temperatura de 50% hibridación.

Primer	Secuencia	Sitio de corte (subrayado)	Tm (°C)
<i>DPL1-dir</i>	5' CTCGA <u>ATTCT</u> CATGTTTGACAGCTT 3'	<i>EcoR</i> I	70
<i>DPL1-rev</i>	5' CTCTCTAGACGTCGTCCTGACATAGG 3'	<i>Xba</i> I	90
<i>SSD1-dir</i>	5' CTCGGATCCGGAACGAAGTTTTGCCGTGC 3'	<i>Bam</i> H I	92
<i>SSD1-rev</i>	5' CTCGGATCCGGATGATGCCTTACCGGAACG 3'	<i>Bam</i> H I	96
<i>SRP101-dir</i>	5' CTCGGATCCGCTTACCCCTCAGTATCC 3'	<i>Bam</i> H I	90
<i>SRP101-rev</i>	5' CTCGGATCCCGCTATTTGTAGTTTGTAACC 3'	<i>Bam</i> H I	90

Para esta reacción se utiliza 1 µL de plásmido p7 (20 ng/µL), 10 µL dNTPs a una concentración de 2 mM cada uno (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 10 µL de “primer” directo y 10 µL de “primer” reverso ambos a 10 µM (X10), 20 µL de Phusion buffer X5 y 1,5 µL de polimerasa de alta fidelidad Phusion DNA polymerase (New England BioLabs, Waltham, Massachusetts, USA). Luego se añaden 50 µL de H₂O y se introduce en el termociclador.

Para los genes *SRP101* y *DPL1* se utiliza el programa RS2F porque tienen tamaños semejantes (2,6 y 2,3 kb respectivamente), siendo los parámetros de amplificación los siguientes: 2 min a 95 °C seguidos de 5 ciclos que consisten en 20 seg a 98 °C, 25 seg a 55 °C y 1 min a 72 °C. A continuación, 20 ciclos de 20 seg a 98 °C, 25 seg a 65 °C y 1 min a 72 °C y para finalizar 5 min a 72 °C.

Por otra parte, debido a que *SSD1* es más grande (4,9 kb) se usa el programa RS2FL que tiene un tiempo de desnaturalización e hibridación mayores: 3 min a 95 °C seguido de 5 ciclos de 20 seg a 98 °C, 25 seg a 55 °C y 1 min 30 seg a 72 °C. Después se realizan 20 ciclos de 20 seg a 98 °C, 25 seg a 65 °C y 1 min 30 seg a 72 °C y para acabar 5 min a 72 °C.

Una vez acabada la amplificación de los productos se lleva a cabo una precipitación para eliminar los posibles dímeros de “primers” que se hayan formado, dNTPs y cambiar el tampón para poder seguir con la digestión. Para la precipitación por cada 100 µL de producto de PCR se adicionan 5 µL de tRNA 1 % como coadyuvante y 350 µL de etanol-acetato amónico a una concentración de 10 mM. Se deja esta mezcla en el congelador durante 15 minutos y, a continuación, se centrifuga a máxima potencia durante 15 minutos más. Se retira el sobrenadante y se lava el precipitado con 1 mL de etanol 70 %. Luego se quita el alcohol y se deja secar al aire o haciendo uso de una centrífuga conectada a una bomba de vacío. Por último se resuspende el precipitado en 20 µL TE X0,1.

Para mejorar el rendimiento de la purificación se desarrolló un protocolo a partir de los reactivos del kit “NucleoSpin Plasmid” (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). En este caso, por cada 100 µL de producto de PCR se añaden 600 µL del reactivo A3 (con alta concentración de

la sal caotrópica cloruro de guanidina) y se mezcla. Se aplica a un tubo con una placa de gel de sílice dispuesto dentro de un microtubo de 2 mL y se centrifuga durante 1 minuto a 12000 rpm para que se retengan los ácidos nucleicos en la membrana de sílice. Se retira el eluido, se aplican 600 μ L de A4 (contiene etanol y cloruro de guanidina diluido) y se vuelve a centrifugar 1 minuto a la misma velocidad para lavar la placa. Tras repetir este paso una vez más se centrifuga durante 2 minutos a la misma velocidad para secar completamente el gel de sílice. Por último, se eluye con 30 μ L de 1 mM Tris y 0,1 mM EDTA, pH 8, y se recoge el contenido en un microtubo. De esta manera se consigue un rendimiento de hasta un 74 %, bastante superior al método tradicional con etanol-acetato amónico.

3.10. Digestión

Para la digestión de los genes se prepara una reacción que contiene 20 μ L del producto de PCR (100 ng/ μ L), 20 μ L de H₂O, 5 μ L de albúmina de suero bovino libre de DNAsas (BSA X10; 1 mg/mL) y 5 μ L de tampón KAB X10 (1 M acetato potásico, 0,2 M Tris-acético pH 7,6, 0,1 M acetato de magnesio y 10 mM ditiotreitól). Para los genes *SRP101* y *SSD1* se utilizan 2 μ L de la enzima de restricción *BamH* I (10 unidades/ μ L), mientras que para el gen *DPL1* se usan 2 μ L de cada una de las enzimas *Xba* I y *EcoR* I (10 unidades/ μ L).

Por otra parte se hace también la digestión del plásmido pRS416 con el que se va a llevar a cabo la reacción de ligamiento. Para ello se usan 4 μ L de plásmido a una concentración de 0,5 μ g/ μ L, 36 μ L de H₂O y los mismos volúmenes de tampón KAB X10, BSA X10 y enzima que en el caso de los productos de PCR.

Tras incubar durante 1 hora y media a 37 °C, se procede a inactivar las enzimas con el método tradicional fenol-cloroformo-etanol isoamílico (PCI). Se añaden 100 μ L de TE X1 y 5 μ L de tRNA 1 % a todo el volumen de la digestión (\approx 50 μ L). Luego se adicionan 150 μ L de PCI y se mezclan durante 20 segundos en el vórtex para luego centrifugar durante 5 minutos a máxima potencia. Una vez centrifugado se pueden ver varias fases y se recogen alrededor de 120 μ L de la fase superior donde se encuentra el producto de interés. A continuación se lleva a cabo una precipitación con etanol-acetato amónico como se ha explicado anteriormente.

En este caso también se puede hacer uso del protocolo desarrollado a partir de los reactivos del kit "NucleoSpin Plasmid" para mejorar el rendimiento. Se usan los mismos volúmenes y pasos que se han comentado en el apartado anterior y se evitan las posibles pérdidas de concentración ligadas a las precipitaciones consecutivas.

3.11. Ligamiento

Una vez digeridos los genes y los plásmidos e inactivadas las enzimas se realiza la reacción de ligamiento. A efectos prácticos las cantidades que se deben usar son 100 ng de plásmido linearizado y 200 ng del inserto para un volumen final de 15 μ L. A estas cantidades se

les añade un 1,5 μL de tampón de ligasa T4 y 1,5 μl de T4 DNA ligasa (1 unidad/ μL). Se completa el volumen con agua y se incuba toda la noche a una temperatura de 7 $^{\circ}\text{C}$.

3.12. Preparación de células competentes de *E. coli*

Para la obtención de células competentes de la cepa DH5 α especificada en el apartado anterior se sigue el protocolo descrito por Inoue *et al.* (1990). Se parte de 400 μL de cultivo saturado que se inoculan en 200 mL de medio SOB. Se incuba el cultivo a una temperatura de 18-25 $^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una absorbancia de 0,5-0,7 a 660 nm y se enfría el matraz en hielo. Transcurridos 10 minutos, se centrifugan las células a 5000 rpm durante 10 minutos a 4 $^{\circ}\text{C}$. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento agitando primero con el sobrenadante restante y luego con 10 mL tampón de transformación TB frío (PIPES 20 mM ajustado a pH 6,7 con KOH, CaCl_2 20 mM, KCl 210 mM y MnCl_2 50 mM). Esta mezcla se deja en hielo durante 10 minutos y se centrifuga en las mismas condiciones. A continuación se repite la operación y se lleva a un volumen final de 5 mL con TB frío. Por último, se añaden 375 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) poco a poco y con una agitación continua leve. Se deja reposar 10 minutos en hielo y se distribuye en microtubos en alícuotas de 100 μL . Estas alícuotas se almacenan a -80 $^{\circ}\text{C}$.

3.13. Transformación de *E. coli*

Se descongelan a temperatura ambiente microtubos que contienen 100 μL de células competentes y se mantienen en hielo. Se les añade 5 μL de la reacción de ligamiento del plásmido con el inserto y se dejan en hielo durante 30 minutos. A continuación se calienta en un termobloque a 42 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos para producir el choque térmico. Después se adicionan 250 μL de medio LB y se incuba el tubo a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora para expresar la resistencia a ampicilina. Por último, se extiende el contenido en placas de LB suplementadas con ampicilina, IPTG y X-Gal como se ha explicado antes, aprovechando la resistencia a este antibiótico que confiere el plásmido y la complementación α debida al gen *lacZ*. Se dejan a 37 $^{\circ}\text{C}$ hasta que aparezcan colonias y se seleccionan las que sean blancas, ya que son estas las que tienen el plásmido con el inserto porque ha truncado el gen *lacZ* y no han permitido la complementación alfa por la cual serían de color azul.

De forma paralela se hace un control negativo que sólo contiene células competentes y un control positivo con el plásmido pBluescript (2 μL a 0,5 ng/ μL).

3.14. Minipreparación del plásmido

Se utiliza el kit "NucleoSpin Plasmid" de Macherey-Nagel (Düren, Alemania) que contiene filtros con gel de sílice para la unión de ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas, el lavado de los filtros con etanol y la elución con 1 mM Tris y 0,1 mM EDTA pH 8.

3.15. Digestión y electroforesis

Se comprueba el plásmido extraído mediante una digestión y electroforesis. Para la digestión se usan las mismas enzimas con las que se digirió el plásmido y el inserto anteriormente para que queden separados. Luego se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa a una concentración del 0,7 % con la finalidad de observar que aparece el patrón de bandas correspondiente a los sitios de corte de las enzimas utilizadas. El gel se sitúa en una cubeta de electroforesis sumergido en buffer TBE X0,5 (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA).

Se cargan 4 μ L de digestión, 6 μ L de H₂O y 2 μ L de tampón de carga (40 % sacarosa, 0,23 % azul de bromofenol y 0,1 M EDTA) a una concentración X6. También se carga el patrón de pesos moleculares λ -HindIII para comparar los tamaños y calcular la concentración de plásmido. Las moléculas de DNA migran por el gel según su tamaño y del polo negativo al positivo debido a la carga negativa intrínseca que posee por los grupos fosfato de su estructura.

Por último, se visualizan los fragmentos por tinción con bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases nitrogenadas y emite fluorescencia al ser excitado con luz ultravioleta.

3.16. Preparación de células competentes de levadura

Se ha llevado a cabo el método de Schiestl y Gietz (1989). En primer lugar se dejan crecer durante toda la noche células de la cepa RS-132 en 1 mL de medio YPD líquido. Al día siguiente, en un matraz de 250 mL con 200 mL de medio YPD se pipetea 200 μ L de cultivo saturado y se deja crecer a 28 °C con agitación.

Tras dejarlo crecer toda la noche, se determina la absorbancia de una dilución 1:10 a 660 nm en el espectrofotómetro. Una vez que el valor de la densidad óptica se encuentra entre 1 y 2 (corrigiendo con la dilución) significa que las células se encuentran en fase exponencial y es el momento óptimo para empezar el protocolo de preparación de células competentes.

Se reparte el cultivo en 4 tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan 5 minutos a 2000 rpm. Se resuspende el sedimento en 5 mL de LiTE (0,1 M de acetato de litio, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6), se junta el contenido de los 4 tubos en uno solo y se vuelve a centrifugar como antes. Ahora el sedimento de levadura se resuspende en 0,8 mL de LiTE y se vierte todo el contenido en un microtubo, dejándolo a 30 °C durante 1 hora sin agitación.

Tras dejarlo incubar, se añaden 400 μ L de ssDNA 1 % (DNA de esperma de salmón sonificado para fragmentarlo y desnaturalizado por calentamiento a 95 °C) para estabilizar el plásmido. Se mide el volumen y se añade $\frac{1}{4}$ del mismo de glicerol 75 %, se mezcla bien y se distribuyen las células en alícuotas de 100 μ L. Por último se congelan las células a -80 °C.

3.17. Transformación de *S. cerevisiae*

Se descongelan tantos tubos de células competentes como transformaciones se vayan a hacer. Una vez descongelados se añade 0,1-1 µg de plásmido, equivalente a 5 µL, y se deja en hielo durante 10 minutos.

A continuación, se adicionan 600 µL de PEG-LiTE (polietilenglicol 4000 al 40 % p/v en LiTE) y se incuba a 30 °C durante 30 minutos primero y 10 minutos a 42 °C después para lograr el choque térmico. Se centrifuga 15 minutos y se eliminan alrededor de 650 µL de sobrenadante. Por último se resuspenden las células con el resto de sobrenadante y se añaden 100 µL de H₂O MiliQ estéril.

Una vez resuspendidas las células, se extiende todo el volumen en placas de SD suplementadas con las auxotrofías de adenina e histidina. Sin embargo, no se añade uracilo (otra de las auxotrofías de la cepa empleada, RS-132) para asegurar que las células crecen porque han incorporado el plásmido con el gen *URA3* y no porque se encuentre el uracilo en el medio. Se dejan incubar las placas a 28 °C hasta que se observen colonias (2-3 días aproximadamente).

3.18. Selección del gen de resistencia a pH ácido

Cuando se ha conseguido transformar la levadura con las 3 construcciones distintas, se procede a hacer un cultivo en medio líquido para identificar cuál de los genes es el responsable de la resistencia a pH ácido mediante réplica en placa.

Una vez que el cultivo líquido ha alcanzado la saturación (24h), se mide la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro SP8001 DINKO (Barcelona) dando como resultado entre 3 y 4, por lo que se encuentra en la fase estacionaria. Para hacer la réplica se prepara una placa multipocillo con 200 µL en cada pocillo que se va a emplear. Se realizan dos diluciones de cada cultivo: la primera diluyendo 5 µL en 200 µL (1/40), y la segunda diluyendo 25 µL de la primera en 200 µL de agua (1/360).

Se preparan placas de SD con adenina, histidina y ácido acético a una concentración de 54 mM y tampón 50 mM succínico-Tris base pH 3,7. El replicador se esteriliza a la llama con alcohol y después se siembran las células depositando gotas de un volumen cercano a 3 µL sobre la placa. Se deja que se absorban las gotas y luego se incuban a 28 °C hasta que se vea crecimiento.

3.19. Comprobación de fenotipos con ácidos débiles y cationes tóxicos

Para llevar a cabo esta comprobación se empieza preparando inóculos en medio SD líquido y en YPDA líquido de la cepa RS-132 transformada con el plásmido pRS416 vacío, el plásmido con el inserto de *SSD1* y el plásmido p7. Cada inóculo contiene 2 mL de medio y una

colonia de levadura que se deja crecer durante toda la noche en agitación y a una temperatura de 28 °C. Al día siguiente se miden las absorbancias a 660 nm para comprobar que el cultivo ha alcanzado la fase exponencial.

Después se preparan tubos con 2 mL de medio SD con adenina e histidina y ácido acético (ACh) a distintas concentraciones (40-60 mM). De la misma manera se hace con ácido sórbico a concentraciones entre 0,2 y 0,6 mM. Por otra parte, se preparan tubos con 2 mL de medio SD y YPDA con cationes tóxicos como la higromicina B (Hyg B) a concentraciones entre 30 y 60 µg/mL y norespermidina (NE) a una concentración entre 2 y 4 mM.

En estos tubos se siembran 5 µL de cultivo en aquellos que contienen medio SD y 2 µL del mismo cultivo en los que sean de YPDA para que no alcance la saturación. Se dejan crecer a 28 °C con agitación continua y se leen las absorbancias al día siguiente.

3.20. Curva de crecimiento mediante análisis con Bioscreen

Para este análisis se vuelven a preparar inóculos de la cepa RS-132 con el plásmido pRS416, *SSD1* y p7 en SD y en YPD para tener un cultivo fresco al día siguiente. Luego, en microtubos de 2 mL se añade 1,5 mL de medio y el volumen de ACh, sórbico, Hyg B o NE necesarios para obtener la concentración en el cultivo que se quiere estudiar. Además se hacen controles de los medios y de cada cepa para poder comparar los datos. Una vez que se ha hecho esto se siembra en los tubos un volumen de cultivo que dé como absorbancia inicial 0,02 a 660 nm.

A continuación se procede a llenar la placa especial de Bioscreen que contiene 100 pocillos. En cada pocillo se añaden 300 µL cultivo, teniendo 3 réplicas técnicas por cada microtubo que se ha preparado. Después de llenar los pocillos, se introduce la placa en el Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd., Finlandia) y se deja durante 3 días. La placa se incuba a 28 °C, con una agitación alta antes de cada lectura de absorbancia, que se mide a intervalos de 30 minutos a 420-550 nm.

Transcurrido este tiempo, se recogen los datos y se corrigen las absorbancias tal y como describe Warringer y Blomberg (2002) con el objetivo de obtener gráficas de crecimiento, rendimiento de los cultivos, tasa de crecimiento y duración de la fase de latencia.

4. RESULTADOS

4.1. Subclonación de los tres genes de levadura presente en el plásmido p7

En primer lugar se hizo amplificación con DNA polimerasa de alta fidelidad de los 3 genes presentes en el plásmido p7 con los primers diseñados específicamente para ello. Tras comprobar los productos de amplificación como se puede ver en la Figura 6, se realizó la digestión de estos productos junto a la del plásmido pRS416 con las enzimas adecuadas para cada gen.

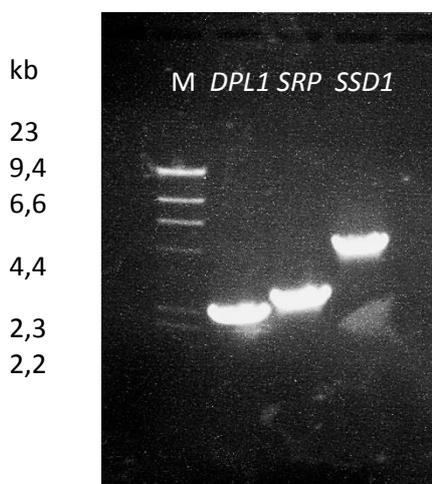


Figura 6. Amplificación de los genes *DPL1*, *SRP101* y *SSD1*. Genes amplificados de tamaño 2,3, 2,6 y 4,9 kb respectivamente con una concentración de 100 ng/uL. El patrón de bandas (M) es λ -HindIII.

Conviene indicar que en el caso del gen *DPL1* el plásmido p7 contenía solamente 60 bp delante del ATG iniciador de la traducción. Por ello se amplificó también una región de 0,35 kb propia del plásmido Ycp50 que contiene el promotor bacteriano del gen de resistencia a tetraciclina por si estuviera contribuyendo a la expresión de este gen en la levadura.

A continuación se llevó a cabo el ligamiento y se transformó *E. coli*, seleccionando colonias resistentes a ampicilina y que no fueran azules (colonias blancas) en placas con IPTG y X-Gal además de ampicilina. Por último, después de que crecieran los cultivos se extrajeron los plásmidos con el kit "NucleoSpin Plasmid" y se hizo una comprobación mediante digestión y gel de electroforesis (véase Figura 7).

Los plásmidos con *SRP101* dan 3 bandas, la primera corresponde al plásmido digerido parcialmente, la segunda al plásmido digerido y la de menor tamaño es el inserto. El gen *SSD1* digerido con la enzima *BamH* I da una banda de mayor tamaño correspondiente al plásmido parcialmente digerido y una segunda banda donde se juntan el plásmido digerido y el inserto porque son del mismo tamaño. Es por ello que se digirió también con la enzima *Nco* I que corta solamente en el plásmido y no en el inserto. Se ve un patrón de tres bandas donde la primera

es el inserto y las dos siguientes son del plásmido. Por otra parte, *DPL1* se digirió con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I y se obtuvieron 3 bandas también, la del plásmido sin digerir totalmente, la del plásmido digerido y la menor que es la del inserto.

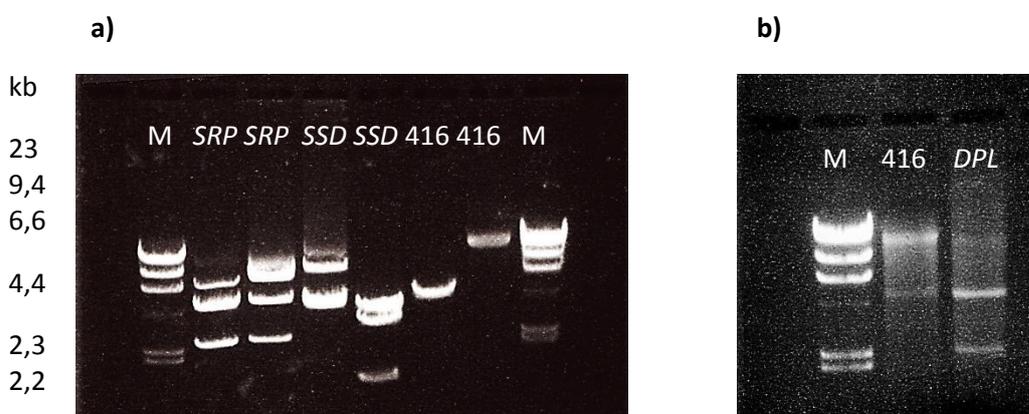


Figura 7. Análisis de la subclonación de los tres genes en el plásmido pRS416. a) De izquierda a derecha: patrón de DNA de fago lambda digerido con *Hind* III (tamaño de las bandas a la izquierda), plásmido con *SRP101* digerido con *Bam*H I, otro plásmido con *SRP101* digerido con *Bam*H I, plásmido con *SSD1* digerido con *Bam*H I, otro plásmido con *SSD1* digerido con *Bam*H I y *Nco* I, plásmido pRS416 vacío digerido con *Bam*H I, plásmido pRS416 sin digerir y el patrón de DNA de nuevo. b) De izquierda a derecha: patrón de DNA de fago lambda digerido con *Hind* III, plásmido pRS416 digerido con *Eco*R I y *Xba* I, gen *DPL1* digerido con *Eco*R I y *Xba* I.

4.2. El gen *SSD1* es responsable de la tolerancia a ácido acético que confiere el plásmido p7

Una vez comprobados los plásmidos ligados con los distintos insertos se procedió a la transformación de la cepa RS-132 de levadura. Se usaron placas de SD con adenina e histidina para aislar colonias transformadas con el gen *URA3* del plásmido pRS416. Después de crecer hasta fase estacionaria, se sembraron los transformantes en placas de SD con adenina e histidina y ácido acético a una concentración de 54 mM con el objetivo de identificar el gen responsable de la tolerancia a estrés ácido del plásmido p7.

Tras dejarlo incubar durante 3 días a 28 °C se recogieron las placas y se comprobó el fenotipo (véase Figura 8).

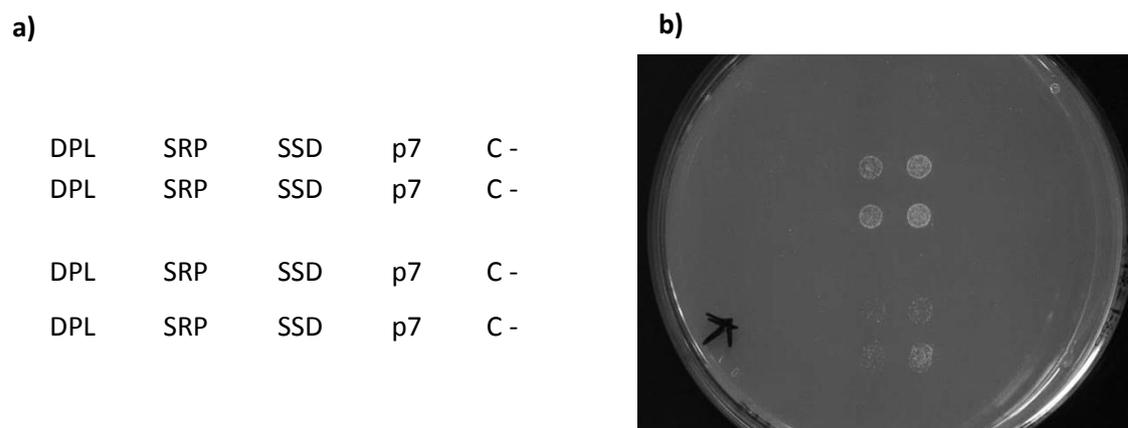


Figura 8. Comprobación de tolerancia a ácido acético por crecimiento de gotas de levadura transformada. a) Esquema que se ha seguido para depositar las gotas. b) Crecimiento de las gotas tras incubar durante 3 días a 28 °C.

Las levaduras transformadas con una copia extra de los genes *DPL1* y *SRP101* no crecieron mientras que las transformadas con el gen *SSD1* sí que mostraron crecimiento de igual forma que las transformadas con el plásmido p7. Además, la dilución 1/40 creció más que la dilución 1/360 como se esperaba. Estos resultados indican que el fenotipo de tolerancia a ácido del plásmido p7 se debe al gen *SSD1*.

4.3. Fenotipos obtenidos en los ensayos en tubo

En primer lugar se identificó la concentración mínima inhibitoria para la cepa de levadura RS-132 transformada con el plásmido pRS416 vacío viendo cuál era la cantidad mínima de ácido que inhibía el crecimiento en medio SD líquido (suplementado con adenina e histidina). Como ya se ha explicado antes, se preparaban inóculos en 2 mL de medio a partir de colonias en placa y se dejaban crecer durante 24 horas con agitación continua. La absorbancia inicial de los inóculos se encontraba alrededor de 0,07. Los resultados se ven reflejados en las Tablas 3 y 4.

Tabla 3. Absorbancias a distintas concentraciones de ácido acético

[AcH] (mM)	0	40	50	60
Absorbancia (u.a.)	0,19	0,02	< 0,02	< 0,02

Tabla 4. Absorbancias a distintas concentraciones de ácido sórbico

[Sórbico] (mM)	0	0,2	0,4	0,6
Absorbancia (u.a.)	0,20	0,05	0,03	< 0,02

Como se puede ver, en el caso del ácido acético una concentración comprendida entre 40 y 60 mM es muy efectiva, coincidiendo con la concentración utilizada en los ensayos en placa (54 mM). En cuanto al ácido sórbico, una concentración entre 0,4 y 0,6 mM inhibe el crecimiento de manera más evidente.

Por otra parte, se procedió de igual manera con los cationes tóxicos higromicina B y noespermidina en medio SD y YPDA líquido para caracterizar en profundidad la cepa transformada con *SSD1*. Los resultados están recogidos en la Tabla 5.

Tabla 5. Absorbancias medidas de higromicina B y noespermidina en medio SD y YPDA

Tóxico	Higromicina B			Noespermidina		
	0 µg/mL	30 µg/mL	60 µg/mL	0 mM	2 mM	4 mM
Medio SD	0,23	0,21	0,20	0,23	0,21	0,22
Medio YPDA	0,40	0,02	< 0,02	0,40	0,02	< 0,02

Con estos resultados se puede decir que estos cationes no tienen efecto en medio SD mientras que en YPDA sí que son efectivos. Esto puede estar debido a que en el medio SD la fuente de nitrógeno es el sulfato de amonio y la alta concentración de amonio de este medio (76 mM) puede impedir la entrada de los cationes tóxicos, que son derivados con grupo amino. En YPDA la fuente de nitrógeno son aminoácidos a bajas concentraciones y no competirían por la entrada de cationes tóxicos.

En este caso, la concentración de higromicina B suficiente para inhibir el crecimiento es de 30 µg/mL mientras que para la noespermidina con una concentración de 2 mM es suficiente.

Una vez recogidos estos datos se procedió a comparar la cepa RS-132 transformada con el plásmido vacío con la misma cepa transformada con el gen *SSD1* y con el plásmido p7, usando las concentraciones de ácidos en medio SD y las de cationes en YPDA indicadas anteriormente. Se dejaron crecer los tubos a 28 °C en agitación durante 24 h. En este caso se sembró más cantidad de la cepa RS-132 transformada con el plásmido pRS416 vacío respecto a los ensayos anteriores, por lo que las absorbancias son mayores. Los resultados obtenidos fueron los siguientes (Tabla 6).

Tabla 6. Absorbancias obtenidas con las 3 cepas en las distintas condiciones

		pRS416	pRS416-SSD1	p7
Medio SD	Control	0,37	0,89	0,84
	AcH 54 mM	< 0,02	0,09	0,05
	Sórbico 0,5 mM	< 0,02	0,11	0,06
Medio YPDA	Control	2,40	4,00	3,89
	Hyg B 30 µg/mL	0,12	0,59	0,17
	NE 2 mM	0,15	0,31	0,25

Cuando la cepa se transforma con otra copia del gen *SSD1* crece de una manera más vigorosa como se aprecia en los controles, ya que alcanza el doble de absorbancia que la cepa con el plásmido vacío. Además, el crecimiento en presencia de ácidos débiles y cationes tóxicos se ve menos inhibido pero esto puede ser por el hecho de que crece más en vez de que haya aumentado la tolerancia hacia el estrés aplicado. Un análisis más detallado del efecto de los ácidos débiles y de los cationes tóxicos sobre el crecimiento se ha realizado con el aparato Bioscreen C y se describe a continuación.

4.4. Análisis mediante Bioscreen del fenotipo de crecimiento de la duplicación génica de *SSD1*

Para dilucidar si la tolerancia conferida por el plásmido centromérico se debe simplemente a un aumento de la tasa de crecimiento o se debe a otro mecanismo realizamos ensayos en Bioscreen con el objetivo de obtener curvas de crecimiento completas con las que poder estudiar y comparar todos los parámetros. En este caso se usa una concentración de ácido acético de 60 mM y de ácido sórbico 0,45 mM en medio SD, mientras que en YPDA se añade higromicina B a una concentración de 30 µg/mL y de norespermidina a 3 mM. La concentración de norespermidina se aumentó respecto a la utilizada en los ensayos en tubo porque se vio que la inhibición era menor de lo que se esperaba.

Transcurrido el tiempo de incubación y procesados los datos, los resultados obtenidos en medio SD con ácido acético se pueden ver en la Figura 9.

Para facilitar la comprensión de los datos se han representado todas las curvas de la cepa RS-132 transformada con el plásmido pRS416 vacío (416) de color azul, cuando está transformada con el plásmido ligado al gen *SSD1* (*SSD1*) de color rojo y cuando se transforma con el plásmido p7 (p7) en color verde. Además, tienen símbolos distintos y los cultivos sometidos a estrés se han representado con el símbolo sin rellenar.

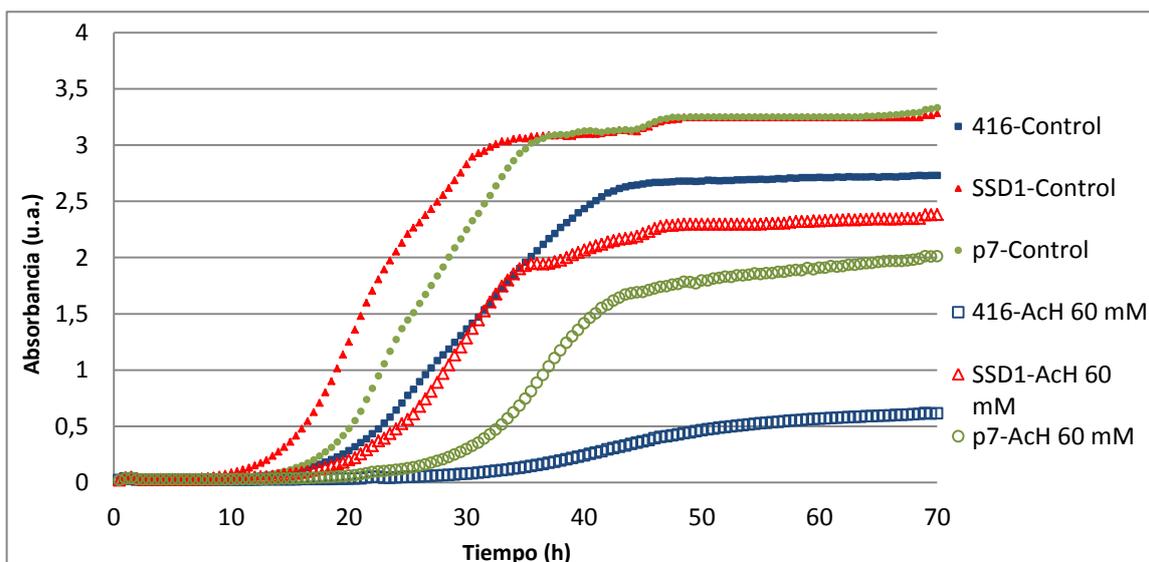


Figura 9. Curva de crecimiento en medio mínimo SD control o suplementado con ácido acético 60 mM.

En medio mínimo SD (suplementado con adenina e histidina) la cepa RS-132 transformada con otra copia del gen *SSD1* (bien solo o con los otros dos genes presentes en el plásmido p7) tiene un crecimiento mayor que el control con plásmido vacío, tanto en medio sin ácido como en presencia del mismo de ácido acético como ya se había visto en los ensayos en tubo. En cuanto al ácido sórbico, los resultados (véase Figura 10) son similares aunque no se ve una inhibición tan clara como la del acético.

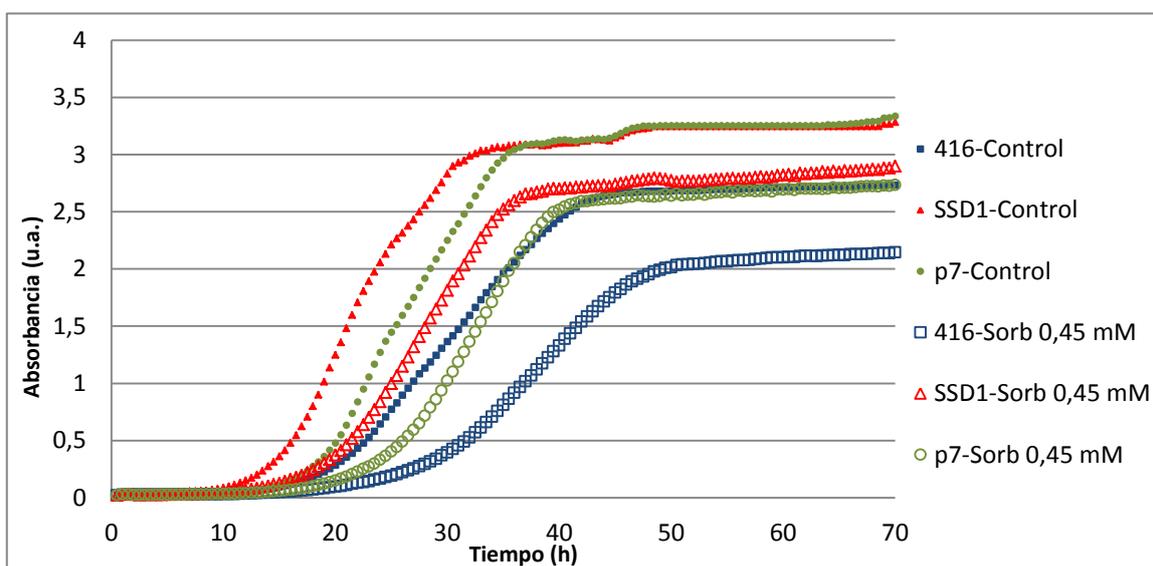


Figura 10. Curva de crecimiento en medio mínimo SD control o suplementado con ácido sórbico 0,45 mM.

Por otra parte, se procesaron las absorbancias obtenidas en medio YPDA con los dos cationes tóxicos, dando en higromicina B los resultados reflejados en la Figura 11 y en noespermidina los de la Figura 12.

La higromicina B sólo provoca pequeños cambios en cuanto a la duración de la fase de latencia pero luego el rendimiento final del cultivo es igual, por lo que no hay diferencias entre la cepa transformada con el plásmido pRS416 vacío y la cepa transformada con el gen *SSD1*. Además el p7 da el mismo resultado también por lo que el resultado es fiable.

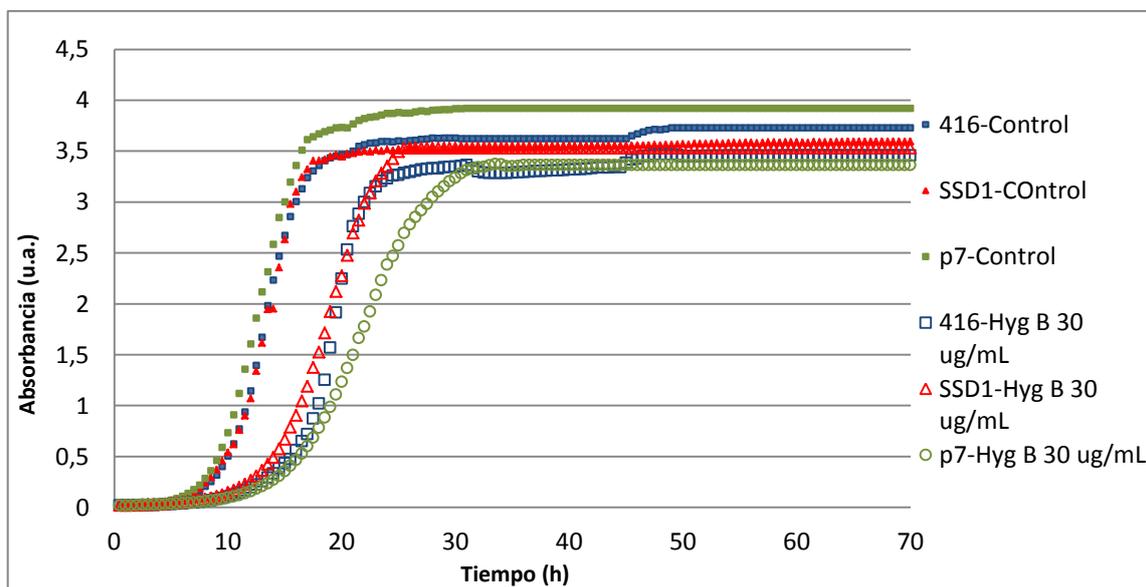


Figura 11. Curva de crecimiento en medio YPDA control o suplementado con higromicina B 30 ug/mL.

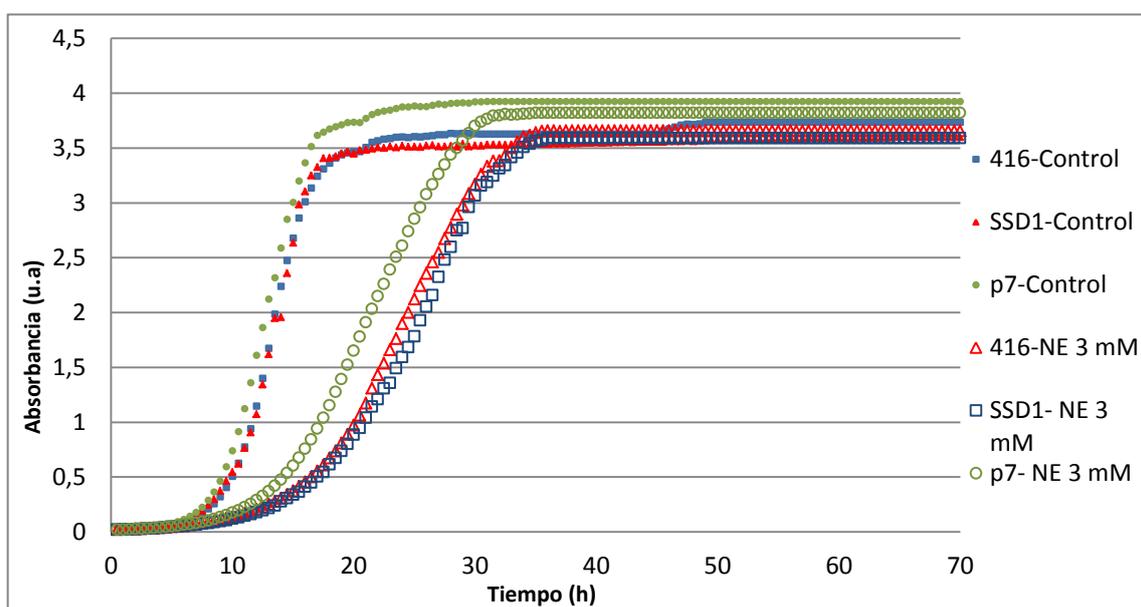


Figura 12. Curva de crecimiento en medio YPDA control o suplementado con noespermidina 3 mM.

En el caso de la noespermidina no se ven diferencias a una concentración de 3 mM ya que el rendimiento final de los controles y los cultivos con el catión tóxico es el mismo. Se pueden ver diferencias en la duración de la fase de latencia y tasa de crecimiento pero afectan a las tres cepas por igual.

Visto que los cationes tóxicos afectan por igual a la cepa con plásmido vacío como a la cepa con otra copia del gen se decidió realizar ensayos con ácidos débiles en medio YPD. A diferencia de lo que ocurría en medio mínimo, el comportamiento en YPD sin ácido es igual tanto para la cepa control como para la cepa con un aumento de dosis génica de *SSD1*. Sin embargo, en presencia de ácido acético, la cepa con una copia más de *SSD1* es más tolerante, al igual que ocurría en medio mínimo (Figura 13).

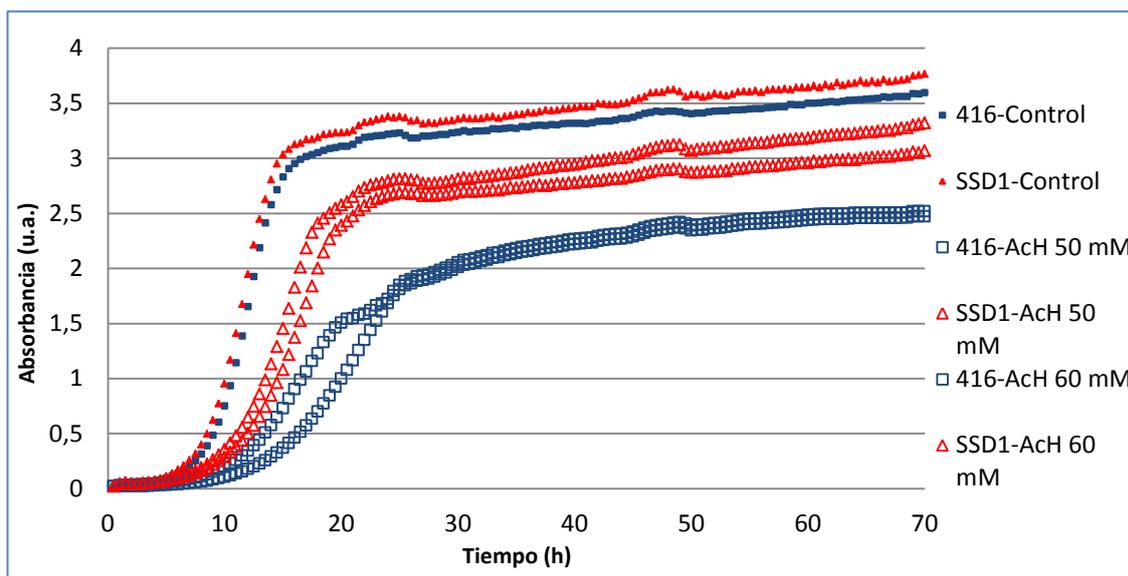


Figura 13. Curvas de crecimiento en medio YPD control o suplementado con ácido acético a distintas concentraciones.

Una vez representadas todas las curvas de crecimiento se procede a hacer un análisis comparativo en ambos medios. Se han analizado en función de tres parámetros básicos: la velocidad o tasa de crecimiento ($\mu = dA / (A \times dt)$ en horas⁻¹; A = absorbancia), el retraso en comenzar el crecimiento exponencial tras la siembra ("lag", en horas) y el rendimiento final de los cultivos (en unidades de absorbancia). Estos valores se representan en la Figura 14 como diagrama de barras. Como puede apreciarse, la copia extra del gen *SSD1* aumenta la velocidad de crecimiento en medio normal (x 1,2 veces) y además la hace menos sensible a la acidificación intracelular provocada por ácidos débiles. Por ejemplo, con 60 mM acético la velocidad de la cepa control cae al 32 % del valor en medio sin ácido mientras que en la cepa con la copia extra de *SSD1* solamente cae al 70 % del valor sin ácido. Lo mismo ocurre con el retraso inicial (que aumenta con los ácidos pero menos en levadura con la copia extra de *SSD1*) y con el rendimiento final (que disminuye con los ácidos pero menos en levadura con la copia extra de *SSD1*). Las diferencias entre la cepa con el plásmido p7 y con la construcción con solamente *SSD1* se deben a pequeñas diferencias de los cultivos iniciales.

La diferencia principal entre el medio rico (YPD) y el mínimo (SD con adenina e histidina) es que en medio mínimo sin estrés ácido, una copia extra de *SSD1* aumenta la velocidad y rendimiento del crecimiento, acortando además el retraso inicial, mientras que en medio rico sin ácido estos parámetros no se afectan. Por otro lado, en medio mínimo una copia extra de *SSD1* reduce el efecto de los ácidos débiles tanto a nivel de velocidad, rendimiento y retraso inicial del crecimiento mientras que en medio rico solo reduce el efecto del estrés ácido en el

rendimiento y retraso inicial del crecimiento pero la inhibición de la velocidad de crecimiento por ácidos es igual que en la cepa control. Estas diferencias serán importantes para dilucidar el mecanismo de acción de *SSD1* en relación con la tolerancia al estrés ácido intracelular.

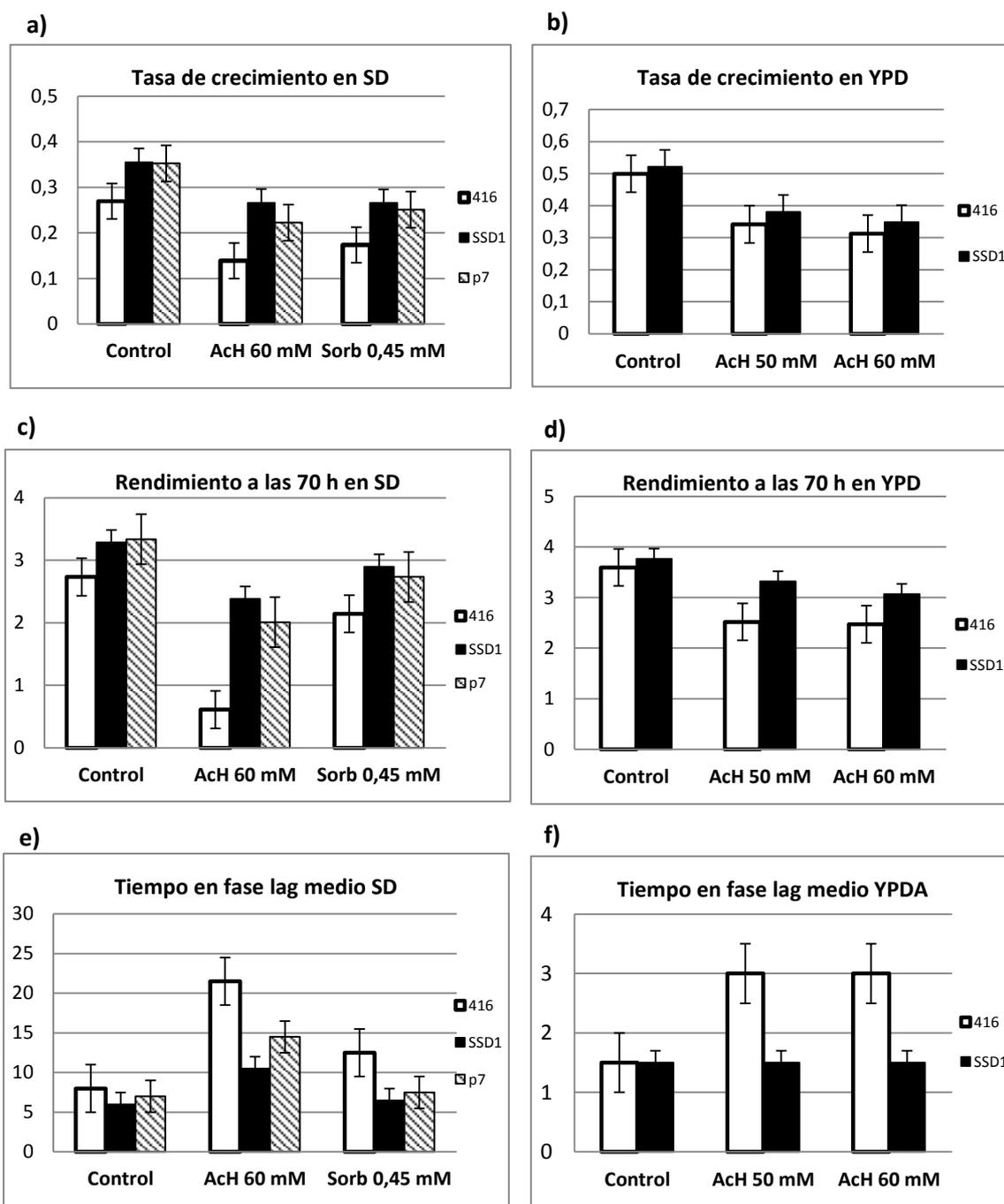


Figura 14. Parámetros de crecimiento en medio SD y medio YPDA suplementados con distintos ácidos. En blanco se representa la cepa RS-132 transformada con el plásmido pRS416 vacío (416), en negro la cepa transformada con el plásmido pRS416 con el inserto *SSD1* (*SSD1*) y con trama de rayas se representa la cepa transformada con el plásmido p7 (*p7*). Los ácidos utilizados son acético (AcH) y sórbico (Sorb). a) Tasa de crecimiento en medio SD (h^{-1}). b) Tasa de crecimiento en medio YPDA. c) Rendimiento del cultivo (Absorbancia) a las 70 horas en medio SD. d) Rendimiento del cultivo a las 70 horas en medio YPDA. e) Tiempo en fase de latencia (h) en medio SD. f) Tiempo en fase de latencia en medio YPDA.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo hemos observado que el gen *SSD1* proveniente de una biblioteca genómica construida con DNA de la cepa silvestre S288C mejora la tolerancia a estrés ácido intracelular (provocado con ácidos débiles) en una cepa de laboratorio con fondo genético BWG1-7A (RS-132, ver Materiales y Métodos). Vamos a describir la información disponible sobre el gen *SSD1* y a continuación el posible mecanismo de los fenotipos observados en el presente trabajo.

5.1. Información sobre el gen *SSD1* de levadura

Se han descrito dos alelos de este gen: *SSD1-V* y *ssd1-d*. Por un lado, *SSD1-V* está presente en la cepa silvestre S288C y es un supresor dominante de la mutación nula en el gen *sit4*, mientras que *ssd1-d* está presente en muchas cepas de laboratorio como las derivadas de W303, es recesivo y resulta letal en combinación con la mutación *sit4* (Sutton *et al.*, 1991). Además se ha visto que *SSD1-V* suprime mutaciones en genes relacionados con la respuesta a cAMP (Sutton *et al.*, 1991), genes que codifican subunidades de la RNA polimerasa III (Stettler *et al.*, 1993) y genes que codifican factores de procesado de RNA (Luukkonen y Seraphin, 1999). También se ha visto que *SSD1-V* es capaz de restaurar la resistencia a temperatura en el caso que haya mutaciones en el gen *TOR1* (Reinke *et al.*, 2004).

Se asocia genética o físicamente con cerca de 200 genes implicados en la integridad de la pared celular, el crecimiento celular y tolerancia a estrés. La adición de una copia del alelo *SSD1-V* a una cepa portadora del alelo *ssd1-d* es capaz de aumentar la longevidad en dos órdenes de magnitud (Kaeberlein *et al.*, 2004), siendo su función regulada por la quinasa Cbk1 en el modelo que se ve en la Figura 15 (Jansen *et al.*, 2009; Kurischko *et al.*, 2011). Los mutantes de *SSD1* muestran sensibilidad a la cafeína, fungicidas, cambios de osmolaridad y otros componentes lo que refuerza la hipótesis de que tenga un rol en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Ibeas *et al.*, 2001). Sin embargo, sigue sin entenderse cuál es el mecanismo molecular por el cual lleva a cabo su función.

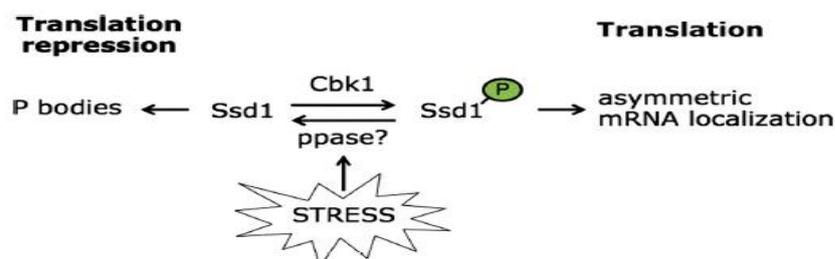


Figura 15. Modelo propuesto para la función de *SSD1* y *Cbk1*. En condiciones normales Cbk1 fosforila *SSD1* y lleva a cabo su función mientras que en condiciones de estrés se desfosforila y se asocia con orgánulos que contienen mRNAs degradados (P bodies) (Jansen *et al.*, 2009).

Ssd1-V tiene 1250 aminoácidos mientras que Ssd1-d (en la cepa W303) ha perdido los últimos 552 aminoácidos por una mutación que introduce un codón de terminación (Jorgensen *et al.*, 2002; Avrahami-Moyal *et al.*, 2012). Ssd1-V tiene homología con la ribonucleasa II de *Escherichia coli* y el dominio deleccionado en Ssd1-d incluye el sitio catalítico de unión a RNA, por lo que probablemente *ssd1-d* es un alelo no funcional. No obstante la función fisiológica de Ssd1-V puede no requerir actividad ribonucleasa sino que parece regular la estabilidad y localización subcelular de algunos mRNAs (Ohyama *et al.*, 2010).

En cuanto a sus proteínas homólogas, Ssd1-V tiene un homólogo en levadura llamado Dis3 que es la subunidad catalítica del complejo “exosoma” que degrada RNAs y el gen *DIS3* es esencial en levadura. Tras enfrentar la secuencia de Ssd1-V frente a la base de datos del NCBI mediante un Blastp se ha visto que en humanos la proteína más semejante es DIS3 (el ortólogo de Dis3 de levadura) como se aprecia en la Figura 16, aunque también tiene cierta homología con otras proteínas relacionadas con DIS3 pero probablemente con otras funciones.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> DIS3-like exonuclease 2 isoform 1 [Homo sapiens]	184	229	54%	6e-47	26%	gil134288890 NP_689596.4
<input type="checkbox"/> PREDICTED: exosome complex exonuclease RRP44 isoform X2 [Homo sapiens]	151	151	48%	1e-36	24%	gil530402172 XP_005286351.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: exosome complex exonuclease RRP44 isoform X1 [Homo sapiens]	151	151	48%	1e-36	24%	gil578824778 XP_006719841.1
<input type="checkbox"/> exosome complex exonuclease RRP44 isoform b [Homo sapiens]	151	151	48%	2e-36	24%	gil190014625 NP_001121698.1

Figura 16. Blastp de la secuencia de la proteína Ssd1 frente a la base de datos del NCBI. La proteína DIS3 y sus isoformas presentan homología con un e-value muy significativo.

El gen *Dis3* se encuentra en el cromosoma 13 en humanos y codifica para una exoribonucleasa 3'-5'. Está conservada a lo largo de la evolución desde eubacterias a eucariotas y es un elemento crucial en el procesamiento de RNA. Recientemente se ha comprobado que mutaciones puntuales en este gen conllevan alteraciones citogenética relacionadas con el desarrollo o progreso del mieloma múltiple (Weißbach *et al.*, 2014).

Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, parece ser que Ssd1-V no funciona como ribonucleasa sino que se une a mRNAs modificando su estabilidad y localización. Es probable que Ssd1 evolucionara a partir de Dis3 perdiendo la actividad exonucleasa y adquiriendo nuevas funciones basadas en unión y estabilización de mRNAs.

Aunque el alelo de *SSD1* en la cepa BWG1-7A (y por tanto en la RS-132 que hemos utilizado) no ha sido caracterizado, existe la posibilidad de que sea similar al *ssd1-d* de otras cepas de laboratorio y en ese caso los fenotipos observados en este trabajo no se deberían a una duplicación de dosis génica sino a la complementación del alelo inactivo o poco activo de

la cepa RS-132 (*ssd1-d*) por la forma activa del gen (*SSD1-V*). Por tanto, un trabajo futuro deberá aislar y secuenciar el gen *SSD1* de la cepa RS-132 para comprobar si corresponde al alelo *ssd1-d* o al alelo *SSD1-V*.

5.2. Mecanismo de tolerancia a ácido acético producido por *Ssd1*

Los conocimientos disponibles sobre el gen *SSD1* no permiten establecer un mecanismo de tolerancia a acidificación intracelular provocada por ácido acético. Sin embargo creemos que el método de selección que identificó a *SSD1* y nuestros estudios de crecimiento y proliferación celular permite establecer una conexión entre *SSD1* y la regulación del crecimiento y proliferación celular por el pH.

En medio mínimo SD (con amonio como fuente de carbono) hemos observado que *SSD1* mejora el crecimiento tanto en ausencia como en presencia de ácido acético y lo hace a tres niveles: el retraso inicial hasta que el cultivo inicia el crecimiento exponencial (“lag”), la velocidad de crecimiento y el rendimiento final del cultivo (Figura 17).

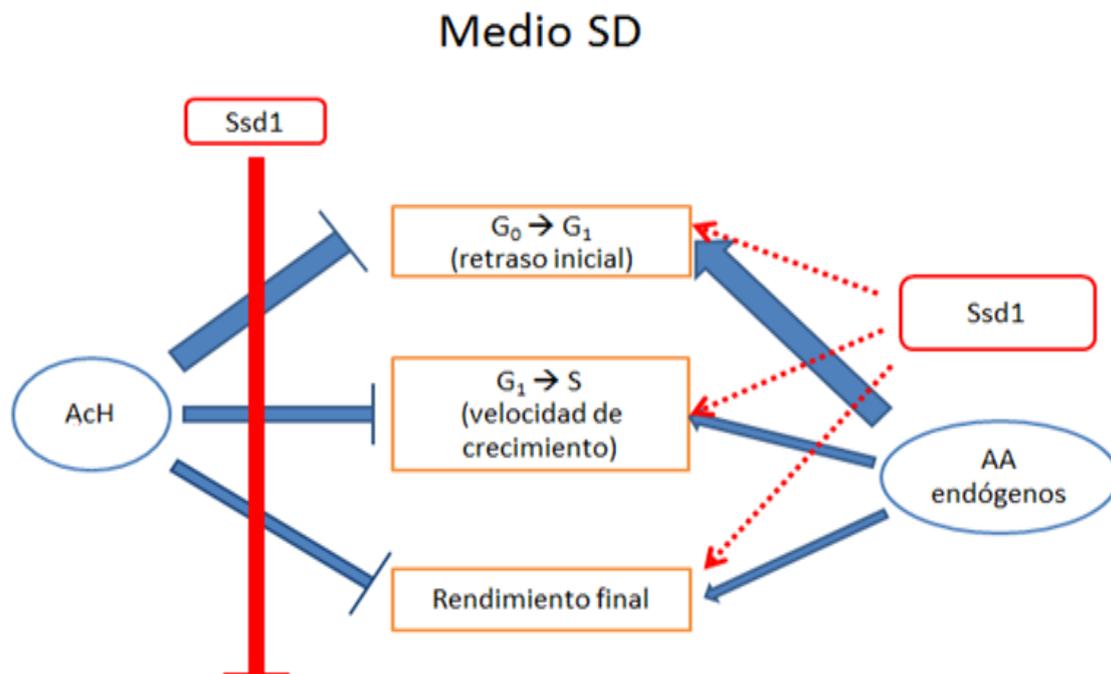


Figura 17. Modelo del efecto de *Ssd1* sobre el crecimiento y tolerancia a acético de la levadura en medio mínimo SD. El retraso inicial refleja la transición $G_0 \rightarrow G_1$ de las células del inóculo, que estaban en fase estacionaria. La velocidad de crecimiento viene determinada por la transición $G_1 \rightarrow S$ y el rendimiento final del cultivo refleja la eficiencia energética del crecimiento en unas condiciones dadas. *Ssd1* tiene efectos en ausencia y en presencia de acético. AA = aminoácidos; AcH = ácido acético para bajar el pH intracelular.

En medio YPD rico en aminoácidos el efecto del gen *SSD1* es similar pero con diferencias sustanciales (Figura 18). Solamente mejora el crecimiento en presencia de acético y ello afectando solamente al retraso inicial y al rendimiento inicial.

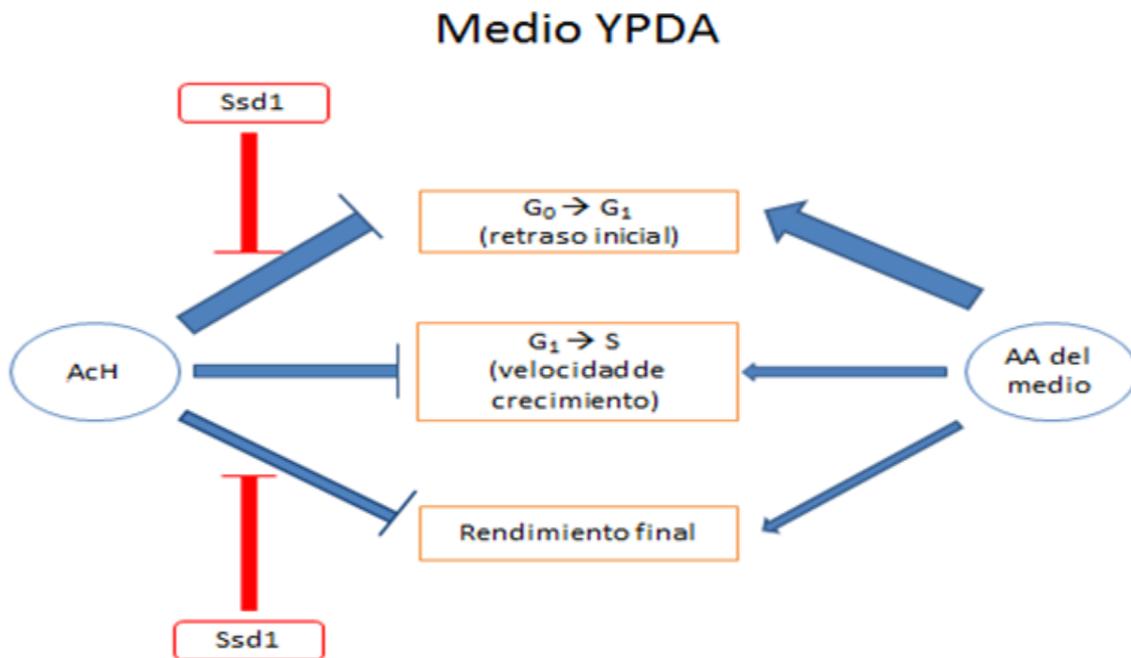


Figura 18. Modelo del efecto de *Ssd1* sobre el crecimiento y tolerancia a acético de la levadura en medio rico YPD. El retraso inicial refleja la transición $G_0 \rightarrow G_1$ de las células del inóculo, que estaban en fase estacionaria. La velocidad de crecimiento viene determinada por la transición $G_1 \rightarrow S$ y el rendimiento final del cultivo refleja la eficiencia energética del crecimiento en unas condiciones dadas. *Ssd1* solamente tiene efectos en presencia de acético y se limitan al retraso inicial y al rendimiento final. AA = aminoácidos; ACh = ácido acético para bajar el pH intracelular.

Dado que el efecto de *Ssd1* depende de la presencia de aminoácidos en el medio, una interpretación de estos resultados podría ser que el efecto de *Ssd1* en el crecimiento y proliferación de la levadura está mediado por los sistemas de respuesta a aminoácidos, como es el caso de TORC1. TORC1 es un complejo esencial de la proteína quinasa Tor1 (o Tor2) con proteínas accesorias que se activa por aminoácidos (Loewith y Hall, 2011). Regulan la síntesis global de proteínas en los ribosomas, activándola cuando hay abundancia de aminoácidos. Recientemente se ha descrito que TORC1 se activa por pH alto (Dechant *et al.*, 2014), es decir, al igual que los aminoácidos, el pH afecta a TORC1. Como se indica en la Figura 19, el efecto de *Ssd1* sobre la tolerancia a acidificación intracelular sugiere que este regulador de crecimiento-proliferación y de tolerancia a estrés actúa en paralelo a la regulación por aminoácidos, es decir, de TORC1. Como los aminoácidos y el pH alto activan TORC1, podemos sugerir que *Ssd1* aumenta la expresión de ciclinas cuando TORC1 no está completamente activado por pH alto o por aminoácidos.

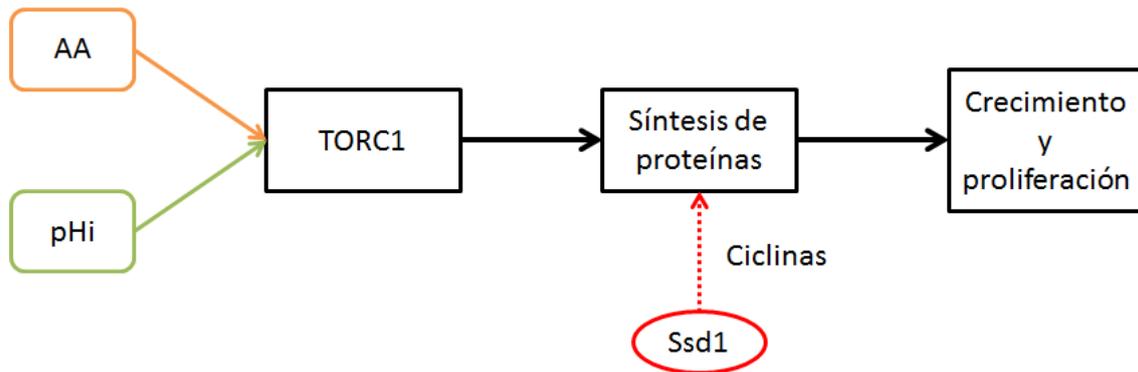


Figura 19. Regulación de pH intracelular y de aminoácidos relacionados con el crecimiento y proliferación celular. *TORC1* es un complejo de proteinquinasa implicada en la síntesis de proteínas para el crecimiento y proliferación celular, reguladas por la presencia de aminoácidos y un pHi alto. AA = aminoácidos.

6. CONCLUSIONES

Se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. El gen *SSD1* transformado en un plásmido centromérico, mejora la tolerancia a acidificación intracelular provocada por ácido acético en la cepa de laboratorio RS-132, dando cuenta del fenotipo observado previamente con el plásmido p7 (aislado de una biblioteca genómica de la cepa silvestre de levadura S288C).
2. El gen *SSD1* mejora el crecimiento en medio mínimo SD de la cepa de laboratorio en ausencia y en presencia de ácido acético. Este efecto se manifiesta en mejora de la velocidad de crecimiento, del retraso inicial y del rendimiento final del cultivo y es mayor en presencia de ácido acético. En medio YPD (rico en aminoácidos) el gen *SSD1* solamente mejora significativamente el crecimiento en presencia de ácido acético, mejorando el retraso inicial y el rendimiento pero no la velocidad durante la fase exponencial.
3. El gen *SSD1* codifica una proteína muy grande (1250 aminoácidos) con homología con la ribonucleasa Dis3 del exosoma pero no tiene actividad ribonucleasa. La proteína Ssd1 une RNA, estabiliza ciertos mRNAs y afecta la expresión de muchos genes y a muchas funciones relacionadas con el crecimiento y proliferación celular. Las cepas de laboratorio contienen un alelo truncado con poca o nula actividad denominado *ssd1-d*.
4. Proponemos que el efecto del gen *SSD1* aislado de una biblioteca genómica posiblemente se basa en expresar un alelo activo del mismo en una cepa de laboratorio portadora del alelo inactivo *ssd1-d* y no se debe a un aumento de dosis génica. Probablemente Ssd1 interacciona con los sistemas reguladores del crecimiento y proliferación celular en respuesta a aminoácidos como es TORC1. Proponemos aislar el gen *SSD1* de la cepa de laboratorio para comprobar su actividad así como estudiar fenotipos de tolerancia a otros estreses y utilizar mutantes en el sistema TOR para demostrar la probable interacción.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AVRAHAM-MOYAL, L.; ENGELBERG, D.; WENGER, J.W.; SHERLOCK, G.; BRAUN, S. (2012) Turbidostat culture of *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A under selective pressure elicited by ethanol selects for mutations in *SSD1* and *UTH1*. *FEMS Yeast Res.* 12: 521-33
- BISSOLI, G.; NIÑOLES, R.; FRESQUET, S.; PALOMBIERI, S.; BUESO, E.; RUBIO, L.; GARCÍA-SÁNCHEZ, M.J.; FERNÁNDEZ, J.A.; MULET, J.M.; SERRANO, R. (2012) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase ROF2 modulates intracellular pH homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 70: 704-16
- DECHANT, R.; SAAD, S.; IBÁÑEZ, A.J.; PETER, M. (2014) Cytosolic pH regulates cell growth through distinct GTPases, Arf1 and Gtr1, to promote Ras/PKA and TORC1 activity. *Mol. Cell* 55: 409-21
- DICKSON, R.C.; LESTER, R.L. (2002) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1583: 13-25
- GIAEVER, G.; CHU, A.M.; NI, L.; CONNELLY, C.; RILES, L.; VÉRONNEAU, S.; DOW, S.; LUCAU-DANILA, A.; ANDERSON, K.; ANDRÉ, B.; ARKIN, A.P.; ASTROMOFF, A.; EL-BAKKOURY, M.; BANGHAM, R.; BENITO, R.; BRACHAT, S.; CAMPANARO, S.; CURTISS, M.; DAVIS, K.; DEUTSCHBAUER, A.; ENTIAN, K.D.; FLAHERTY, P.; FOURY, F.; GARFINKEL, D.J.; GERSTEIN, M.; GOTTE, D.; GÜLDENER, U.; HEGEMANN, J.H.; HEMPEL, S.; HERMAN, Z.; JARAMILLO, D.F.; KELLY, D.E.; KELLY, S.L.; KÖTTER, P.; LABONTE, D.; LAMB, D.C.; LAN, N.; LIANG, H.; LIAO, H.; LIU, L.; LUO, C.; LUSSIER, M.; MAO, R.; MENARD, P.; OOI, S.L.; REVUELTA, J.L.; ROBERTS, C.J.; ROSE, M.; ROSS-MACDONALD, P.; SCHERENS, B.; SCHINMACK, G.; SHAFER, B.; SHOEMAKER, D.D.; SOOKHAI-MAHADEO, S.; STORMS, R.K.; STRATHERN, J.N.; VALLE, G.; VOET, M.; VOLCKAERT, G.; WANG, C.Y.; WARD, T.R.; WILHELMY, J.; WINZELER, E.A.; YANG, Y.; YEN, G.; YOUNGMAN, E.; YU, K.; BUSSEY, H.; BOEKE, J.D.; SNYDER, M.; PHILIPPSSEN, P.; DAVIS, R.W.; JOHNSTON, M. (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418: 387-91
- GILLIES, R.J. (1982) Intracellular pH and proliferation in yeast, *Tetrahymena* and sea urchin eggs. In *Intracellular pH: Its Measurement, Regulation, and Utilization in Cellular Functions* (Nuccitelli, R. and Deamer, D. W., eds), pp. 341-59, Alan R. Liss, New York
- GOTTLIEB, R.A.; NORDBERG, J.; SKOWRONSKI, E.; BABIOR, B.M. (1996) Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 654-58
- GUARENTE, L.; YOCUM, R.R.; GIFFORD, P. (1982) A Gal10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 7410-14

- HOLYOAK, C.D.; STRATFORD, M.; MCMULLIN, Z.; COLE, M.B.; CRIMMINS, K.; BROWN, A.J.; COOTE, P.J. (1996) Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3158-64
- HUESO, G.; APARICIO-SANCHÍS, R.; MONTESINOS, C.; LORENZ, S.; MURGUÍA, J.R.; SERRANO, R. (2012) A novel role of protein kinase Gcn2 in yeast tolerance to intracellular acid stress. *Biochem. J.* 441: 255-64
- HUGHES, T.R.; ROBINSON, M.D.; MITSAKAKIS, N.; JOHNSTON, M. (2004) The promise of functional genomics: completing the encyclopedia of a cell. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 546-54.
- IBEAS, J.I.; YUN, D.J.; DAMSZ, B.; NARASIMHAN, M.L.; UESONO, Y.; RIBAS, J.C.; LEE, H.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; PARDO, J.M. (2001) Resistance to the plant PR-5 protein osmotin in the model fungus *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the regulatory effects of *SSD1* on cell wall composition. *Plant J.* 25: 271-80
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-8
- JANSEN, J.M.; WANLESS, A.G.; SEIDEL, C.W.; WEISS, E.L. (2009) Cbk1 regulation of the RNA-binding protein Ssd1 integrates cell fate with translational control. *Curr. Biol.* 19: 2114-20
- JORGENSEN, P.; NELSON, B.; ROBINSON, M.D.; CHEN, Y.; ANDREWS, B.; TYERS, M.; BOONE, C. (2002) High-resolution genetic mapping with ordered arrays of *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants. *Genetics* 162: 1091-9
- KREBS, H.A.; WIGGINS, D.; STUBBS, M.; SOLS, A.; BEDOYA, F. (1983) Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J.* 214:657-63
- KURISCHKO, C.; KIM, H.K.; KURAVI, V.K.; PRATZKA, J.; LUCA, F.C. (2011) The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *J Cell Biol.* 192: 583-98
- LOEWITH, R.; HALL, M.N. (2011) Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189: 1177-1201
- LUDOVICO, P.; SOUSA, M.J.; SILVA, M.T.; LEO, C.; CORTE-REAL, M. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147: 2409-15
- LUUKKONEN, B.G.; SERAPHIN, B. (1999) A conditional U5 snRNA mutation affecting pre-mRNA splicing and nuclear pre-mRNA retention identifies *SSD1/SRK1* as a general splicing mutant suppressor. *Nucleic Acids Res.* 27: 3455-65

- MARTÍN, M.D.L.D. (2014). Identificación en levadura de genes determinantes de la tolerancia a ácidos preservantes de alimentos. <http://hdl.handle.net/10251/40410>
- MCPHERSON, N.; SHABALA, L.; ROONEY, H.; JARMAN, M.G.; DAVIES, J.M. (2005) Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acidpreservative response of disparate food spoilage yeast. *Microbiology* 151: 1995-2003
- MOLLAPOUR, M.; PIPER, P.W. (2007) Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fpd1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol. Cell Biol.* 27: 6446-56
- NIÑOLES, R.; RUBIO, L.; GARCÍA-SÁNCHEZ M.J.; FERNÁNDEZ J.A.; BUESO, E.; ALEJANDRO, S.; SERRANO, R. (2013) A dominant-negative form of Arabidopsis AP-3 β -adaptin improves intracellular pH homeostasis. *Plant J.* 74: 557-68
- OGG, S.C.; PORITZ, M.A.; WALTER, P. (1992) Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 3: 895-911
- OHYAMA, Y.; KASAHARA, K.; KOKUBO, T. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* Ssd1p promotes CLN2 expression by binding to the 5'-untranslated region of CLN2 mRNA. *Genes Cells* 15: 1169-88
- PARKS, S.K.; CHICHE, J.; POUYSSEGUR, J. (2013) Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 13: 611-23
- PERONA, R.; SERRANO, R. (1988) Increased pH and tumorigenicity of fibroblats expressing a yeast proton pump. *Nature* 334: 438-40
- PERONA, R.; PORTILLO, F.; GIRALDEZ, F.; SERRANO, R. (1990) Transformation and pH homeostasis of fibroblasts expressing yeast H⁺-ATPase containing site-directed mutations. *Mol Cell Biol* 10: 4110-15
- REINKE, A.; ANDERSON, S.; MCCAFFERY, J.M.; YATES, J.; ARANOVA, S.; CHU, S.; FAIRCLOUGH, S.; IVERSON, C.; WEDAMAN, K.P.; POWERS, T. (2004) TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279: 14752-62
- RESHKIN, S.J.; GRECO, M.R.; CARDONE, R.A. (2014) Role of pHi, and proton transporters in oncogene-driven neoplastic transformation. *Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369: 20130100
- ROSE, M.D.; BROACH, J.R. (1991) Cloning genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol.* 194:195-230
- SCHIESTL, R.H.; GIETZ, R.D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16: 339-46

- SERRANO, R. (1991) Transport across yeast vacuolar and plasma membrane. In: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics (Broach, J.R.; Pringle, J.R.; Jones, E.W. eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 523-85
- SHERMAN, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 350: 3-41
- SOPKO, R.; HUANG, D.; PRESTON, N.; CHUA, G.; PAPP, B.; KAFADAR, K.; SNYDER, M.; OLIVER, S.G.; CYERT, M.; HUGHES, T.R.; BOONE, C.; ANDREWS, B. (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol. Cell Biol.* 21: 319-30
- STETTLER, S.; CHIANNILKULCHAI, N.; HERMANN-LE, S.D.; LALO, D.; LACROUTE, F.; SENTENAC, A.; THURIAUX, P. (1993) A general suppressor of RNA polymerase I, II and III mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 239: 169-76
- SUTTON, A.; IMMANUEL, D.; ARNDT, K.T. (1991) The SIT4 protein phosphatase functions in late G₁ for progression into S phase. *Mol. Cell Biol.* 11: 2133-48
- WARRINGER, J.; BLOMBERG, A. (2003) Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 20: 53-67
- WEINBERG, R.A. (2014) *The Biology of Cancer*, 2nd edition. Garland Science, New York
- WEIßBACH, S.; LANGER, C.; PUPPE, B.; NEDEVA, T.; BACH, E.; KULL, M.; BARGOU, R.; EINSELE, H.; ROSENWALD, A.; KNOP, S.; LEICH, E. (2015) The molecular spectrum and clinical impact of DIS3 mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 169: 57-70
- WINZELER, E.A.; SHOEMAKER, D.D.; ASTROMOFF, A.; LIANG, H.; ANDERSON, K.; ANDRE, B.; BANGHAM, R.; BENITO, R.; BOEKE, J.D.; BUSSEY, H.; CHU, A.M.; CONNELLY, C.; DAVIS, K.; DIETRICH, F.; DOW, S.W.; EL BAKKOURY, M.; FOURY, F.; FRIEND, S.H.; GENTALIN, E.; GIAEVER, G.; HEGEMANN, J.H.; JONES, T.; LAUB, M.; LIAO, H.; LIEBUNDGUTH, N.; LOCKHART, D.J.; LUCAU-DANILA, A.; LUSSIER, M.; M'RABET, N.; MENARD, P.; MITTMANN, M.; PAI, C.; REBISCHUNG, C.; REVUELTA, J.L.; RILES, L.; ROBERTS, C.J.; ROSS-MACDONALD, P.; SCHERENS, B.; SNYDER, M.; SOOKHAI-MAHADEO, S.; STORMS, R.K.; VÉRONNEAU, S.; VOET, M.; VOLCKAERT, G.; WARD, T.R.; WYSOCKI, R.; YEN, G.S.; YU, K.; ZIMMERMANN, K.; PHILIPSEN, P.; JOHNSTON, M.; DAVIS, R.W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901-6