

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA Y DEL  
MEDI NATURAL



Identificación en levadura de genes determinantes de la  
tolerancia a ácidos preservantes de alimentos

## **TRABAJO FIN DE GRADO**

Grado en Biotecnología

Autora: **María de los Desamparados Martín Hernández**

Tutor: Prof. Ramón Serrano Salom

Co-tutora: Consuelo Montesinos de Lago

Curso Académico: 2013-2014

**Valencia, Julio de 2014**



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

## ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

### Datos personales

Nombre y apellidos: María de los Desamparados Martín Hernández

### Datos del trabajo de fin de grado

Título del TFC: Identificación en levadura de genes determinantes de la tolerancia a ácidos preservantes de alimentos.

Localidad: Valencia

Fecha de lectura: Julio 2014

Titulación: Grado en Biotecnología

Tutor/a: Ramón Serrano Salom

Cotutor/a: Consuelo Montesinos de Lago

### Resumen

El pH intracelular ( $pH_i$ ) es un parámetro fundamental en las células, ya que regula muchos de los procesos que tienen lugar en ellas, incluyendo el crecimiento y la muerte celular. El pH intracelular, así como los sistemas celulares afectados por los cambios de este parámetro, están regulados por el sistema de homeostasis del pH. Tienen un papel importante los transportadores de protones y potasio, los tampones celulares y las reacciones metabólicas que consumen y producen protones.

Para crear un estrés ácido en las células se emplean en el laboratorio ácidos orgánicos débiles como el acético, que en medios de pH 4-5 están en estado no disociado, y al difundir dentro de la célula se disocian provocando un descenso del  $pH_i$ , inhibiendo su crecimiento y provocando muerte celular a altas concentraciones y  $pH_i$  muy bajos. Por esta razón, se emplean como conservantes de alimentos, ya que la presencia de microorganismos como bacterias, hongos o levaduras alteran sus cualidades y pueden resultar dañinos para los consumidores.

El laboratorio de Ramón Serrano está buscando nuevos componentes implicados en la homeostasis del  $pH_i$  utilizando el sistema modelo de levadura y seleccionando mutantes con mayor tolerancia a estrés ácido intracelular. Ello ha permitido identificar el transporte de leucina y la proteína kinasa Gcn2.

El sistema de levadura presenta una serie de características técnicas que lo hacen indicado para este tipo de estudios biológicos. Se emplea el sistema de plásmidos que permiten conseguir una ganancia de función de genes para seleccionar las colonias de levadura según el fenotipo de interés, en nuestro caso una mayor tolerancia a ácido acético. Tras la selección de los mutantes y la extracción del plásmido, mediante técnicas de secuenciación, se puede saber cuáles son los genes presentes en el plásmido, que serán los responsables de esta mayor tolerancia a estrés ácido.

Empleando esta metodología se ha aislado un plásmido centromérico de la biblioteca genómica de levadura que confiere un aumento en la tolerancia a ácido acético.

### Palabras clave

Homeostasis, pH, *Saccharomyces cerevisiae*, plásmido, ácido acético, tolerancia

## Abstract

Intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) is a fundamental parameter in living cells because it regulates many processes, including cell growth and death. Proton and potassium transporters and their regulators, cellular buffers, metabolic reactions consuming and producing protons and cellular systems affected by changes in  $\text{pH}_i$  constitute the  $\text{pH}_i$  homeostasis system. To create intracellular acid stress in the laboratory we used weak organic acids such as acetic, that at pH 4-5 are to a large extent in undissociated state, and when introduced into the cell dissociate a proton causing a decrease in  $\text{pH}_i$ . This intracellular acidification inhibits growth at low levels and induces cell death at high levels. These acids are used as food preservatives, because the presence of microorganisms such as bacteria or fungi alters their qualities, spoil them and may be harmful to consumers.

Ramón Serrano's laboratory is looking for new components involved in  $\text{pH}_i$  homeostasis using the yeast model system and selecting mutants with increased tolerance to intracellular acid stress created by organic acids. This has identified the transport of leucine as a very sensitive system to acid  $\text{pH}_i$  and protein kinase GCN2 as activator of that transporter.

The yeast system has a number of technical features that makes it suitable for this type of biological tests. Yeast plasmids allow gain of function of genes from gene libraries to select yeast colonies with the phenotype of interest. In our case a higher tolerance to acetic acid is used. After selection of colonies and plasmid extraction and sequencing we can know which genes are present in the plasmid. These genes are responsible for the increased tolerance to acid stress.

Employing this methodology I have isolated a plasmid from a yeast genomic library conferring an increased tolerance to acetic acid.

## Key words

Homeostasis, pH, *Saccharomyces cerevisiae*, plasmid, acetic acid, tolerance

## AGRADECIMIENTOS

La ciencia es paciencia, y eso bien claro me ha quedado durante estos meses dedicados a mi TFG. Por eso, no podía acabar sin agradecer a todas las personas que han tenido algo que ver en que a falta de escasos días, sea por fin, biotecnóloga.

Gracias a Ramón Serrano por dejarme formar parte de su equipo este tiempo y ayudarme a que este TFG sea una realidad. Cómo no, muchas gracias a Mariche, que ha sufrido conmigo, y con creces, esa paciencia de la que antes hablaba, y ha estado conmigo en todo momento, supervisándome y guiándome, evitando que metiese la pata. También gracias a todos los que forman parte del laboratorio, que me han hecho sentir como una más.

*Mil gràcies a les meues "bessonetes", companyes de batalla durant aquests quatre anys, i també a la resta de l'equip: Dionís, Dani, Laura, Miquel, Carlos, Rubén, Alba, Marta, Ximo, Andrés, Victor. Molta sort en la vostra vida professional!*

Por último, gracias a mis amigas, y a mi familia, muy especialmente a mis padres, Paco y Amparo, que han luchado tanto o más que yo en esta carrera de fondo.

También me gustaría hacer una mención especial a mi abuelo Paco, que aunque sin tener ningún conocimiento científico, sería la persona que más ilusión tendría en leer las páginas que vienen a continuación.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>pág. 1</b>
1.1. La importancia de la homeostasis del pH intracelular .....	pág. 1
1.2. Conservantes ácidos de alimentos .....	pág. 3
1.3. Homeostasis del pH <sub>i</sub> en levadura .....	pág. 5
1.4. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como sistema modelo .....	pág. 6
1.5. Ventajas del sistema de plásmidos .....	pág. 7
1.6. Plásmidos de levadura .....	pág. 7
1.7. La estrategia de ganancia de función .....	pág. 8
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>pág. 10</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>pág. 11</b>
3.1. Cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	pág. 11
3.2. Condiciones de cultivo .....	pág. 11
3.3. Medio YPD .....	pág. 11
3.4. Medio Mínimo SD .....	pág. 11
3.5. Medio Mínimo Completo SCD .....	pág. 12
3.6. Medio LB .....	pág. 12
3.7. Plásmido YCp50 .....	pág. 12
3.8. Preparación de plásmidos de la biblioteca de genes de levadura a partir de bacterias .....	pág. 13
3.9. Preparación de células competentes de levadura .....	pág. 14
3.10. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .....	pág. 14
3.11. Selección de mutantes de sobreexpresión de levadura en ácido acético .....	pág. 15
3.12. Extracción de plásmido de levadura .....	pág. 15
3.13. Transformación de <i>E. coli</i> .....	pág. 15
3.14. Minipreparación de plásmido .....	pág. 16
3.15. Digestión del plásmido .....	pág. 16
3.16. Electroforesis .....	pág. 16

3.17. Recomprobación del fenotipo .....	pág. 17
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>pág. 19</b>
4.1. Preparación de plásmidos de la biblioteca de genes de levadura a partir de bacterias .....	pág. 19
4.2. Cálculo de número de clones transformados de levadura necesarios para tener representación de todo el genoma .....	pág. 21
4.3. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con los plásmidos de la biblioteca genómica .....	pág. 22
4.4. Selección de los mutantes resistentes a acético .....	pág. 23
4.5. Aislamiento de los plásmidos de los candidatos y retransformación .....	pág. 25
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>pág. 29</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>pág. 29</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>pág. 30</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Posibles funciones de genes que por un pequeño aumento de dosis génica puedan conferir tolerancia a estrés ácido intracelular causado por ácido acético .....	pág. 9
<b>Tabla 2.</b> Características del plásmido YCp50 .....	pág. 12
<b>Tabla 3.</b> Resultado de la transformación de la cepa de levadura RS-132 con los plásmidos de la biblioteca genómica pRS-148 y pRS-149 de la Figura 5 .....	pág. 22
<b>Figura 1.</b> Principales componentes de la homeostasis de pH <sub>i</sub> en levadura .....	pág. 2
<b>Figura 2.</b> Los ácidos orgánicos débiles acidifican el interior de las células en medio ácido .....	pág. 3
<b>Figura 3.</b> Mapa de restricción del plásmido YCp50 .....	pág. 13
<b>Figura 4.</b> Análisis de los plásmidos YCp50 y de la biblioteca genómica por electroforesis .....	pág. 19
<b>Figura 5.</b> Análisis de plásmidos de biblioteca genómica por electroforesis .....	pág. 20
<b>Figura 6.</b> Comprobación por gotas de 7 candidatos tolerantes a ácido acético junto a 4 controles de levadura transformada con plásmido sin inserto .....	pág. 23
<b>Figura 7.</b> Digestión con <i>Hind</i> III de plásmido extraído de bacterias transformadas con el plásmido de las cepas de levadura candidatas 1, 2, 3, 5 y 7 .....	pág. 24
<b>Figura 8.</b> Comprobación por crecimiento de gotas de levadura transformada con plásmidos de los candidatos 1, 2, 3, 5 y 7 y controles con levadura transformada con plásmidos sin inserto .....	pág. 25
<b>Figura 9.</b> Digestión del plásmido 7 con <i>Hind</i> III .....	pág. 25
<b>Figura 10.</b> Digestión con <i>Hind</i> III del plásmido 7 purificado con el kit “NucleoSpin Plasmid” .....	pág. 26
<b>Figura 11.</b> Comprobación por crecimiento en gotas de levadura transformada con el plásmido 7 purificado mediante el kit “NucleoSpin Plasmid” .....	pág. 27

# **1.INTRODUCCIÓN**



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La importancia de la homeostasis del pH intracelular

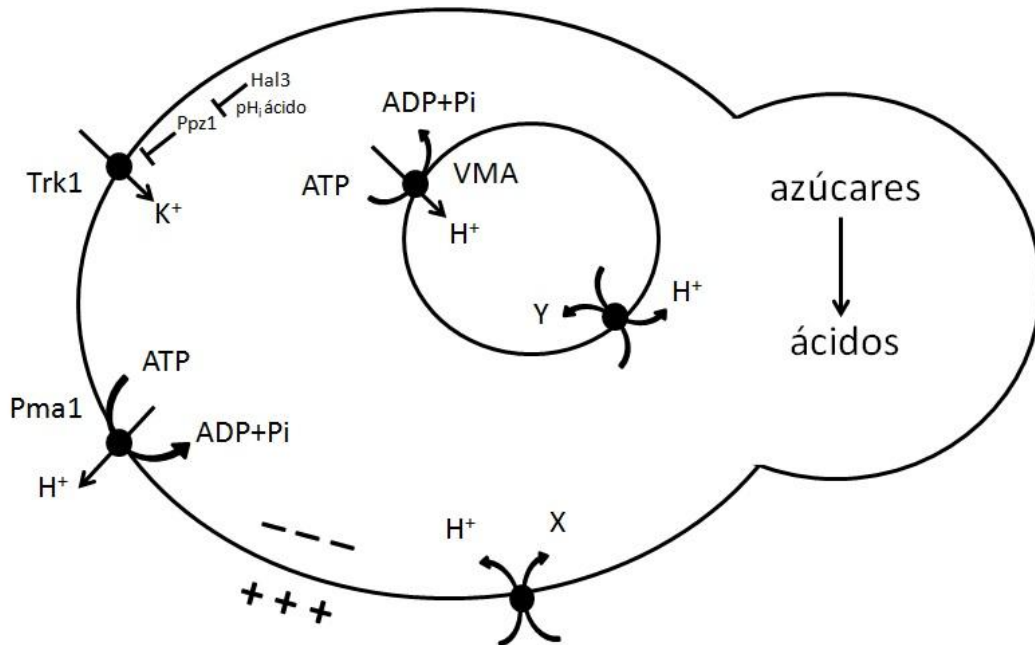
El pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) es un parámetro de fundamental importancia para las células ya que determina la actividad de muchos procesos celulares incluyendo el crecimiento ( $\text{pH}_i$  relativamente alto) y muerte ( $\text{pH}_i$  relativamente bajo) (Hueso *et al*, 2012). Esto se debe fundamentalmente al efecto del pH sobre las proteínas, que contienen cadenas laterales de los aminoácidos que cambian de estado de carga al cambiar el pH (Berg *et al*, 2002).

La homeostasis de  $\text{pH}_i$  se refiere a los mecanismos de las células para estabilizar este importante parámetro así como los sistemas celulares más afectados por cambios del  $\text{pH}_i$ . De capital importancia son los transportadores de protones, tanto en membrana plasmática como en vacuolar, sin olvidar los reguladores de estos sistemas. (Serrano, 1991). Aunque se conocen muchos de los componentes de la maquinaria de homeostasis del  $\text{pH}_i$ , no se han identificado los sensores del  $\text{pH}_i$  que desencadenan las regulaciones, con la excepción del sistema Ppz1-Hal3 de levadura (Yenush *et al*, 2005).

El laboratorio de Ramón Serrano está buscando nuevos componentes que participen en la homeostasis del  $\text{pH}_i$  utilizando el sistema modelo de levadura y seleccionando mutantes con mayor tolerancia a estrés ácido intracelular. Esta estrategia se basa en que los sistemas biológicos descubren mejor sus sistemas bajo condiciones de estrés, es decir, un mutante con mayor tolerancia a acidificación intracelular probablemente estará afectado en un componente de la maquinaria de homeostasis de  $\text{pH}_i$  (Hueso *et al*, 2012).

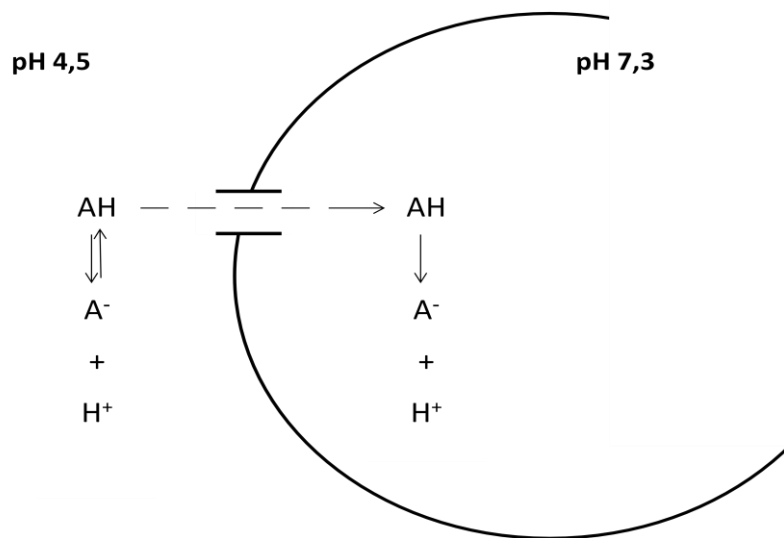
En la Figura 1 se representan los principales componentes de la homeostasis de  $\text{pH}_i$  en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática (Pma1) genera un gradiente de protones (pH ácido y potencial eléctrico positivo fuera) que impulsa la acumulación de nutrientes mientras que la  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar (VMA) energiza la acumulación de moléculas (fosfato, arginina) en la vacuola. Faltan en este esquema los sistemas de regulación, con la excepción de Ppz1-Hal3, el único conocido hasta el momento y que activa al transportador de potasio Trk1 cuando el  $\text{pH}_i$  se vuelve ácido. Al activarse Trk1 la  $\text{H}^+$ -ATPasa puede sacar mejor protones por balance

eléctrico y restaurar el  $\text{pH}_i$  neutro. Ppz1 es una proteína fosfatasa que elimina grupos fosfato que activan Trk1. Hal3 es una subunidad inhibidora que actúa a  $\text{pH}$  ácido (Yenush *et al*, 2005).



**Figura 1. Principales componentes de la homeostasis de  $\text{pH}_i$  en levadura.** X = moléculas tomadas del medio (aminoácidos, etc.), Y = moléculas acumuladas en vacuola (fosfato, etc.). En la membrana plasmática se representa la  $\text{H}^+$ -ATPasa (Pma1), el transportador de  $\text{K}^+$  (Trk1) y los sistemas de transporte activo de nutrientes (co-transportadores o simportadores con  $\text{H}^+$ ). En la membrana vacuolar se indica la  $\text{H}^+$ -ATPasa (VMA) y los sistemas de antiporte con  $\text{H}^+$  para acumular moléculas. Asimismo se representa la producción metabólica de ácidos (carbónico, acético, succínico).

Aunque el estrés ácido intracelular lo provocan muchos estreses (Hueso *et al*, 2012), la herramienta utilizada para generar estrés ácido intracelular en el laboratorio son los ácidos orgánicos débiles como el acético, propiónico y sórbico que actúan por el mecanismo de la Figura 2. En medios de  $\text{pH}$  4-5 estos ácidos están en gran parte no disociados y esta forma no cargada puede difundir al interior de las células a través de las proteínas llamadas "porinas" (Mollapour *et al*, 2007). Una vez dentro los ácidos se disocian y hacen caer el  $\text{pH}_i$ . Estos ácidos se utilizan ampliamente como conservantes de alimentos de origen vegetal por lo que a continuación describiremos este aspecto de la tecnología de alimentos.



**Figura 2.** Los ácidos orgánicos débiles acidifican el interior de las células en medio ácido.

## 1.2. Conservantes ácidos de alimentos

La principal causa del deterioro de los alimentos se debe a la presencia de microorganismos como bacterias, levaduras y otros hongos, que alteran sus cualidades pudiendo resultar dañinos para los consumidores, así como las grandes pérdidas que supone para la industria. A pesar de que la mayoría de las levaduras se relacionan de forma positiva con los alimentos, existen algunas especies perjudiciales. Son mucho más resistentes a condiciones ambientales estresantes tales como la baja actividad del agua, temperaturas bajas, al uso de antimicrobianos, o a bajos valores de pH. Es por eso, que suelen aparecer en alimentos de origen vegetal, cuyo pH suele ser menor de 5.

La alteración microbiana de los alimentos se evita, en determinados casos, mediante el uso de agentes que suelen llamarse “conservantes”. Dentro de estos conservantes de alimentos se sitúan los ácidos preservantes de alimentos; estos son ácidos orgánicos débiles como el acético, propiónico y sórbico que inducen acidificación intracelular en microorganismos contaminantes de alimentos y desencadenan inhibición del crecimiento y su muerte (Holyoak *et al*, 1996; McPherson *et al*, 2005).

El ácido sulfuroso y el ácido benzoico son los dos aditivos conservadores más utilizados en la industria de alimentos. El ácido sulfuroso se emplea, sobre todo, en enología y en la industria de bebidas refrescantes, pulpas y frutas desecadas. Este se puede aplicar como anhídrido ( $\text{SO}_2$ ), o en forma de sales, bisulfito sódico ( $\text{SO}_3\text{HNa}$ ) y también sulfitos ( $\text{SO}_3\text{Na}_2$ ). Al disolverse en agua, forman ácidos o iones, cuya proporción dependerá del pH de la disolución. A pH muy bajo (2,5-3,5), el  $\text{SO}_3\text{H}_2$  es la forma predominante, siendo esta la de mayor actividad antimicrobiana. El ácido sulfuroso inhibe el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias. Las levaduras son más resistentes que las bacterias.

El ácido benzoico es un buen fungicida y menos bactericida, se utiliza para bebidas refrescantes, preparados de frutas no esterilizados, encurtidos, mermeladas, etc. Se utiliza generalmente como sal sódica, que es soluble en agua, pero la forma activa es el ácido libre. Por esta razón, el ácido benzoico actúa con mayor eficacia en el rango de pH comprendido entre 2,5 y 4,0, por lo que se utiliza para conservar alimentos ácidos o acidificados.

El acético se usa como vinagre, para conservar vegetales (cebollitas, pepinos, col, pimientos, etc.) reforzando el efecto de la fermentación láctica. En algunos productos de más baja calidad, la acidez y el poder conservante se deben, casi exclusivamente, al vinagre, y el sabor es mucho más ácido; también se usa en escabeches de pescado y de productos cárnicos. Inhibe principalmente levaduras y bacterias a la dosis de 2-3 g/l; aparte de la alta acidez del acético, el ión acetato es microbicida.

El ácido propiónico es un buen fungicida que se usa, sobre todo, en panadería. Los propionatos son más activos frente a moho que el benzoato sódico; pero son poco activos frente a levaduras o bacterias. También es un buen fungicida superficial. Tanto el propionato cálcico como el sódico liberan el ácido en el rango del pH adecuado de los alimentos; y tanto el ácido como las sales son solubles en agua. La forma más activa es la no disociada, cuyo margen de actividad se localiza en pH 5-5,5.

El ácido sórbico se utiliza principalmente como fungicida en bebidas, zumos, mermeladas, vinos, encurtidos, quesos, margarinas, bollería y pastelería, pero también es activo contra levaduras y bacterias. Como el resto de conservantes, su actividad se

debe principalmente a la forma no disociada, por lo que actúa mejor en medio ácido. Sin embargo, su margen de actividad eficaz llega hasta pH 6-6.5 (Primo, 1997).

### 1.3. Homeostasis del $\text{pH}_i$ en levadura

A pesar del bajo pH externo, las levaduras son capaces de mantener su pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) alrededor de la neutralidad para tener una actividad óptima de los procesos metabólicos principales. Al mismo tiempo, se crea en la célula un gradiente de protones (ácido y potencial eléctrico positivo fuera) esencial para el transporte de nutrientes, y como consecuencia, para el crecimiento (Serrano, 1991).

No obstante, pequeñas variaciones en el  $\text{pH}_i$  tienen un papel importante en la regulación de los procesos celulares. Los cambios de  $\text{pH}_i$  son importantes en el control del ciclo celular, y la síntesis de DNA y RNA se ven incrementada con un aumento del  $\text{pH}_i$ , dentro del rango normal. Cuando el pH intracelular baja excesivamente se dispara una producción de agua oxigenada que mata a las células (Hoeberichts *et al*, 2010).

Las levaduras tienen un sistema bien desarrollado para mantener la homeostasis del  $\text{pH}_i$ , que es dependiente de una  $\text{H}^+$ -ATPasa bombeara de protones localizada en la membrana plasmática. Esta es la proteína más abundante de la membrana plasmática. La  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana acopla la hidrólisis del ATP con la expulsión de protones, generando así un gradiente de protones. Dicha enzima es limitante y esencial para el crecimiento, y crítica en el mecanismo de resistencia a estreses (Serrano, 1991).

Se cree que el modo de acción de los ácidos débiles preservantes de alimentos es reducir el  $\text{pH}_i$  por debajo del rango fisiológico, provocando una inhibición del crecimiento y muerte celular.

Si el principal efecto inhibitorio de los ácidos débiles es reducir el  $\text{pH}_i$ , el mecanismo de resistencia a ácidos débiles involucra la  $\text{H}^+$ -ATPasa bombeara de protones. Ciertamente, la actividad de la  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana se ve incrementada durante el crecimiento en condiciones ácidas, y aquellas que reducen el  $\text{pH}_i$  (Hueso *et al*, 2012). El transporte de  $\text{K}^+$  al interior de la célula, mediado por Trk1 en levadura, es

también importante para expulsar protones puesto que debe haber un balance eléctrico durante el proceso.

El mantenimiento de la homeostasis del  $\text{pH}_i$  resulta caro energéticamente, de tal manera que la  $\text{H}^+$ -ATPasa consume entre el 40 y el 60 % del ATP total de la célula. Además, el mantenimiento de la homeostasis del  $\text{pH}_i$  en presencia de ácidos débiles preservantes puede disminuir los niveles de ATP celular de forma significativa. Y con la disminución del ATP, el crecimiento queda restringido (Holyoak *et al*, 1996).

#### **1.4. *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo**

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha considerado como un microorganismo eucariota que constituye un sistema modelo ideal para llevar a cabo estudios biológicos. Se trata de un organismo eucariótico con una mayor complejidad que las bacterias, aunque comparte la mayoría de las ventajas técnicas que la hacen adecuada para este tipo de investigaciones: un rápido crecimiento, facilidad de réplica en placa y aislamiento de mutantes, un sistema genético bien definido con el genoma secueciado y anotado, y un sistema muy versátil de transformación de DNA incluyendo plásmidos. Así mismo, al tratarse de una especie no patogénica, no requiere precauciones especiales para su manipulación. Las células de *Saccharomyces cerevisiae* pueden existir en estado haploide o diploide (Sherman, 1991).

El desarrollo de la técnica de transformación del DNA hace a la levadura especialmente indicada para la clonación génica, e ingeniería genética. Los genes estructurales se pueden identificar por complementación con bibliotecas de plásmidos. Los plásmidos se pueden introducir en las levaduras por replicación de las moléculas o bien, integrándolos en el genoma, donde la transformación del DNA tiene lugar mediante recombinación homóloga. Las secuencias clonadas, así como los plásmidos, pueden integrarse de forma específica en el genoma.

Además, la recombinación homóloga junto con la conversión de genes en la levadura ha llevado al desarrollo de técnicas para la sustitución directa de secuencias de DNA por ingeniería genética en localizaciones normales de cromosomas. Por lo tanto, los genes "wild-type", o incluso aquellos que no tienen mutaciones conocidas

anteriormente, pueden ser sustituidos por alelos alterados. Los fenotipos que surgen después de la interrupción de los genes de levadura han contribuido de manera significativa a la comprensión de la función de ciertas proteínas *in vivo*. Con esta tecnología se ha avanzado en análisis de la regulación de genes, relaciones estructura-función de las proteínas y la estructura cromosómica (Rose and Broach, 1991).

### **1.5. Ventajas del sistema de plásmidos**

Los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena de DNA que aparecen de forma natural en bacterias y actúan como cromosomas accesorios. Estos plásmidos actúan como vectores que se replican de forma automática en el hospedador apropiado. Mediante el uso de enzimas de restricción se puede escindir el vector en un lugar específico para poder insertar un nuevo fragmento de DNA. Los extremos del fragmento deben ser complementarios a los del plásmido escindido, y se unirán mediante la acción de la DNA ligasa.

Su tamaño oscila entre 2 y varios cientos de kilobases. Los plásmidos portan genes para la resistencia a antibióticos, la producción de toxinas y la degradación de productos naturales. A diferencia del genoma del hospedador, son prescindibles bajo ciertas condiciones.

Se pueden obtener biblioteca genómicas mediante la fragmentación del DNA genómico de una determinada especie e insertándolos en vectores, como los plásmidos. Posteriormente, se introducen estos plásmidos en *E. coli*, se propagan de forma masiva, y se extraen mediante lisis alcalina. La propagación puede tener lugar de forma indefinida, y la biblioteca se puede utilizar repetidamente durante largos periodos de tiempo (Rose and Broach, 1991).

Con estas bibliotecas es relativamente sencillo buscar genes que por aumento de dosis génica (las copias presentes en el plásmido) confieran un fenotipo particular.

### **1.6. Plásmidos de levadura**

En el sistema de levadura se emplean tres tipos de construcciones de plásmidos para la obtención de transformantes: YIp (*Yeast Integrative plasmid*), YEp (*Yeast*

*Episomal plasmid*) y YCp (*Yeast Centromeric Plasmid*). Todos los vectores se construyen a partir de plásmidos bacterianos y se pueden seleccionar y propagar en *E. coli*. En levadura se suele emplear como marcadores de selección de los plásmidos genes que corrigen auxotrofías de las cepas de levadura receptoras de los mismos. Los marcadores más comúnmente empleados son *LEU2*, *HIS3*, *URA3* y *TRP1*. Estos vectores contienen su propia secuencia de inicio de la replicación (ARS) en la levadura. Por otro lado, se ha visto, que la presencia de estos ARS en los vectores, aumentan la tasa de transformación en levadura.

La diferencia entre los vectores YEp y YCp con los plásmidos YIp es la presencia de un componente adicional que aporta una mayor estabilidad mitótica y meiótica, y fija el número de copias. Los plásmidos YCp contienen un fragmento centromérico que permite al plásmido anclarse al huso de la célula. Como consecuencia de esto el número de copia de plásmido por célula se ve reducido a 1 o 2, a lo que se le suma una mayor estabilidad que adquiere el plásmido.

Un cultivo *overnight* que contienen plásmidos YCp, en un medio no selectivo, da lugar a un 90-99% de células transformadas. Esto contrasta con el resultado de un 1-5% de células transformadas con plásmido ARS en las mismas condiciones. La estabilidad de los vectores YCp depende en cierto grado del tamaño del plásmido, ya que su estabilidad aumenta a medida que el tamaño del mismo es mayor (Rose and Broach, 1991).

### **1.7. La estrategia de ganancia de función**

Los plásmidos son la herramienta ideal para conseguir ganancia de función de genes ya que la recuperación del plásmido de la colonia de levadura seleccionada por fenotipo de interés es relativamente sencillo. En el presente trabajo hemos escogido una biblioteca hecha en un plásmido centromérico porque al ser el número de copias 1-2 permitirá detectar genes de gran relevancia, aquellos que por solo un pequeño aumento de dosis génica (de 1 a 2-3) consiguen mejorar la tolerancia a ácido acético. Una ventaja de la ganancia modesta de función es que los genes que confieran fenotipo deben ser muy limitantes para el fenómeno considerado. Un gen cuya función no sea limitante no podrá ser seleccionado. La ganancia de función muy



grande como se consigue con los plásmidos YEp, por otra parte, puede dar lugar a artefactos, ya que la producción masiva de una proteína (10-20 veces lo normal) puede hacer que interaccione con otros componentes celulares con los que normalmente no lo hace.

La estrategia de pérdida de función ha sido posible gracias a la colección de mutantes nulos generada por el proyecto genoma de levadura y sus resultados han sido recogidos por Hueso et al. (2012) y aparecen en la Tabla 1 como funciones conocidas. La pérdida de función tiene el problema de la redundancia, ya que si una función depende de varios genes similares, la mutación de uno de ellos no dará fenotipo. En la Tabla 1 se recogen las expectativas de nuestra estrategia de modesta ganancia de función indicando posibles funciones de genes seleccionados. Los genes identificados por pérdida de función también podrían serlo por ganancia de función.

**Tabla 1. Posibles funciones de genes que por un pequeño aumento de dosis génica puedan conferir tolerancia a estrés ácido intracelular causado por ácido acético.** Dichas funciones y genes pueden ser conocidas (ver revisión en Hueso *et al*, 2012) o desconocidas, en este último caso suponiendo un avance en el conocimiento.

<b>Funciones conocidas (identificadas por pérdida de función)</b>	
	Expulsión de acetato
	Toma de K <sup>+</sup>
	Toma de aminoácidos
	Biosíntesis de ergosterol
	de la membrana plasmática
	de la membrana vacuolar
	Tráfico de vesículas
	Glucólisis
	Sensores de pH intracelular (Hal3-Ppz1)
	Reguladores de transportadores (Gcn2)
<b>Funciones conocidas (potenciales)</b>	
	Nuevos sensores de pH intracelular
	Nuevos reguladores de transportadores y ATPasas
	Reguladores de crecimiento

## **2.OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general es utilizar una estrategia de modesta ganancia de función en plásmido centromérico para identificar nuevos genes y funciones en la homeostasis de pH intracelular. Ello se concreta en los siguientes objetivos parciales:

1. Preparar plásmido de una biblioteca de levadura a partir de bacterias.
2. Transformar levadura con el plásmido de la biblioteca y obtener un número adecuado de colonias.
3. Seleccionar colonias de levadura transformada tolerantes a ácido acético, extraer el plásmido de las colonias tolerantes y recomprobar el fenotipo por transformación.

Esta es la parte del proyecto que puede realizarse en el tiempo de realización del TFG. Faltará subclonar cada uno de los genes presentes en el inserto en YCp50 para determinar cuál es el responsable del fenotipo de tolerancia a ácido.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa de *S. cerevisiae* que se ha empleado para la realización de este trabajo es la cepa RS-132, que deriva de la BWG1-7A (Guarente *et al*, 1982; genotipo *MATa ade1-100 his4-519 ura3-52 leu2-3,112::LEU2*) transformándola con un fragmento que contiene el gen *LEU2*. Ello evita que el transporte de leucina sea limitante para la tolerancia a acidificación intracelular (Hueso *et al*, 2012).

#### 3.2. Condiciones de cultivo

En los desarrollos experimentales, las levaduras se hacen crecer entre 28 y 30°C, en medio completo, YPD, o en medio sintético, que puede ser mínimo, SD, o completo SCD (Sherman, 1991). En el caso de utilizar mutantes con requerimientos nutricionales, se suplementan los medios con los nutrientes necesarios.

Todos los medios que se describen a continuación se esterilizan en autoclave durante 20 minutos a 120 °C y 1 atmósfera de presión.

#### 3.3. Medio YPD (*Yeast extract Peptone Dextrose*)

Se trata de un medio de cultivo de uso rutinario que aporta todos los nutrientes que la levadura necesita para su crecimiento. Su composición consiste en 1 % p/v de extracto de levadura, 2 % p/v de peptona bacteriológica y 2 % p/v de glucosa. Se añade 2 % p/v de agar para solidificar el medio.

Se puede añadir 0,003 % p/v de sulfato de adenina para inhibir la reversión de mutaciones *ade1* y *ade2*, y así evitar que las colonias de levadura con estas mutaciones adquieran un color rosado. Este medio se conoce como YPDA.

#### 3.4. Medio Mínimo SD (*Synthetic Dextrose*)

Compuesto por 2 % p/v de glucosa (Dextrosa), 0,7 % p/v de YNB (base nitrogenada para levadura sin aminoácidos), y 50 mM de ácido succínico ajustado a 5,5 con Tris. Este medio se puede suplementar según los requerimientos nutricionales de

cada cepa, con los aminoácidos correspondientes (a una concentración de 30 µg/ml). Se añade 2 % p/v de agar para solidificar el medio.

Por las características de la cepa empleada, para suplir los requerimientos auxotróficos de la misma, las placas se han suplementado con adenina e histidina, o bien, se empleaban placas SCD sin uracilo ni leucina.

### 3.5. Medio Mínimo Completo SCD sin uracilo ni leucina

Se trata de medio SD suplementado con todos los aminoácidos y bases nitrogenadas salvo leucina y uracilo y con adenina pero no uracilo.

### 3.6. Medio LB

El medio LB es un medio complejo estándar para bacterias. Está compuesto por 10 % p/v de Triptona (10 g/l), 0,5 % p/v de extracto de levadura (5 g/l) y 1 % p/v de NaCl (10 g/l, 0,17 M).

### 3.7. Plásmido YCp50

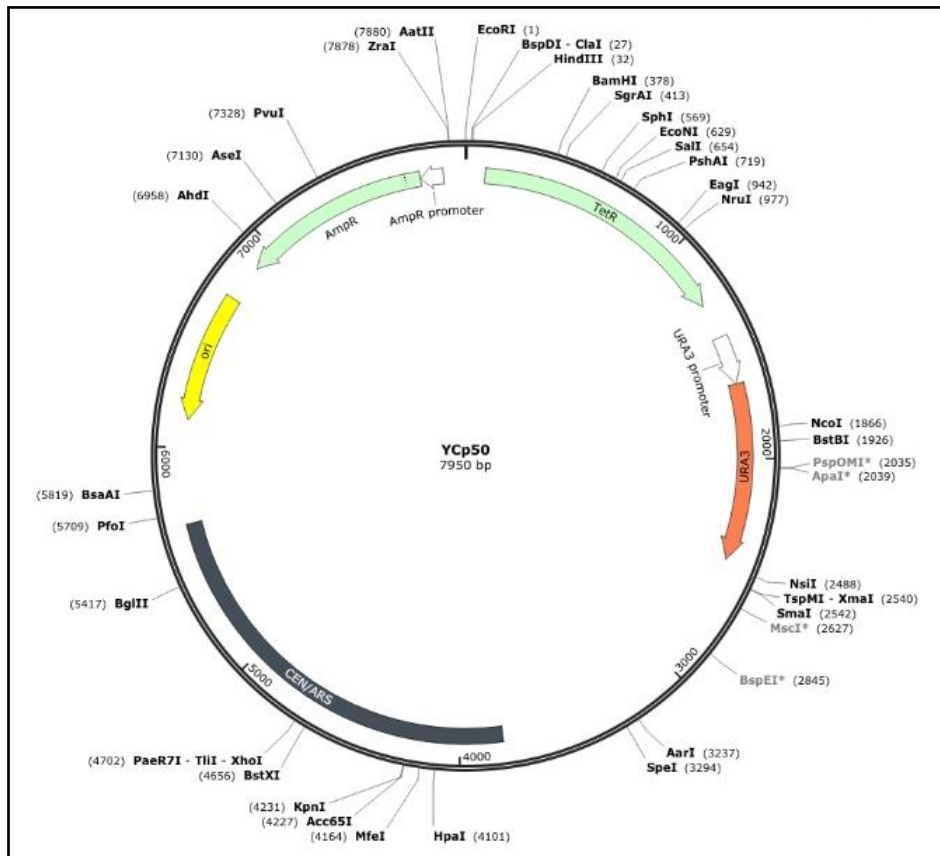
Para transformar la cepa de levadura RS-132 se empleó el plásmido obtenido de la tres bibliotecas genómicas en YCp50 (*Yeast Centromeric plasmid*) construidas por Rose *and* Broach (1991), y que en la colección de Ramón Serrano se nombran como RS-148, RS-149 y RS-150.

Las características de este plásmido aparecen detalladas en la Tabla 2, y el mapa de restricción está reflejado en la Figura 3.

**Tabla 2. Características del plásmido YCp50.**

Nombre	Marcador de levadura	Genes <i>E. coli</i>	Plásmido parental	CEN	Otro DNA	Tamaño (kb)	Sitios de Restricción	Comentarios
YCp50	URA3	<i>amp</i> , <i>tet</i>	pBR322	CEN4	ARSI	8,0	<i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>BamHI</i> , <i>SphI</i> , <i>Sall</i> , <i>NruI</i> , <i>Clal</i>	Derivado de YIp5 mediante inserción de CEN4 y ARSI en el sitio <i>PvuII</i>

El inserto del genoma de levadura se localiza en el sitio *Bam*HI del vector, y se consigue alrededor de un 90% del plásmido con el inserto (Rose and Broach, 1991).



**Figura 3. Mapa de restricción del plásmido YCp50.** Se indica el origen de replicación de bacterias (ori), los genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina para selección en bacterias, el centrómero y origen de replicación de levadura y el gen *URA3* para selección en levadura. Los sitios de corte únicos se indican en negra.

### 3.8. Preparación de plásmidos de la biblioteca de genes de levadura a partir de bacterias

Se empleaba el método de lisis alcalina (Birnboim, 1983) de forma artesanal o utilizando el kit “NucleoSpin Plasmid” de Macherey-Nagel (Düren, Germany) que incorpora una placa de gel de sílice para purificar ácidos nucleicos por unión en presencia de sales caotrópicas.

### 3.9. Preparación de células competentes de levadura

Se empleó el método de Schiestl and Gietz (1989). En un 1 ml de YPD se deja crecer toda la noche células de la cepa de levadura RS-132. Al día siguiente se pasa 200  $\mu$ l de cultivo saturado a 200 ml de YPD (en un matraz de 250 ml).

A la mañana siguiente se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a 660 nm, a una dilución 1:10. Cuando el valor de la densidad óptica (corrigiendo por la dilución) se encuentre entre 1 y 2, se comienza el protocolo de la preparación de células competentes.

Se reparte todo el volumen del cultivo en 4 tubos "Falcon" de 50 ml y se centrifuga 5 minutos a 2000 rpm. El precipitado se resuspende en 5 ml de LiTE (0,1 M de acetato de litio, 10 mM Tris-ClH, 1 mM EDTA, pH 7,6) y se junta el contenido de 2 tubos en 1 sólo. Se centrifuga 5 minutos a 2000 rpm. Se resuspende el precipitado en 0,8 ml de LiTE y se junta el contenido en un tubo "Eppendorff". Se deja incubar durante una hora a 30 °C sin agitación.

Se añaden 400  $\mu$ l de SS DNA 1 % (DNA de esperma de salmón desnaturalizado por calentamiento a 95 °C). Se mide el volumen y se añade  $\frac{1}{4}$  del volumen de suspensión con Glicerol 15 %. Se mezcla bien y se distribuyen las células en alícuotas de 100  $\mu$ l. Se congelan las células a -80°C.

### 3.10. Transformación de *S. cerevisiae*

Se descongela un tubo de células competentes por cada transformación que vaya a realizarse. En el tubo se añaden 0,1 – 1  $\mu$ g de plásmido (equivalente a unos 5  $\mu$ l). Se deja durante 10 minutos en hielo.

Se añaden 600  $\mu$ l de PEG-LiTE al 40 % (9 volúmenes de PEG (polietilenglicol 4000) al 40 % por cada volumen de LiTE x10). Se deja 30 minutos a 30 °C y posteriormente 10 minutos a 42 °C para conseguir un choque térmico. Se centrifuga unos 15 segundos y se elimina aproximadamente 650  $\mu$ l de sobrenadante. Se resuspenden las células con el resto de sobrenadante y se añaden 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MiliQ estéril.



Se extiende todo el contenido del tubo en placas de SCD sin leucina ni uracilo. Al tratarse de una cepa auxótrofa para el uracilo, no se añade este aminoácido para asegurar que las células crecen por haber incorporado el plásmido, y no porque tomen el uracilo del medio. Se deja incubar las placas a 28 °C hasta que se observen colonias (2 días aproximadamente).

### **3.11. Selección de mutantes de sobreexpresión de levadura en ácido acético**

Una vez se ha conseguido transformar la levadura con el plásmido de la biblioteca, se recogen las células de las colonias con agua y se utilizan para seleccionar mutantes resistentes a ácido acético. Para ello se preparan placas de YPDA conteniendo 54 mM acético y 50 mM tampón succínico-Tris pH 3.7. Se extienden unas 10000-20000 células transformadas por la biblioteca y se dejan las placas incubando a 28 °C hasta que aparezcan colonias.

Las colonias que se observan han incorporado el plásmido que les hace capaces de crecer en acético a la concentración indicada. Sin embargo, en algunos casos puede que el fenotipo de tolerancia a acético se deba a mutaciones cromosómicas, por lo que es necesario extraer el plásmido de la levadura (se obtienen pequeñas cantidades), transformar *E. coli* para amplificarlo y transformar levadura para comprobar que confiere el fenotipo.

### **3.12. Extracción de plásmido de levadura**

Se siguió el método de Hoffman y Winston (1987). Las células se rompen agitando con bolas de vidrio en presencia de Triton X-100, SDS, fenol y cloroformo. Se separan las fases por centrifugación y se toman 1-5 µl de la fase superior para transformar *E. coli*.

### **3.13. Transformación de *E. coli***

Se trabaja con células competentes de *E. coli* (cepa DH 5α).

Se parte de tubos que contienen unos 100  $\mu\text{l}$  de células competentes. Las células se descongelan a temperatura ambiente y se mantienen en hielo. A estas células se les añade el plásmido que se ha extraído con anterioridad de las células de levadura (entre 2 y 10  $\mu\text{l}$ ). La mezcla se coloca en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se aplica un choque térmico, que consiste en colocar la mezcla a 42  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos.

Se agregan 250  $\mu\text{l}$  de medio LB y se coloca el tubo a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Finalmente, se entien de todo el contenido en placas de LB con ampicilina, ya que el plásmido obtenido tiene el gen de resistencia a este antibiótico. Las placas se dejan a 37  $^{\circ}\text{C}$  hasta que aparezcan colonias (aproximadamente 1 día).

### **3.14. Minipreparación de plásmido**

Se realizaron utilizando el kit “NucleoSpin Plasmid” de Macherey-Nagel (Düren, Germany) mencionado anteriormente.

### **3.15. Digestión del plásmido**

Para la digestión del plásmido se prepara en un tubo una mezcla que contenga 13  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 2  $\mu\text{l}$  de tampón KAB (1 M acetato potásico, 0,2 M Tris-acético pH 7,6, 0,1 M acetato de magnesio y 10 mM ditiotreitól) a una concentración 10x, 2  $\mu\text{l}$  de BSA (albúmina de suero bovino libre de DNasas, 1 mg/ml) a una concentración 10x, 1  $\mu\text{l}$  de la enzima de restricción *HindIII* (10 unidades/  $\mu\text{l}$ ), y 3  $\mu\text{l}$  de la minipreparación de plásmido. Se incuba durante aproximadamente 1 hora a 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Pasado el tiempo de digestión se aplican 4  $\mu\text{l}$  de tampón de carga (40 % sacarosa, 0,25 % azul de bromofenol y 0,1 M EDTA) a una concentración 6x para parar la reacción enzimática.

### **3.16. Electroforesis**

Una vez se ha digerido el plásmido, se pasa a la comprobación mediante electroforesis con el fin de observar que aparece un patrón de bandas equivalente al correspondiente según los sitios de corte de la enzima utilizada.

El gel que se ha empleado es un gel de agarosa a una concentración del 0,7 %. El gel se coloca en una cubeta de electroforesis sumergido en buffer de electroforesis TBE x 0.5 (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA). Las muestras de DNA se colocan en los pocillos de uno de los extremos del gel, así como un patrón de pesos moleculares ( $\lambda$ -HindIII) que servirá posteriormente para ver el tamaño de los fragmentos y calcular la concentración del plásmido. Al aplicarse la corriente eléctrica, las moléculas de DNA migran a través del gel en función de su tamaño, desde el polo negativo, al polo positivo.

Tras la electroforesis, se procede a visualizar mediante tinción los fragmentos de DNA separados. En este caso, se emplea bromuro de etidio, que se intercala entre las bases del DNA y emite fluorescencia bajo la luz ultravioleta.

### **3.17. Recomprobación de fenotipo**

Una vez se tiene el plásmido purificado, se utiliza para volver a transformar las células competentes de levadura y recomprobar el fenotipo resistente a acético mediante réplicas en placa.

Las colonias de levadura transformadas están extendidas en placas de SCD menos uracilo y leucina. Cuando las colonias han crecido, se procede a hacer un cultivo en medio líquido con las mismas auxotrofías. Cuando el cultivo líquido ha crecido hasta la saturación (24 h), se mide la densidad óptica o absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro tras diluir 0,1 ml de cultivo con 0,9 ml de agua, resultando un valor de 0,3-0,4 (tras corregir por la dilución entre 3 y 4). Una unidad de absorbancia equivale a  $13 \times 10^6$  células/ml, por lo que los cultivos saturados tienen  $4-5 \times 10^6$  células/ml. Para hacer la réplica, se emplea una placa multipocillo que contiene 200  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O en cada uno de los pocillos que se van a emplear. Para ello, es conveniente realizar un esquema del contenido de cada uno de los pocillos. Se realizan dos diluciones de cada cultivo: la primera (1/40), diluyendo 5  $\mu$ l en 200  $\mu$ l y la segunda (1/360) diluyendo 25  $\mu$ l de la primera en 200  $\mu$ l de agua.

Cuando las diluciones están preparadas, se pasan las células a las placas de SD con adenina, histidina, y ácido acético, utilizando para ello un replicador de acero

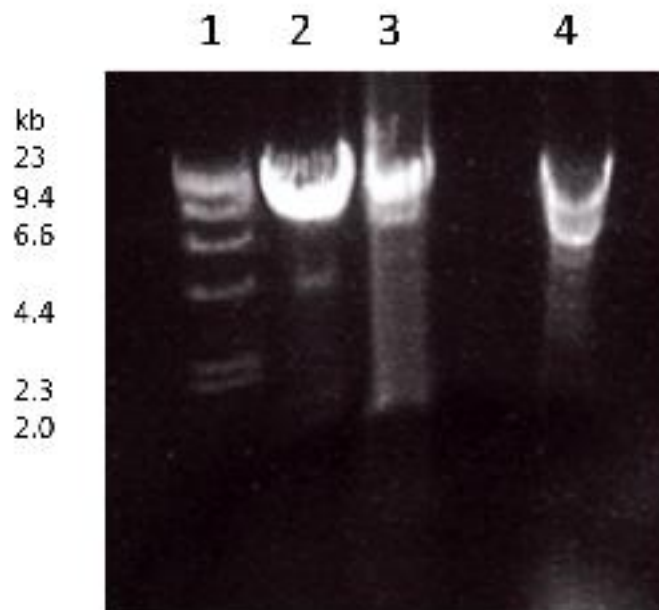
previamente esterilizado y que deposita gotas de unos 3  $\mu$ l. Por tanto, la cantidad de células que se deposita es de 300 y 33 por gota 1/40 y 1/360, respectivamente. las placas se dejan en posición normal hasta que se absorban las gotas y luego en posición invertida a 28 °C hasta que se observe crecimiento.

## **4.RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Preparación de plásmidos de la biblioteca de genes de levadura a partir de bacterias

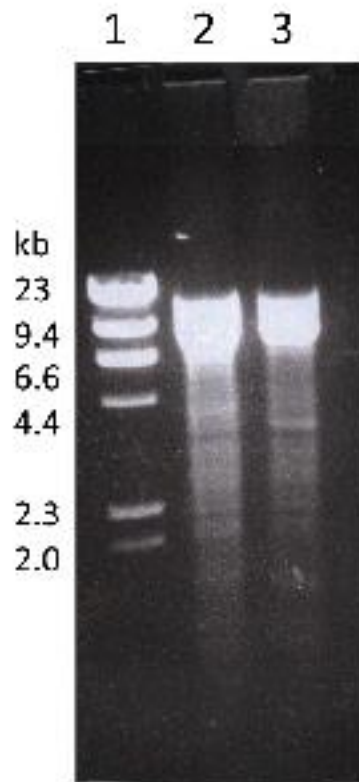
La biblioteca genómica de levadura en el plásmido YCp50 se obtuvo en forma de bacterias transformadas en tres remesas y lo primero que hicimos fue preparar plásmido purificado de la biblioteca y del plásmido YCp50 vacío como control. Para ello las cepas bacterianas RS-148, 149 y 150 (bacterias con plásmido de biblioteca genómica) y RS-140 (bacterias con YCp50, plásmido utilizado para la biblioteca sin inserto) de la colección de Ramón Serrano guardadas en 15% glicerol a -80 °C se sembraron en placas de LB con ampicilina y al día siguiente se utilizaron para inocular cultivos líquidos que tras crecer por la noche permitieron purificar plásmidos en gran escala por el método de la lisis alcalina. En la Figura 4 se muestra el análisis de una alícuota de 2 µl de los plásmidos por electroforesis tras digerir con *Bam*HI.



**Figura 4. Análisis de los plásmidos YCp50 y de la biblioteca genómica por electroforesis.** Carril 1: Patrón de DNA de fago lambda digerido con *Bam*HI. Carril 2: digestión del plásmido pRS-140. Carril 3: digestión del plásmido pRS-148. Carril 4: digestión del plásmido pRS-150. El carril vacío se corresponde con la digestión del plásmido pRS-149, pero la extracción de dicho plásmido no fue efectiva.

La cuantificación de los plásmidos se basa en la comparación con los patrones, cuyas bandas contienen 180, 78, 54, (no), 19 y 16 ng. La banda de 4,4 kb no se usa para cuantificar porque es cohesiva con la de 23 kb. La cantidad aproximada de DNA que estimamos en los carriles 2, 3 y 4 es 600, 360 y 260 ng. Como estas cantidades corresponden a 2  $\mu$ l de preparación de plásmido, las concentraciones estimadas son 300, 180 y 130 ng/ $\mu$ l y las cantidades totales aproximadas (80  $\mu$ l de volumen final de cada preparación) son 24, 14 y 10  $\mu$ g. En los carriles 3 y 4 se observa un continuo de bandas de DNA correspondientes a los fragmentos genómicos con *Bam*HI

En la Figura 5 se muestra otra preparación de plásmidos de la biblioteca genómica tras digerir una alícuota de 2  $\mu$ l con *Hind*III.



**Figura 5. Análisis de plásmidos de biblioteca genómica por electroforesis.** Carril 1: Patrón de DNA de fago lambda digerido con *Hind*III. Carril 2: digestión del plásmido pRS-148. Carril 3: digestión del plásmido pRS-149.

En este caso la cantidad de DNA en las bandas del patrón fue 360, 156, 108, (no), 38 y 32 ng. La cantidad aproximada de DNA que estimamos en los carriles 2 y 3 es

600 y 400 ng. Como estas cantidades corresponden a 2 µl de preparación de plásmido, las concentraciones estimadas son 300 y 200 ng/µl. La cantidad total de plásmido obtenido (80 µl volumen final) fue 24 y 16 µg. En los carriles 2 y 3 se observa un continuo de bandas de DNA correspondientes a los fragmentos genómicos con *HindIII*.

#### **4.2. Cálculo del número de clones transformados de levadura necesarios para tener representación de todo el genoma**

Nuestro abordaje experimental se basa en un aumento de dosis génica de fragmentos del genoma de levadura en una colección de células transformadas del tamaño suficiente para tener todo el genoma representado. A continuación esta colección se rastreará para identificar clones con mayor tolerancia a ácido acético que la levadura control. La pregunta es: ¿qué tamaño ha de tener la biblioteca?. Esta pregunta vale tanto en el momento de generarla por ligamiento de fragmentos genómicos con el plásmido como al obtener colonias de levadura.

El tamaño de una biblioteca se calcula con la distribución de Poisson según la ecuación desarrollada por Clarke and Carbon (1972):

$$N = \frac{\log(1 - p)}{\log\left(1 - \frac{y}{x}\right)}$$

Donde “N” es el número de clones, “p” la probabilidad de contener un fragmento determinado, “x” el tamaño de inserto e “y” el tamaño del genoma haploide. Para un 99% de probabilidad de que cualquier fragmento esté contenido en la biblioteca esta ecuación se simplifica en (Kaiser and Murray, 1985):

$$N \approx 5\left(\frac{y}{x}\right)$$

Los insertos de nuestra biblioteca genómica están en torno a 10-15 kb y el 90 % de los plásmidos contienen inserto. El genoma de levadura es de 12000 kb, por lo que harían falta unos 5000 clones para tener buena representación de todo el genoma. La



biblioteca en *E. coli* tenía un total de 10000 clones, el doble de lo requerido. Por otra parte, necesitaríamos un mínimo de 5000 colonias transformadas de levadura para tener una buena representación.

### 4.3. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con los plásmidos de la biblioteca genómica

A continuación se transformó la cepa de levadura RS-132 con los plásmidos de la biblioteca genómica preparados anteriormente. Con células competentes recién hechas, sin congelar con glicerol, la eficiencia de transformación es de varios miles de colonias por cada microgramo de plásmido. Esta eficiencia cae hasta 10 veces al congelarlas. Los resultados de la transformación se recogen en la Tabla 3.

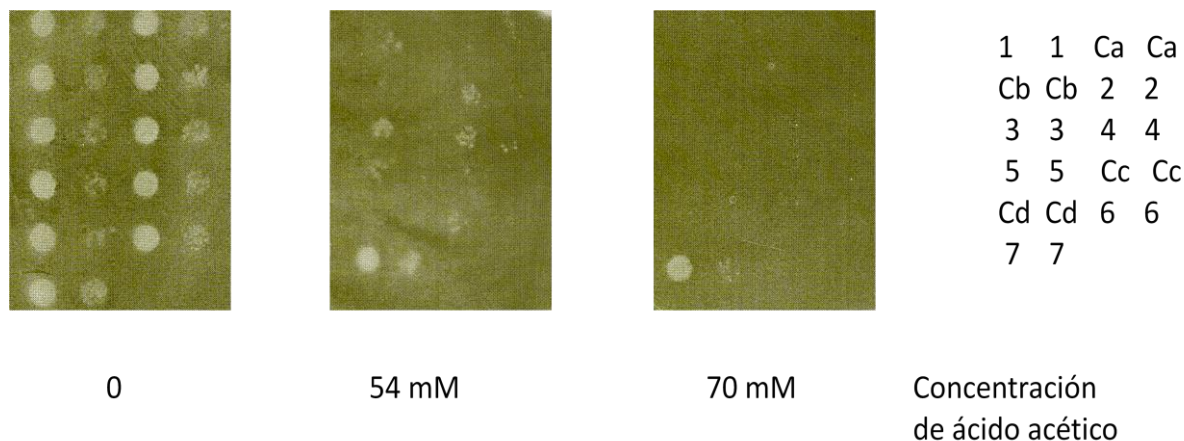
**Tabla 3. Resultado de la transformación de la cepa de levadura RS-132 con los plásmidos de la biblioteca genómica pRS-148 y pRS-149 de la Figura 5 (no digeridos).** Se utilizaron 0.3 µg de pRS-148 y 0.5 µg de pRS-149 en cada tubo de transformación que se extendía luego en una placa de medio selectivo sin uracilo. Cada línea corresponde a un tubo de transformación.

Tubo	Plásmido	Número de transformantes en placa
1	ninguno	0
2	pRS-148	607
3	pRS-148	1480
4	pRS-148	1000
5	pRS-148	1240
6	pRS-149	960
7	pRS-149	1328
8	pRS-149	2648
9	pRS-149	1900
10	pRS-149	2400

En total se recogieron células de unas 15000 colonias y se resuspendieron en agua para realizar la selección por tolerancia a ácido acético.

#### 4.4. Selección de mutantes resistentes a acético

Tras extender en placas con 54 mM acético unas 20000 células transformadas con la biblioteca e incubar durante 6 días, se obtuvieron 7 colonias que eran candidatos a mutantes resistentes. Estas colonias se crecieron para comprobar su fenotipo en ensayos de crecimiento de gotas (Figura 6).

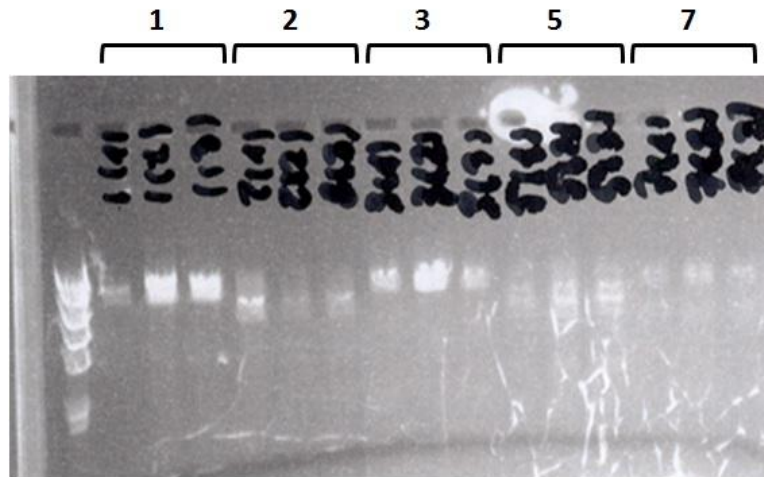


**Figura 6. Comprobación por crecimiento de gotas de 7 candidatos tolerantes a ácido acético (numerados 1 a 7) junto a 4 controles de levadura transformada con plásmido sin inserto (nombrados Ca a Cd).** Cada cultivo líquido saturado daba lugar a dos diluciones con unas 300 (izquierda) y 30 (derecha) células. A la derecha aparece un esquema con la posición de cada cepa. Las placas se habían incubado 4 días a 28 °C.

El candidato 7 es el más tolerante a 54 mM acético, seguido de 2, 3 y 4 y a cierta distancia de 1, 5 y 6. Los controles no crecían en absoluto. Es de destacar que el candidato 7 resistía hasta 70 mM acético.

#### 4.5. Aislamiento de los plásmidos de los candidatos y retransformación

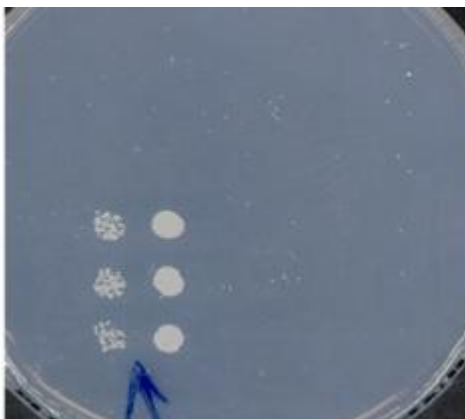
Se extrajo plásmido de los 7 candidatos y se transformó la cepa bacteriana DH5 $\alpha$ , obteniéndose colonias de todos menos de los números 4 y 6. Se extrajo plásmido de tres colonias bacterianas de cada candidato y se analizó tras digerirlo con *Hind*III, apareciendo el resultado en la Figura 7.



**Figura 7. Digestión con *Hind*III de plásmido extraído de bacterias transformadas con el plásmido de las cepas de levadura candidatas 1, 2, 3, 5 y 7. A la izquierda el patrón de DNA de fago lambda digerido con *Hind*III como en las figuras 4 y 5.**

Puede observarse que los tres plásmidos de cada candidato dan un patrón similar y que el plásmido del candidato 7 se extrae en pequeña cantidad en las tres réplicas.

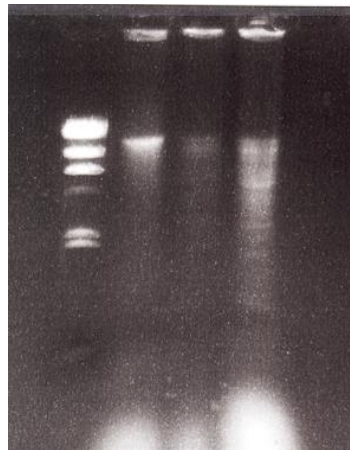
A continuación se transformó la levadura RS-132 con estos plásmidos y se comprobó la tolerancia a acético en tres colonias de cada plásmido. El resultado del crecimiento en placa con 54 mM acético aparece en la Figura 8. Como puede apreciarse solamente el plásmido del candidato 7 reproducen el fenotipo y por tanto su fenotipo dependía del plásmido. Los otros candidatos debían corresponder a mutaciones cromosómicas.



5b	5b	2c	2c	1a	1a
5c	5c	Cb	Cb	1b	1b
Cc	Cc	3a	3a	1c	1c
7a	7a	3b	3b	Ca	Ca
7b	7b	3c	3c	2a	2a
7c	7c	5a	5a	2b	2b

**Figura 8. Comprobación por crecimiento de gotas de levadura transformada con plásmidos de los candidatos 1, 2, 3, 5 y 7** (tres colonias de cada uno: a, b y c) **y controles con levadura transformada con plásmidos sin inserto** (Ca, Cb y Cc). Cada cultivo líquido saturado daba lugar a dos diluciones con unas 300 (derecha) y 30 (izquierda) células. A la derecha aparece un esquema con la posición de cada cepa. Las placas se habían incubado 4 días a 28 °C.

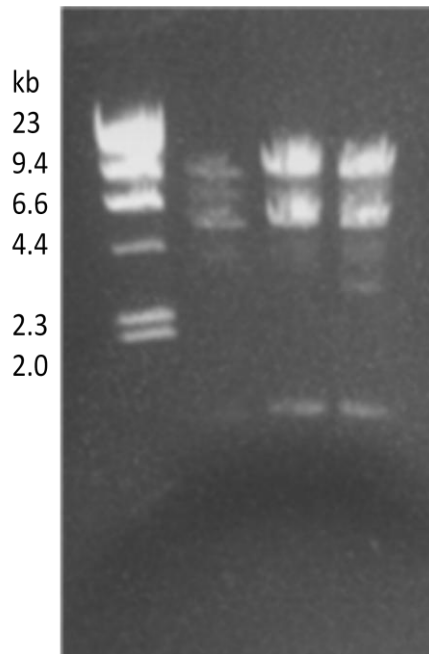
Finalmente se hicieron nuevas extracciones de plásmido 7 para mejorar la digestión de la Figura 7. Nunca se pudo obtener más de 10 ng/ $\mu$ l tras la lisis alcalina de 100 ml de cultivo y resuspensión final en 80  $\mu$ l. Con otros plásmidos siempre se obtienen más de 100 ng/ $\mu$ l, un rendimiento de por lo menos 10 veces mayor. Se volvió a digerir con *Hind*III y el resultado aparece en la Figura 9.



**Figura 9. Digestión del plásmido 7 con *Hind*III.** El primer carril de la izquierda es el patrón de lambda digerido con *Hind*III como en las figuras 4 y 5. El siguiente es el plásmido sin digerir y los dos carriles siguientes son dos cantidades de plásmido digerido.

El plásmido 7 parece tener varias bandas tras digestión con *Hind*III: una alrededor de 10 kb, otra de 5 kb y dos más pequeñas de unos 3 y 2 kb, aunque habría que mejorar la preparación de plásmido para tener un mapa de restricción más fidedigno.

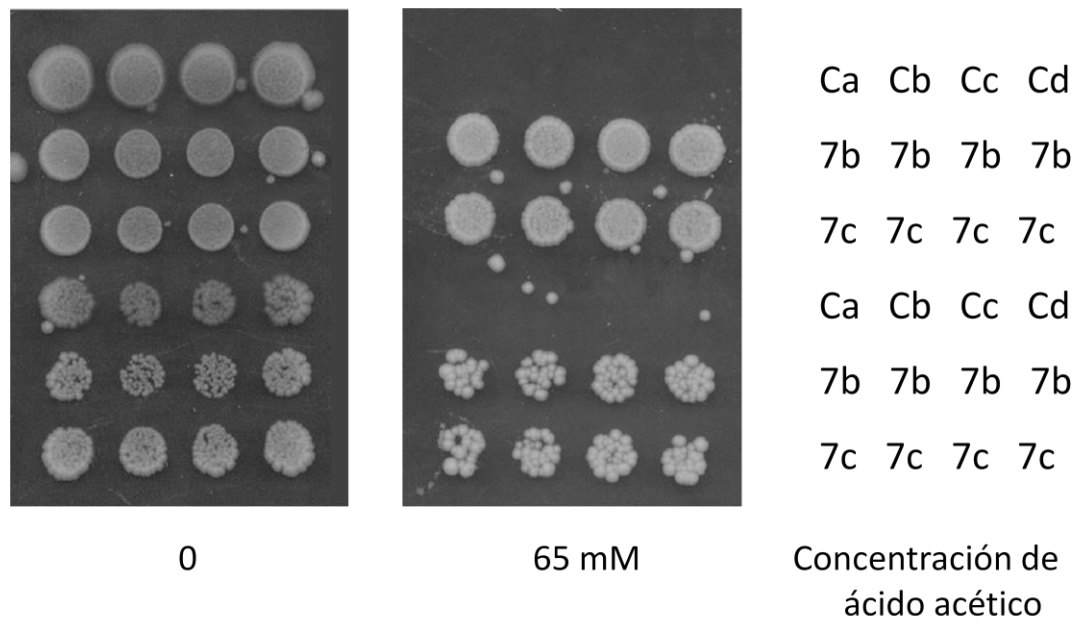
Se llevó a cabo una nueva extracción de plásmido siete utilizando en este caso el kit “NucleoSpin Plasmid” para intentar mejorar los resultados anteriores. Se hicieron tres preparaciones y se digirieron con *Hind*III según se muestra en la Figura 10.



**Figura 10. Digestión con *Hind*III del plásmido 7 purificado con el kit “NucleoSpin Plasmid”.** El primer carril de la izquierda es el patrón de lambda digerido con *Hind*III. Los tres siguientes son las tres preparaciones del plásmido 7 digerido.

Se consiguió extraer una concentración final de 70 ng/ $\mu$ l aproximadamente, superando de forma significativa la extracción mediante el método manual. Se observaron tres bandas tras la digestión con *Hind*III: una alrededor de 12 kb, otra de 5 kb y una más pequeña de 1 kb.

A continuación se transformó de nuevo la levadura RS-132 para recomprobar el fenotipo y ver si realmente la levadura transformada con el plásmido crecía en 65 mM de ácido acético, utilizando como control la cepa RS-132 transformada con el plásmido YCp50 sin inserto (RS-140). El resultado se muestra en la Figura 11.



**Figura 11. Comprobación por crecimiento en gotas de levadura transformada con el plásmido 7 purificado mediante el kit "NucleoSpin Plasmid".** La primera y cuarta fila se corresponden con los controles (RS-140). Las filas 2, 3, 5 y 6 se corresponden con la cepa RS-132 transformadas con el plásmido 7. Cada cultivo saturado daba lugar a dos diluciones con unas 300 células (primeras tres filas) y 30 (últimas tres filas). A la derecha aparece un esquema con la posición de cada cepa. Las placas se habían incubado 5 días a 28 °C.

## **5.DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

El presente trabajo puede considerarse como un primer intento de encontrar nuevos genes determinantes de la homeostasis de pH intracelular. Al acidificar el interior de las células con ácido acético es de esperar que la sobreexpresión modesta en plásmidos centroméricos (2-3 copias del gen por célula) de genes importantes para tolerar acidificación permitirá crecer a la levadura transformada.

En nuestro trabajo solamente hemos podido encontrar 1 plásmido de la biblioteca genómica con estas características, al que hemos llamado plásmido 7. Se trata de un plásmido muy difícil porque parece existir en *E. coli* en muy pocas copias ya que las preparaciones con métodos tradicionales dan un rendimiento muy bajo. Ello podría explicarse si expresase en la bacteria alguna proteína tóxica. Utilizando el sistema de adsorción a gel de sílice en presencia de sales caotrópicas la purificación del plásmido 7 ha mejorado sustancialmente.

Trabajos recientes del laboratorio han permitido secuenciar el inserto del plásmido 7 y contiene tres genes de levadura que son candidatos para explicar el fenotipo de tolerancia a acidificación intracelular. Para ello habrá que subclonar en el plásmido YCp50 por separado cada uno de estos genes (tras amplificarlos por PCR), transformarlos en levadura y comprobar cuál de ellos confiere tolerancia a ácido acético.

La estrategia utilizada parece funcionar aunque solamente cuando se llegue a un gen que confiera tolerancia a acético se podrá concluir definitivamente su utilidad.



## **6.CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1. Con la biblioteca utilizada (90% de plásmidos con inserto y tamaño de insertos en torno a 10-15 kb) se ha calculado que hacen falta 5000 clones para una buena representación del genoma. Hemos obtenido 15000 colonias de levadura transformada por lo que estamos por encima del requerimiento.
2. En un primer rastreo de la biblioteca se han seleccionado 7 candidatos (colonias de levadura transformada).
3. Solamente uno de los 7 candidatos contiene un plásmido (plásmido 7) que al extraerlo y retransformar reproduce el fenotipo. Los otros 6 deben corresponder a mutaciones cromosómicas que confieren tolerancia a acético independientemente del plásmido que contienen las levaduras.
4. El plásmido positivo o 7 existe en un número de copias muy bajo en *E. coli* porque se extrae con bajo rendimiento.
5. La estrategia utilizada parece prometedora para descubrir nuevos genes importantes para la homeostasis del pH intracelular.

## **7.BIBLIOGRAFÍA**

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2002) Biochemistry, Fifth Edition, WH Freeman and Company, New York. Chapter 3, pp 41-76
- Birboim HC (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 100, 243-255.
- Clarke L, Carbon J. (1976) A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9, 91-99.
- Guarente L, Yocum RR, Gifford P (1982) A Gal10–CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 7410–7414
- Hoeberichts FA, Perez-Valle J, Montesinos C, Mulet JM, Planes MD, Hueso G, Yenush L, Sharma SC, Serrano R (2010) The role of K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport systems during glucose- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27, 713-725.
- Hoffman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomously plasmid for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57, 267-272.
- Holyoak CD, Stratford M, McMullin Z, Cole MB, Crimmins K, Brown AJP, Coote PJ (1996) Activity of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3158-3164
- Hueso G, Aparicio-Sanchis R, Montesinos C, Lorenz S, Murguía JR, Serrano R (2012) A novel role for proteína kinase Gcn2 in yeast tolerante to intracellular acid stress. *Biochem J* 441, 255-2647

- Kaiser K, Murray NE (1985) The use of phage lambda replacement vectors in the construction of representative genomic libraries. In "DNA Cloning" Vol. I, Glover DM editor, IRL Press, Oxford, pp. 1-47.
- McPherson N, Shabala L, Rooney H, Jarman MJ, Davies JM (2005) Plasma membrane H<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiol.* 151, 1995-2003
- Mollapour M, Piper PW (2007) Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fpd1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6446-6456
- Rose MD, Broach JR (1991) Cloning genes by complementation in yeast. *Methods Enzymol.* 194, 195-230
- Schiestl RH and Gietz RD (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16, 339-46
- Serrano R (1991) Transport across yeast vacuolar and plasma membrane. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics* (Broach JR, Pringle JR, Jones EW, eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 523-585
- Sherman F (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194, 3-21
- Yenush L, Merchan S, Holmes J, Serrano R (2005) pH-responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8683-8692
- Primo Yufera E (1997) *Química de los alimentos*. Editorial Síntesis. Madrid. Capítulo 13, pp 409-448