

Contribución de genes duplicados en la adaptación a estrés en poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*

TRABAJO FINAL MASTER

Master en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

Autor: ADRIÀ SANS SÁNCHEZ

Directores: Dr. MARIO A. FARES RIAÑO

Directores experimentales:

Dra. Beatriz Sabater-Muñoz

D. Florian Mattenberger

Tutor: Dr. RAMÓN SERRANO SALÓM

Enero 2017

RESUMEN

El objetivo de este proyecto es poder entender como los genes duplicados contribuyen a las innovaciones evolutivas. En concreto, se pretende estudiar mediante evolución experimental y análisis transcriptómico la re-programación de genes durante procesos de adaptación a condiciones ambientales estresantes, utilizando como organismo modelo la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En un primer objetivo hemos realizado una evolución experimental adaptativa en varios estreses (etanol, glicerol, láctico y estrés oxidativo) durante 100 pases (~330 generaciones) a partir de dos líneas previamente evolucionadas en medio estándar rico (YPD) y medio estándar pobre (1/8 YPD) durante ~667 generaciones. Las poblaciones adaptadas han mostrado un aumento generalizado de su μ_{max} en el correspondiente medio de estrés respecto a la ancestral.

Debido a la capacidad de los genes duplicados de generar innovaciones, hemos testado la hipótesis de que estos genes presentan mayor plasticidad transcripcional que los genes de copia única y que esta plasticidad es clave en los procesos de adaptación a estrés.

Con el fin de presentar un ejemplo de la capacidad de la duplicación génica de generar plasticidad fenotípica, hemos puesto a punto un sistema de duplicación génica en *S. cerevisiae* basado en la técnica CRISPR/Cas9. Estos experimentos, no obstante, han presentado una serie de problemas que se discuten en la memoria del presente proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer todo el trabajo realizado y las muestras de apoyo del grupo del Dr. Mario A. Fares. En especial a Beatriz y Flo. Mencionar especialmente a mi familia por el esfuerzo requerido. También quiero hacer una mención especial a los compañeros y amigos del máster.

Índice de Contenido

AGRADECIMIENTOS	ii
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 El origen de la variabilidad genética por medio de las mutaciones	7
1.2 Fuerzas evolutivas: selección natural y deriva genética	8
1.3 Duplicación génica: ¿redundancia o innovación?	9
1.4 Innovación y adaptación.....	10
1.5 Evolución experimental	13
1.6 Implicaciones biotecnológicas de la innovación por duplicación	15
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	16
3 MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Cepas utilizadas.....	16
3.2 Evolución adaptativa de <i>S. cerevisiae</i> Y06240.	17
3.2.1 Medios de cultivo.	17
3.2.2 Evolución Experimental Adaptativa. Pases seriados.....	17
3.2.3 Comprobación del estado de las líneas.....	19
3.3 Caracterización fenotípica de las poblaciones adaptadas	20
3.3.1 Curvas de crecimiento y tasa de crecimiento	20
3.3.2 Caracterización morfológica de las poblaciones evolucionadas.....	22
3.4 Determinación de plasticidad transcripcional en poblaciones adaptadas.....	23
3.5 Duplicación génica mediante sistema CRISPR-Cas 9 en <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	24
4 RESULTADOS Y DISCUSSION	26
4.1 Evolución adaptativa de <i>S. cerevisiae</i> Y06240.	26
4.1.1 Comprobación del estado de las líneas.....	27
4.2 Caracterización fenotípica de las poblaciones adaptadas.	30
4.2.1 Tamaño de las colonias.	30
4.2.2 Fenotipos anormales en la morfología de las colonias.....	31
4.2.3 Curvas de crecimiento.....	32
4.3 Determinación de plasticidad transcripcional en poblaciones adaptadas.....	36

4.4	Puesta a punto de un sistema basado en CRISPR-Cas9 para duplicación génica en <i>S. cerevisiae</i> Y06240.	39
4.4.1	Obtención del fragmento HR1 (Δ gRNA) + HR2 (AmCyan).....	39
4.4.2	Transformación de la levadura con pCRCT	41
4.4.3	Comprobación de la transformación.	41
4.4.4	Western para comprobar la proteína Cas 9.	44
4.4.5	Construcción del plásmido CRISPyBerger	45
4.4.6	Comprobación del plásmido	46
4.4.7	Ligación del gRNA[SWI]_LDRs al plásmido CRISPyberger y verificación	47
5	CONCLUSIONES.....	50
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
7	ANEXO I	54
7.1	Listado de primers utilizado durante el trabajo.	54
7.2	Genotipado y solapamiento de bases	55
7.3	Medios para la evolución adaptativa	55
7.4	Análisis de las curvas de crecimiento.	57
7.5	Transformación de levadura	58
7.6	Transformación <i>E. coli</i> Dh5 α (One Step Transformation)	58
7.7	Extracción de proteínas en levadura.	59
7.8	Extracción de DNA.....	59
7.8.1	SDS/LiAC (Looke et al. 2011)	59
7.9	Purificar Productos de PCR (Kit Promega, REF)	60
7.10	Extracción de RNA total de levadura (kit RNeasy Qiagen).....	60
7.11	SDS-Page	61
7.11.1	Extracción De Proteínas	61
7.11.2	Cuantificación De Proteínas	61
7.11.3	Preparación Del Gel De Acrilamida	62
7.11.4	Tinción Y Conservación Del Gel De Acrilamida	62
7.12	WESTERN BLOT	63
7.12.1	Transferencia.....	63
7.12.2	Confirmación De La Transferencia	63

7.12.3	Detección De Proteína Mediante Hibridación Con Anticuerpos	63
7.13	Otros medios y soluciones	64
7.13.1	YNB ura ⁺ (1000 ml)	64
7.13.2	LB	64
7.13.3	TSS (50 ml)	64
7.13.4	SDS Sample Solution.....	65
7.13.5	SOC	65

THIS PAGE IS LEFT BLANC INTENTIONALLY

1 INTRODUCCIÓN

El presente TFM se enmarca dentro del proyecto "Caracterizando los mecanismos de innovación por duplicación génica", en el que se pretende entender las rutas evolutivas que siguen los genes duplicados en la aparición de innovaciones evolutivas.

¿Qué relación tienen estos mecanismos de innovación con el Máster de Biotecnología Molecular y Celular de Plantas? Para contestar esta pregunta, primero vamos a presentar algunos de los puntos básicos necesarios para entender el proyecto, como son: mutación y variabilidad genética, duplicación génica, selección natural y deriva, innovación y adaptación, métodos experimentales de evolución, y por último implicaciones biotecnológicas de la innovación por duplicación.

1.1 *El origen de la variabilidad genética por medio de las mutaciones*

La máquina encargada de la replicación del DNA actúa con alta fidelidad. No obstante, en ocasiones se producen cambios o errores (mutaciones) que dan origen a formas alteradas, la mayoría de las cuales funcionan de manera menos satisfactoria que los alelos de tipo salvaje. Los mejores genes y las mejores características son las que más se reproducen, es por eso que raras veces estos errores quedan fijados en el genoma. Este fenómeno provee una fuente de variabilidad nueva y necesaria para permitir que los organismos se adapten a un medio en cambio continuo (James D. Watson 2016).

Ya en el año 1926, incluso antes del descubrimiento de la estructura del ADN (Watson, 1953, Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid), el genetista ruso Sergei Chetverikov sugirió que "la variabilidad mutacional proporciona la materia prima para la evolución pero no constituye la evolución en sí mismo" (S.S 1961). Chetverikov propuso que los individuos que forman una población en la naturaleza, son capaces de tamponar mutaciones y retenerlas en condiciones de heterocigosis, proporcionando así una fuente para la variabilidad de futuros cambios.

Estas nuevas mutaciones pueden tener efectos muy diversos para el organismo. Lo más probable es que las mutaciones que se produzcan en una población tengan un efecto desestabilizante o neutro para la viabilidad del organismo, puesto que la selección natural ha ido perfeccionando a los individuos y descartando todos aquellos alelos menos ventajosos. Debido al efecto destructor o neutro este tipo de

mutaciones son llamadas mutaciones deletéreas o mutaciones neutras respectivamente. Una particularidad de este tipo de mutaciones es que debido a su efecto desestabilizador no suelen ser fijadas en la población por selección natural, pero si por otras fuerzas evolutivas como la deriva genética.

1.2 Fuerzas evolutivas: selección natural y deriva genética

La selección natural es el proceso por el cual los organismos individuales con rasgos favorables son más propensos a sobrevivir y reproducirse. Hasta ahora parece que la selección natural solamente tiene un efecto destructor y deletéreo sobre los genes y los organismos, sin embargo, también pueden tener un papel constructivo en el origen de nuevas funciones y nuevos rasgos en los individuos. Durante un proceso evolutivo por selección natural, continuamente se fijan mutaciones en el ADN que, al cabo de sucesivas generaciones, pueden producir nuevas variantes alélicas y por lo tanto un nuevo conjunto de rasgos sobre los cuales la selección natural puede actuar de manera positiva, ya que son beneficiosos para su portador.

Por otro lado, existen más fuerzas evolutivas, como la deriva genética, que produce cambios significativos en las frecuencias alélicas. La deriva genética no tiene la capacidad de eliminar aquellas variantes alélicas menos ventajosas, como lo hace la selección natural, y produce cambios en las frecuencias alélicas de manera completamente estocástica. Es por ello que la deriva genética puede hacer que algunas variantes alélicas, independientemente de que sean ventajosas o no para el individuo, puedan desaparecer por completo de la población y, por lo tanto, reducir la variabilidad genética (Figura1). De este modo, se podría considerar la deriva genética como la antítesis de la selección natural ya que produce la fijación tanto de mutaciones beneficiosas como de mutaciones neutras o deletéreas.

El mayor determinante que mantiene la deriva génica a raya y actúa a favor de la selección natural es el tamaño efectivo poblacional: a mayor tamaño poblacional, mayor competición por los recursos disponibles, mayor severidad a de la selección natural y, por tanto, menor deriva génica. De este modo, la deriva génica es inversamente proporcional al tamaño efectivo poblacional (Wright 1931).

La suma de estas dos fuerzas contrarias, llevó a establecer la teoría de evolución neutral (Kimura 1983) que propone que la mayoría de mutaciones que se producen en un organismo no tienen ningún efecto sobre su eficacia biológica por lo que pasan desapercibidas a ojos de la selección natural.

Supongamos ahora unas condiciones donde el coeficiente de selección es muy bajo, es decir, el efecto de la selección natural en esa población no favorecerá a unos organismos sobre los otros, pero sin embargo es suficiente para que las mutaciones de efectos deletéreos se vean eliminados. De esta manera, la cantidad de mutaciones neutrales que puede acumular un organismo es mayor, y esta nueva variabilidad genética adquirida puede suponer una ventaja adaptativa en un ambiente más competitivo donde la selección natural es más severa. Tanto es así, que las mutaciones neutrales en determinadas condiciones pueden suponer una diferencia entre la vida y la muerte en otras condiciones.

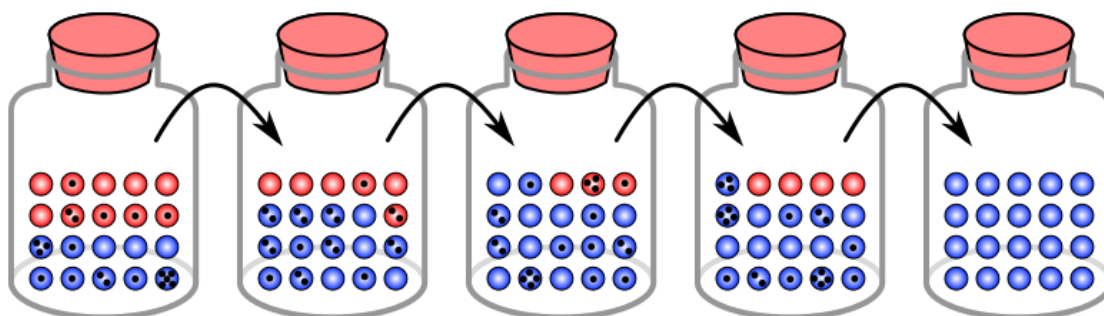


Figura 1. Representación de la pérdida de variabilidad. Partimos de una población con dos fenotipos (rojo y azul) y diferentes variantes alélicas. Cada frasco representa una población donde actúa de manera estocástica la selección natural y la deriva genética marcada por una flecha negra desplazando las frecuencias alélicas y reduciendo la variabilidad fenotípica. En este caso el tamaño efectivo poblacional es pequeño por lo que el efecto de la deriva génica es mucho mayor que la selección natural, de esta manera las variantes alélicas iniciales, sean ventajosas o no para el individuo, desaparecen por completo de la población y, reducen la variabilidad genética de la población inicial hasta la homocigosis, donde todos los individuos son del mismo fenotipo (azul) y solo una variante alélica (liso).

1.3 Duplicación génica: ¿redundancia o innovación?

Además de la mutación, otro fenómeno genético que permite aumentar la variabilidad es la duplicación génica. Esta duplicación, puede darse de dos maneras: en el primer caso, cuando se duplica un único gen, se denominan "Small-Scale Duplications (SSDs)"; mientras que el segundo caso, cuando se produce una duplicación de todo el genoma del organismo, se denominan "Whole-genome duplications (WGDs)".

La disponibilidad de genomas completos y de herramientas bioinformáticas, para el análisis de los mismos, ha permitido determinar que un gran número de especies tuvieron su origen tras eventos de duplicación genómica (Bennett and Leitch

2005) e incluso otras se especializaron a un determinado ambiente y fueron capaces de colonizar nuevos nichos ecológicos tras eventos de duplicación. Precisamente, gracias a estos estudios genómico-funcionales, se ha llegado a determinar que la duplicación génica está relacionada con grandes saltos evolutivos, como por ejemplo la radiación de las plantas angiospermas (Blanc and Wolfe 2004, Soltis, Marchant et al. 2015), la radiación de los animales vertebrados (Hoegg, Brinkmann et al. 2004), e incluso en detalles más pequeños como la estructura de órganos tan complejos como el corazón (revisado en Wagner, 2015).

Estos saltos evolutivos, *a priori* relacionan una mayor complejidad del organismo con un mayor tamaño del genoma. Sin embargo, cuando comparamos los tamaños de los genomas (Valor C (Greilhuber, Dolezel et al. 2005)), caemos en una paradoja: en contra de lo que cabría esperar no existe una correlación entre el tamaño del genoma y la complejidad del organismo. Por ejemplo, algunos protistas unicelulares como las amebas, tienen tamaños de genomas mayores que los humanos (<http://www.genomesize.com>) cuando de manera evidente son menos complejos. Sin embargo, la paradoja del valor C tiene una explicación. Dado que los genomas más compactos presentan una mejor economía metabólica y son más competitivos en la división celular, la selección natural tiende a compactar los genomas y a erosionar la copias redundante y/o no funcionales de los genes (Cavalier-Smith 2005). Entonces, si las duplicaciones lo que hacen es aumentar el tamaño del genoma y la selección natural lo reduce, ¿cómo es posible que se hayan mantenido tantos genes duplicados a lo largo del tiempo?.

1.4 Innovación y adaptación.

Como se ha indicado anteriormente, existe una relación entre innovación y duplicación génica, pero los mecanismos y las rutas moleculares que siguen estos duplicados sigue siendo un punto controvertido.

¿Cuál es el destino de los genes duplicados? ¿Cómo da lugar la duplicación de genes a la diversidad biológica?

En 1970, Susumo Ohno, con su libro *Evolution by Gene Duplication* (Ohno 1970), publicó un modelo (Figura 2) según el cual el destino más probable de un gen después de duplicarse es la pseudogenización, es decir, que una de las copias se pierde. La pseudogenización puede darse bien sea porque la acumulación de mutaciones en la región reguladora imposibilita la expresión del gen, o bien, por mutaciones

en la región codificante que imposibilitan la generación de un producto funcional. Un segundo destino evolutivo posible para los genes duplicados es la subfuncionalización. En este caso se da un reparto de las funciones del gen ancestral, de manera que las dos copias se vuelven imprescindibles para los organismos. Por último, puede darse el fenómeno de neofuncionalización; que a pesar de ser el menos probable es el más relevante en cuanto a términos evolutivos. La neofuncionalización se da cuando una copia del gen duplicado retiene la función original la otra adquiere una nueva función diferente a la original y evolutivamente ventajosa.

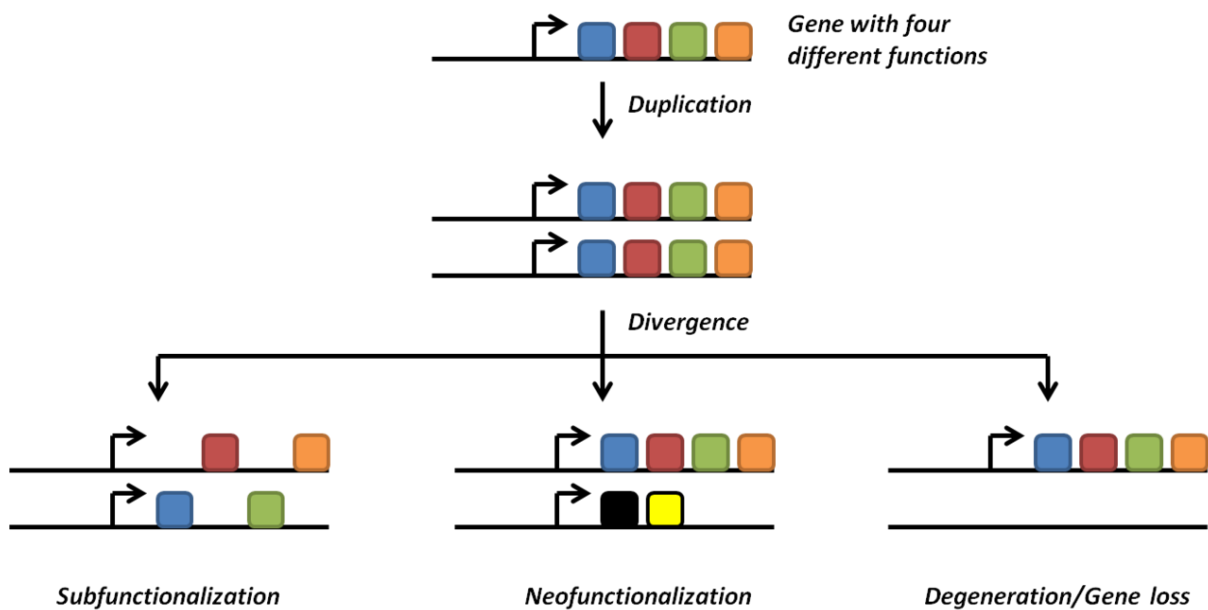


Figura 2. Modelo evolutivo de divergencia funcional entre genes duplicados propuesto por Susumu Ohno. Los genes duplicados se representan mediante líneas y las funciones de los genes se muestran mediante cuadrados sólidos de diferentes colores. El modelo representa diferentes destinos de los genes duplicados: i) la degeneración, en el que el destino del gen es la desaparición. ii) la subfuncionalización, donde se da un reparto de las funciones del gen ancestral. iii) la neofuncionalización se da cuando una copia del gen duplicado retiene la función original la otra adquiere una nueva función diferente a la original (cuadro amarillo y negro). A veces se puede producir un reparto de funciones y la adquisición de nuevas a la vez.

El motivo de que la mayoría de los genes duplicados vuelvan a copia única después de la duplicación es debido a la redundancia génica. Esta redundancia facilita la acumulación de mutaciones deletéreas y el genoma acaba sufriendo una erosión genética después de la duplicación [11]. Sin embargo, es evidente que los genes duplicados persisten en el genoma, por lo tanto, en teoría los genes duplicados solo se podrán mantener duplicados si cumplen los siguientes requisitos: (i) proporcionan robustez mutacional, es decir, que permiten incrementar la tolerancia a las mutaciones

[12]; (ii) si hay selección hacia el aumento de la dosis génica [13]; o (iii) si los genes duplicados divergen funcionalmente respecto del gen ancestral [14] .

En 2013, nuestro laboratorio propuso un modelo por el cual el destino evolutivo de los genes duplicados predicho por Ohno está determinado, entre otros factores, por el origen de la duplicación (Fares, 2013, The roles of whole-genome and small-scale duplications in the functional specialization of *Saccharomyces cerevisiae* genes). Según este modelo, aquellos genes duplicados procedentes de una duplicación genómica completa (WGD) son más propensos a mantenerse en el genoma que las duplicaciones a pequeña escala (SGD), pero las SGD establecen más interacciones genéticas y lo más importante, es que son funcionalmente más divergentes [17]. En 2014 se validó experimentalmente este modelo analizando la distribución de SNPs en el genoma de la levadura *S. Cerevisiae* [18].

Por lo tanto, si un gen duplicado se mantiene en el genoma el tiempo suficiente puede acumular un gran número de mutaciones y cambiar lo suficiente como para divergir funcionalmente de la copia original. Esto se debe a que se produce una relajación de selección purificadora en una de las copias. Es decir, la selección natural tolera cambios mutacionales en una de las copias, mientras que la otra copia continúa proporcionando la información genética ancestral manteniendo un fenotipo apto para el ambiente sin que la selección natural actúe en su contra [15]. Si se acumulan mutaciones suficientes en una de las copias, puede dar origen a una nueva función que confiera una ventaja adaptativa al organismo, incrementando así su eficacia biológica.

La variabilidad genética que se genera con las duplicaciones, puede ser aprovechada por los organismos para sobrevivir a un cambio ambiental. Para ello, los organismos se adaptan fisiológicamente al cambio ambiental de manera rápida, produciendo cambios discretos en el fenotipo. Esta capacidad de los organismos para generar variaciones discretas del fenotipo sin modificar el genotipo, se conoce como plasticidad fenotípica [19, 20]. La plasticidad fenotípica les confiere a los seres vivos una mayor capacidad de sobrevivir a ambientes en continuo cambio; porque capacidad de un genotipo para producir más de un fenotipo cuando el organismo se halla en diferentes condiciones ambientales (Figura 3) (Pigliucci, 2006, Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation)(Pigliucci, 2005, Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?). Se ha demostrado que los genes duplicados muestran un incremento significativo de la transcripción en condiciones de estrés demostrando así que el aumento de la plasticidad transcripcional es más probable que el aumento

de la plasticidad funcional, ya que los efectos del aumento de la plasticidad transcripcional son más propensos a ser objeto de selección en entornos cambiantes, mientras el último requiere más tiempo evolutivo para ser seleccionado [17, 18].

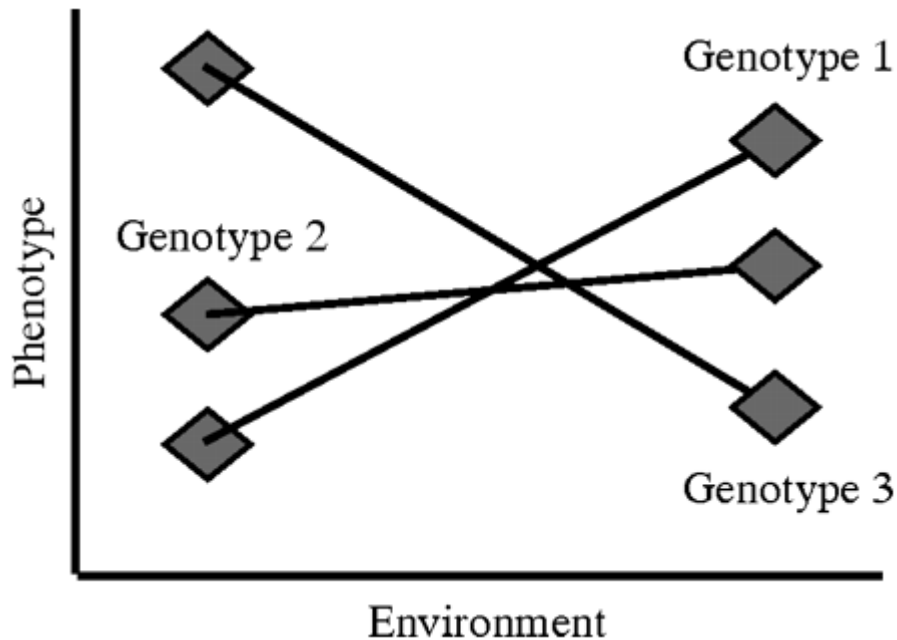


Figura 3. Este ejemplo ilustra el concepto de plasticidad fenotípica. En este caso simple, se simulan 2 entornos, las líneas representan las normas de reacción de cada genotipo, mientras que la pendiente es una medida del grado y/o patrón (positivo o negativo) de la plasticidad fenotípica. Así, por ejemplo, los genotipos 1 y 3 son plásticos, pero muestran patrones opuestos en respuesta a los mismos entornos; El genotipo 2, por el contrario, muestra poca plasticidad para los 2 ambientes (Pigliucci, 2006, Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation).

1.5 Evolución experimental

La escala de los procesos evolutivos es de millones de años, una escala inviable en términos humanos y, sobre todo, en términos experimentales. Por ello, la evolución experimental hace uso de microorganismos para reducir esta escala temporal mientras mantiene un alto número de generaciones que permita testar los distintos fenómenos evolutivos en condiciones controladas [21]. Actualmente y gracias a herramientas moleculares modernas, como la secuenciación de genomas y/o el estudio de la expresión diferencial de genes, es posible desengranar los mecanismos moleculares que sirven de base para la selección, como se fijan y se mantienen las mutaciones y/o como se producen las adaptaciones.

Un factor a tener en cuenta en evolución experimental es la aplicación de cuellos de botella periódicos. Toda población, ya sea en condiciones experimentales

como en la naturaleza, se ve sometido a una reducción poblacional (cuello de botella) (Figura 4).

En condiciones experimentales podemos controlar este fenómeno que afecta a la población. Controlar el cuello de botella nos permite ajustar el coeficiente de selección y la deriva genética. Cuanto más fuerte sea el cuello de botella, mayor es el efecto de la deriva genética puesto que menor será el número efectivo poblacional. De esta manera, un cuello de botella fuerte produce la fijación aleatoria de todas las mutaciones, sean beneficiosas o deletéreas. Esto provoca que al cabo de pocas generaciones, determinados caracteres, pasen a ser mayoritarios en los individuos supervivientes. Además, se acelera la evolución reduciendo la variabilidad genética de la población pudiendo llegar a un punto de homocigosis. Como consecuencia se reduce al mínimo la plasticidad fenotípica perdiendo la capacidad de respuesta a cambios ambientales. Por lo contrario, si relajamos el cuello de botella, aumentamos el efecto de la selección natural, ya que pasan más individuos a la siguiente generación. Esto se traduce en una mayor competencia por los recursos, por lo que la selección natural mantendrá solo a aquellos individuos mejor adaptados.

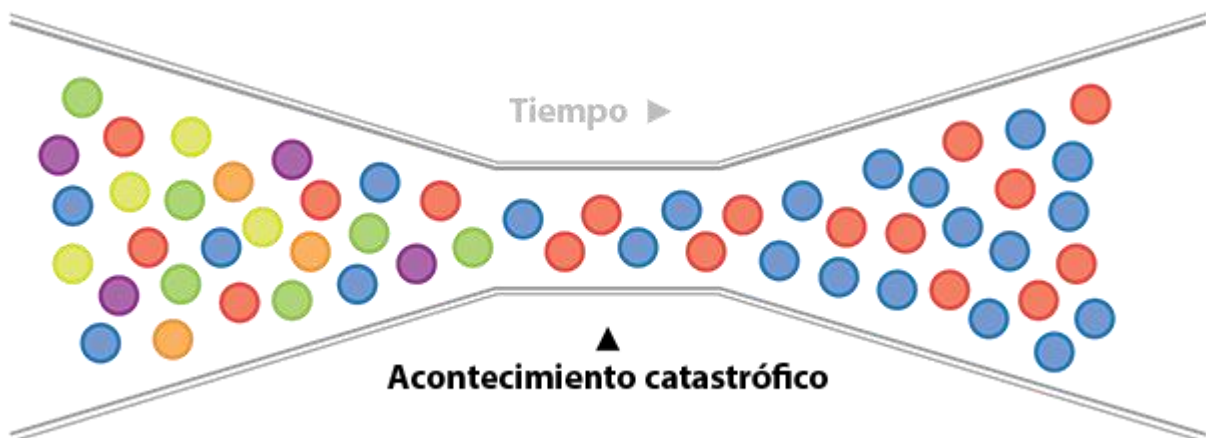


Figura 4. Una visualización típica de lo que sucede en un cuello de botella genético. La variabilidad de colores, muestra la variabilidad de genotipos en una población. Esta se ve reducida tras pasar un cuello de botella, donde de manera estocástica o por medio de la selección natural solo sobreviven algunos individuos, reduciendo así la variabilidad genética de la población.

1.6 Implicaciones biotecnológicas de la innovación por duplicación

La duplicación genética tiene una importancia destacada en la industria biotecnológica ya que es fuente de innovación biológica que puede dar lugar a nuevos productos de interés biotecnológico. La manipulación genética, molecular y genómica de *S. cerevisiae* y la abundancia de genes parálogos que contiene en su genoma, la convierten en un candidato ideal para la innovación de nuevos productos y rutas metabólicas.

Por ejemplo, en *S. cerevisiae* el evento de duplicación total del genoma hace 100 millones de años {Marcet-Houben, 2015, Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage}, coincidió con el surgimiento una gran variedad de plantas con fruto, de tal forma que existieron una gran cantidad de sustratos fermentables que estuvieron a disposición de comunidades microbianas, las cuales explotaron la capacidad para producir y consumir etanol. En plantas parece ser que el auge de las angiospermas se debe a una sincronización de antiguas duplicaciones del genoma compartida por muchas especies {De Bodt, 2005, Genome duplication and the origin of angiosperms}. De hecho, en este punto reside la clave de lo que podría ser un gran avance en la biotecnología, entender y/o buscar cuales son los motivos que hace que se den ciertos patrones de expresión que llevan a esas ventajas evolutivas, en este caso al uso de sustratos fermentables y el auge de las angiospermas.

Por ejemplo, en plantas cultivables, la inducción a la poliploidia es una técnica muy usada para la adquisición de nuevos caracteres. En este caso no solo se produce la subfuncionalización, también actúan fenómenos como la dosis génica. Lo mismo pasa con las levaduras, donde la hibridación entre cepas es muy común para mejorar funciones como la de producir fermentaciones con un mayor grado alcohólico o mayores niveles de glicerol. Pero esas nuevas características, no las obtenemos de manera controlada sino que tienen cierto grado de estocasticidad.

Descifrando estas claves evolutivas que confieren ventajas evolutivas, seríamos capaces de poder dirigir la subfuncionalización de genes a través de; i) la diversificación de los patrones de expresión de cada uno de los genes, ii) cambios en la secuencia de la región codificante que resultan en modificaciones de las propiedades de las proteínas codificadas, iii) desarrollo y mejora de nuevas funciones celulares por medio de la neofuncionalización de genes duplicados.

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente TFM se enmarca dentro del proyecto "Caracterizando los mecanismos de innovación por duplicación génica". Como se ha visto en la Introducción, en el punto 1.3, existen fuerzas evolutivas que determinan las modificaciones genómicas y su destino. Sin embargo, sigue habiendo un vacío en cuanto a los mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento de los genes duplicados en un organismo, y en las rutas evolutivas que siguen para llegar a la innovación (o a la generación de nuevas funciones). Dado que la mayor parte de estos eventos se producen a escala evolutiva, y esta es una escala impensable para un TFM, se ha seleccionado la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como especie modelo y el proceso de evolución experimental para intentar dilucidar estos mecanismos moleculares.

En concreto los objetivos propuestos en este TFM son:

- 1) Adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a distintos estreses.
- 2) Caracterización fenotípica de las poblaciones adaptadas.
- 3) Determinación de plasticidad transcripcional en poblaciones adaptadas.
- 4) Puesta a punto de un sistema de edición del genoma, mediante técnica CRISPR-Cas9, para generar la duplicación de genes.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

El listado de soluciones específicas, medios y preparación de los mismos se encuentran como anexos al final del presente documento.

3.1 Cepas utilizadas

En este trabajo se han utilizado tres cepas de dos especies de microorganismos *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

De *E. coli* hemos utilizado la cepa DH5 α (Life Technologies, 18263-012), para mantener todos los plásmidos y realizar todos los procesos de clonación

De la levadura *S. cerevisiae*, se han utilizado dos cepas haploides relacionadas y ampliamente utilizadas en laboratorios como organismo modelo de eucariota unicelular: la cepa BY4741 (*MATa*, *his3 Δ 1*, *leu2 Δ 0*, *met15 Δ 0*, *ura3 Δ 0*) y su derivada Y06240 (BY4741; *MATa*, *his3 Δ 1*, *leu2 Δ 0*, *met15 Δ 0*, *ura3 Δ 0*; *msh2::kanMX4*). La cepa BY4741 deriva directamente de FY2, que a su vez es un descendiente directo de S288c, la cepa de referencia de *S. cerevisiae*, de la que se dispone su genoma, transcriptoma y proteoma en distintos ambientes [22-24]. La cepa Y06240 se diferencia de

la BY4741 por la delección del gen *msh2* (mediante inserción del ‘cassette’ de resistencia a kanamicina, *kanMX4*), codificante de la proteína MSH2, implicada en el sistema de reparación post-replicación del DNA (sistema MMR). Este sistema está implicado en la reparación de mutaciones puntuales (inserciones y delecciones) [25], la falta de cualquier componente de este sistema (PMS1, MLH1, MSH3, MSH6 y MSH2) implica que la cepa acumule mutaciones a un ritmo de 6 a 40 veces superior que la cepa silvestre, es decir, presenta una tasa de mutación mayor.

La tasa o ratio de mutación se define como la probabilidad que un gen sea alterado por una nueva mutación y sea capaz de pasar a la siguiente generación. La ratio es expresada típicamente como el número de nuevas mutaciones en un gen determinado por generación. Un valor común es de 10^{-5} a 10^{-6} mutaciones por generación (Brooker 2010).

3.2 Evolución adaptativa de *S. cerevisiae* Y06240.

3.2.1 Medios de cultivo.

Todos los medios utilizados (Tabla 1) tienen una base de extracto de levadura y bactopectona, además, contienen Kanamicina a una concentración de 30 mg/L. La preparación de cada medio esta descrita en el anexo 7.3

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados indicando su composición y utilización.

Medio	Composición	Utilización
YPD _{kan}	1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 2% dextrosa	Medio rico estándar
1/8 YPD _{kan}	0.125% extracto de levadura, 0.25% bactopectona, 0.25% dextrosa	Medio pobre estándar
YPL _{kan}	1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 2% lactato	Medio de estrés
YPE _{kan}	1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 3% etanol	Medio de estrés
YPG _{kan}	1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 3% glicerol	Medio de estrés
YPO _{2D} _{kan}	1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 3% H ₂ O ₂ , 1% dextrosa	Medio de estrés

3.2.2 Evolución Experimental Adaptativa. Pases seriados.

En el laboratorio del Dr. Fares se realizó una evolución experimental de la cepa de levadura Y06240 (hipermutágena) con 6 líneas en medio estándar rico y otras 6 líneas en medio estándar pobre, mediante pases seriados del 1% de la población a medio fresco cada 24h. Las poblaciones fueron crecidas en 5ml del medio correspondiente, en tubos falcón de 50ml, a 28-30 °C (cámara primer piso IBMCP), en agitación

(220 rpm) durante 24 horas. A partir del pase t100 (aproximadamente 660 generaciones), se seleccionó una de las poblaciones evolucionadas en YPD (YPD#1_{t100}) y otra en 1/8 YPD (1/8YPD#5_{t100}). Se seleccionaron estas líneas ya que fueron las que mejor crecieron en los medios de estrés que se querían testar. En este TFM se prosiguió con los pases seriados, en este caso del 10% de la población a medio fresco (0.5 ml del cultivo a tubo nuevo con 4.5 ml de medio nuevo), generando tres réplicas biológicas de cada población en cada nuevo medio de cultivo. Para simplificar los códigos, la línea YPD#1_{t100}, se denominaron "a", numerando las réplicas biológicas de 1 a 3, y aplicando el código del medio de estrés (YPL, YPE, YPG o YPO₂D) o estándar (YPD) según correspondiera. Igualmente, la línea 1/8YPD#5_{t100} se denominaron "b", numerando las réplicas biológicas de 1 a 3 y aplicando el código del medio de estrés (YPL, YPE, YPG o YPO₂D) o estándar (YPD 1/8) según correspondiera. Estas nuevas líneas se sometieron a 100 nuevos pases seriados (aproximadamente 330 generaciones). (Figura 5).

Cada cinco pases, se realizó un glicerinado de las poblaciones (2 viales con la población y glicerol al 25%), creando el registro fósil de cada línea, que se mantiene a -80C.

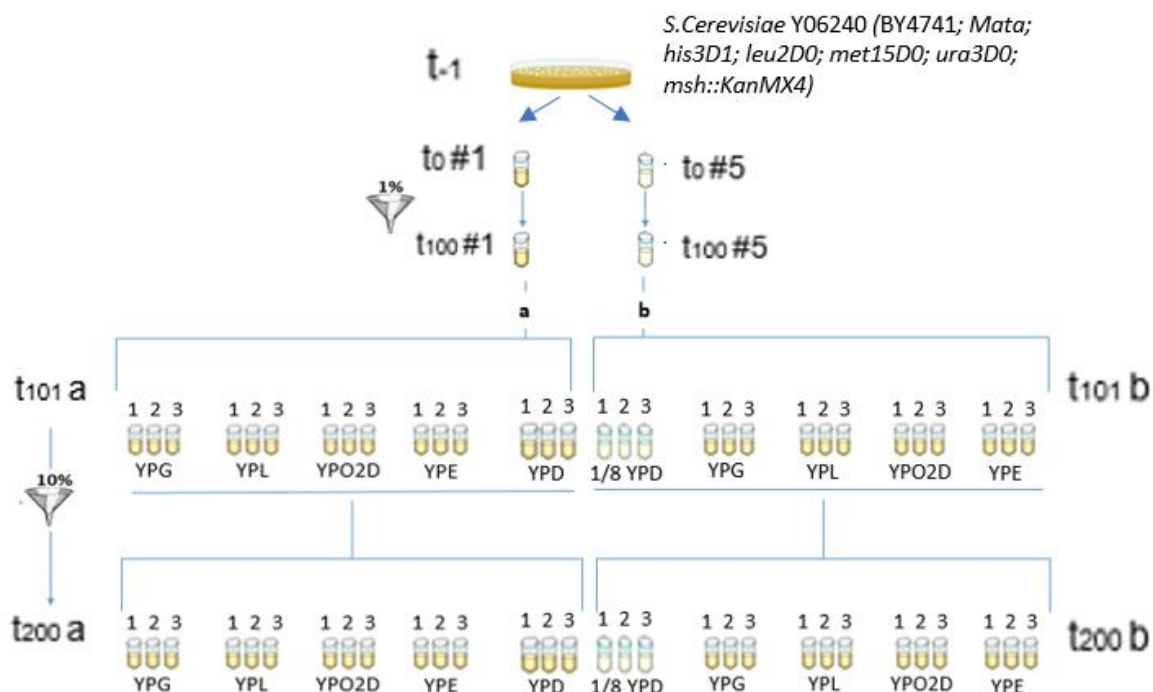


Figura 5. Evolución experimental adaptativa. A partir de una sola colonia de *S. cerevisiae* cepa Y06240, se obtuvo una población que se utilizó en el resto de los experimentos (población en t0). De la población en t0 evolucionamos durante 100 pases (aproximadamente 660 generaciones) 6 poblaciones en YPD y otras 6 poblaciones en YPD diluido 1/8 realizando una dilución al 1% cada 24 horas en 5mL de medio YPD fresco. Luego, para el presente TFM

evolucionamos dos de estas poblaciones t100 en los diferentes estreses (YPG, YPL, YPO2D, YPE) durante otros 100 pases (aproximadamente 330 generaciones) para generar un proceso adaptativo. Como control se hizo la misma evolución creciendo en YPD y en YPD diluido 1/8 sin estar sometidos a ningún estrés. Durante esta evolución, se realizó una dilución del 10% cada 24 horas en 4,5mL de medio fresco. La evolución se llevó a cabo con kanamicina 30mg/L para reducir la probabilidad de contaminación

3.2.3 Comprobación del estado de las líneas.

De forma regular, las líneas en adaptación se observaron bajo microscopio óptico y/o se genotiparon mediante PCR para comprobar el estado de las líneas.

3.2.3.1 Morfología celular.

La observación de la morfología celular se hizo a partir de un montaje temporal de la muestra in vivo y se comparó con la morfología celular de referencia de la cepa YO6240 (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html).

La técnica de preparación consistió en montar sobre un portaobjetos y bajo un cubreobjetos, una pequeña cantidad de la población (aproximadamente 10 μ L). La observación se realizó a 20x o 40x en un microscopio Leica 5000 con el propósito de descartar que hubiese contaminación por bacterias u otro tipo de levaduras, al comparar las poblaciones con la cepa original.

3.2.3.2 Genotipado por PCR.

A cada punto (o cada dos puntos) del registro fósil, se genotipó con dos reacciones de PCR que nos indicaron la presencia de levadura (gen *Asc1*) y la presencia de la cepa YO6240 (por medio de la presencia del 'cassette' de resistencia KMX4). Para ello primeramente, se realizó una extracción de DNA genómico según el protocolo SDS/LiAC (Looke, Kristjuhan et al. 2011), o conforme se indica en el Anexo 7.8.1.

- a. Marcador *Asc1*. El genotipado se realizó con los oligonucleótidos *Asc1_F-NSII* y *Asc1_R-NSII*. Estos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 2520pb del gen *Asc1*, específico de levadura.

La PCR se realizó en un volumen final de 20 μ l utilizando 2 μ l de Buffer con MgCl₂ [Biotools, 10X], 1 μ l de cada cebador [10 μ M], 0,3 μ l de mix de dNTP's [10mM], 0,2 μ l de ADN polimerasa Netzyme [Biotools, 5U/ μ L], 0,8 μ L de MgCl₂ y 14,7 μ l de H₂O. Las condiciones de amplificación fueron: un primer paso de desaturalización a 94°C y a continuación 35 ciclos con: un primer paso de desaturalización de 15 segundos a 94 °C, seguido de 57°C durante 30 segundos

para la unión de los cebadores, una extensión durante 1 min y 30 segundos a 72 °C; finalmente se hizo una extensión a 72 °C durante 10 min. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler Ep (Eppendorf).

- b. Detección del 'cassette' de resistencia KMX4. La cepa utilizada tiene reemplazado el gen *msh2* por el 'cassette' de resistencia a Kanamicina KMX4. Sobre este 'cassette' hay diseñados varios oligonucleótidos, de los que se han utilizado el KanC y KanB (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html), junto con dos oligonucleótidos flanqueantes al gen *msh2* (Msh2A, Msh2D) como se muestra en la figura 6. En ausencia del 'cassette', y utilizando los oligonucleótidos A y D, la PCR daría un fragmento de 3500 pb aproximadamente.

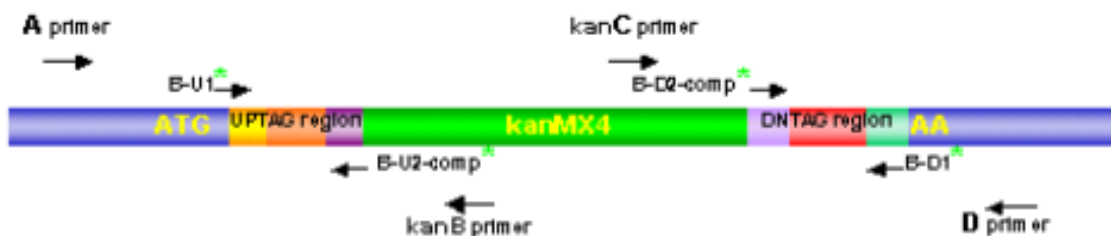


Figura 6. Región del módulo KanMX4 y localización de los oligonucleótidos para el genotipado por PCR. <http://www-sequence.stanford.edu>

La PCR se realizó en un volumen final de 20 μ l, con 1x Biotools Netzyme reaction buffer (Biotools, Madrid, España), 2mM MgCl₂, 10 pmol de los primers correspondientes (Msh2A y Msh2D, Msh2A y kanB, o kanC y Msh2D), 150nM dNTP's y 1 u. de polimerasa Netzyme (Biotools). Las condiciones de amplificación fueron: un primer ciclo de desnaturalización de 3 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 15s a 57°C y 60 s a 72 °C; y finalizando con una extensión a 72 °C durante 3 min. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler Ep (Eppendorf).

3.3 Caracterización fenotípica de las poblaciones adaptadas

Como medidas fenotípicas se ha seleccionado la tasa de crecimiento (μ max) y la morfología de colonia.

3.3.1 Curvas de crecimiento y tasa de crecimiento

Para la elaboración de las curvas de crecimiento se empleó el espectrofotómetro en continuo Bioscreen C (Bioscreen Analysis System, Oy Growth Curves Ab Ltd.,

Helsinki, Finlandi,)), que permite medir la densidad óptica (OD) de cultivos líquidos en continuo, aplicando agitación e incubación (a temperatura controlada), permitiendo analizar hasta 200 muestras a la vez.

A partir del registro fósil de cada línea, se realiza un precultivo de 24 horas en un tubo falcon de 50 ml con 100µl del glicerinado y 4,5 ml de medio fresco a 28 °C. De estos precultivos, se inocularon 40 µl en 760 µl del medio fresco correspondiente. De estos 800 µl de cultivo se realizaron 3 réplicas técnicas de 200µl de cada línea. Las muestras se repartieron en placas multipocillo 10x10 Honeycomb (Honeycomb 2 plate, ref. 9502550, Bioscreen, Finlandia) incluyendo en cada placa al menos 5 pocillos de control negativo para comprobar la esterilidad del medio y para corregir la OD. El Bioscreen se programó para captura de OD a 600nm en intervalos de 15 minutos durante un periodo de 72-96 horas, en agitación continua y a 28°C.

La tasa de crecimiento máximo (μ_{max}) se determinó a partir de la fase exponencial de cada curva de crecimiento (Figura 7), una vez corregidas las medidas de OD600 mediante la fórmula; $OD_{cor} = OD_{obs} + 0.449(OD_{obs})^2 + 0.191(OD_{obs})^3$ (Warringer y Blomberg, 2003).

Los datos se obtuvieron mediante utilización en Excel y/o con el programa GrowthRates {Hall, 2014, Growth rates made easy}.

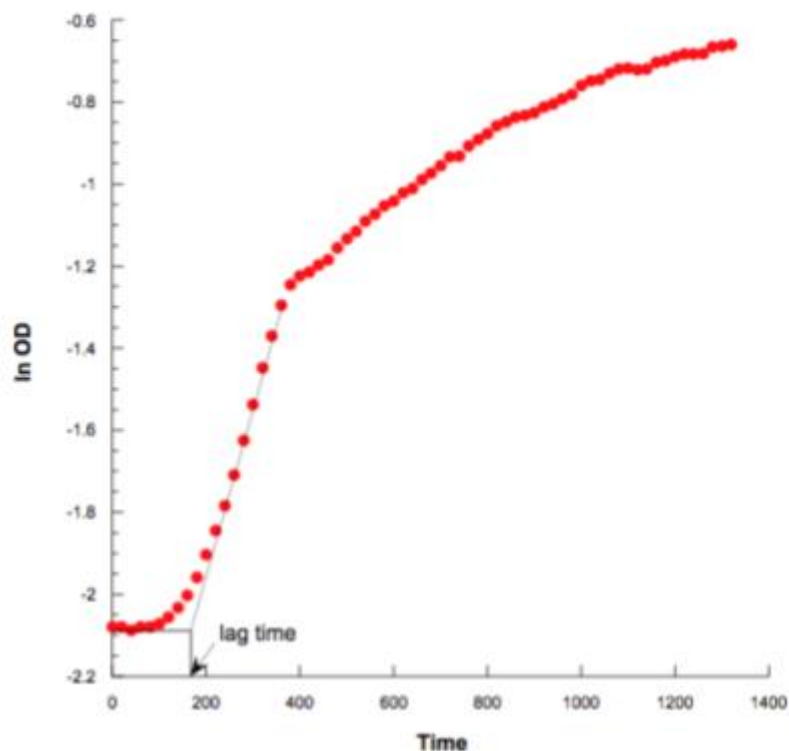


Figura 7. Representación gráfica de datos obtenidos después de su corrección. A partir del gráfico acotamos la fase lineal para obtener la μ_{max} .

3.3.2 Caracterización morfológica de las poblaciones evolucionadas.

Las características fenotípicas que queremos observar son: el tamaño de la colonia, el color, la forma y el tipo de crecimiento.

Las líneas YPD#1 y YPD#5 a t0, t100 y sus adaptadas a los distintos estreses (láctico, etanol, glicerol y oxidativo) desde t110 hasta t170, se recuperaron en el medio líquido correspondiente (en tubos de 50 ml con 5 ml de medio fresco), a partir de sus registros fósiles, durante 24h a 28°C, con agitación continua de 220-250 rpm.

Cada precultivo se sometió a diluciones seriadas hasta 10^{-4} y 10^{-5} , para que al sembrar en placa se obtuvieran 30-300 colonias. Cada línea se sembró en placas de medio normal (YPD) y en sus medios de evolución. Además, la línea control (evolucionada en YPD) se sembró también en medios de estrés. Por ejemplo, YPE t170 fue crecida tanto en YPD como en YPE, mientras que la línea YPD t170 (control), también fue crecida tanto en YPD como en YPE.

Las comprobaciones fenotípicas se realizaron comparando las líneas evolucionadas hasta t100 con las evolucionadas hasta t170, usando las líneas #1 y #5 de t100 como control para determinar el fenotipo inicial.

Los términos descriptivos para la morfología de las colonias (Figura 8) en la superficie del medio sólido, usamos las características: i) forma (puntiforme, circular, rizoide, irregular, filamentosa); ii) tamaño (grande, mediana, pequeña); iii) color; iv) borde (entero, ondulado, lobulado, filamentoso, ondeado); v) elevación (plano, elevado, convexo); vi) superficie (suave, brillante, rugosa, plegada, seca, polvorienta); y iv) luz reflejada (opaca, brillante).

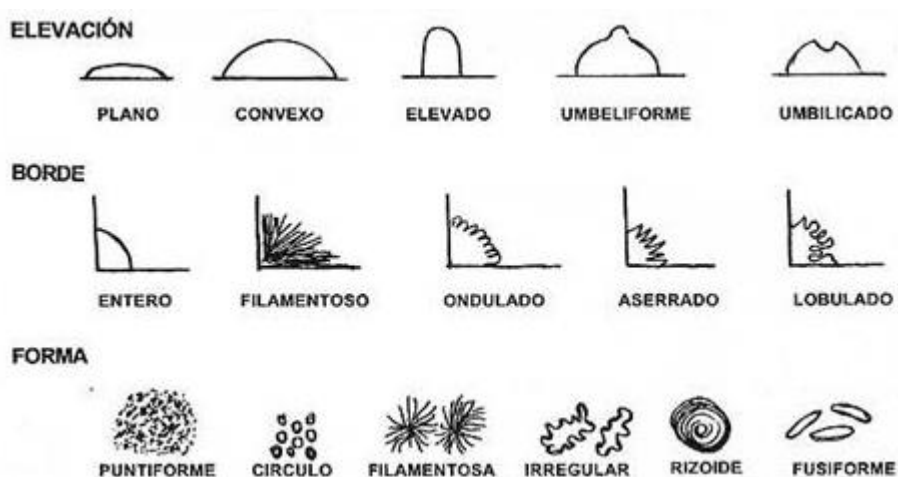


Figura 8. Descripción visual de las características morfológicas de las colonias.

3.4 Determinación de plasticidad transcripcional en poblaciones adaptadas.

El análisis transcripcional se realizó en los pases t0, t100 y t110 con tres replicas técnicas para las condiciones de estrés en YPG y en comparación con la condición de crecimiento normal de medio YPD. Las extracciones totales de RNA se realizaron con el kit RNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA Ribosomal fue eliminado mediante el uso del kit de eliminación de rRNA de levadura RiboZero Gold (Illumina). Las bibliotecas de RNA se construyeron utilizando TruSeq mRNA (Illumina) a partir de oligo-dT de muestras de mRNAs. Las bibliotecas se ejecutaban en NextSeq 500 (Illumina) a 75nt por cada lectura usando High Output 75 ciclos kit v2.0 (Illumina). Las bibliotecas de ARN se secuenciaron en el centro genómico del Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

Las lecturas crudas se analizaron usando software RobiNA v 1.2.4 (Lohse, Bolger et al. 2012), descartando las lecturas de baja calidad o cortas (Phred inferior a 20 y tamaño < 40 nt). Las lecturas se alinearon con Bowtie (hasta dos desajustes aceptados) al transcriptoma de referencia (PRJNA290217) de la cepa de referencia S288C. La evaluación estadística de la expresión génica diferencial entre estrés y

normal se realizó con edgeR {Robinson, 2013, Effects of exenatide and liraglutide on heart rate, blood pressure and body weight: systematic review and meta-analysis} y con DESeq (Anders and Huber 2010), implementado en RobiNA. Se identificaron cambios de expresión significativos usando una tasa de descubrimiento falso (FDR <0,05).

Los genes que se consideraron transcripcionalmente alterados en YPG tenían lecturas significativamente mayores por mil millones (RPKM) en YPG que YPD (con una tasa de falsos descubrimientos para el doble cambio de expresión FDR <0,05). Debido a que las moléculas de RNA pueden sufrir degradación antes de ser traducidas, se examinó la correlación entre los RPKMs de nuestros análisis transcriptómicos y los obtenidos por otros grupos utilizando el perfil ribosómico, una técnica que mide la ocupación de ribosomas y la traducción de todo el genoma {Albert, 2014, Genetic influences on translation in yeast}. A pesar del gran número de datos disponibles para ambos métodos (N=4682), encontramos una correlación muy fuerte y significativa entre los recuentos de ambos métodos (Coeficiente de correlación Spearman: $\rho=0.995$, $P < 2.2 \times 10^{-16}$). Por lo tanto, los genes altamente transcritos también están altamente traducidos y viceversa. Nuestros datos, por lo tanto, son indicativos de los niveles de expresión génica. La tecnología RNA-seq es sensible en a la detección de la expresión base, de tal manera que a menudo se hace difícil distinguir genes con muy baja expresión de ruido de fondo. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la métrica RPKM es robusta a las estrategias de filtrado de baja expresión {Lin, 2016, Comparison of normalization and differential expression analyses using RNA-Seq data from 726 individual *Drosophila melanogaster*}. De hecho, podríamos identificar genes expresados diferencialmente en lecturas por debajo de RPKM=0.001 (logRPKM= -2.8).

3.5 Duplicación génica mediante sistema CRISPR-Cas 9 en *S. cerevisiae* BY4741.

La técnica CRISPR-Cas9 permite la edición de genomas ({Marraffini, 2016, The CRISPR-Cas system of *Streptococcus pyogenes*: function and applications}). La función original del sistema CRISPR-Cas es la protección frente a la infección por otros organismos (virus y/o bacterias), pero ha sido rediseñado como herramienta biotecnológica, principalmente para la inactivación o delección de genes (Dounda, J. A. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9). En nuestro

caso, queremos utilizar esta tecnología para realizar una duplicación a pequeña escala simulando los eventos que acontecidos en el genoma de *S. cerevisiae* durante su historia evolutiva. De esta manera, nos permitirá dilucidar el destino y la función de los genes duplicados, en una escala evolutiva accesible.

Se ha escogido escogido la técnica CRISPR por su gran versatilidad, ya que permite de manera muy sencilla elegir en que punto del genoma se quiere insertar el gen duplicado, y aunque esto también se podría hacer por recombinación homóloga clásica, la técnica CRISPR/Cas9 permite hacer una edición genómica sin dejar cicatrices.

En este TFM se pretendió duplicar el gen *hst2* (Figura 9) codificante para la histona deacetilasa HST2 implicada en eventos de silenciamiento nuclear. Activa el silenciamiento subtelo mérico y aumenta la represión en el silenciamiento nucleolar. Su función es regulada negativamente por la exportación nuclear activa (Perrod, 2001, A cytosolic NAD-dependent deacetylase`, Hst2p`, can modulate nucleolar and telomeric silencing in yeast)(Landry, 2000, The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases)(Tanner, 2000, Silent information regulator 2 family of NAD- dependent histone/protein deacetylases generates a unique product`, 1-O-acetyl-ADP-ribose).

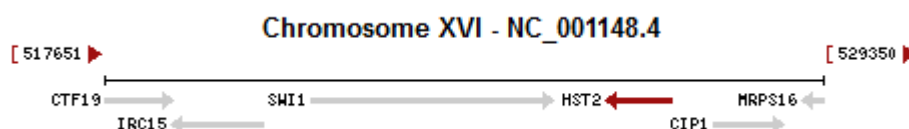


Figura 9. Región del cromosoma 8 de *S. Cerevisiae* donde se localiza el gen *hst2*.

Para ello se diseñó el siguiente proceso en dos pasos (Figura 10). Primero se inserta en el genoma de la célula mediante recombinación homóloga, sobre el punto de corte de Cas9, un fragmento de ADN que contiene la región codificante para la proteína AmCyan, que confiere fluorescencia a las células portadoras cuando se excita a longitud de onda de 485nm. Además, se inserta un segundo fragmento que insensibiliza la región cromosómica a la digestión con Cas9, puesto que se ha generado una mutación sinónima sobre la secuencia PAM, imprescindible para la edición por CRISPR/Cas9. A este fragmento lo llamaremos HR 1+2. El segundo paso es insertar el gen *hst2* en el sitio de AmCyan. En este caso se diseñó un gRNA que reconoce una secuencia concreta de AmCyan, las Cas9 corta y el *msh2* se inserta por recombinación homóloga.

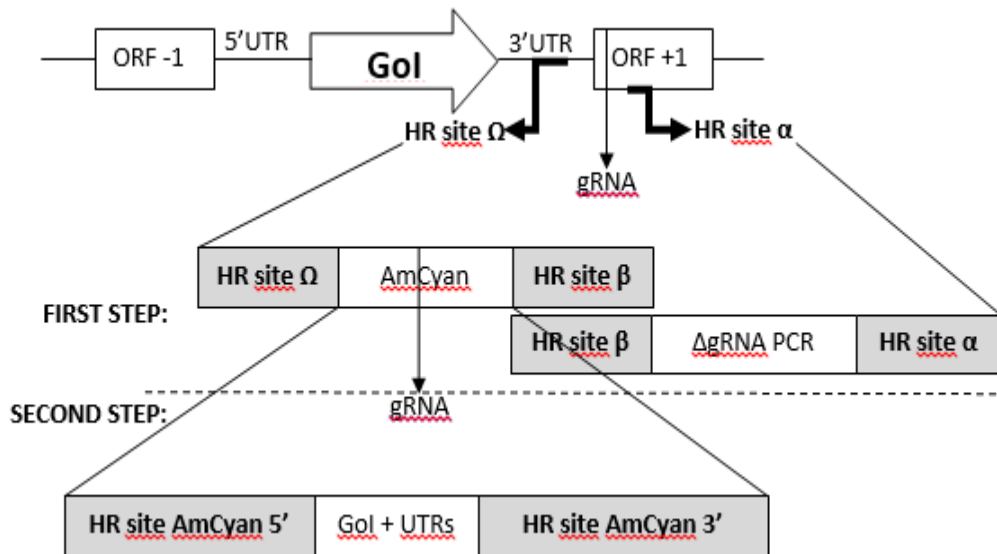


Figura10. Transformación en dos pasos mediante CRISPR Cas9. El primero paso es insertar el fragmento (HR1 + HR2) en el genoma de la. El segundo paso es insertar el gen que queremos duplicar en el sitio de AmCyan.

4 RESULTADOS Y DISCUSSION

4.1 Evolución adaptativa de *S. cerevisiae* Y06240.

La evolución adaptativa, es una continuación de una evolución experimental realizada en nuestro laboratorio. Los detalles se han detallado en el apartado de materiales y métodos. En la imagen 11, se representa esquemáticamente los puntos más importantes, tanto la fase experimental como la fase de adaptación.

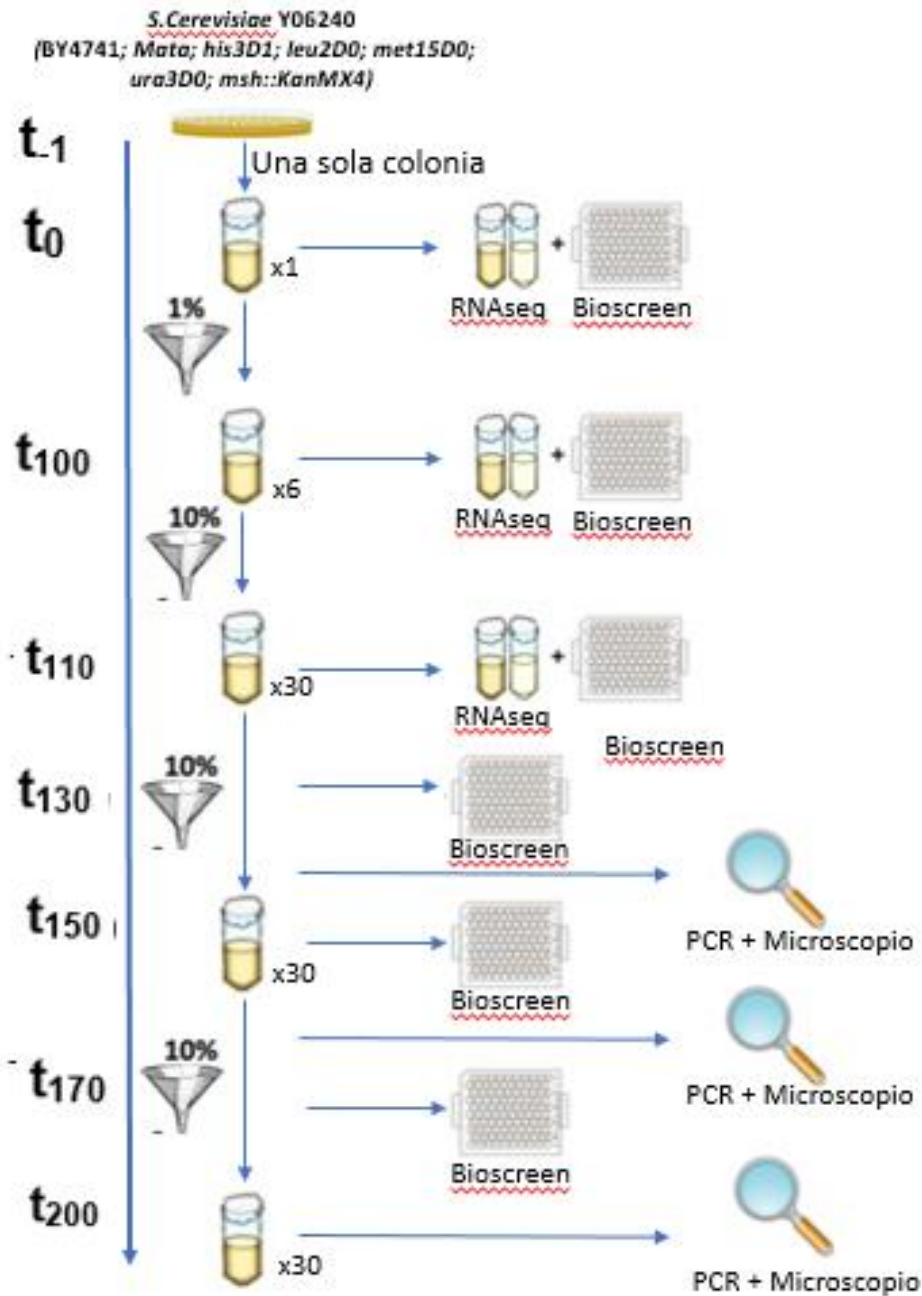


Figura 11. Representación esquematizada de los diferentes puntos donde se realizaron los bioscreens, el RNAseq y las respectivas comprobaciones. Los RNAseq se realizaron en dos puntos de la evolución experimental y uno en la adaptación del estrés por Glicerol. Los Bioscreen se realizaron a t_0 , t_{100} , t_{110} , t_{130} , t_{150} , t_{170} . Las comprobaciones se realizaron en puntos aleatorios de la evolución adaptativa.

4.1.1 Comprobación del estado de las líneas.

4.1.1.1 Morfología celular.

En algunos casos se detectaron contaminaciones con forma de coco, conforme se puede ver la figura 12, marcadas con flecha blanca, junto con células de levadura.

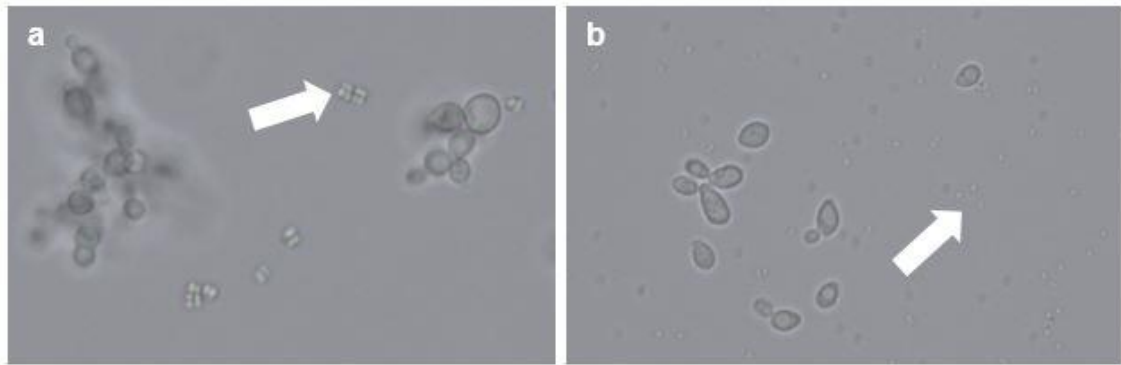


Figura 12. En las dos imágenes, señalado con una fletxa blanca, se observan dos morfologías de cocos. **a.** cocos formando tétadras **b.** Cocos aislados.

4.1.1.2 Comprobación genotípica

Como se puede observar en la figura 13, mediante el genotipado con el marcador Asc1, solo se produjo la amplificación en el ADN genómico de la levadura control BY4741 (muestra 3), indicando que las muestras 4 a 8, correspondientes a varios puntos del registro fósil de la línea adaptada en YPL, no contienen DNA de levadura. El problema de esta comprobación, es que no podemos asegurar que sea la cepa Y06240.

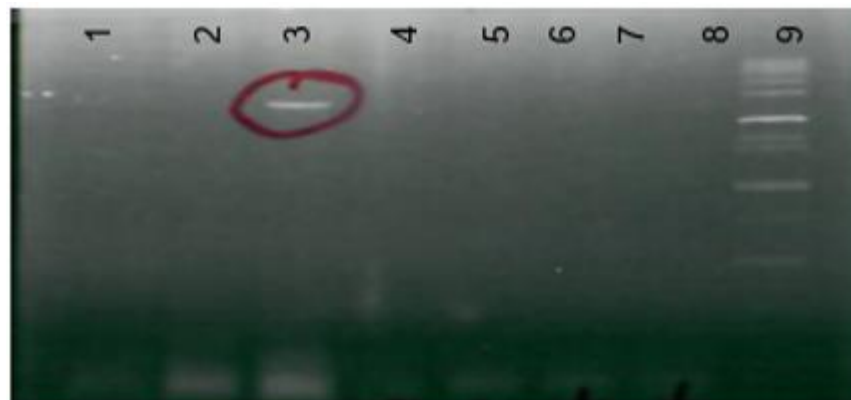


Figura 13. Genotipado utilizando los oligonucleótidos Asc1_F-NSII y Asc1_R-NSII. El orden de las muestras; **1.** gDNA *Arabidopsis thaliana* **2.** gDNA *E. Coli* **3.** gDNA BY4741 **4.** YPL a1 t₁₄₉ **5.** YPL a2 t₁₄₀ **6.** YPL a3 t₁₄₀ **7.** YPL d1 t₁₄₀ **8.** CN **9.** Marcador Gen Ruler 1 Kb plus.

En la figura 14, se muestra el genotipado KMX4 utilizando los oligonucleótidos MshD y KanC. En la que se puede ver, que las muestras 2 a 4 y 8 a 15 dan un fragmento de aproximadamente 1500 pb similar a la muestra original (16; cepa Y0624) indicando que todas las muestras corresponden a la levadura YO6240. Este resultado también se confirmó con los oligonucleótidos Msh2A y Msh2D (Figura 15). Esta PCR, dio un patrón de bandas diferencial, donde las levaduras WT (BY4741) muestran una banda de mayor tamaño que la cepa Y06240 a causa del inserto KanMX4

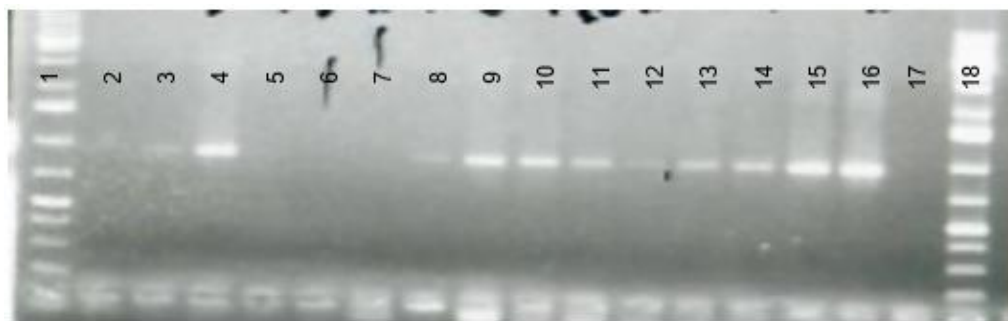


Figura 14. genotipado utilizando los oligonucleótidos MshD y KanC. **1.** Marcador Gen Ruler 1Kb plus. **2.** YPL d₁ t₁₈₄ **3.** 1/8 YPD d₁ t₁₉₄ **4.** YPL d₁ t₁₇₄ **5.** YPL d₁ t₁₈₃ **6.** YPL d₂ t₁₈₃ **7.** YPL d₃ t₁₈₃ **8.** 1/8 YPD d₂ t₁₉₄ **9.** 1/8 YPD d₃ t₁₉₄ **10.** YPL a₁ t₁₉₄ **11.** YPL a₂ t₁₉₄ **12.** 1/8 YPD d₁ t₁₉₄ **13.** C+ Y06240 **14.** #1 t₀ **15.** YPL d₁ 174 (sin diluir) **16.** C+ Y02640 **17.** C- Marcador Gen Ruler 1 Kb plus

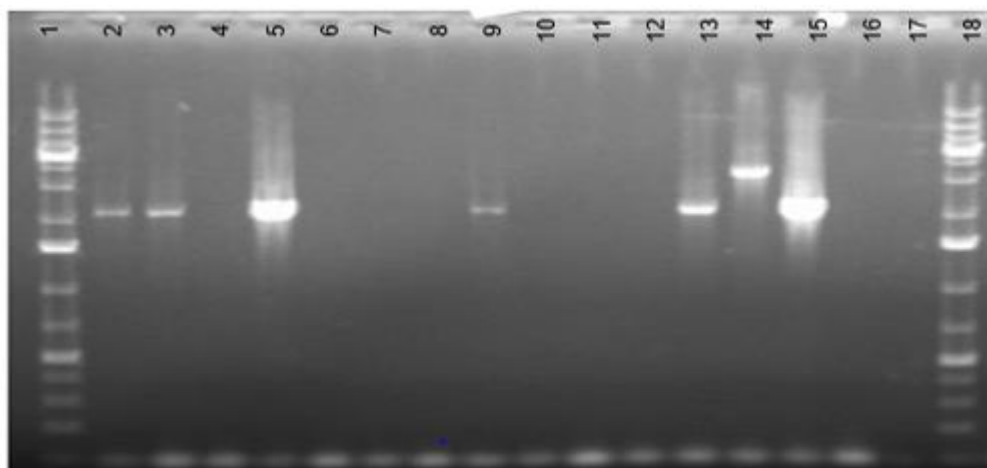


Figura 15. Genotipado utilizando los oligonucleótidos MshD y KanC. Las muestras están numeradas: **1.** Marcador Gen Ruler 1 Kb plus **2.** YPL d₁ t₁₈₄ **3.** 1/8 YPD d₁ t₁₉₄ **4.** YPL d₃ t₁₆₀ **5.** YPL d₁ t₁₇₄ **6.** YPG d₃ t₁₉₄ **7.** YPL d₃ t₁₈₃ **8.** YPL d₃ t₁₉₄ **9.** 1/8 YPD d₃ t₁₉₄ **10.** YPL d₁ t₁₈₃ **11.** YPL d₂ t₁₉₄ **12.** 1/8 YPD d₂ t₁₉₄ **13.** C+ Y06240 **14.** C+ BY4741 **15.** YPL d₁ t₁₇₄ **16.** #1 t₀ **17.** C- **18.** Marcador Gen Ruler 1Kb plus.

Estos resultados muestran que ha habido algunas contaminaciones, quizás debido a mala esterilización del medio (fallo de la autoclave) o a contaminaciones accidentales (los tubos de evolución se tapan con bolas de algodón para permitir intercambio de gases, y en algunos casos detectamos que los tapones se habían caído).

Dado que se detectaron estos puntos, se revisó todo el registro fósil, descartando los puntos contaminados y re-iniciando las evoluciones en las líneas que así lo requirieron, hasta completar los 100 pases en adaptación a medios de estrés, con líneas formadas solo por levaduras Y06240.

4.2 Caracterización fenotípica de las poblaciones adaptadas.

4.2.1 Tamaño de las colonias.

En la figura 16, podremos ver algunas de las imágenes obtenidas para caracterizar los tamaños poblacionales.

Si tomamos el tamaño de las colonias de la figura 16a como referencia y las comparamos con las demás, se puede observar que las mismas células crecidas en YPG sólido, muestran un tamaño mucho menor, aunque el número de colonias crecidas fue muy parecido. También observamos que en la figura 16b, existe una heterogeneidad en el tamaño de las colonias, sin embargo, no existen evidencias de que estuviese relacionado con la heterogeneidad de los genotipos, puesto que partimos de una sola colonia y *a priori* de una población homogénea. Si observamos la figura 16c, podremos comprobar que se aprecia un tamaño de colonia sensiblemente mayor a las colonias de la imagen 16a. Esta característica puede ser atribuida al efecto de la evolución experimental fruto de cierta adaptación y optimización de los recursos. Si nos fijamos detalladamente en la figura 16d, podemos observar cierta heterogeneidad en las colonias. Esto lo podemos relacionar a que, durante la evolución experimental, se ha generado una acumulación de mutaciones que achacan al fenotipo y a la adaptación de esta línea al medio donde ha crecido, ya que el medio sólido donde ha crecido, no corresponde al que ha sido adaptada. Hay que tener en cuenta que la adaptación ha sido en YPG líquido, por lo que la selección natural actuara sobre las levaduras que muestren mejor adaptación a este medio. Este hecho se observa en la figura 16e, donde existen colonias pequeñas, debido al fuerte estrés que genera el glicerol a la célula, pero homogéneas y de mayor tamaño que la t_0 crecida en YPG sólido a causa de su reprogramación y adaptación a este medio.

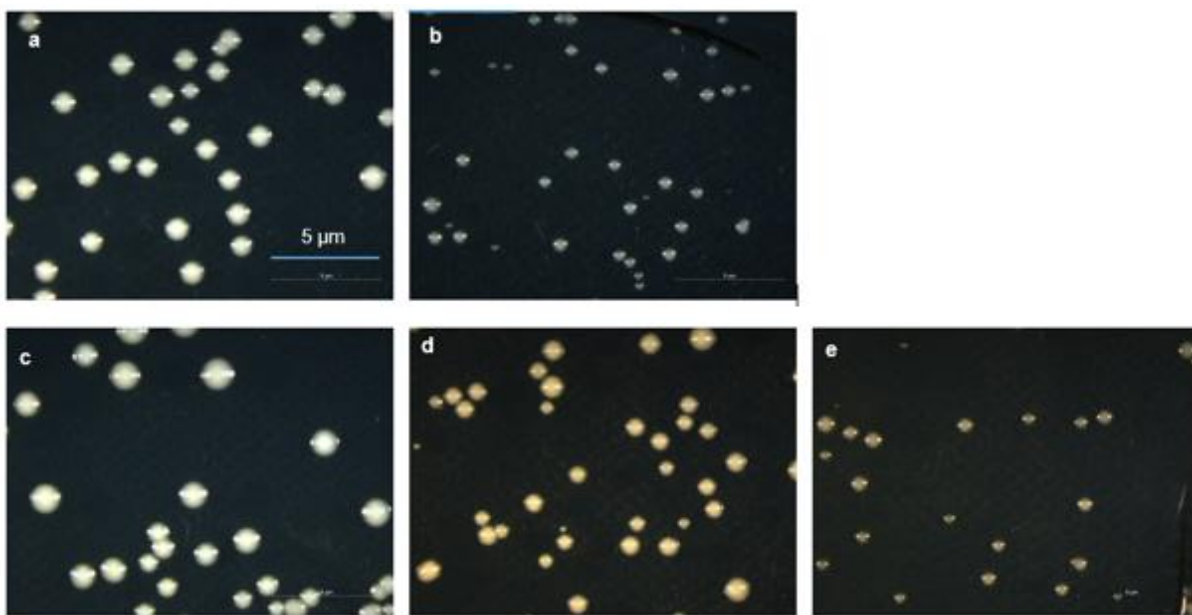


Figura 16. Caracterización fenotípica de las poblaciones adaptadas a medios con y sin estrés. **a.** Línea t_0 #1 crecida en YPD sólido [10^{-4}] **b.** Línea t_0 #1 crecida en YPG sólido [10^{-4}] **c.** Línea t_{100} #1 crecida en YPD sólido [10^{-4}] **d.** Línea evolucionada en YPD hasta t_{100} , adaptada en YPG a₁ hasta t_{170} y crecida en YPD sólido t_{171} [10^{-4}] **e.** Línea evolucionada en YPD hasta t_{100} , adaptada en YPG a₁ hasta t_{170} y crecida en YPG sólido t_{171} [10^{-4}].

4.2.2 Fenotipos anormales en la morfología de las colonias

En la figura 17, se observan en detalle algunos de los fenotipos anormales que aparecen en ciertas colonias.

Como se puede ver en la figura 17a, la t_0 , presenta colonias con forma punti-forme, con una elevación plana y bordes enteros. El color que observamos es de un blanco brillante. Morfológicamente, observamos una excepción, una colonia que muestra cierta ondulación en el borde. Esta característica, también se aprecia con más claridad cuando el crecimiento es en YPG, además en este medio las células presentan un color blanco apagado y translúcido. Después de la evolución experimental hasta t_{100} , observamos que la morfología celular cambia sensiblemente, las colonias adquieren mayor tamaño, tienen una elevación convexa y hay más colonias con bordes rugosos. Estos caracteres pueden ir asociados a una mejor adaptación permitiendo que un mayor número de células que conforma la colonia accedan a sustrato y de esta manera poder adquirir un mayor tamaño de la colonia. Esto se justifica por el hecho de que las colonias pequeñas no presentan tantas formas irregulares en los bordes, tal y como se observa en la figura 17d. Hay que tener en cuenta que las colonias que crecen en la figura 17d, lo hacen en YPG sólido y han sido adaptadas en este medio. Por lo que este medio puede influenciar en que las colonias no muestren

este fenotipo por motivos metabólicos. En cambio, como se observa en la figura 17e, este fenotipo es común en colonias crecidas en YPD.

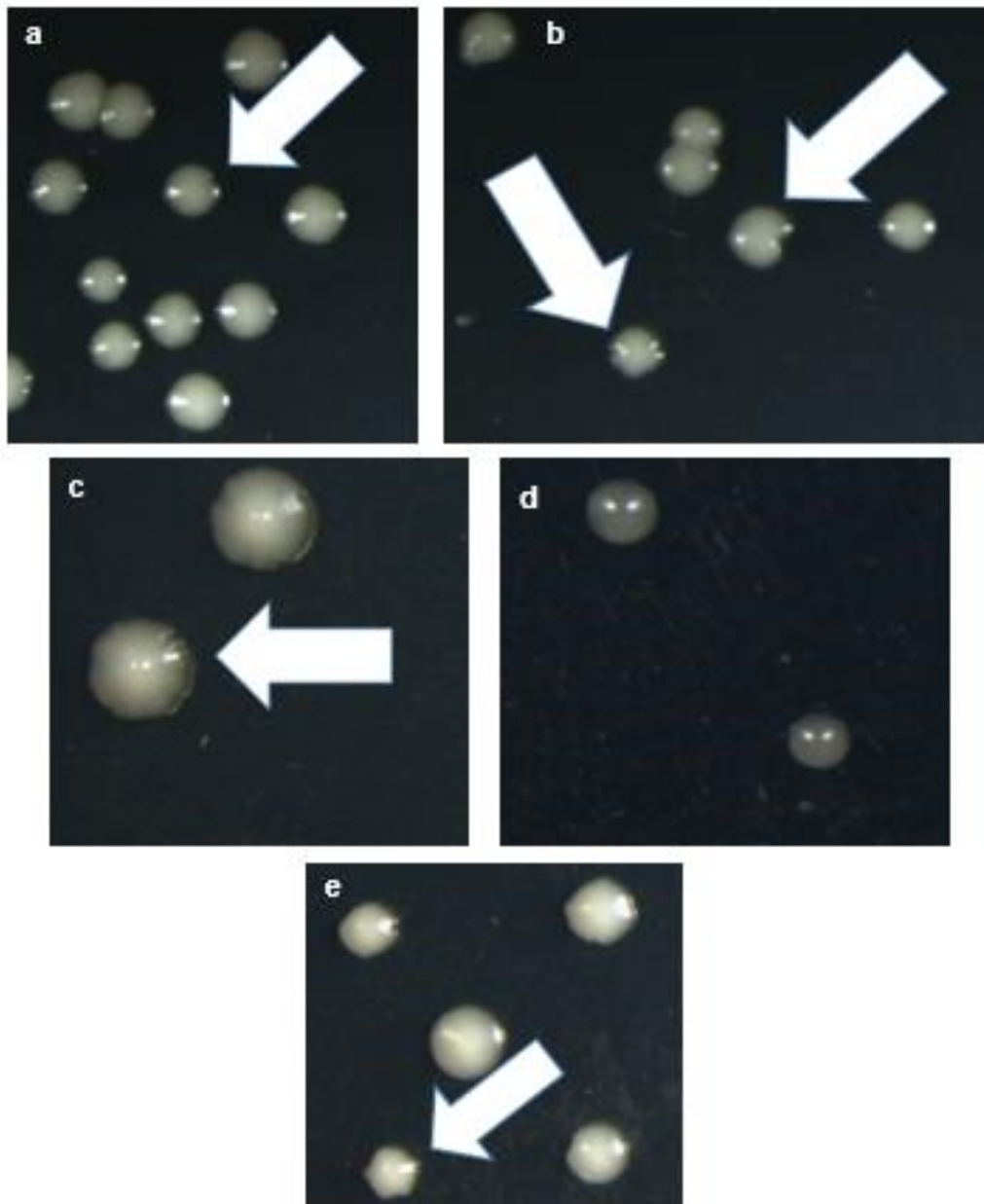


Figura 17. Fenotipo que muestran las colonias crecidas en diferentes medios y a diferentes tiempos de evolución. **a.** Línea t_0 #1 crecida en YPD sólido 10^{-4} **b.** Línea t_0 #1 crecida en YPG sólido 10^{-4} **c.** Línea evolucionada en YPD hasta t_{100} , crecida en medio YPD sólido **d.** Línea evolucionada en YPD hasta t_{100} adaptada en YPG hasta t_{170} y crecida en YPG sólido t_{171} **e.** Línea evolucionada en YPD hasta t_{100} , adaptada en YPG hasta t_{170} y crecida en YPD sólido t_{171} .

4.2.3 Curvas de crecimiento.

Como se ha indicado en el apartado de M&M, se ha determinado el parámetro μ_{max} de las poblaciones evolucionadas en condiciones de estrés y se ha comparado con la respuesta de la población ancestral (Figura 18), utilizando este parámetro como

medida de la plasticidad fenotípica de la levadura. [(Pigliucci, 2006, Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation)(Warringer, 2003, Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*;Pigliucci, 2005, Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?;Mattenberger, 2016, The Phenotypic Plasticity of Duplicated Genes in *Saccharomyces cerevisiae* and the Origin of Adaptations;Keane, 2014, Preservation of genetic and regulatory robustness in ancient gene duplicates of *Saccharomyces cerevisiae*)]

Tras analizar las curvas de crecimiento y obtener las tasas de crecimiento a través de la μ_{max} , analizamos como ha variado a lo largo de la evolución ya que este parámetro se puede relacionar con procesos de adaptación y/o especialización.

Observando las figuras 18a y 18b, podemos ver que existen tres medios altamente estresantes para la célula ya que su tasa de crecimiento es menor. Estos medios corresponden al YPE, YPG y YPL. En cambio, el medio YPO2D, observamos que solo produce un sensible estrés. Esto se debe a que los medios YPD y YPO2D, contienen glucosa que es la principal fuente de carbono para la levadura. Es más, en la figura 18b, se observa que las crecidas en YPO2D, presentan una μ_{max} ligeramente mayor que las adaptadas y crecidas en YPD. Para explicar este hecho, hay que tener en cuenta que la población evolucionada en YPD 1/8, la evolucionamos en un medio pobre en nutrientes, por lo que esperamos que se fijen mutaciones durante la fase experimental que le permitirán a la célula optimizar las rutas metabólicas para la obtención de energía. De este modo, al llegar a la evolución adaptativa, el hecho de abrir el cuello de botella del 1% al 10% permitirá a las células que optimicen mejor los recursos, una mayor supervivencia. Como era de esperar, estas líneas, adaptadas en YPD y crecidas en cada uno de los medios de estrés, presentan cierta homogeneidad en las tasas de crecimiento. Si miramos en detalle, observamos que esa homogeneidad se mantiene, sobretodo, entre la t_0 i la t_{100} debido a la acumulación de mutaciones neutras. De t_{100} a t_{170} adaptadas en YPD, observamos que hay un descenso muy ligero de la tasa de crecimiento cuando se crecen en medio de estrés debido a que las células se adaptan y especializan a sobrevivir en medio YPD. La excepción la encontramos en YPO2D por los motivos explicados anteriormente.

Si observamos que sucede con las líneas adaptadas a YPO2D, tanto la línea a como la línea d, vemos que se produce una adaptación al medio YPO2D de las líneas

adaptadas a YPO2D, ya que podemos hacer la relación de una mayor tasa de crecimiento es sinónimo de una mayor adaptación y por lo tanto una mayor especialización. Por lo contrario, cuando crecemos las líneas adaptadas a YPO2D en YPD, observamos que la tasa de crecimiento va descendiendo ligeramente a medida que avanzamos en la adaptación causada por esa especialización. Lo mismo sucede con las líneas adaptadas en YPL (Figura 18 f y g) a excepción de cuando crecemos la líneas adaptadas a YPL d, ya que cuando la crecemos en YPD, muestra un ligerísimo aumento de la μ_{max} . Este ligero aumento, podría no ser significativo por lo que debería ser evaluado estadísticamente.

Si observamos las líneas adaptadas en YPG (Figura 18 g y h), observamos que no hay una variación de la tasa de crecimiento apreciable en las líneas crecidas en YPD. Esa variación, la podemos observar cuando son crecidas en el mismo medio a las que están adaptadas. En este caso podemos observar una diferencia notable en la tasa de crecimiento en t_{100} cuando las crecemos en YPG tras la evolución experimental en YPD ($\mu_{max} = 0,124$) y la evolución experimental en YPD 1/8 ($\mu_{max} = 0,176$) atribuible a un mayor aprovechamiento de los recursos de las poblaciones evolucionadas en YPD 1/8 ya que tras la evolución adaptativa los valores de la tasa de crecimiento mantienen una tendencia positiva. En este caso, la adaptación y especialización al medio, no repercute negativamente cuando las crecemos en YPD

Un caso especial es el que sucede con las líneas adaptadas en YPE, ya que tanto cuando las crecemos en YPD como en YPE, muestran una tendencia positiva de la tasa de crecimiento a lo largo de la evolución. Es importante observar en detalle que los puntos (μ_{max}) de las líneas adaptadas en YPE y crecidas en YPD, muestran una distribución un tanto aleatoria. Por lo que, aun cuando se observa una cierta tendencia positiva, hay que tener en cuenta que esos datos no tienen un ajuste preciso. En cambio, si se mantiene una correlación en las líneas adaptadas y crecidas en YPE, por lo que la especialización es más que evidente

En general, podemos observar un patrón que se da durante la evolución experimental (de t_0 a t_{100}), y es que no se observan grandes cambios en las μ_{max} . La base genética de este patrón es que durante la evolución experimental estamos generando poblaciones con una alta heterogenicidad debido a la acumulación de mutaciones neutras. En cambio, si que son más apreciables los cambios que se producen en la tasa de crecimiento durante la evolución experimental (de t_{100} a t_{170}). Esos cambios,

los podemos asociar a una mayor adaptación cuando la tasa de crecimiento muestra una tendencia positiva.

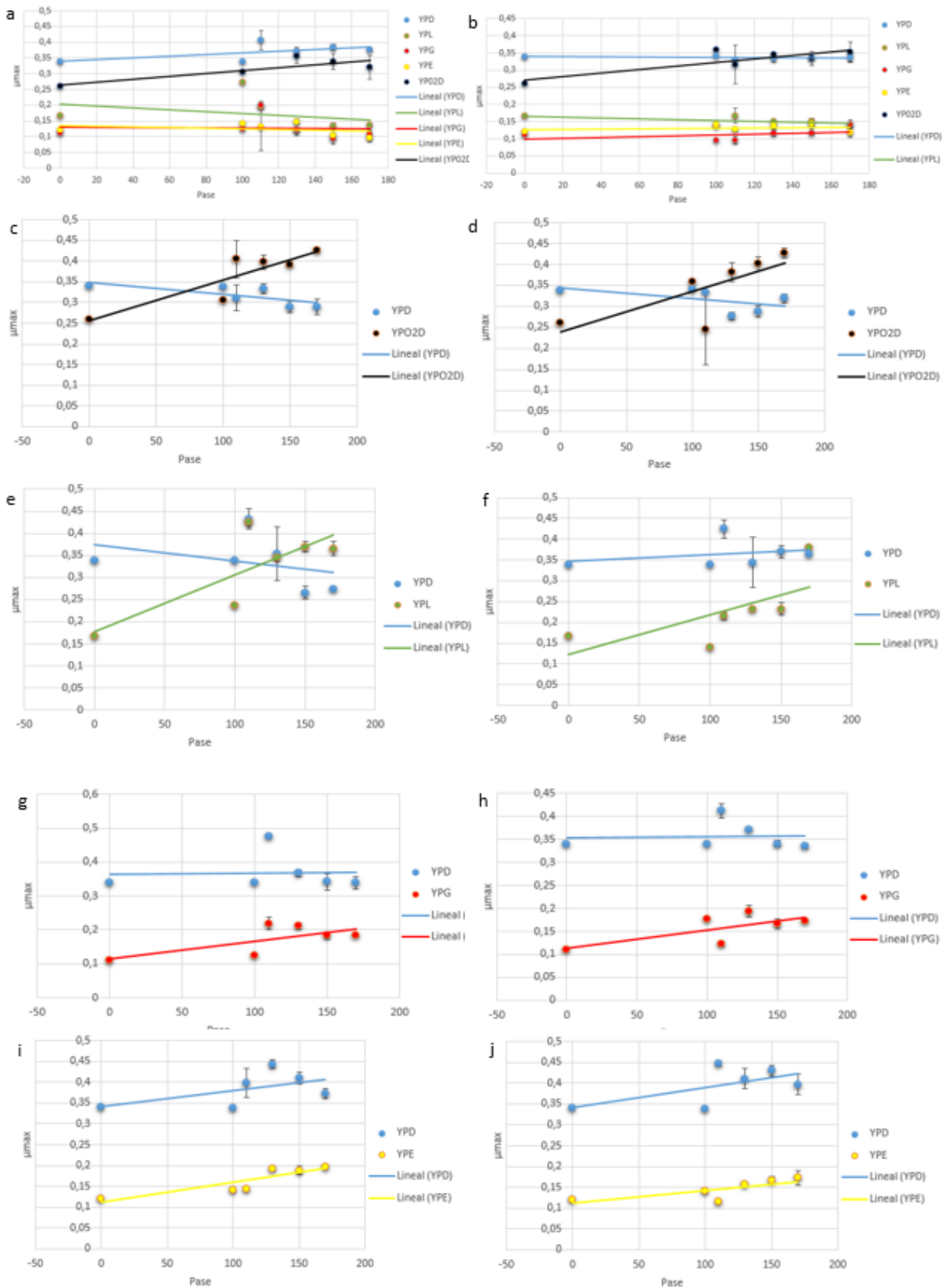


Figura 18. Representación de las curvas de crecimiento en forma de gráficas de tendencia. De esta manera podemos determinar como afecta la evolución experimental, seguido de la

evolución adaptativa a la tasa de crecimiento celular. Los gráficos de la izquierda se representan las muestras que fueron evolucionados en YPD (a) y los de la derecha, las que fueron evolucionadas en YPD 1/8 (d). En color azul se representan las líneas adaptadas en YPD, en negro las adaptadas en YPO2D, en verde las adaptadas en YPL, en amarillo, las adaptadas en YPE. a) Líneas adaptadas en YPD y crecidas en cada uno de los medios de estrés. d) Líneas adaptadas en YPD 1/8 y crecidas en cada uno de los medios de estrés. c) Línea adaptada en YPO2D a y crecida en YPO2D y YPD. d) Línea adaptada en YPO2D d y crecida en YPO2D y YPD. e) Línea adaptada en YPL a y crecida en YPL y YPD. f) Línea adaptada en YPL d y crecida en YPL y YPD. g) Línea adaptada en YPG a y crecida en YPG y YPD h) Línea adaptada en YPG d y crecida en YPG y YPD i) Línea adaptada en YPE a y crecida en YPE y YPD j) Línea adaptada en YPE d y crecida en YPE y YPD

4.3 Determinación de plasticidad transcripcional en poblaciones adaptadas.

La duplicación génica está muy ligada a como las poblaciones se pueden adaptar a condiciones cambiantes. Estos cambios rápidos se dan a consecuencia de que los organismos tienen cierta plasticidad transcripcional. En nuestro caso, investigamos si los genes duplicados de *S. cerevisiae* (1120 pares, aproximadamente el 32,8% del genoma) tienen una respuesta transcripcional en situaciones de estrés inducidas por glicerol.

En la t_0 se observó que, del total de los genes alterados, un 40,5 % correspondían a genes duplicados. Una cifra significativamente más alta de lo esperado (test binomial: $P < 2.2 \times 10^{-16}$). Complementariamente, el 59,5 % de 1634 genes transcripcionalmente alterados, eran onólogos. Lo que indica que los genes duplicados tienen un gran impacto en la respuesta a glicerol en la población t_0 .

Dado que el mecanismo de duplicación (Carretero-Paulet and Fares, 2012; Fares et al., 2013; Keane et al., 2014) es sumamente importante para entender el destino de los genes duplicados, investigamos que diferencias existían en el análisis transcritoómico en presencia de los WGD y los SSD. En la población t_0 que crecimos en YPG, encontramos que los WGD eran transcripcionalmente más representados de lo esperado (test binomial: $P = 4 \times 10^{-4}$), mientras que, en los SSD no se encontró esa representabilidad. En las poblaciones t_{100} and t_{110} no mostraban diferencias WGDs y SSDs.

Curiosamente, se identificó un grupo de genes que se alteraba en las tres poblaciones (T_0 , t_{100} i t_{110}) ($N=369$, figura 19 a). Como es de esperar, la proporción de este grupo de genes duplicados ($369/1079=34,2\%$), que mostraban alteración, era significativamente mayor que el grupo de genes alterados onólogos ($533/18215=29.3\%$) (Fisher's exact test: odds ratio $F=1,26$, $P=6,2 \times 10^{-3}$). Se encontró

un patrón diferencial entre la respuesta transcripcional de onólogos y duplicados: mientras que la mayoría de los duplicados bajaron su expresión en las tres poblaciones crecidas en YPG, se observó que sucedía el contrario para los onólogos (Figura 19 b). De hecho, el número de duplicados sobreexpresados en las poblaciones crecidas en YPG fue menor de lo esperado en t0, t100 y t110 (Figura 19 b).

Cuando se examinaron como los procesos celulares se veían afectados por los genes duplicados, se observaron diferencias entre las poblaciones adaptadas en YPD y las adaptadas en YPG. El grupo de genes duplicados alterados que respondían transcripcionalmente al glicerol en las tres poblaciones, se distribuyó entre los procesos celulares relacionados con el transporte de carbohidratos y sustratos orgánicos y la respiración, incluyendo la oxidación-reducción, la derivación energética por oxidación de compuestos orgánicos (Figura 19 c). En la población t0 crecida en glicerol, los genes duplicados que se alteraron transcripcionalmente se referían a procesos de traducción y biosíntesis (Figura 19 d). En la población t100 no se observaron genes duplicados alterados específicamente. Por último, la población t110 adaptada a YPG exhibió alteraciones transcripcionales en una serie de duplicados principalmente involucrados en la respuesta al estrés y estímulos, así como en la regulación de los procesos biológicos (Figura 19 e). Vale la pena notar que los análisis de duplicados regulados en las tres poblaciones también produjeron resultados muy diferentes para las poblaciones cultivadas en YPD (poblaciones t0 y t100) en comparación con la población cultivada en YPG: Los duplicados sobreexpresados en las poblaciones t0 y t100 estaban relacionados con procesos celulares de reproducción sexual, esporulación, transporte, procesos oxidativo-reductivos y biogénesis de pared de ascosporas, entre otros. En contraste, en la población t110 muchos procesos catabólicos, incluyendo la derivación de energía por oxidación, TCA, y los procesos catabólicos de lípidos fueron sobreexpresados por genes duplicados en células cultivadas en YPG.

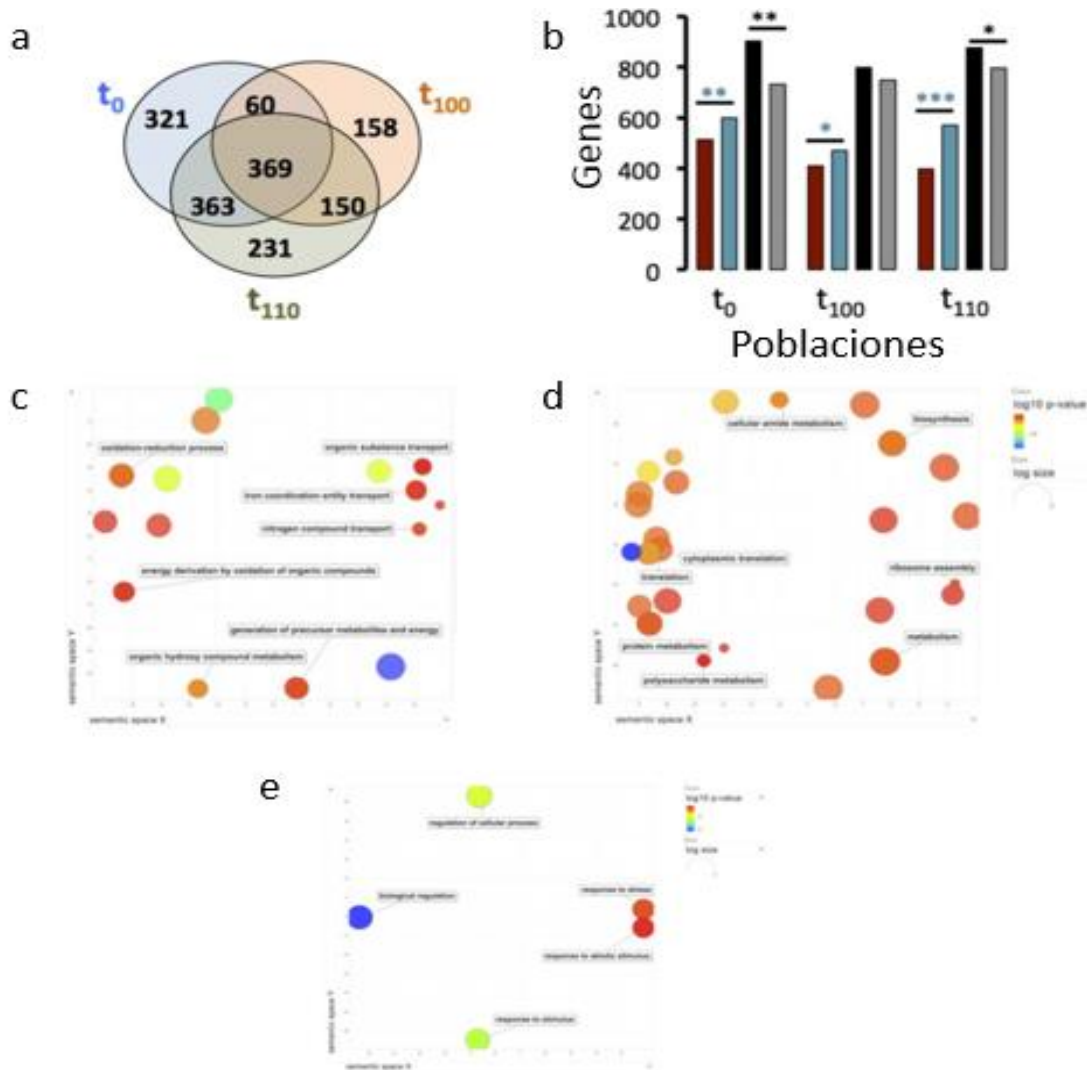


Figura 19. Los genes duplicados son más enriquecidos que los onólogos para los genes transcripcionalmente alterados y muestran diferentes patrones de respuesta a los onólogos en condiciones de crecimiento YPG. **a.** El diagrama de Venn, identifica la respuesta de los duplicados más comunes en las tres poblaciones (t_0 , t_{100} y t_{110}) y los duplicados que responden únicamente al glicerol en cada una de las poblaciones. **b.** Los duplicados muestran más regulación negativa que una regulación positiva, mientras que los onólogos muestran más regulación positiva que regulación negativa (*, **, *** se refieren a $P < 0,05$, $P < 0,01$, $P < 0,001$ bajo un ensayo binomial y los colores identifica el patrón más abundante en la comparación entre arriba y abajo de los genes regulados). **c.** Agrupamiento semántico de procesos celulares enriquecidos por genes duplicados que se alteraron transcripcionalmente en las tres poblaciones. El color de las burbujas representa la proporción de genes en un proceso celular particular que se encuentra transcripcionalmente alterado (valor log P), mientras que el tamaño indica la frecuencia del término GO en el organismo. **d.** Agrupamiento semántico de procesos celulares enriquecidos por genes duplicados que se alteraron transcripcionalmente en la población en t_0 . **e.** Agrupamiento semántico de procesos celulares enriquecidos para genes duplicados que se alteraron transcripcionalmente en la población en t_{110} .

4.4 Puesta a punto de un sistema basado en CRISPR-Cas9 para duplicación génica en *S. cerevisiae* Y06240.

En la literatura reciente se han descrito distintos métodos de edición del genoma para *S. cerevisiae*, junto con la creación de diversos plásmidos de expresión del sistema CRISPR-Cas9 (Marraffini, 2016, The CRISPR-Cas system of *Streptococcus pyogenes*: function and applications; Horwitz, 2015, Efficient Multiplexed Integration of Synergistic Alleles and Metabolic Pathways in Yeasts via CRISPR-Cas; DiCarlo, 2013, Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems; Bao, 2015, Homology-Integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR System for One-Step Multigene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*)). Entre ellos, los pCRCT, pCR y pCT que empezamos a utilizar en este trabajo.

4.4.1 Obtención del fragmento HR1 (Δ gRNA) + HR2 (AmCyan)

La obtención del fragmento *in silico* del gRNA en el ORF aguas abajo del gen *hst2*, se hizo mediante el programa CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp>). *In vitro*, se obtuvo mediante la hibridación y la fosforilación de 4 fragmentos de sDNA de simple cadena. Se utilizó 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos FM001dir (100 μ M), FM001rev (100 μ M), FM002dir (100 μ M), FM002rev (100 μ M), en una reacción con 1x buffer T4 PNK y 5 unidades de T4 PNK en un volumen final de 10 μ l. La reacción de fosforilación se realizó a 37 °C durante 30 min, seguida de una desnaturalización de 5 minutos a 95 °C; Para permitir que los oligonucleótidos hibridasen con sus complementarios, generando así un fragmento de doble cadena (gRNA), se disminuyó la temperatura de reacción desde los 95 a 25 °C, con un gradiente de -5 °C/ minuto.

La obtención del fragmento de HR 2 (AmCyan) que servirá como marcador de selección, se obtuvo a partir del plásmido AmCyan de Clontech. En este caso se diseñó el cebador para la región 3' del gen. Esta región homóloga será la región 5' del HR Ω y usaremos la misma región homóloga β , en este fragmento será la 3'.

La obtención de HR1 i HR2 en un solo fragmento, se hizo mediante una PCR anidada utilizando los oligonucleótidos FM007b y FM003 en una mezcla de 5 μ l de Buffer Q5 (x5), 0,5 μ l de dNTPs (10 μ M), 1,25 μ l de cada cebador (10 μ M), 0,25 μ l de polimerasa Q5HFTaq [2U/ μ l] y 14,75 μ l de H₂O. Las condiciones de la PCR fueron de 35 ciclos con una desnaturalización de 20 segundos a 94 °C, una hibridación a 54 °C y una extensión de 40 segundos a 74 °C. La purificación de este fragmento se hizo con Kit Promega como detalla el fabricante.

Como se ve en la figura 20 (correspondientes a los geles de obtención del fragmento HR1+HR2 y genotipado), todos los fragmentos se construyeron satisfactoriamente.

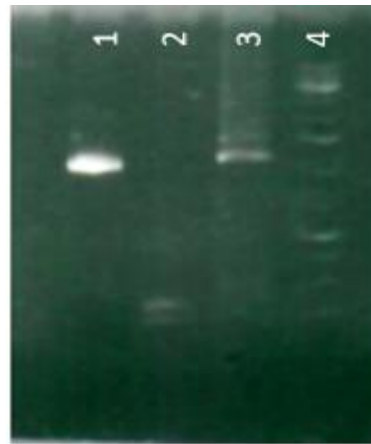


Figura 20. Obtención del fragmento HR1+HR2 a partir del fragmento de HR1 (Δ gRNA) y HR2 (AmCyan). Las muestras son: 1. HR 1 2. HR 2 3. HR1+HR2 4. Marcador Gene Ruler 1Kb

El gRNA se clonó en el plásmido pCRCT *ura*⁺ (figura 20) para poderlo expresar en la levadura mediante digestión y ligación. Primero hizo una digestión con la enzima de restricción BsaI-HF utilizando 0,75 μ l (NEB; 20 U/ μ l), 1,5 μ l de Buffer Cut Smart (NEB, 10x), 11,75 μ l de H₂O para y 1 μ l de plásmido para llegar a un volumen final de 15 μ l. Incubamos el mix a 37 °C durante 3 horas. La ligación, se realizó utilizando 9 μ l de plásmido digerido y 3 μ l de gRNA manteniendo una relación 3:1 de plásmido:inserto. A la mezcla se le añadió 1,3 μ l de rATP (ThermoFisher; 5mM), 0,2 μ l de T4 ligase (NEB; 200U/ μ l), 2 μ l de Buffer (NEB, 10x) y 4,5 μ l de H₂O para llegar a un volumen final de 20 μ l.

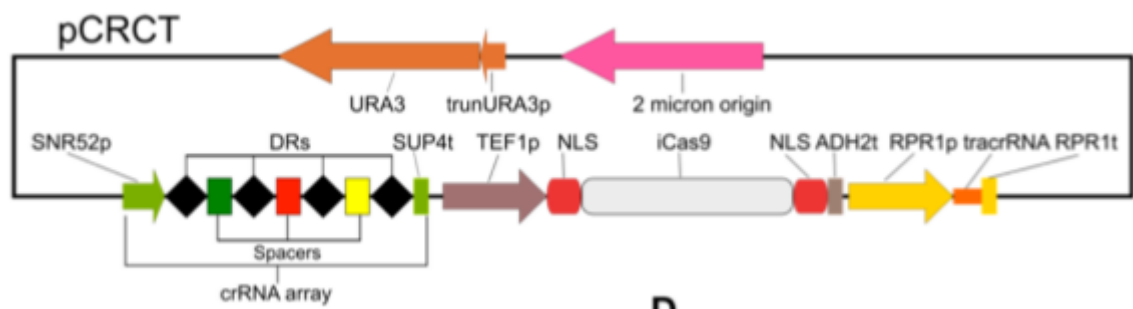


Figura 21. Esquema del plásmido pCRCT suministrado por Addgene (Bao, 2015, Homology-Integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR System for One-Step Multigene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*).

Para eliminar la actividad de la Cas9 se generó una mutación sinónima en la secuencia PAM de la levadura, haciendo ineficaz la digestión por Cas9. Esta mutación se generó mediante una PCR anidada utilizando unos cebadores (F2*Tgg2TTA, R2*Tgg2TTA, F3*Tgg2TAA, R3*Tgg2TAA) a los que se le ha añadido la región recombinación homóloga de 60 pb. Una región homóloga α (HR α) en 3' hasta el gRNA y otra región homóloga artificial β (HR β) que va de 5' al gRNA.

4.4.2 Transformación de la levadura con pCRCT

El objetivo de esta transformación es introducir el AmCyan en el genoma de la levadura BY4741 siguiendo el protocolo en el anexo 7.5 Para la transformación utilizamos 3 μ g de DNA en una proporción 1:1 de pCRTC:HR1+HR2. Una vez hecha la transformación se incubó 48 horas a 30 °C. A continuación, se sembraron 100 μ l en medio sólido selectivo YNB ura⁻ kan y 1 ml en medio YNB ura⁻ líquido fresco y se incubó durante durante 24 horas a 28° C.

4.4.3 Comprobación de la transformación.

Se seleccionaron aleatoriamente varias colonias crecidas en medio sólido selectivo YNB ura⁻ kan. Se realizó una extracción de gDNA mediante el protocolo detallado en el anexo 7.8.1.

Para esta comprobación se realizaron varios genotipados con oligonucleótidos situados en los extremos adyacentes al fragmento de AmCyan (FM003, qHST2D). El mix de PCR se hizo con 2 μ l de Buffer2 [10x] con MgCl₂, 0,3 μ l de dNTPs [10 mM], 1 μ l de cada cebador [10 μ M], 0,2 μ l de polimerasa NETZYME (Biotools, 10 U/ μ l) y 15,5 μ l de H₂O para un volumen final de 20 μ l por reacción.

Sin embargo, ninguno de los plásmidos indujo la inserción del gen AmCyan en el genoma de *S. cerevisiae*, ya que de las colonias obtenidas en las placas URA-, ninguna tenía el genotipo esperado (figura 22).

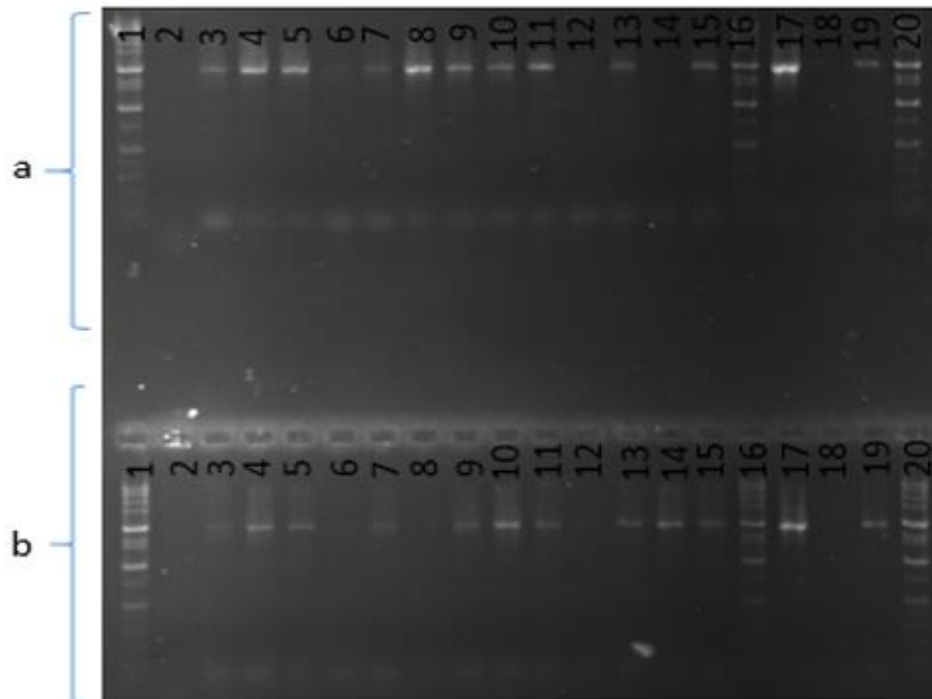


Figura 22. Genotipado de las levaduras transformadas. La comprobación de la transformación se realizó utilizando los oligonucleótidos FM003, qHST2D, estos cebadores amplifican un patrón de bandas diferencial entre las levaduras WT y las transformadas. El orden de las muestras es: **a) 1.** Gene Ruler 1kb plus **2.** 1 **3.** 2 **4.** 3 **5.** 4 **6.** 5 **7.** 6 **8.** 7 **9.** 8 **10.** 9 **11.** 10 **12.** 11 **13.** 12 **14.** 13 **15.** 14 **16.** Gene Ruler 1kb plus **17.** C+ **18.** C- **19.** BY4741 **20.** Gene Ruler 1kb plus **b) 1.** Gene Ruler 1kb plus **2.** 15 **3.** 16 **4.** 17 **5.** 18 **6.** 19 **7.** 20 **8.** 21 **9.** 22 **10.** 23 **11.** 24 **12.** 25 **13.** 26 **14.** 27 **15.** 28 **16.** Gene Ruler 1kb **17.** C+ **18.** C- **19.** BY4741 **20.** Gene Ruler 1kb plus.

A pesar del resultado negativo de la PCR también se comprobó mediante microscopía de fluorescencia, a una longitud de onda 485 nm. Ya que las células que *a priori* eran transformantes puesto que crecían en medio selectivo, deberían presentar fluorescencia. Sin embargo, no se observó fluorescencia en ninguna de las líneas (Figura 23).

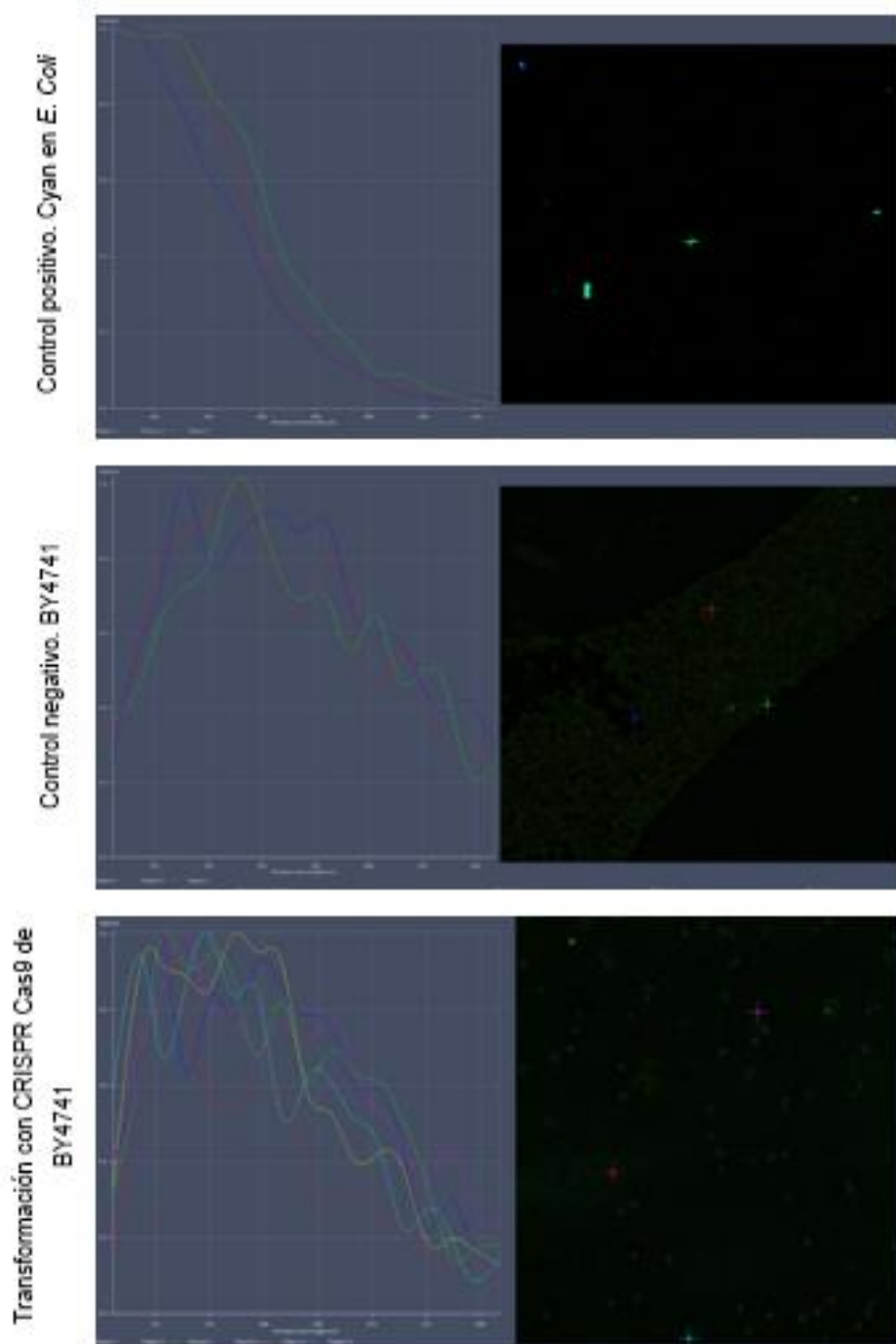


Figura 23. Imágenes obtenidas con el microscopio confocal ZEISS LSM 780 a una longitud de onda de 485nm. Donde se puede observar que las células transformadas mediante CRISPR Cas9, no muestran fluorescencia Cyan.

4.4.4 Western para comprobar la proteína Cas 9.

Para comprobar que la proteína iCas 9 se estaba expresando correctamente, se procedió a hacer una extracción de proteínas de las células transformadas mediante el protocolo 7.12 detallado en el anexo. Se realizó un experimento una electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) según se detalla en el anexo 7.11. Posteriormente se realizó un marcaje con anticuerpos específicos para la proteína Cas9.

Conforme se puede observar en la figura 24 correspondiente al experimento de WesternBlot, el plásmido pCRCT que nos suministró la empresa Addgene no producía la enzima Cas9.

Tabla 2. Concentraciones de proteínas extraídas de cada una de las muestras.

Muestra	Absorbancia 595 nm	Proteínas [mg/ml]
PCas 9 <i>E.coli</i>	6579	2,904
pCT	5450	2,173
pCRCT_LDR	5005	1,884
pCRCT_SDR	5006	1,885
BY4741	12216	6,554
pCRCT_LDR+HR	3022	0,600
pCRCT_SDR+HR	4407	1,497
pCT+pCR_LDR+HR	7978	3,499
pCT+pCR_SDR+HR	7571	3,546

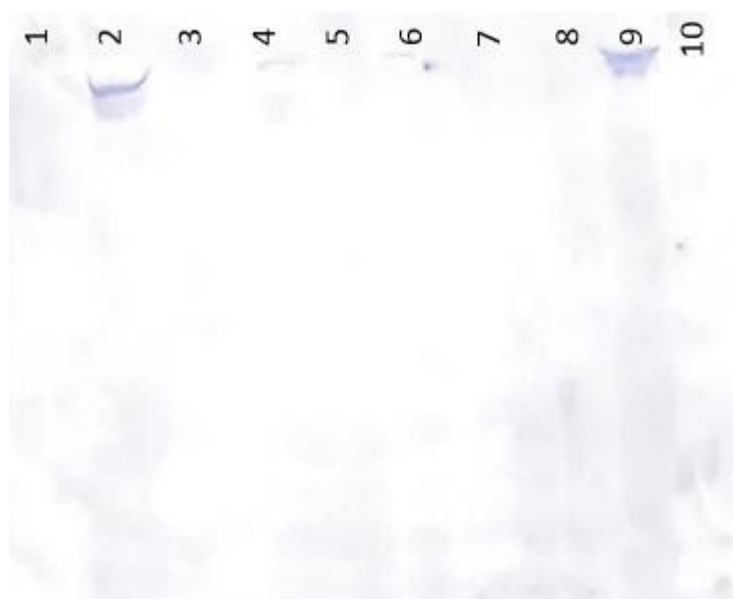


Figura 24. Resultado del Western, donde solo se puede apreciar la aparición de banda, indicativo de la presencia de proteína iCas9, en las muestras de *E. Coli*. Las muestras se ordenan;

1. Page Ruler Unstained Protein Ladder 2. Cas9 E.Coli 3. pCRCT_LDR 4. pCRCT_SDR 5. BY4741 6. pCRCT_LDR+HR 7. pCRCT_SDR+HR 8. pCT 9. Cas9 E.Coli 10. Page Ruler Unstained Protein Ladder.

4.4.5 Construcción del plásmido CRISPyBerger

Debido a los resultados negativos obtenidos hasta el momento, diseñamos nuestro propio vector, CRISPyBerger, a partir de los plásmidos cedidos por el laboratorio del Dr. Horwitz {Horwitz, 2015, Efficient Multiplexed Integration of Synergistic Alleles and Metabolic Pathways in Yeasts via CRISPR-Cas}. A partir de estos plásmidos se obtuvo por PCR la enzima Cas9 mejorada y adaptada a *S. cerevisiae*, y se clonó en el esqueleto del plásmido pCRCT. Para ello, partimos de los plásmidos (AH2 y AH3) desarrollados en el laboratorio del Dr. Horwitz [27]. Estos plásmidos integran un 'cassette' de resistencia a Higromicina y el 'cassette' de expresión para la enzima Cas9, pensados para insertar ambos en el genoma de la levadura. Aprovechando que estos plásmidos contienen zonas de corte con la enzima de restricción PmeI adyacentes a los casetes mencionados, se cortó y pegó el fragmento de Cas9 con el fin de sustituir el 'cassette' de iCas 9 del plásmido pCRCT [28].

La digestión con PmeI se realizó en un volumen final de 15 μ l utilizando 1 μ l de cada plásmido [500 ng/ μ l], 1,5 μ l de Buffer B [10x] (Thermo), 1 μ l de PmeI [5U/ μ l] y 10,5 μ l de H₂O. La reacción se dejó incubando durante toda la noche a 37 °C y se inactivó la digestión a 65 °C durante 20 minutos.

Para la amplificación por PCR del 'cassette' de Cas9 utilizamos los oligonucleótidos CC9ahF y CC9ahR. Esta PCR la realizamos en un mix de 2 μ l de Buffer sin MgCl₂ (10x), 0,8 μ l de MgCl₂ [10 μ M] 0,3 μ l de dNTPs [10 mM], 1 μ l de cada cebador, 0,2 μ l de polimerasa Biotools [10U/ μ l] y 14,4 μ l de H₂O para llegar a un volumen final de 20 μ l. Se programó el termociclador para una hibridación a 60 °C y una extensión de 4 minutos y 30 segundos durante 35 ciclos. Para obtener el vector npCRCT vacío de Cas9, se utilizaron los oligonucleótidos CC9pF y CC9pR. Esta PCR se realizó en un mix de 5 μ l de Reaction Buffer (5x), 0,5 μ l de dNTPs [10 mM], 1,25 μ l de cada cebador, 0,25 μ l de polimerasa Q5 HF [2U/ μ l] y 16,25 μ l de H₂O para llegar a un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de PCR fueron de una temperatura de hibridación a 60 °C, 5 minutos y 30 segundos de elongación a 70 °C y 35 ciclos.

Se cuantificó la concentración del vector (257,0 ng/μl) y del inserto (161,6 ng/μl), para mezclar los dos productos en una relación de 1:3 vector:inserto. Esta mezcla se incubó con las enzimas de restricción XmaI y NotI para obtener extremos de corte que posteriormente servirán para unirse en una ligación. La reacción de restricción la hacemos con 2 μl de npCRCT sin Cas9, 9,54 μl del 'cassette' de la Cas9ah, 1 μl y 0,5 μl de las enzimas de restricción XmaI [10U] y NotI HF [20u] respectivamente, 1,5 μl de Buffer CutSmart [10x] y finalmente 0,46 μl de H₂O para llegar a un volumen final de 15 μl por reacción. La reacción se incubó a 37 °C durante una hora y la actividad enzimática se bloquea a 20 min a 65 °C. El siguiente paso fue la ligación del pCRCT y la Cas9 ah. Para la ligación se usaron los 15 μl de la restricción anterior y se añadió 1,3 μl de ATP, 1,5 μl de Buffer T4 ligase [10x], T4 ligase y 0,7 μl de H₂O para llegar a un volumen final de 20 μl. La reacción se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

4.4.6 Comprobación del plásmido

Para la clonación del plasmido se realizó una transformación en Dh5α utilizando el protocolo One Step Transformation detallado en el anexo 7.6. Se seleccionaron 10 colonias y se crecieron en LB ampicilina líquido a 37°C. Con cada una de estas colonias, tras una extracción de DNA plasmídico con kit Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante, se hizo una digestión con la enzima ClaI (figura 25). La segunda comprobación se realizó mediante una PCR de las extracciones de DNA plasmídico (mp3 y mp6) con los oligonucleótidos CC9ah_F y CC9ah_R y como controles utilizamos en npCRCT y las Cas9 de Horwtich. Para la reacción se emplearon 2 μl de Reaction Buffer [10x], 0,5 μl de dNTPs [10 mM], 1 μl de cada cebador [10μM], 2 μl de polimerasa Netzyme [5U/μl]. Con esta PCR, nos aseguramos que el plasmido ha incorporado correctamente el cassette de CCPah.

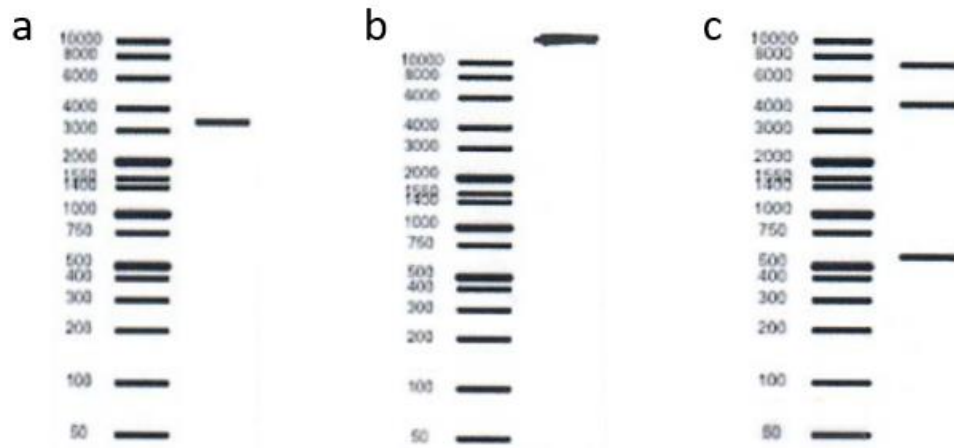


Figura 25. Análisis in Sillico del patrón de los patrones de restricción de los plásmidos usados (pAmpCyan, pCRCT, pCRISPyberger) para la comprobación restricción incubado con ClaI. A. análisis de restricción del plásmido pAmCyan incubado a 37 °C con ClaI. Se genera un fragmento de 3325 pb. B. análisis de restricción del plásmido pCRCT incubado a 37 °C con ClaI. No se genera ningún fragmento. C. análisis de restricción del plásmido CRISPyberger incubado a 37 °C con ClaI. Se generan 3 fragmentos de 711p pb, 4196 pb, 543 pb.

4.4.7 Ligación del gRNA[SWI]_LDRs al plásmido CRISPyberger y verificación

Con el plásmido ya formado, se procedió a su corte para insertar el dsRNA (Figura 26). Para esta digestión, se utilizaron 0,75 μ l de la enzima de restricción BSAI HF con 2 μ l de plásmido. Para la ligación del plásmido con el dsRNA, se utilizaron 9 μ l de plásmido digerido y 3 μ l de dsRNA (relación vector:inserto 1:3) con la ligasa T4 (NEB, 200U/ μ l) en un volumen final de 20 μ l.

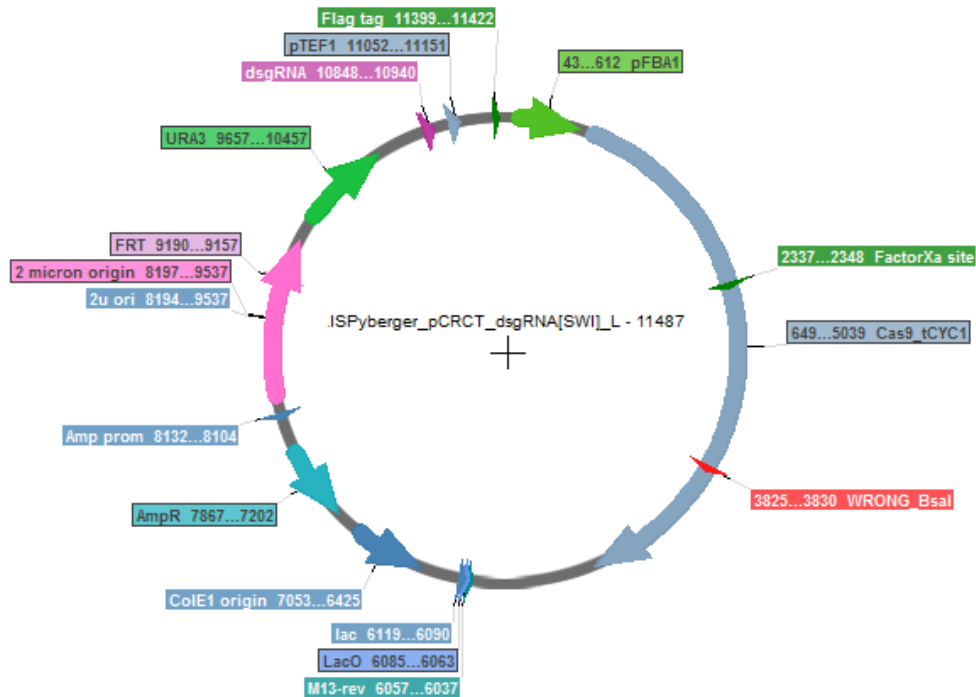


Figura 26. CRISPyberger_pCRCT_dsrRNA obtenido in sillico.

La amplificación del plásmido se hizo mediante la transformación en *E. Coli* Dh5 α (Anexo 7.6) y se creció en placas de LB ampicilina Xgal. De esta transformación se seleccionan las colonias que crecieron de color blanco ya que la inserción del fragmento se hace en la región LacZ. Al insertar el gRNA, se pierde el LacZ y la célula es incapaz de metabolizar Xgal, por lo tanto, no se produce el compuesto 5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo que produce el color azul. Con las colonias ya crecidas, se hizo la extracción de DNA plasmídico para posteriormente digerir con EcoRV para verificar la inserción del gRNA (figura 28). Esta digestión se realizó añadiendo 1 μ l de enzima de restricción EcoRV, junto con 1,5 μ l de Buffer NEB3 [10x], 2 μ l de DNA y 10,5 μ l de H₂O para un volumen final de 15 μ l.

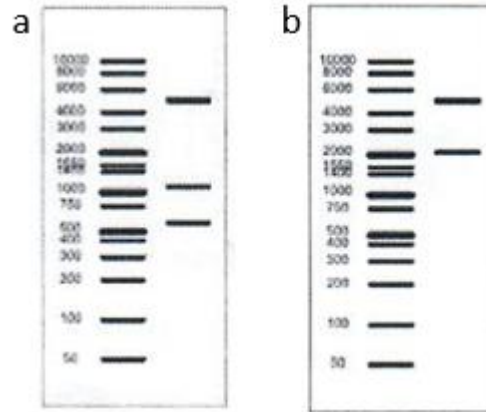


Figura 27. Patrón de restricción in Silico mediante Serial Cloner. **a.** Análisis de restricción del plásmido CRISPyberger_pCRCT_dsgRNA[SWI]_LDRs incubado con EcoRV. Se obtienen 4 fragmentos de 5033 pb, 4826 pb, 1078 pb y 556 pb. **b.** Análisis de restricción del plásmido CRISPyberger_pCRCTs, incubado con EcoRV. Se obtienen 3 fragmentos de 5033 pb, 4826 pb y 1999 pb.

Como se observa en la figura 28 la obtención del plásmido es exitosa. Por lo contrario, la inserción del dsgRNA, no resulto correcta como se puede observar en la figura 29 pero si mantenía las zonas de restricción de NotI. Los motivos por los que este dsgRNA no se inserta correctamente son los desapareamientos y la aparición de secuencias repetidas cuando realizamos el corte y unión del dsgRNA (Anexo 7.2)

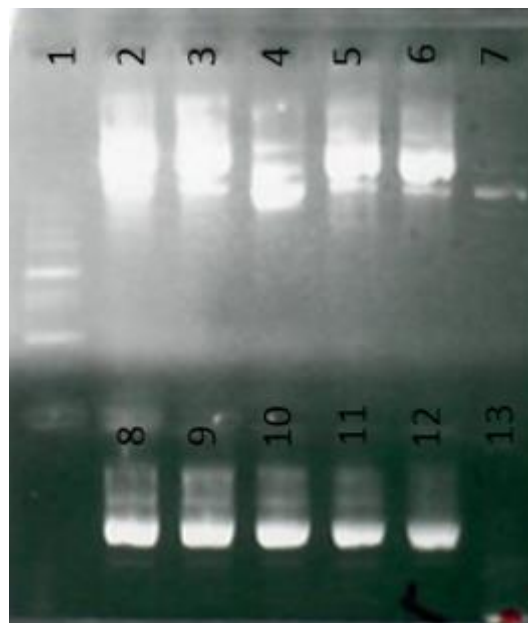


Figura 28. Patrón de bandas del plásmido pCRCT+CC9ah (CRISPyberger). El plásmido pCRCT se usó como control para verificar un patrón de bandas diferentes. La restricción se usa EcoRV. Para la comprobación mediante PCR, se utilizaron las líneas 4 y 7 de la imagen. La imagen de la izquierda muestra el resultado de la PCR de comprobación utilizando los oligonucleótidos CCPah y CC9ah. Como control positivo se usó un fragmento de iCas9. Las

muestras corresponden a: 1. Marcador Gene Ruler 1 Kb 2-11 Colonias seleccionadas al azar 12. pCRCT 13. pAmpCyan

Finalmente, para verificar que el sitio de restricción de NotI no ha sido eliminado, se hizo una última comprobación utilizando los enzimas NotI y EcoRV sobre el plásmido CRISPyberger_dsgRNA (figura 29). Para esta digestión se utilizó 1 µl de cada enzima, 1,5 µl de Buffer NEB3 [10x], 1 µl de DNA plasmídico y 10,5 µl de H₂O para un volumen final de reacción de 15 µl. Se acabó la comprobación del plásmido, genotipando la región donde se inserta el dsgRNA, para comprobar que los sitios de restricción EcoRV no han sido eliminados. Para este genotipado utilizamos varios plásmidos obtenidos en paralelo y con los oligonucleótidos 107Pi i 107P2.

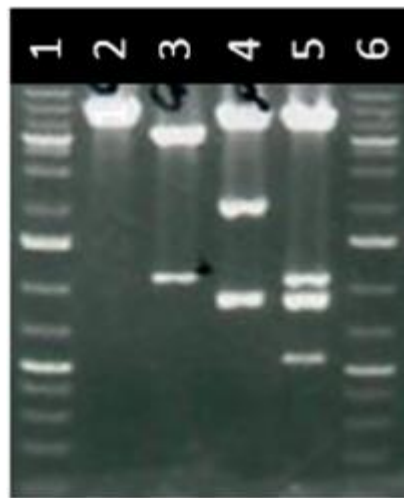


Figura 29. La imagen muestra la restricción de los plásmidos con EcoRV y NotI. Como se puede observar, hay pérdida de una zona de corte en la formación del nuevo plásmido. Las muestras corresponden a: 1. Marcador Gene Ruler 1 Kb plus 2. CRISPyberger 3. CRISPyberger_dsgRNA 4. pCRCT 5. pCRCT_dsgRNA 6. Marcador Gene Ruler 1 Kb plus.

5 CONCLUSIONES

Uno de los principales objetivos de la biología evolutiva, es poder determinar si un genotipo tiene potencial para adaptarse a nuevos cambios. Estos estudios han resultado poco congruentes, debido a la dificultad de poder cartografiar de un genotipo a un fenotipo o asignar cambios transcripcionales a las variaciones fenotípicas. Los objetivos iniciales del presente TFM, van encaminados a arrojar luz a sobre estos mecanismos, de esta manera, podemos concluir que:

Durante la evolución experimental adaptativa en varios estreses (etanol, glicerol, láctico y estrés oxidativo) durante 100 pases (330 generaciones) a partir de dos líneas previamente evolucionadas en medio estándar rico (YPD) y medio estándar

pobre (1/8 YPD) durante 667 generaciones, observamos que las poblaciones adaptadas han mostrado un aumento generalizado de su μ_{max} en el correspondiente medio de estrés respecto a la ancestral. Lo cual nos indica que la selección actúa sobre la población heterogénea generada en la t_{100} , obteniendo una especialización al medio de estrés en detrimento de su capacidad generalista (Fares, 2015, Survival and innovation: The role of mutational robustness in evolution).

Además, pudimos observar con claridad que, la variación transcripcional está vinculada a la adaptación fenotípica al glicerol y que los genes duplicados muestran mayor alteración transcripcional en situaciones de estrés. El hecho de que algunos genes duplicados respondan selectivamente al glicerol, plantea la posibilidad de que sean los responsables a especializaciones importantes en la respuesta reguladora a ambientes cambiantes, tal vez a través de la adquisición de nuevas funciones o nuevas interacciones en la célula (Fares, 2015, Survival and innovation: The role of mutational robustness in evolution). Además, se ha podido correlacionar esta plasticidad de expresión con plasticidad funcional, como se ha observado en las morfologías de las colonias de pasar de medios de estrés a YPD y viceversa.

Con el fin de presentar un ejemplo de la capacidad de la duplicación génica de generar plasticidad fenotípica, intentamos poner a punto un sistema de duplicación génica en *S. cerevisiae* basado en la técnica CRISPR/Cas9. No obstante, como se ha visto en el apartado de resultados y discusión, debido a problemas con los niveles de expresión de la proteína Cas9 en los plásmidos adquiridos a Addgene, no pudimos realizarlo a tiempo. Para solucionar este problema de falta de expresión diseñamos nuestro propio plásmido con el que aún estamos trabajando.

A modo general, podemos concluir que en el marco de este proyecto hemos dilucidado como los genes duplicados contribuyen a las innovaciones evolutivas. En concreto, mediante evolución experimental y análisis transcriptómico pudimos observar con claridad que la que la variación transcripcional está vinculada a la adaptación fenotípica y que los genes duplicados muestran mayor alteración transcripcional en situaciones de estrés. Con el marco teórico clásico de la evolución por duplicación, en el que una de las copias queda libre de selección gracias a que la otra continúa manteniendo sus funciones ancestrales (Ohno, 1970, Evolution by Gene Duplication)(Conant, 2008, Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions), podemos extrapolar esta afirmación tanto a las características funcionales como reguladoras de los genes.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anders, S. and W. Huber (2010). "Differential expression analysis for sequence count data." Genome Biol **11**(10): R106.
- Bao, Z., H. Xiao, J. Liang, L. Zhang, X. Xiong, N. Sun, T. Si and H. Zhao (2015). "Homology-Integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) System for One-Step Multigene Disruption in *Saccharomyces cerevisiae*." ACS Synthetic Biology **4**(5): 585-594.
- Bennett, M. D. and I. J. Leitch (2005). CHAPTER 2 - Genome Size Evolution in Plants A2 - Gregory, T. Ryan. The Evolution of the Genome. Burlington, Academic Press: 89-162.
- Blanc, G. and K. H. Wolfe (2004). "Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during Arabidopsis evolution." Plant Cell **16**(7): 1679-1691.
- Brachmann, C. B., A. Davies, G. J. Cost, E. Caputo, J. Li, P. Hieter and J. D. Boeke (1998). "Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications." Yeast **14**(2): 115-132.
- Brooker, R. (2010). Genetics: Analysis and Principles.
- Cavalier-Smith, T. (2005). "Economy, speed and size matter: evolutionary forces driving nuclear genome miniaturization and expansion." Ann Bot **95**(1): 147-175.
- Conant, G. C. and K. H. Wolfe (2008). "Turning a hobby into a job: how duplicated genes find new functions." Nat Rev Genet **9**(12): 938-950.
- DiCarlo, J. E., J. E. Norville, P. Mali, X. Rios, J. Aach and G. M. Church (2013). "Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems." Nucleic Acids Res **41**(7): 4336-4343.
- Elena, S. F. and R. E. Lenski (2003). "Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation." Nat Rev Genet **4**(6): 457-469.
- Fares, M. A., O. M. Keane, C. Toft, L. Carretero-Paulet and G. W. Jones (2013). "The roles of whole-genome and small-scale duplications in the functional specialization of *Saccharomyces cerevisiae* genes." PLoS Genet **9**(1): e1003176.
- Force, A., M. Lynch, F. B. Pickett, A. Amores, Y. L. Yan and J. Postlethwait (1999). "Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations." Genetics **151**(4): 1531-1545.
- Greilhuber, J., J. Dolezel, M. A. Lysak and M. D. Bennett (2005). "The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents." Ann Bot **95**(1): 255-260.
- Gu, Z., L. M. Steinmetz, X. Gu, C. Scharfe, R. W. Davis and W. H. Li (2003). "Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations." Nature **421**(6918): 63-66.
- Hall, B. G., H. Acar, A. Nandipati and M. Barlow (2014). "Growth rates made easy." Mol Biol Evol **31**(1): 232-238.
- Hoegg, S., H. Brinkmann, J. S. Taylor and A. Meyer (2004). "Phylogenetic timing of the fish-specific genome duplication correlates with the diversification of teleost fish." J Mol Evol **59**(2): 190-203.
- Horwitz, Andrew A., Jessica M. Walter, Max G. Schubert, Stephanie H. Kung, K. Hawkins, Darren M. Platt, Aaron D. Hernday, T. Mahatdejkul-Meadows, W. Szeto, Sunil S. Chandran and Jack D. Newman (2015). "Efficient Multiplexed Integration of Synergistic Alleles and Metabolic Pathways in Yeasts via CRISPR-Cas." Cell Systems **1**(1): 88-96.
- James D. Watson, T. A. B., Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine, Richard Losick (2016). Biología Molecular del Gen.
- Keane, O. M., C. Toft, L. Carretero-Paulet, G. W. Jones and M. A. Fares (2014). "Preservation of genetic and regulatory robustness in ancient gene duplicates of *Saccharomyces cerevisiae*." Genome Res **24**(11): 1830-1841.
- Kimura, M. (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge, Cambridge University Press.

- Kunz, B. A., K. Ramachandran and E. J. Vonarx (1998). "DNA sequence analysis of spontaneous mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **148**(4): 1491-1505.
- Lohse, M., A. M. Bolger, A. Nagel, A. R. Fernie, J. E. Lunn, M. Stitt and B. Usadel (2012). "RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics." *Nucleic Acids Res* **40**(Web Server issue): W622-627.
- Looke, M., K. Kristjuhan and A. Kristjuhan (2011). "Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications." *Biotechniques* **50**(5): 325-328.
- Lynch, Michael and B. Walsh. (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*, Sinauer Associates.
- Marraffini, L. A. (2016). The CRISPR-Cas system of *Streptococcus pyogenes*: function and applications. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. J. J. Ferretti, D. L. Stevens and V. A. Fischetti. Oklahoma City (OK), University of Oklahoma Health Sciences Center c) The University of Oklahoma Health Sciences Center.
- Mattenberger, F., B. Sabater-Munoz, J. E. Hallsworth and M. A. Fares (2016). "Glycerol stress in *Saccharomyces cerevisiae*: Cellular responses and evolved adaptations." *Environ Microbiol.*
- Mattenberger, F., B. Sabater-Munoz, C. Toft and M. A. Fares (2016). "The Phenotypic Plasticity of Duplicated Genes in *Saccharomyces cerevisiae* and the Origin of Adaptations." *G3 (Bethesda)*.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by Gene Duplication*. Berlin, Springer-Verlag.
- S.S, C. (1961). On certain aspects of the evolutionary process from the standpoint of modern genetics. transl. of 1921 paper by Malina Parker; ed I.M. Lerner). *Proceedings of the American Philosophical Society*.
- Soltis, P. S., D. B. Marchant, Y. Van de Peer and D. E. Soltis (2015). "Polyploidy and genome evolution in plants." *Curr Opin Genet Dev* **35**: 119-125.
- Winston, F., C. Dollard and S. L. Ricupero-Hovasse (1995). "Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C." *Yeast* **11**(1): 53-55.
- Winzeler, E. A., D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D. J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J. L. Revuelta, L. Riles, C. J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T. R. Ward, R. Wysocki, G. S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston and R. W. Davis (1999). "Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis." *Science* **285**(5429): 901-906.
- Wright, S. (1931). *Evolution in mendeline populations*.

7 ANEXO I

Se presentan aquí los cebadores, medios de cultivo utilizados, así como su preparación, con todo detalle para reproducir el presente trabajo en condiciones similares. También están los protocolos seguidos en cada caso, ya sean, diseñados en el laboratorio o de los kits comerciales utilizados.

Se han omitido de este anexo las soluciones más comunes, conocidas sobradamente.

7.1 Listado de primers utilizado durante el trabajo.

Ref.	Secuencia
qHST2_fwd	CTTGCCAGGTTGAAGTTGC
qHST2_rev	TGCCAACGACGATGACAAGA
FM001_dir	CCAAA AATTGTAAAGTAATTGATAC
FM001_rev	CCGG GATCAATTACTTTACAATT
FM001b_rev	CTCTGTATCAATTACTTTACAATT
FM002b_dir	CCGGTTTTGAATGGT CAATGATATCCTAACCAATT
FM002b_rev	CTCT AATTGGTTAGGATATCATTT CACCATTCAAAC
FM003	TTTGTTCCCCACGGATTTAG
FM007b	AGTTACAACATTTTATATAGGTTTATAAAAAGAAAATAGTgccgattcattaatgcagctg
F2*Tgg2TTA	ATAAA T AGTATCAATTAC
R2*Tgg2TTA	GTAATTGATAC T ATTTAT
F3*Tgg2TAA	CTAACCAAT T AAATGATG
R3*Tgg2TAA	CATCAT T TAATTGGTTAG
qASC_dir	CAAATGGTTAAGGTATGTG
qASC_rev	GGTTTAAGTTCCAAGCCTGTC
FMCC9p_dir	CGTAAGAATATCCC CCGGGG GGGAgagtcagctaggagtgacc
FMCC9p_rev	ATAAGAAT GCGGCCG CCTAAACTATcgatatctaagcctattgag
FMCC9ah_F	ATAAGAAT GCGGCCG CCTAAACTATaagagcctcgccaacgccg
FMCC9ah_R	CGTAAGAATATCCC CCGGGG GGGActctggcgctgattaaacg
Msh2_A	CGTATAAACAAAGCCAAAGACAAGT
Msh2_D	ACATCTCTGTTTATCCCATCCATA
Kan_C	TGATTTTGATGACGAGCGTAAT
Kan_B	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT

7.2 Genotipado y solapamiento de bases

```

Features [Seq_2]:
T3 : [348 : 323]
M13-fwd : [238 : 253]
M13-rev : [386 : 366]
T7 : [265 : 284]
LacZ alpha : [387 : 391]
LacO : [434 : 392]
lac : [445 : 419]
BsaI : [72 : 77]
BsaI : [519 : 524]
Seq_1 181 gcatgctctggggcctcgaaaactctctccggcagtcgaaagataaaatgatccgggttttagagct 240
                      |||
Seq_2 1 -----CTTCGAAACTTCGCGCACGcaaaagataaaatgatccgggttttagagct 48

Seq_1 241 atgctgcttttgaatggtcccaaaagagcctcagccggtccagggcggctcczcttcgcca 300
                      |||
Seq_2 49 atgctgcttttgaatggtcccaaaagagcctcagccggtccagggcggctcczcttcgcca 108

Seq_1 301 cttaggctggcgaactgctgppaaaggngarccggtgngppctctcttggctattaaagcag 360
                      |||
Seq_2 109 cttaggctggcgaactgctgppaaaggngarccggtgngppctctcttggctattaaagcag 168

Seq_1 361 ctgggcaaaagggggctgctgctcaaggcgttaagtgggtcaagccaggggttttccag 420
                      |||
Seq_2 169 ctgggcaaaagggggctgctgctcaaggcgttaagtgggtcaagccaggggttttccag 228

Seq_1 421 tccagcctctgtaaaaagcgggcagtcgagcggcggtaatacagctccactatggggcaa 480
                      |||
Seq_2 229 tccagcctctgtaaaaagcgggcagtcgagcggcggtaatacagctccactatggggcaa 288

Seq_1 481 ttgggcaagggggcccccctcaggtctccagctcttggctccctttagcaggggttaat 540
                      |||
Seq_2 289 ttgggcaagggggcccccctcaggtctccagctcttggctccctttagcaggggttaat 348

Seq_1 541 tgccgctctgggctaactcagctcctagcctctctctgctgcaaatgctctccggctcc 600
                      |||
Seq_2 349 tgccgctctgggctaactcagctcctagcctctctctgctgcaaatgctctccggctcc 408

Seq_1 601 aattccacacacatcagcagccggagatcaagtgtaaaagcctggggcgcttaactgag 660
                      |||
Seq_2 409 aattccacacacatcagcagccggagatcaagtgtaaaagcctggggcgcttaactgag 468

Seq_1 661 gagtaactccactcaattgctgctgagctcactgcccggcttccacccggcggctctcaga 720
                      |||
Seq_2 469 gagtaactccactcaattgctgctgagctcactgcccggcttccacccggcggctctcaga 628

Seq_1 721 gctatgctgttttgaatggtcccaaaactctctctctgctctctctctctctctctctct 780
                      |||
Seq_2 479 GCTATGCTGTTTTGAATGCTCCCAAACTTTTTCTGTTTTTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 538

Seq_1 781 aatgctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct 840
                      |||
Seq_2 489 AATGCTT----- 694

-----
Features [Seq_3]:
BsaI : [72 : 77]
BsaI : [519 : 524]
dmgGSA(FWI)_LOR : [67 : 154]
dmgGSA : [182 : 301]
Seq_1 721 atgctgtagaagtgaaagtggtgogcagctcttoggcgttcgaaactctccggcagtgaa 780
                      |||
Seq_2 1 -----CTTCGAAACTTCGCGCACGcaaa 23

Seq_1 781 agataaatgatccgggttttagagctatgctgcttttgaatggtcccaaaacaa----- 832
                      |||
Seq_2 24 Agataaatgatccgggttttagagctatgctgcttttgaatggtcccaaaacattgtaag 83

Seq_1 833 -----atgatctctaa 844
                      |||
Seq_2 24 taatgtagcgttttagcctcagctgcttgaatggtcccaaaacaaatgatctctaa 243

Seq_1 845 ccaatgcttagagcctatgctgttttgaatggtcccaaaactctctctctctctctctct 904
                      |||
Seq_2 144 ccaatgctttt---CTATGCTGTTTTGAATGCTCCCAAACTTTTTCTGTTTTTCTCT 193

Seq_1 905 ctgctatgctccaaagctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctctct 964
                      |||
Seq_2 200 CTATGCTGTTTTGAATGCTT----- 219
    
```

7.3 Medios para la evolución adaptativa

- ✓ Todas las esterilizaciones en la autoclave se dan a 1 atmósfera de presión y 121°C durante 20 minutos. La esterilización la realiza el personal del IBMCP autorizado para el manejo de autoclaves.

✓ Los stocks de Kanamicina se encuentran a una concentración 30 mg/ml.

a. YPD (1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 2% dextrosa)

Para este medio se disuelve el extracto de levadura (Pronadisa, cat nº 1702.05) y la bactoPeptona (Pronadisa, cat nº 1616.00) en el volumen final deseado y siempre manteniendo los porcentajes mencionados. A continuación, se autoclava. Este primer paso es la base de todos los medios excepto para el YPL.

Una vez autoclavado, cuando el medio está frío, se le añade la dextrosa (esterilizada por filtración y guardada a -20 °C) para llegar a la concentración final del 2% y el volumen de Kanamicina.

b. 1/8 YPD (0.125% extracto de levadura, 0.25% bactopectona, 0.25% dextrosa)

Este medio contiene una octava parte de YPD. Por lo que para prepararlo debemos diluir el YPD hasta una octava parte en H₂O miliQ previamente esterilizada, o diluir 0.125% de extracto de levadura, 0.25% de bactopectona en el agua correspondiente, esterilizarla, y añadirle en frío el volumen correspondiente de glucosa. A continuación, añadimos la Kanamicina correspondiente hasta tener 30 mg/l.

c. YPG (1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 3% Glicerol)

El primer paso de preparación es el mismo que en YPD. A continuación, añadimos el volumen de Glicerol previamente esterilizado para obtener una concentración final del 3%. Finalmente añadimos la Kanamicina correspondiente.

d. YPE (1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 3% etanol)

El primer paso de preparación es el mismo que en YPD. A continuación, añadimos el volumen de etanol deseado para obtener una concentración final del 3%. Cuando añadimos el etanol, nos aseguramos que el medio está frío para evitar la evaporación de este. Finalmente añadimos la Kanamicina.

e. YPO₂D (1% extracto de levadura, 2% bactopectona, 1% dextrosa, 3% H₂O₂)

El primer paso de preparación es el mismo que en YPD. El volumen de H₂O₂ que vamos a añadir, depende de la casa comercial, en cualquier caso, se ajusta hasta que esté a una concentración final del 3%. Finalmente añadimos la Kanamicina. Este medio sirve solo durante una semana, debido al poder oxidativo del agua oxigenada que se va perdiendo con el tiempo. Por lo que es mejor prepararlo cuando se vaya a usar.

f. YPL (2% extracto de levadura, 1% bactopectona, 2 % lactato) 500 ml.

Para la preparación de este medio debemos disolver 6g de NaOH (en pellets) en 300 ml de H₂O mQ. Una vez disuelto ir añadiendo poco a poco el ácido láctico

(Sigma, L-6661) hasta llegar a pH 5,5. Una vez ajustado el pH, se añade el extracto de levadura y la peptona hasta disolución y se ajusta el volumen a 500ml. A continuación, se esteriliza y finalmente se añade la Kanamicina.

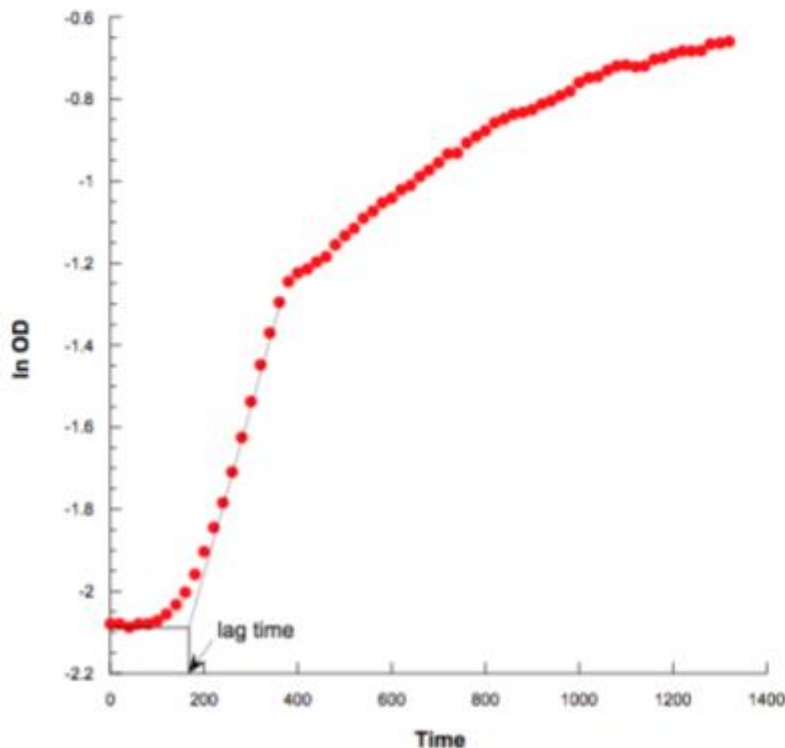
7.4 **Análisis de las curvas de crecimiento.**

El Bioscreen proporciona las medidas de OD sin corregir, en un fichero con formato csv, y por tiempo. El primer paso es hacer un promedio de los blancos y a continuación restar ese promedio a cada uno de los valores de OD₆₀₀. A continuación, se normalizan las OD usando la fórmula (Warringer y Blomberg, 2003):

$$OD_{\text{cor}} = OD_{\text{obs}} + 0.449(OD_{\text{obs}})^2 + 0.191(OD_{\text{obs}})^3$$

A partir de las OD corregidas, se determina el promedio de cada una de las réplicas técnicas y se representa los datos de las OD_{cor} frente al tiempo.

El siguiente paso es representar lnOD_{cor} vs t. En cada una de estas curvas, se acota la fase exponencial y se determina la tasa de crecimiento a partir de la pendiente de la fase lineal. Ésta pendiente corresponde la μ_{max} (como se ve en la figura).



7.5 Transformación de levadura

1. Inocular 10 ml de YPAD con 300 μ l de precultivo BY4741 e incubar durante 2 horas a 30 °C.
2. Centrifugar a 4500 RPM durante 5 minutos, y descartamos el sobrenadante.
3. Lavar el pellet de levaduras con 2 ml de H₂O mQ, centrifugar a 4500 rpm, durante 5 minutos, descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pelet en 1 ml de solución LiAc recién preparada (0.1M LiAc, 1xTE).
5. Se pasan 100 μ l de células por cada transformación a un mix de 240 μ l de PEG 50%, 36 μ l de LiAc 1M, 40 μ l de H₂O, 10 μ l de ssDNA carrier (DNA de esperma de salmón a 10 mg/ml desnaturalizado a 94 °C durante 20 min) y 1 μ g de plásmido.
6. Incubar 40 minutos a 42 °C.
7. Centrifugar durante 1 minuto a 14000 RPM y descartar el sobrenadante. A continuación, añadir 1 ml de YPAD e incubar durante 1 hora a 30 °C.
8. Centrifugar durante 1 minuto a 14000 RPM, descartar el sobrenadante.
9. Añadir 0,5 ml de H₂O mQ para lavar las células y centrifugar a 14000 RPM durante 1 minuto. Descartar el sobrenadante. Repetir este punto una vez más.
10. Resuspender el pelet en 1 ml de YNB ura⁻ kan⁻.
11. Pasar a un falcón de 50 ml y añadir 4 ml de YNB ura⁻ kan⁻.
12. Incubar durante 48 h a 30 °C, 220 rpm.

Para la eliminación de falsos positivos es recomendable que tras la incubación a 30 °C hacer un pase de 250 μ l de cultivo a 5 ml de medio fresco YNB ura⁻ kan⁻ y 100 μ l en placas YNB ura⁻.

7.6 Transformación *E. coli* Dh5 α (One Step Transformation)

1. Inocular 150 μ l de precultivo en 7,5 ml de LB. Incubar a 37 °C hasta una OD₆₀₀ de 0,6.
2. Transferir 1 ml de cultivo en eppendorf de 2 ml, e incubar 20 min en hielo.
3. Centrifugar 30 segundos a 14000 rpm, y descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet bacteriano en 100 μ l de TSS 1x, mediante pipeteo, y añadir 1 μ l de plásmido.
5. Incubar en hielo durante 10-30 min.
6. Añadir 900 μ l de SOC.

7. Incubar 1 hora a 37 °C, 220 rpm.
8. Siembra en placas de LB con el antibiótico correspondiente (dependiendo del marcador y resistencia de cada plásmido). Para garantizar el crecimiento, podemos centrifugar la muestra para concentrarla.
9. Finalmente incubar las placas a 37 °C 'over night'.

7.7 Extracción de proteínas en levadura.

1. Inocular YPD con las líneas de interés y dejar crecer 'over night' a 30 °C, 220 rpm.
2. Ponemos 1,5 ml de cada cultivo en tubos eppendorff de 2 ml.
3. Se centrifuga a 4500 rpm durante 4 minutos y 30 segundos, descartamos el sobrenadante.
4. Repetimos el punto 2 y 3 sobre el mismo tubo (dos centrifugaciones con el mismo tubo para recuperar el máximo de células).
5. Resuspendemos el pelet en 200 µl de H₂O mQ, añadiendo a continuación 200 µl de NaOH 0'2 M. Agitar mediante vortex.
6. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
7. Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos, descartar el sobrenadante.
8. Añadir 50 µl de SDS Sample Solution.
9. Incubar a 100 °C durante 3 - 5 minutos.
10. Centrifugar a 14000 rpm durante 2 minutos, para eliminar el debris celular.
11. Las muestras pueden ser almacenadas a -20 °C, para usarlas volver a hervir durante 5 minutos a 95 °C y volver a centrifugar a máxima velocidad durante otros 5 minutos.

7.8 Extracción de DNA

7.8.1 SDS/LiAC (Looke et al. 2011)

1. Resuspender una colonia en 100 µl de solución SDS 1%, LiAc 0,1 M
2. Incubar durante 15 min a 70 °C.
3. Añadir 300 µl de etanol absoluto.
4. Centrifugar a 14000 RPM durante 3 min y descartar el sobrenadante.
5. Dejar evaporar los restos de etanol a temperatura ambiente.
6. Añadir 100 µl de TE 1x y resuspender el pellet.
7. Centrifugar a 14000 rpm durante 1 min.

8. Guardar a 4 °C.

7.9 Purificar Productos de PCR (Kit Promega, REF)

1. Añadir el todo el volumen de las PCR en un ependorff de 1,5 ml.
2. Añadir el mismo volumen de 'membrane binding solution' al producto de PCR.
3. Transferir el volumen a la columna 'binding column'
4. Centrifugar a 10000 rpm durante un minuto, descartar el eluido.
5. Añadir 700 µl de 'membrane wash solution' y centrifugar a 10000 rpm durante un minuto, descartar el eluido.
6. Repetir el paso 5, pero con 500 µl de 'membrane wash solution'.
7. Centrifugar a 10000 rpm durante 1-5 min, descartar el eluido.
8. Transferir la columna a un eppendorf limpio, añadir 30 µl de H₂O en el centro de la membrana, dejar actuar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
9. Centrifugar a 14000 rpm, descartar la membrana y guardar el volumen eluido a 4 °C ó a -20 °C.

7.10 Extracción de RNA total de levadura (kit RNeasy Qiagen).

1. Inocular YPD (o el medio correspondiente) con las líneas de interés y dejar crecer 'over night' a 30 °C, 220 rpm.
2. A partir del precultivo re-inocular en medio nuevo hasta una OD₆₀₀ ~ 0.3.
3. Transferir 1.5ml de cultivo a tubo de 2.0 ml, centrifugar a 4000 rpm, 4 °C, durante 1 min. Eliminar sobrenadante.
4. Resuspender las células en 100 µl de buffer BY1 suplementado con lincasa. Incubar 10-30 min a 30 °C, 120 rpm, para generar esferoplastos.
5. Añadir 350 µl de buffer RLT suplementado con B-mercaptoetanol. Si se forma un precipitado centrifugar 2 min a 14000 rpm, y transferir sobrenadante a eppendorf nuevo.
6. Añadir 250 µl de etanol absoluto, mezclar por pipeteo y transferir todo el volumen, incluido cualquier precipitado a la columna RNeasy spin.
7. Centrifugar 15 s a 10000 rpm, descartar el eluido.
8. Lavar la membrana con 700 µl de buffer RW1.
9. Centrifugar 15 s a 10000 rpm, descartar el eluido.
10. Lavar la membrana con 500 µl de buffer RPE.
11. Centrifugar 15 s a 10000 rpm, descartar el eluido.
12. Lavar la membrana por segunda vez con 500 µl de buffer RPE.

13. Centrifugar 2 min a 10000 rpm, descartar el eluido. Y volver a centrifugar 1 min para eliminar cualquier traza de etanol.
14. Transferir la columna a un eppendorf limpio (y libre de RNasas), eluir el RNA con 30-50 µl de mQ H₂O libre de RNasas, tras incubar durante 1-3 min a RT. Centrifugar 2 min a 10000 rpm y guardar a -80 °C.
15. Se puede repetir el paso 14, realizando una segunda recuperación de RNA total en otro vial a partir de la misma membrana.

7.11 SDS-Page

7.11.1 Extracción De Proteínas

1. Inocular YPD con las células de interés y dejar crecer over night a 30 °C y agitación continua.
2. Ponemos 1,5 ml de cada cultivo en tubos eppendorff de 2 ml.
3. Se centrifuga a 4500 RPM durante 4 minutos i 30 segundos y descartamos el sobrenadante.
4. Repetimos el punto. (Dos centrifugaciones con el mismo tubo)
5. Resuspendemos el pelet en 200 µl de H₂O mQ y 200 µl de NaOH 0'2 M.
6. Agitar mediante vortex.
7. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
8. Centrifugar a 14000 RPM durante 3 minutos y descartar el sobrenadante.
9. Añadir 50 µl de SDS Sample Solution.
10. Incubar a 100 °C durante 3 o 5 minutos.
11. Centrifugar a 14000 RPM durante 2 minutos.
12. Las muestras pueden ser almacenadas a -20 °C, para usarlas volver a hervir durante 5 minutos a 95 °C y volver a centrifugar a máxima velocidad durante otros 5 minutos.

7.11.2 Cuantificación De Proteínas

1. Diluir 4ml de reactivo Bradford (Sigma B8916-500ML) en 8ml de agua de tizada.
2. Para preparar la curva de calibrado, diluir BSA (1mg/ml) en 200µl de la dilución de Bradford preparada anteriormente en una placa multipocillo. De 0 a 4µl de BSA 1mg/ml en incrementos de 0,4ml.
3. Para las muestras, añadir 10µl de la extracción de proteínas preparada anteriormente en 200µl del reactivo diluido.

4. Medir absorbancia a 595nm. Construir la curva de calibrado e inferir la cantidad de proteína total de las muestras.
5. Normalizar la cantidad de proteína a cargar para que de la muestra con menor cantidad de proteína total se carguen 10µl.

7.11.3 Preparación Del Gel De Acrilamida

1. Limpiar las partes de cristal con etanol antes de empezar.
2. Preparar el Lower gel, añadiendo el APS y TEMED en el último momento. Una vez “puesto” entre los dos cristales, añadir isobutanol en la superficie para eliminar burbujas y nivelar el gel. Dejar reposar durante 30 minutos.
3. Eliminar y secar el isobutanol y añadir el Stacking gel. Añadir los peines entre los cristales. Dejar reposar 30 minutos más.
4. Cargar las muestras y dejar correr el gel a 150 voltios hasta que el frente azul haya salido del gel (aproximadamente 2 horas).

7.11.4 Tinción Y Conservación Del Gel De Acrilamida

1. Separar cuidadosamente las partes de cristal y eliminar el Stacking gel.
2. Cortar una esquina para identificar rápidamente la orientación correcta del gel.
3. Sumergir el gel en la solución de teñido de azul de Coomassie durante 30 minutos. (El azul de Coomassie puede ser reutilizado varias veces)
4. Lavar el gel durante 30 minutos en “Slow destaining solution” y dejar overnight en agua.
5. Equilibrar gel en una disolución de etanol/glicerol al menos 30 minutos antes de empezar el secado.
6. Colocar dos hojas de celofan en agua durante 1-2 minutos para ablandarlos.
7. Posicionar una de las hojas sobre el marco de secado, eliminar burbujas de aire, pipetear una pequeña cantidad de solución de equilibrado encima del celofan.
8. Situar el gel en el centro del marco con el celofan y añadir más solución de equilibrado.
9. Poner el segundo celofan sobre el gel, evitando que queden atrapadas burbujas de aire que podrían causar grietas en el gel.
10. Posicionar el segundo marco, haciendo coincidir los bordes de ambos marcos y asegurar la colocación con los clips de plástico.
11. Dejar a temperatura ambiente en posición horizontal hasta que el gel este seco.

7.12 WESTERN BLOT

7.12.1 Transferencia

1. Después de haber corrido el gel completamente, preparar la solución de transferencia.
2. Preparar las membranas cortándolas del mismo tamaño que el gel de acrilamida y una de sus esquinas para conocer rápidamente la orientación del gel.
3. En el tampón de transferencia, empapar las esponjas, el papel de filtro para transferencia y las membranas.
4. Montar la estructura de la transferencia. Se debe tener en consideración que para que las muestras aparezcan en el mismo orden en el que han sido cargadas en el gel, a este se le debe dar la vuelta al posicionar los elementos de la transferencia.
5. Para la transferencia, posicionar primero el “plástico” negro, después una esponja, el primer papel de filtro, el gel (en posición invertida), la membrana, el siguiente papel de filtro, la segunda esponja y por último el “plástico” rojo.
6. Asegurarse en todo momento que entre el gel y la membrana no quedan esponjas. Estas pueden ser eliminadas fácilmente rodando un tubo sobre la membrana.
7. Sumergir en el tanque de transferencia lleno del tampón preparado anteriormente.
8. Dejar la transferencia O/N a 12V, sobre un agitador magnético a 250rpm.

7.12.2 Confirmación De La Transferencia

1. Sumergir en solución Ponceau durante 10 minutos. Esta solución puede ser reutilizada.
2. Desteñir con Ácido Acético 1% dos veces durante unos pocos segundos hasta que el fondo de la membrana sea blanco. En este punto la membrana puede ser escaneada.
3. Desteñir totalmente la membrana con unos pocos lavados con TBS 1x.

7.12.3 Detección De Proteína Mediante Hibridación Con Anticuerpos

A partir de este momento todas las incubaciones deben hacerse en agitación suave

1. Bloquear la membrana con TBST durante media hora.

2. Eliminar el TBST, pasar la membrana a una bolsa especial (Fisher: Sachet polyethylen 100x125mm) y añadir el anticuerpo primario. Sellar la bolsa e incubar durante 30 minutos.
3. Lavar 3 veces durante 5 minutos con TBST.
4. Incubar con el anticuerpo secundario en una bolsa de plástico igual a la que se ha utilizado el anticuerpo primario durante 30 minutos.
5. Lavar 3 veces con TBST.
6. Eliminar el TBST y añadir unos pocos mililitros de NBT/BCIP hasta cubrir la membrana. Incubar durante unos minutos (sin agitación) hasta que las bandas sean visibles. La reacción debe ser detenida con agua.

7.13 Otros medios y soluciones

7.13.1 YNB ura⁺ (1000 ml)

1. Pesar 6,70 g YNB y 1,4 g Yeast Synthetic Drop-out Medium Supplements (without histidine, leucine, tryptophan and uracil)
2. Disolver en H₂O destilada hasta 920 ml.
3. Autoclavar
En condiciones estériles:
4. Añadir 50 ml de Glucosa 40%, 10 ml Histidina 100 X [2g/L], 10 ml Triptófano 100 X [10g/L] y 10 ml Leucina 100 X [10g/L]

7.13.2 LB

Para preparar el presente medio se disolvieron 25g del preparado de LB (Conda cat. 1551.05) en 800ml de agua miliQ, y una vez disuelto, se enrasa a 1000ml. Con este preparado no es necesario ajustar el pH.

7.13.3 TSS (50 ml)

PEG 8000	5g
MgCl ₂ :6 H ₂ O	0,3 g
LB	Enrasar hasta 50 ml
DMSO (filtrado)	2,5 µl

1. Filtrar después de disolver. Alicuotar 10 ml en tubos de 15 ml y conservar a -20 °C

7.13.4 SDS Sample Solution

Las concentraciones de esta solución son; 0,06 M Tris-Hcl pH=6,8, 5% Glicerol, 2% SDS, 2% DTT

	Para un volumen de 20 ml
DTT	0,4 g
1M Tris-Hcl pH=6,8	1,2 ml
Glicerol 50 %	2 ml
SDS 20%	ml

1. Pesar el DTT en tubo de 50 ml.
2. Añadir 2 ml de H₂O y disolver.
3. Añadir Tris-Hcl pH=6,8.
4. Añadir Glicerol.
5. Añadir H₂O hasta enrasar a casi 18 ml.
6. Añadir SDS. Es importante añadir el SDS en último lugar y mezclar con suavidad ya que genera mucha espuma.
7. Añadir H₂O hasta enrasar a 20 ml.

7.13.5 SOC

	Cantidad para 100 ml	Cantidad para 1 L	[] Final
Triptófano	2 g	20 g	2%
Extracto de levadura	0,5 g	5 g	0,5%
NaCl	0.05g (o 1 ml de 1M)	0.5g (o 10 ml de 1M)	M

1. Disolvemos y ajustamos el pH a 7 con HCL.
2. Añadimos H₂O hasta 98 ml (para volumen total de 100 ml) ó 980 ml (para volumen total de 1 L).
3. Autoclavar.
4. En cabina añadimos:

	Cantidad para 100 ml	Cantidad para 1 L	[] Final
1 M KCL	250 μ l	2,5 ml	2,5 mM
1 M MgCl₂	1 ml	10 ml	10 mM
1 M MgSO₄	1 ml	10 ml	10 M

5. Añadir 2ml de Glucosa 1M filtrada por cada 100 ml de solución.
6. Alicuotar 10 ml en tubos de 15 ml y conservar a -20 °C.