



Clonación del gen KIABF2 en plásmidos de expresión para Saccharomyces cerevisiae

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y
GENÉTICA



Trabajo Fin de Máster

Autor: Gonzalo Castro Vila

Directoras: Esperanza Cerdán Villanueva

Mónica Lamas Maceiras



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR Y GENÉTICA

“Clonación del gen *KIABF2* en plásmidos de expresión para *Saccharomyces cerevisiae*”

“Clonación do xene *KIABF2* en plásmidos de expresión para *Saccharomyces cerevisiae*”

“Cloning of the gene *KIABF2* in expression plasmids for *Saccharomyces cerevisiae*”

Dras. ESPERANZA CERDAN VILLANUEVA y MÓNICA LAMAS MACEIRAS, Profesoras del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidad de A Coruña,

INFORMAN:

Que el presente Trabajo Fin de Máster presentado por Gonzalo Castro Vila, Licenciado en Biología, ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, damos el Visto Bueno para su presentación al Tribunal Calificador.

A Coruña, 17 de junio de 2014

Fdo.: Mónica Lamas Maceiras

Fdo.: Esperanza Cerdán Villanueva

ÍNDICE

Introducción	2
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Kluyveromyces lactis</i>	2
2. Gen <i>ABF2</i>	3
3. Objetivos	5
Materiales y métodos	6
1. Cepas	6
1.1. Cepas bacterianas	6
1.2. Cepas de levaduras	6
2. Vectores	7
3. Medios de cultivo	8
3.1. Para bacterias	9
3.2. Para levaduras	10
4. Técnicas de Biología Molecular	11
4.1. Obtención, amplificación y purificación de ADN	11
4.2. Construcción de los plásmidos	16
4.3. Transformación de bacterias y levaduras	17
4.4. Electroforesis en geles de agarosa	18
5. Herramientas bioinformáticas	19
Resultados y discusión	20
1. Construcción de los plásmidos recombinantes	21
a. Obtención de las ORFs del gen <i>ABF2</i> de <i>S. cerevisiae</i> y de <i>K. lactis</i>	21
b. Construcción de los plásmidos <i>YCplac33+ScABF2</i> e <i>YEplac195+ScABF2</i>	23
c. Construcción de los plásmidos <i>YCplac33+KIABF2</i> e <i>YEplac195+KIABF2</i>	27
2. Ensayos fenotípicos y discusión de los resultados	31
3. Conclusión	32
Bibliografía	35
Abreviaturas	36

1. *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*

Saccharomyces cerevisiae es una levadura, ampliamente estudiada por su gran gama de aplicaciones en la industria panadera y vitivinícola. Pero igual o mayor interés tiene su utilización en el laboratorio como organismo modelo para el estudio de la célula eucariota, tanto por las ventajas que ofrece su manipulación (es unicelular, tiene un rápido crecimiento, es fácil de cultivar y de transformar) como por haber sido el primer organismo eucariota en ser secuenciado completamente en el año 1996 (Goffeau *et al.* 1996).

Por su parte, *Kluyveromyces lactis* es también una levadura de elevado interés biotecnológico, muy utilizada en estudios genéticos y en aplicaciones industriales. Como característica especial destaca que es capaz de asimilar lactosa y convertirla en ácido láctico que es un producto con un amplio rango de aplicaciones en la industria alimenticia, química, farmacéutica y cosmética, entre otras. Su genoma también está completamente secuenciado desde el año 2004 (Dujon *et al.* 2004).

S. cerevisiae y *K. lactis* pertenecen a la familia *Saccharomycetaceae*. Su proximidad evolutiva es tal que *K. lactis* anteriormente se denominaba *Saccharomyces lactis*. Aun así, existen diferencias significativas entre ambas, sobre todo si hablamos de aspectos metabólicos. *S. cerevisiae* tiene un metabolismo fundamentalmente fermentativo, tanto es así, que aun en condiciones de aerobiosis, esta levadura fermenta la fuente de carbono del medio para producir energía para su crecimiento. El único momento en el que *S. cerevisiae* cambia su metabolismo fermentativo a un metabolismo respiratorio es cuando en el medio se agota la fuente de carbono fermentable (ej. glucosa, fructosa, etc.) y sólo quedan fuentes de carbono no fermentables (ej. etanol, glicerol, etc.) para la producción de energía (Dejean *et al.* 2000). En contraposición a *S. cerevisiae*, *K. lactis* posee un metabolismo fundamentalmente respiratorio, es decir, sea cual sea la fuente de carbono que haya en el medio, *K. lactis* la degradará por la vía respiratoria siempre y cuando exista O₂ suficiente para llevar a cabo la respiración. Si no hay suficiente O₂ en el medio, *K. lactis* tornará su metabolismo respiratorio en metabolismo fermentativo (González-Siso *et al.* 2000).

Todo lo expuesto anteriormente tiene su importancia en los procesos biotecnológicos a nivel industrial. Teniendo en cuenta la gran cantidad de productos que se generan en los procesos biotecnológicos, es necesario optimizar al máximo su producción ya sea minimizando costes, implementando la producción o disminuyendo el tiempo de la misma. Por ello, a veces, el

metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* es contraproducente, porque a menudo es necesaria la generación de una gran cantidad de biomasa por parte del organismo. Mediante el metabolismo respiratorio la levadura genera una mayor cantidad de biomasa partiendo de la misma cantidad de nutrientes. Es por esto que organismos que tengan un metabolismo fundamentalmente respiratorio (como *K. lactis*) aseguran una mayor rendimiento biotecnológico, y por ende económico.

2. Gen *ABF2*

Aunque el ADN mitocondrial (*mtADN*) de las levaduras no contiene histonas, si está empaquetado en *complejos de ADN-Proteínas* conocidos como *nucleoides mitocondriales* (Miyakawa *et al.* 1995). Se han descrito cerca de 30 proteínas como posibles componentes de estos nucleoides mitocondriales entre los que se encuentran no solo factores que intervienen en replicación y transcripción de ADN, sino también proteínas estructurales para el mantenimiento de los nucleoides (Chen y Butow, 2005). Los principales componentes de los nucleoides mitocondriales son las proteínas que pertenecen al grupo denominado *de alta movilidad electroforética* (en inglés, *high mobility group – HMG*) (Kuroiwa, 1982). A este grupo pertenece la proteína de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Kluyveromyces lactis* denominada *Abf2p*, que es el producto del gen de estudio en este trabajo experimental. *Abf2p* es una proteína de unión al ADNmt involucrada en la replicación, la recombinación, la expresión y el mantenimiento del genoma mitocondrial (Newman, 1996). En *S. cerevisiae* una cepa $\Delta abf2$ (nula para el gen *ABF2*) que crece en un medio fermentable pierde rápidamente el ADNmt. En un medio con fuente de carbono no fermentable, se genera una presión selectiva que impide la pérdida de las mitocondrias, pero aun así las células experimentan una disminución de crecimiento (Yoon *et al.* 2011).

En *Kluyveromyces lactis*, objeto de estudio en este trabajo experimental, existe una pauta abierta de lectura (ORF) denominada *KLLA0F01485g* que muestra similitud de secuencia con el gen *ABF2* de *S. cerevisiae* según se recoge en la base de datos Genolevúres (<http://genolevures.org>). Cuando se comparan las proteínas de ambas levaduras se comprueba, al hacer un alineamiento entre ellas por el programa BLAST accesible desde la propia base de datos, que existe entre ellas un 33% de identidad de aminoácidos y una similitud que aumenta hasta el 55% si se consideran sustituciones entre aminoácidos equivalentes. En el proceso evolutivo muchas funciones nuevas se generan mediante previa duplicación de los genes que posteriormente se especializan. Una duplicación del genoma completo (WGD), sucedió en la evolución de las

levaduras cuando se produjo la adaptación al metabolismo fermentativo (Wolfe y Shields, 1997). De hecho muchos genes que en *K. lactis* no están duplicados muestran dos o más copias evolutivamente relacionadas en *S. cerevisiae*. Por estos motivos aunque entre dos genes de *S. cerevisiae* y *K. lactis* exista similitud de secuencia, eso no significa que exista una homología funcional, ya que pueden haber derivado de un ancestro común para terminar codificando proteínas con distinta función. En este trabajo nos propusimos averiguar si el gen de *K. lactis* identificado por la ORF *KLLA0F01485g* es un homólogo funcional del gen *ABF2* de *S. cerevisiae*.

3. OBJETIVOS

El objetivo final de este trabajo es comprobar si existe homología funcional entre los genes *ABF2* de *S. cerevisiae* y *KLLA0F01485g* de *K. lactis*. Para evitar problemas que no sean causados por la diferencia existente entre la estructura/función de la proteínas en ambas levaduras, sino que pudieran deberse a diferencias en la expresión de los genes, decidimos complementar la mutación $\Delta abf2$ de *S. cerevisiae* únicamente con la región codificante del gen de *K. lactis* pero utilizando las regiones promotoras y terminadoras propias del gen *ABF2* de *S. cerevisiae*.

Los objetivos concretos se han desglosado del siguiente modo:

1. Obtención de las construcciones necesarias para expresar la proteína codificada por *KLLA0F01485g* de *K. lactis* en *S. cerevisiae*.
2. Transformación de las cepas de *S. cerevisiae* y selección de levaduras que contengan los plásmidos necesarios para el ensayo de complementación.
3. Comprobación, mediante el análisis de los fenotipos de los transformantes, de la existencia o no de complementación funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas

1.1. Cepas Bacterianas

XL1-Blue (Stratagene®): cepa de *Escherichia coli* utilizada para la construcción y multiplicación de los plásmidos.

Genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]*

1.2. Cepas de levaduras

BY4742 (Euroscarf®): cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada para la obtención del ADN genómico utilizado como molde para la PCR para obtener el gen *ScABF2*. También se utilizó como control para realizar los ensayos fenotípicos.

Genotipo: *MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0.*

Y16205 ($\Delta abf2$) (Euroscarf®): cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* (gen *ABF2* delecionado) utilizada para realizar los ensayos fenotípicos.

Genotipo: *MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0 YMR072w::kanMX4*

SAY529 (Dr. S. Carter): cepa de *Kluyveromyces lactis* para la obtención del ADN genómico utilizado como molde obtener el gen *KLABF2*.

Genotipo: *MAT α ade1 trp1 leu2 metA1 urnA1 nej1:: hisG.*

BJ3505 (Sigma-Aldrich®): cepa huésped de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizada para la construcción de los plásmidos por recombinación.

Genotipo: *MAT α pep4::HIS3 prb1- Δ 1.6R lys2-208 trp1- Δ 101 ura3-52 gal2 can*

2. Vectores

YCplac33 (*ori ampr CEN4/ARS1 URA3*) (Gietz y Sugino, 1988) (Figura 1): plásmido centromérico en el que se clonará el gen *ABF2* tanto de *S. cerevisiae* como de *K. lactis*.

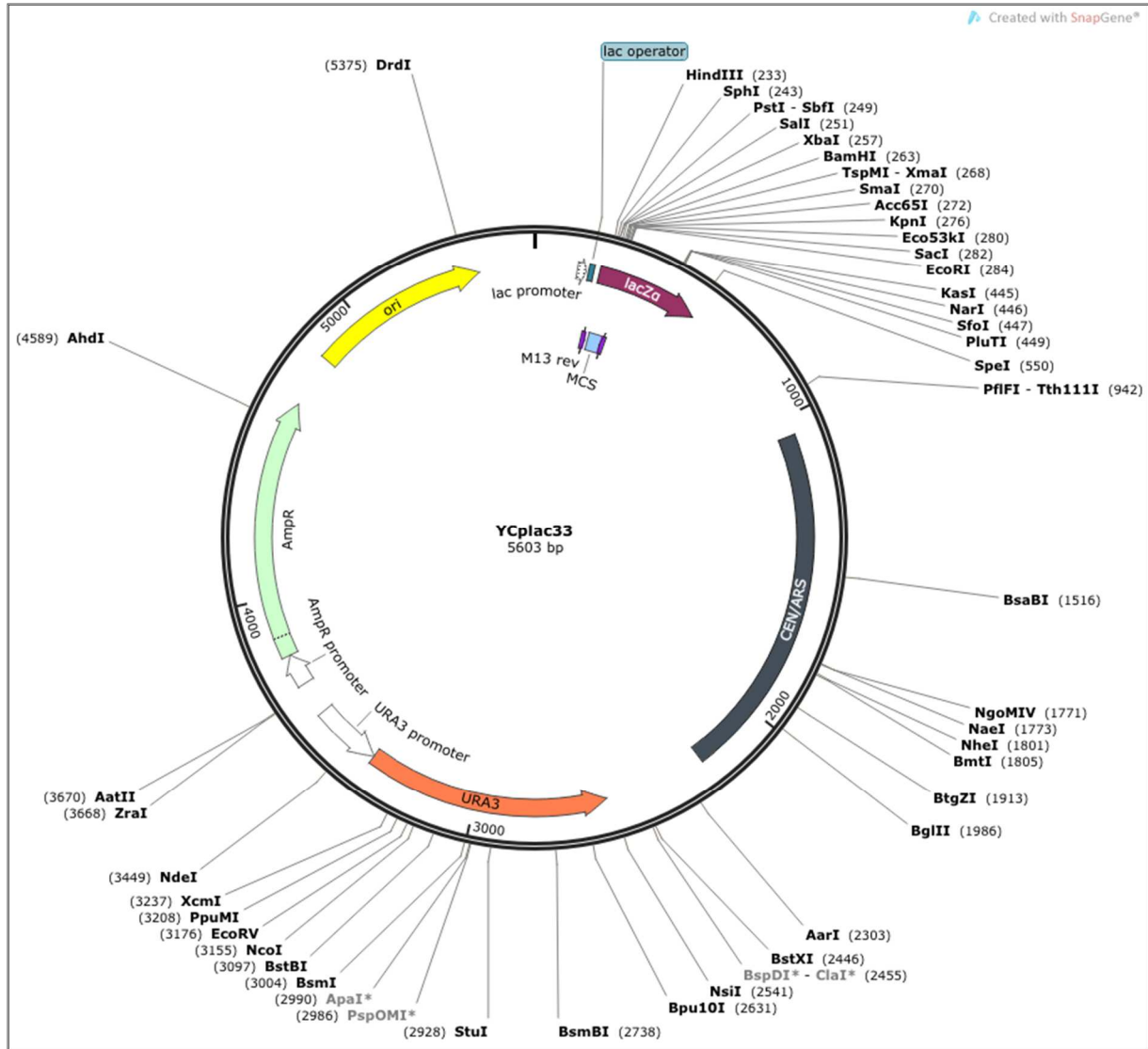


Figura 1.- Plásmido *YCplac33*

YEplac195 (*ori2 μ m amp^r CEN4/ARS1 URA3*) (Gietz y Sugino, 1988) (Figura 2): plásmido episomal en el que se clonará el gen *ABF2* tanto de *S. cerevisiae* como de *K. lactis*.

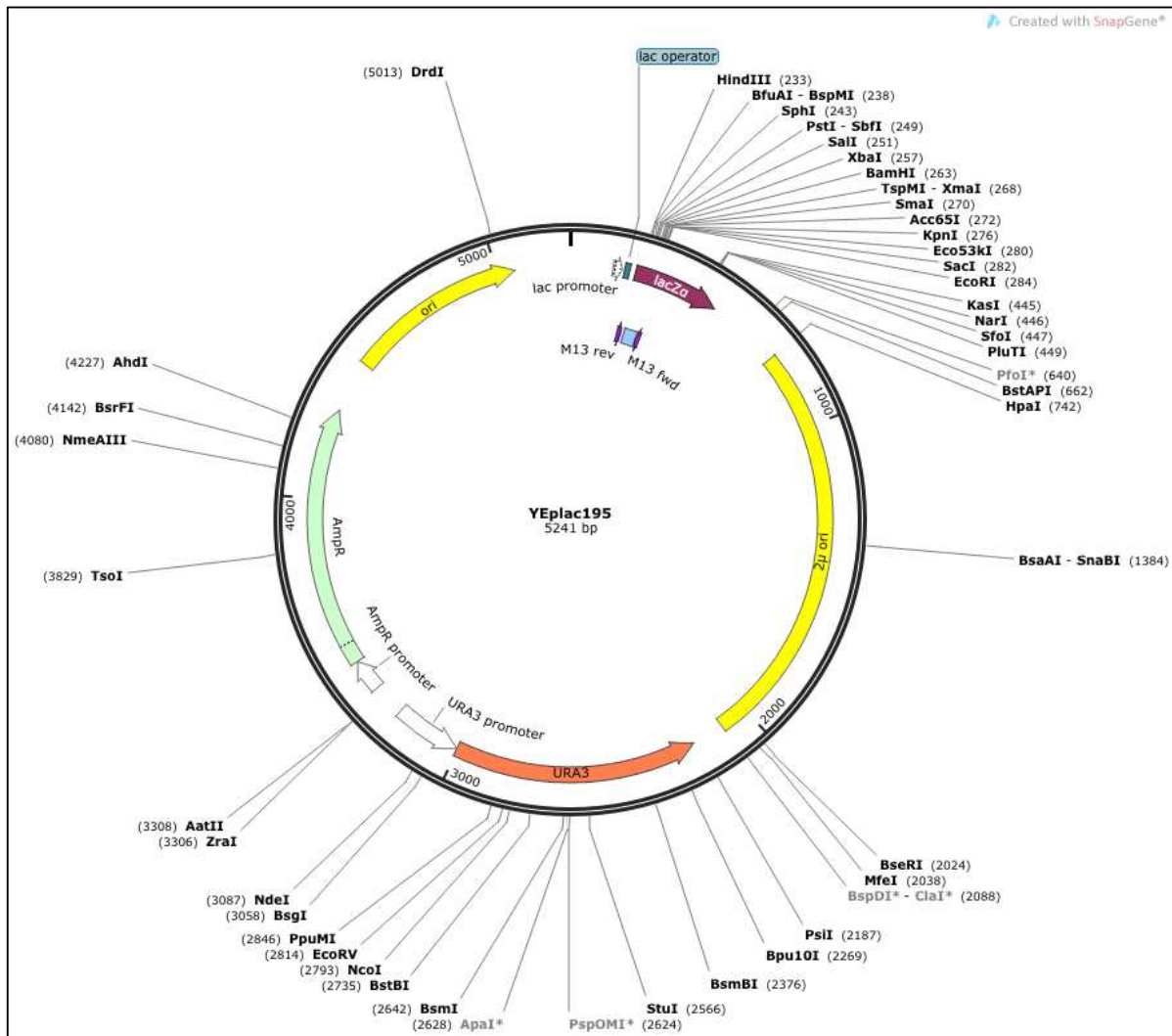


Figura 2.- Plásmido *YEplac195*

3. Medios de cultivo

A continuación se describen los medios utilizados para los cultivos de bacterias y levaduras. Todos los medios fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121 °C, en 1 atmósfera de presión.

Para la fabricación de placas, a estos medios se les añadió agar al 1,5%.

3.1. Para bacterias

Para el crecimiento de bacterias se empleó el medio selectivo **LBA** (Luria – Bertani) con ampicilina (Sigma- Aldrich®) a una concentración final de 77µg/ml. Este medio nos permitió seleccionar las bacterias que contenían los plásmidos con el gen de resistencia a la ampicilina.

LBA

- Bactotriptono.....1%
- NaCl.....0.5%
- Extracto de levadura..... 0.5%
- Dextrosa..... 0.1%

Nota: la ampicilina es añadida después de esterilizar el medio en el autoclave, cuando la temperatura ha descendido a 60 °C aproximadamente.

LBA (X-gal + IPTG)

Se utilizaron placas **LBA** tratadas con **X-gal** (*5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido*) e **IPTG** (*isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido*) para la selección de colonias por coloración **blanco/azul**.

El **IPTG** se usó como análogo no-hidrolizable de la alolactosa para inducir la transcripción del operón de expresión *lacZα* del plásmido (gen que codifica la *β-galactosidasa*).

El **X-gal** se usó como sustrato cromogénico para diferenciar entre las colonias que adquirieron el plásmido recombinante y las que no. Las colonias de células transformadas con un plásmido no recombinante obtuvieron una coloración **azul** ya que el plásmido mantuvo la actividad *β-galactosidasa*. Por el contrario, las colonias con células transformadas con un plásmido recombinante obtuvieron una coloración **blanca** ya que el inserto interrumpió la secuencia *lacZα* del plásmido.

Se añadieron 20 µl de IPTG (de una solución de concentración 0,23mg/ml) y 100 µl de X-gal (de una solución de concentración 20 mg/ml) por cada placa y se dejaron secar antes de su uso.

SOC

Utilizado para la producción de células competentes XL1-Blue.

- Bactotriptona..... 1%
- Extracto de levadura..... 0,5%
- ClNa..... 0,5%

Condiciones de crecimiento de bacterias.

Se utilizó una temperatura de 37 °C durante 24 horas.

3.2. Para levaduras

YPD

- Extracto de levadura..... 1%
- Bactopeptona..... 2%
- D-glucosa..... 2%

Nota: se utilizaron medios **YPE** y **YPG** en los que el contenido en D-glucosa fue sustituido por *etanol* al 3% y por *glicerol* al 4% respectivamente. En el caso del YPE el etanol fue añadido una vez la temperatura descendió a unos 55 °C tras esterilizar en el autoclave.

CM

- Glucosa 2%
- **Mezcla de aminoácidos** 5 ml/L
 - Isoleucina y fenilalanina..... 60 mg/L
 - Histidina, Leucina, lisina, uracilo y tirosina..... 40 mg/L
 - Triptófano..... 30 mg/L
 - Arginina, Metionina, Treonina y Lisina..... 10 mg/L
- **YNB (Yeast Nitrogen Based)**..... 67 ml/L
 - (NH₄)₂SO₄..... 75 ml/L
 - KH₂PO₄..... 15 ml/L
 - MgSO₄..... 7.5 ml/L
 - NaCl..... 1.5 ml/L

- CaCl₂ 1.5 ml/L
- Mezcla de vitaminas..... 50 ml/L
 - Biotina y ácido fólico..... 0.6 mg/L
 - P-aminobenzoico y riboflavina..... 60 mg/L
 - Pantotenato cálcico, niacina, piridoxina y tiamina..... 120 mg/L
 - Inositol..... 600 mg/L
- Sales traza..... 100 ml/L
 - Ácido bórico..... 75 mg/L
 - Sulfato cúprico..... 6 mg/L
 - Ioduro potásico..... 15 mg/L
 - Cloruro férrico y molibdato sódico..... 30 mg/L
 - Sulfato manganeso y sulfato de zinc..... 60 mg/L

Nota: el YNB se esteriliza por separado de la mezcla anterior al que se añade posteriormente.

Se utilizaron medios derivados de **CM** que fueron:

CM – URA: se usó la misma receta prescindiendo del uracilo.

CM (Glicerol): se usó glicerol al 4% en lugar de glucosa.

CM – URA (Glicerol): se usó glicerol al 4% en lugar de glucosa y se prescindió del uracilo.

Condiciones de crecimiento de levaduras.

Se empleó una temperatura de 30 °C durante unas 48 – 72 horas.

4. Técnicas de Biología Molecular

4.1. Obtención, amplificación y purificación de ADN

4.1.1. Extracción de ADN plasmídico de bacterias mediante kit comercial Genejet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas®)

El kit se basa en el uso de columnas de centrifugación que tienen una membrana de sílice a la que se une el ADN plasmídico para así poder separarlo del resto de componentes celulares. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- a. Se tomó con un palillo aproximadamente un cuarto del total de la masa de células sembradas en una placa Petri y se resuspendieron en 250 µl de *Resuspension solution*® (con RNAsa) en un tubo *Eppendorf*® hasta dejarlo homogéneo. Luego se añadieron 250 µl de *Lysis solution*® (con SDS para liberar el ADN plasmídico) y se mezcló por inversión hasta que la mezcla quedó más viscosa y transparente. Posteriormente se añadieron 350 µl de *Neutralization solution*® (creando las condiciones adecuadas para la unión del ADN plasmídico a la membrana de la columna de centrifugación) y se mezcló de nuevo por inversión hasta que la mezcla tuviese un color blanquecino. A continuación se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min.
- b. El sobrenadante se pasó a una columna del kit y se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm. Se descartó el líquido que quedó en el tubo colector y se realizaron 2 lavados con *Wash solution*® (con etanol al 96%), para eliminar posibles contaminantes, centrifugando a 13000 rpm durante 1 min cada vez. Se descartó el líquido del tubo colector ambas veces. Luego se pasó la columna a un tubo colector nuevo y se centrifugó durante 2 min a 13000 rpm para eliminar todo el etanol. Se transfirió nuevamente la columna a un tubo colector limpio y el ADN adherido a la membrana se eluyó con 50 µl de agua bidestilada centrifugando a 13000 rpm durante 2 min.

El ADN plasmídico se conservó a -20 °C.

4.1.2. Extracción de ADN plasmídico de levaduras mediante lisis alcalina

Para la obtención de ADN plasmídico a pequeña escala se utilizó el protocolo de lisis alcalina (modificado de Sambrook et al. 1989).

Se inocularon colonias aisladas en matraz con medio líquido (YPD) y se dejaron crecer toda la noche en agitación a 30 °C.

Se tomaron 5 ml de cada cultivo y se centrifugaron 1 minuto a 13000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 250 µl de *SOLUCIÓN I* previamente enfriada en hielo. El contenido de cada tubo se pasó a un tubo eppendorf. Se añadieron 0,3 g. de *Glass-beads diámetro 0,5mm (Biospec*®) y se agitaron en el vortex a 15-20 Hz durante 3 minutos aproximadamente. Posteriormente se añadieron 250 µl de la *SOLUCIÓN II* y se mezcló por inversión hasta lograr una viscosidad homogénea. Luego se añadieron 350 µl de *SOLUCIÓN III* y se mezcló nuevamente. Se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm y se transfirió el sobrenadante a una columna del kit de *Genejet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)*. A partir de aquí se siguió el **punto b** del protocolo indicado por el fabricante (se detalla en el punto 4.1.1).

Preparación de las SOLUCIONES

- *SOLUCIÓN I*: 50 mM. de Glucosa; 10 mM de EDTA; 25 mM de Tris-ClH (pH 8.0).

La *solución I* se prepara a partir de patrones estériles de cada uno de sus componentes. Se almacenan a 4 °C. Se mantiene en hielo durante su manipulación.

- *SOLUCIÓN II*: 0,2 N de NaOH; SDS (Dodecil Sulfato Sódico) al 1%.

Se prepara a partir de patrones estériles en el momento de su uso.

- *SOLUCIÓN III*: Acetato potásico 3M pH 4,8.

Se prepara como solución patrón estéril y se conserva a temperatura ambiente o a 4 °C.

4.1.3. Extracción de ADN genómico de levaduras

Se siguió el protocolo descrito por Ausubel (2002). De cultivos crecidos durante toda la noche se tomaron 10 ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado de células en 500 µl de agua bidestilada. Se transfirió la suspensión a un tubo *Eppendorf*® y se centrifugo 2 min a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 µl de *Tampón de Rotura**. Se añadieron 0,3 g de *Glass-beads*® diámetro 0,5mm (*Biospec*®), y 200 µl de PCIA (Fenol - Cloroformo - Alcohol IsoAmílico) para separar las proteínas. La mezcla se agitó en vortex a 15-20 Hz durante 3 minutos. Se agregaron 200 µl de 1xTE (*Tris-HCl 10mM pH 8.0; EDTA 1mM*) y se agitó en vortex unos segundos. Se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm y se transfirió la fase superior a un tubo limpio. Se añadió 1 ml de etanol al 95% para precipitar el ADN, mezclando por inversión. Luego se incubó en hielo 10 minutos, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70 % para eliminar las sales. Se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm. Se descarta el sobrenadante (la mayor cantidad posible) y se deja secar al aire libre con la tapa del *Eppendorf*® abierta. Una vez seco se guardó el ADN genómico a 4 °C resuspendido en 100 µl H₂O esterilizada.

**Tampón de rotura:*

- Triton X-100 2%.
- SDS 1%.
- NaCl 100 mM.
- Tris-HCl 10 mM a pH 8.0.
- EDTA 1 mM a pH 8.0.

Medida de la concentración de ADN:

Se utilizó 1,5 µl de la muestra de ADN para medir en un espectrofotómetro *BioPhotometer plus de Eppendorff®*, la absorbancia a 260 y 280 nm. La concentración se calculó sabiendo que la absorbancia 1 a 260 nm es equivalente a 50 µg/ml de ADN. La relación de la absorbancia a 260/280 indica la calidad de la muestra y debe ser cercana a 1.8.

4.1.4. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes se siguió el siguiente esquema:

Etapa		Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial		94 – 95 °C	2 – 5 min	1
	Desnaturalización	94 – 95 °C	35 – 60 s	
Amplificación	Hibridación	50- 56 °C	35 – 60 s	35
	Elongación	68 – 72 °C	1 min/Kb	
Extensión final		68 – 72 °C	5 – 10 min	1

Tabla 1.- Esquema general de las PCR realizadas.

Para la realización de las diferentes PCR se utilizaron distintas enzimas. Para la amplificación de los genes se utilizó la polimerasa de alta fidelidad *Pfu (Fermentas®)* y para la comprobación

de los plásmidos recombinantes se utilizó la polimerasa *DreamTaq* (Fermentas®). El termociclador utilizado fue el “Primus” de MWG – BIOTECH.

Los cebadores que se usaron se detallan en la tabla 2. Para su diseño se utilizó el programa *OligoPerfect™ Designer* (Invetrogen™) indicando que los oligos cumplieren las siguientes características en la medida de lo posible: tener una $T_m \geq 50$ °C, tener un contenido en GC > 40%, ausencia de complementariedad interna para evitar la formación de horquillas y ausencia de anillamiento entre la pareja de cebadores.

Nombre	%GC	Cadena	Tm(°C)	Secuencia 5’-3’ (n° bases)
ScAbf2 F	52,38	FWR	55	CTCGTCTAGAGAG CATCTCTCTAACAACGGCCTC (34)
ScAbf2 R	33,33	REV	55	TCGAGTCGACGAGC CCAATCCAGCGAATTATTATACAA (38)
KIAbf2 F	33,33	FWR	55	GAAGCCAATCAATTACAACAACAAATAAAT GAACAGTTACAGCCTATT AACTAGATCTTTC (61)
KIAbf2 R	57,14	REV	55	GGCATAAAAAACATTGTGAGAGTACCGCGGTCTAGTTGTGTGGGTAGC GAGC (52)
invpScAbf2 F	39,29	FWR	56	ACCGCGGTACTCTCACAATGTTTTTTAT (28)
invpScAbf2 R	26,47	REV	56	TTATTTGTTGTTGTAATTGATTGGCTTCTTTGTT (34)

Tabla 2.- Cebadores utilizados para la realización de las PCR; se ha subrayado las secuencias de corte de *SaI* I (GTCGAC) y *Xba* I (TCTAGA); En negrita se ha destacado los codones de inicio (ATG) y terminación (CTA) del gen *KIABF2*; En azul se indica la secuencia del promotor y del terminador de *ScABF2* utilizadas para la recombinación.

4.1.5. Protocolo para la purificación de los productos de PCR con el kit GeneJet® PCR purification Kit de Fermentas®

El producto de la PCR realizada se llevó a un volumen de 100 µl con agua bidestilada. Se agregaron 200 µl de *Tampón de Unión* (Buffer NTI®), se mezcló y se transfirió a una columna de purificación. Se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm. Se descartó el líquido recogido en el tubo colector y se agregaron 700 µl de *Tampón de Lavado* (Buffer NT3®) con etano. Se centrifugó

por 1 min a 13000 rpm y se descartó el líquido del tubo colector. Se repitió el lavado con otros 700 µl de *Tampón de Lavado (Buffer NT3®)*. La membrana de la columna se secó centrifugando en un tubo *Eppendorf* nuevo durante 2 min a 13000 rpm. Por último se eluyó el ADN de la membrana en un tubo *Eppendorf* nuevo agregando 50 µl de agua bidestilada y centrifugando por 2 minutos a 13000 rpm. El ADN purificado fue almacenado a -20 °C.

En las purificaciones a partir de geles de agarosa se utilizó el mismo kit, la única diferencia con el protocolo explicado anteriormente es un paso previo donde se diluyó la agarosa incubándola con *Tampón de Unión (Buffer NTI®)* a 55°C (se añadieron tantos µl como mg de peso de la banda del gel).

4.2. Construcción de los plásmidos

4.2.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Se realizaron digestiones, de los plásmidos y de *ScABF2*, con las enzimas *Sal I* y *Xba I* para realizar las diferentes construcciones. Como tampón se usó el proporcionado por la casa comercial. Las digestiones se llevaron a cabo durante 3 horas a 37 °C. En la tabla 3 se muestran las secuencias de corte de estas enzimas.

Enzima	Secuencia de corte (5'-3')
<i>Sal I</i>	GTCGAC
<i>Xba I</i>	TCTAGA

Tabla 3.- Enzimas de restricción usadas y sus secuencias de corte.

4.2.2. Ligamientos

Los ligamientos se realizaron utilizando 2 ligasas diferentes, la ligasa T4 (*nzytech™*) y la ligasa T4 *Speedy (nzytech™)*. Se usó como tampón el correspondiente a cada ligasa. La proporción entre la cantidad de vector y de fragmento fue aproximadamente 1:3.

4.3. Transformación de bacterias y levaduras

4.3.1. Preparación de bacterias competentes (*XLI-Blue*)

El protocolo que se utilizó para prepararlas fue el siguiente:

Bajo condiciones de esterilidad se inoculó un precultivo de *E. coli* de la cepa *XLI-Blue* (*Stratagene*®) en medio **SOC**. Se dejó crecer hasta alcanzar una absorbancia a 600 nm de 0,6 (2 – 3 horas). Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se lavó en 50 ml de NaCl 10 mM frío. Se volvió a centrifugar y se resuspendió en 50 ml de Cl₂Ca 100 mM frío, incubando en hielo por 20 minutos. Después de centrifugar a 5000 rpm se resuspendió en 3 ml de Cl₂Ca mM y glicerol al 30% y se repartió en alícuotas almacenadas en tubos *Eppendorf* a -80 °C.

4.3.2. Transformación de bacterias

En condiciones de esterilidad, se agregaron 10 µl de cada ligamiento a 100 µl de bacterias competentes (*XLI-Blue*). Se incubó en hielo durante 20 minutos. A continuación se realizó un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos y se devolvió al hielo por 1 min. Se agregó 1 ml de medio LB líquido y se incubó durante 45 minutos en agitación a 37 °C. Se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 150 µl de medio LB y se sembró en placas con medio LBA, y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

Para el control negativo a una alícuota de células no se le añadió ADN.

4.3.3. Transformación levaduras

En condiciones de esterilidad, se inóculo de una colonia de cada cepa de levadura (*BY4742* y *Δabf2*) en aproximadamente 15 ml de YPD y se dejó crecer toda la noche a 30°C en agitación. Tras el tiempo de crecimiento se tomaron 10 ml de células y se centrifugaron a 13000 rpm durante 1 min. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de *tampón**. Se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de *tampón** y se añadieron 50 µl de ADN sonicado de salmón.

Del resuspendido de células anterior se tomaron 100 µl y se añadió 1 µl del ADN de la construcción a transformar. Como control negativo en un tubo no se añadió ADN. Se echaron 600 µl de PEG (*polietilenglicol 4000 al 50%*) y se incubó durante 30 min a 30 °C en agitación. Posteriormente se incubó a 42 °C en bloque durante 15 min. Luego se centrifugó 1 min a 13000 rpm y se eliminó el sobrenadante con una pipeta. Se añadió 1 ml de YPD para lavar el

precipitado y se centrifugó durante 1 min. a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 1 ml de YPD y se incubó durante 45 - 60 min a 30 °C. Por último, se sembraron las células en placas CM-URA.

Para el control negativo a una alícuota de células no se le añadió ADN.

**Tampón: 0,9 ml de Acetato de litio 1M y 0,1 ml de TE 10X (Tris-HCl pH 8.0 10mM + EDTA 1mM) por cada ml de tampón preparado.*

4.3.4. Construcción de plásmidos recombinantes por recombinación de levaduras

Se utilizó el kit *Frozen-EZ Yeast Transformation II™* (Zymo). A 50 µl de levaduras competentes (cepa *BJ3505*) se le añadieron 0.5 µg de vector y el triple de fragmento. Se añadieron 500 µl de *solución EZ3®* y se mezcló por inversión. Se incubó a 30 °C durante 45 min y posteriormente se sembraron las células en placas con medio selectivo, en nuestro caso CM-URA.

4.4. Electroforesis en geles de agarosa

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa para visualizar los ácidos nucleicos. Los geles se prepararon a una concentración del 0,7% de agarosa en *tampón TAE (Tris- Acetato – EDTA) (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, acetato acético 20 mM)* el cual permite la separación de los productos en un rango de entre 0,8 a 10 kb (Sambrook *et al.*, 1989).

Como referencia para los tamaños moleculares se utilizó el marcador *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Ladder (Fermentas®)* (Figura 6) y como fluoróforo intercalante de ácidos nucleicos para visualizar el ADN se utilizó *GelGreen™ (Biotium®)* a una concentración final 1x. Se utilizó el transiluminador molecular *Imager GelDoc XR+ (BioRad)*.

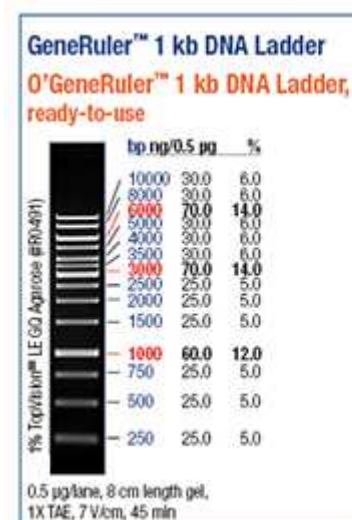


Figura 1.- Referencias de pesos moleculares

5. Herramientas bioinformáticas

- Para la obtención de secuencias de las ORFs a clonar:

SGD (*Saccharomyces Genome Database*):

<http://www.yeastgenome.org/>

Génolevures:

<http://genolevures.org/>

- Para el diseño de cebadores:

Programa *OligoPerfect™ Designer* de *Invitrogen™*:

<http://tools.lifetechnologies.com/content.cfm?pageid=9716>

Programa *Netprimer®* de *Premier Biosoft™*:

<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>

- Búsquedas bibliográficas: PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

Para estudiar si la ORF del gen *ABF2* de *K. lactis* complementa la mutación de la cepa $\Delta abf2$ de *S. cerevisiae* se siguieron los pasos que se muestran a continuación:

1. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.

a. Obtención de las ORFs del gen *ABF2* de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*.

- PCR de las ORFs de los genes *ScABF2* y *KIABF2*.
- Purificación de las PCRs.

b. Construcción de los plásmidos *YCplac33+ScABF2* e *YEplac195+ScABF2*.

- Extracción de ADN plasmídico (*YCplac33* e *YEplac195*).
- Digestión con enzimas de restricción de la PCR de la ORF de *ScABF2* y los plásmidos. Purificación y ligamiento de ambos.
- Transformación de bacterias.
- Comprobación de las construcciones mediante PCR.

c. Construcción de los plásmidos *YCplac33+KIABF2* e *YEplac195+KIABF2*.

- PCR divergente utilizando como molde *YCplac33+ScABF2* e *YEplac195+ScABF2*.
- Recombinación en levaduras de los productos de la PCR divergente y la ORF de *KIABF2*.
- Extracción de los plásmidos recombinantes de levaduras.
- Transformación de bacterias.
- Comprobación de candidatos.

2. ENSAYOS FENOTÍPICOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

3. CONCLUSIÓN.

1. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

a. Obtención de las ORFs del gen *ABF2* de *S. cerevisiae* y *K. lactis*

La secuencia del gen *ScABF2* se obtuvo de la base de datos SGD (*Saccharomyces Genome Database*) y la del gen *KIABF2* se obtuvo de la base de datos de Génolevures. Para la amplificación por PCR de estas secuencias se diseñaron cebadores específicos (4.1.4 de *Materiales y métodos*).

- **PCR de las ORFs de los genes *ScABF2* y *KIABF2***

Los protocolos utilizados fueron optimizados variando las cantidades de ADN molde y la temperatura de anillamiento hasta conseguir amplificar los fragmentos de interés. Los esquemas mostrados en las figuras 6 y 7 fueron los que se utilizaron para la amplificación del gen *ABF2* de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*.

Se utilizaron como molde para la amplificación los ADN genómicos de *S. cerevisiae* (BY4742) y de *K. lactis* (SAY529). El método utilizado para la extracción del ADN genómico se detalla en el punto 4.1.3 de *Materiales y métodos*.

La enzima polimerasa utilizada fue la *Pfu* (*Fermentas*®), que es una enzima de alta fidelidad (tasa de error: 2.6×10^{-6} nucleótidos por sitio) junto con el *Pfu buffer 10X*. Los tiempos de elongación establecidos fueron de 1 minuto por Kb de fragmento a amplificar. Los oligonucleótidos empleados como cebadores para las PCR fueron *ScAbf2 F* y *R* (para *ScABF2*) y *KIAbf2 F* y *R* (para *KIABF2*), y sus características se muestran en la tabla 2 (4.1.4 de *Materiales y métodos*). En las figuras 4 y 5 se muestran los protocolos utilizados para la amplificación del gen *ABF2* de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*.

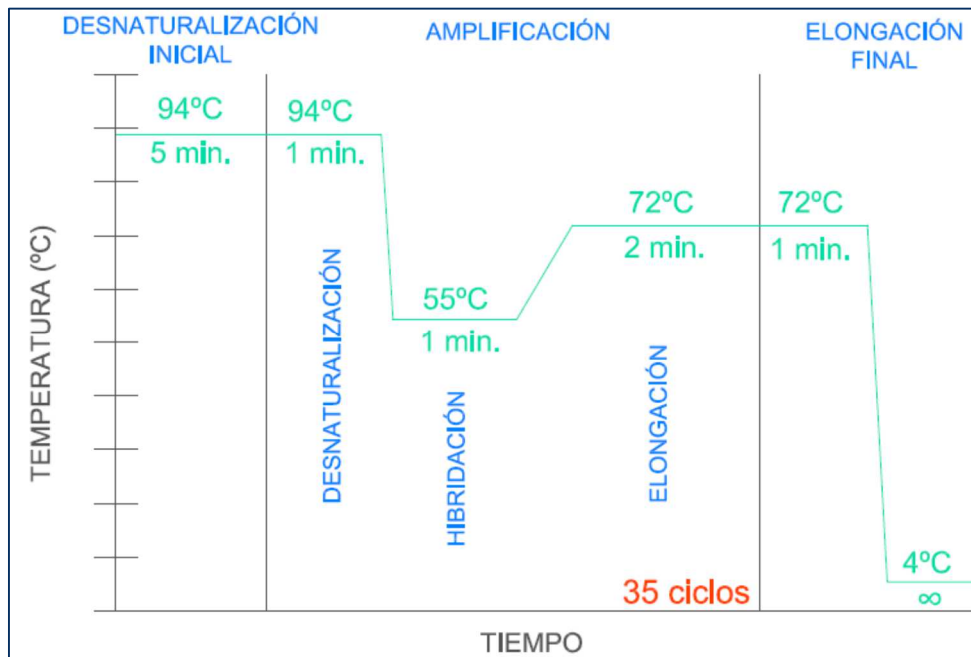


Figura 4.- Esquema de la PCR para la amplificación del gen *ABF2* de *S. cerevisiae*.

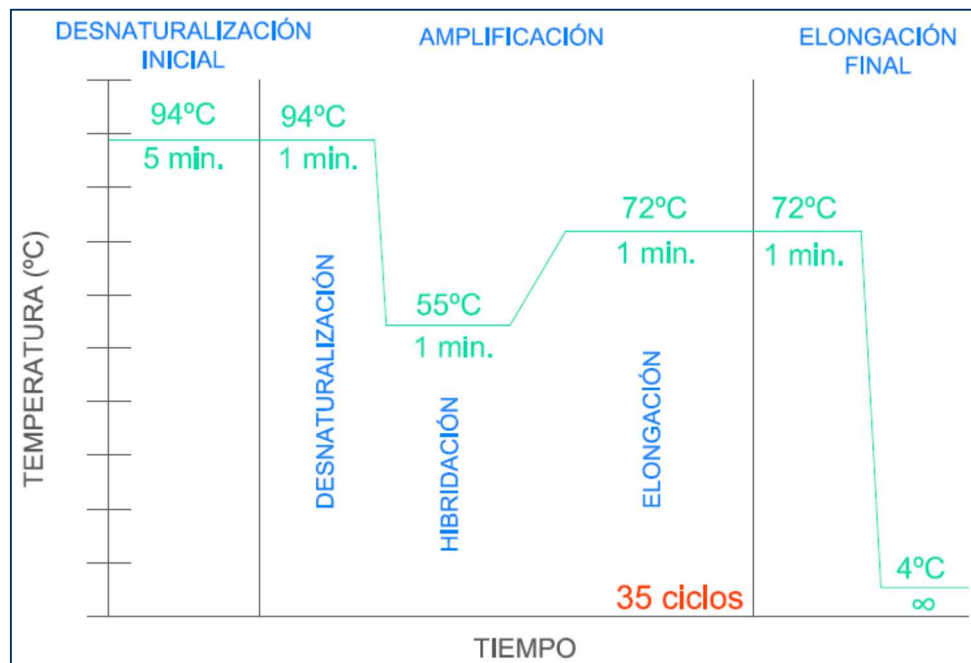


Figura 5.- Esquema de la PCR para la amplificación del gen *ABF2* de *K. lactis*.

En las figuras 6 y 7 se muestran las electroforesis para las comprobaciones de los productos de las PCR realizadas.

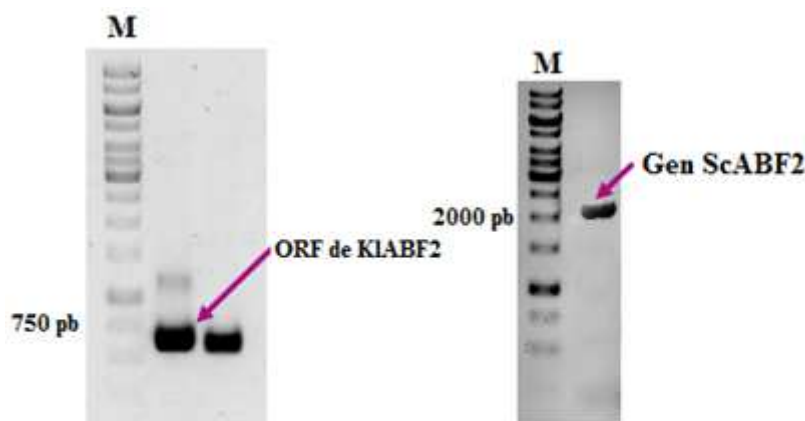


Figura 6.- Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de KlABF2.

Figura 7.- Electroforesis en gel de agarosa de la PCR de ScABF2.

- **Purificación de las PCRs**

Las purificaciones de los productos de las PCR se realizaron con el kit comercial *GeneJetTM PCR purification Kit* (Fermentas®), siguiendo el protocolo detallado en el punto 4.1.5 (*Materiales y métodos*).

b. Construcción de los plásmidos *YCplac33+ScABF2* e *YEplac195+ScABF2*.

- **Extracción de ADN plasmídico**

Se realizaron minipreparaciones con el kit comercial *GeneJet® Plasmid Miniprep Kit* (Fermentas®) de *YCplac33* e *YEplac195* según el protocolo que se detalla en el punto 4.1.1 (*Materiales y métodos*).

- **Digestión con enzimas de restricción de la PCR de la ORF de *ScABF2* y los plásmidos. Purificación y ligamiento de ambos**

Aproximadamente 5 µg de los dos plásmidos y la PCR de *ScABF2* se digirieron con las enzimas *Sal I* y *Xba I* durante 3 horas a 37 °C del modo en que se detalla en la tabla 4.

	YCplac33	YEplac195	PCR (<i>S. cerevisiae</i>)
Muestra	6 µl	6 µl	48 µl
<i>Sal</i> I	3 µl	3 µl	8 µl
<i>Xba</i> I	3 µl	3 µl	8 µl
Buffer Tango 2X	5 µl	5 µl	20 µl
H ₂ O bidestilada	8 µl	8 µl	16 µl
Volumen final	25 µl	25 µl	100 µl

Tabla 4.- Esquema de las digestiones realizadas con *Sal* I y *Xba* I a la PCR de *ScABF2* y a los plásmidos.

Las digestiones se purificaron con el kit *GeneJet™ PCR purification Kit* (*Fermentas®*). Se comprobaron las digestiones en un gel de agarosa tal y como muestra la figura 8.

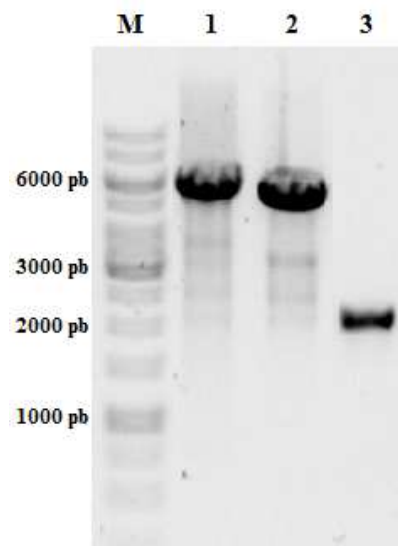


Figura 8.- Electroforesis en gel de agarosa para la comprobación de la digestión con *Sal* I y *Xba* I de los plásmidos *YCplac33* (1) e *YEplac195* (2), y del gen *ScABF2* (3).

A continuación se ligó *ScABF2* con los dos plásmidos (*YCplac33* e *YEplac195*).

➤ *S. cerevisiae* (2 tubos):

▪ Tubo 1:

- 7 µl (2 µg aproximadamente) de *ScABF2* digerido.
- 1 µl (0,5 µg aproximadamente) de *YCplac33* digerido.
- 1 µl de ligasa.
- 1 µl de Tampón de ligasa 10X.

▪ Tubo 2:

- 7 µl (1,5 µg aproximadamente) de *ScABF2* digerido
- 1 µl (0,5 µg aproximadamente) de *YCplac195* digerido.
- 1 µl de ligasa.
- 1 µl de Tampón de ligasa 10X.

El ligamiento se realizó con 2 protocolos distintos para aumentar las posibilidades de éxito de los ligamientos. Uno de ellos con la *ligasa T4 Speedy* (*nzytech*TM) a 22 °C durante 30 min. El otro con la *ligasa T4* (*nzytech*TM) incubando durante toda la noche a 4 °C.

Como controles se utilizaron tubos en los que se añadió H₂O esterilizada en lugar de *ScABF2* para comprobar si los vectores podían recircularizar, cosa que ocurriría si estos hubiesen sido cortados con una única enzima de restricción durante la digestión.

➤ 2 tubos control:

▪ Tubo 1:

- 7 µl de H₂O esterilizada.
- 1 µl (0,5 µg aproximadamente) de *YCplac33* digerido.
- 1 µl de ligasa.
- 1 µl de Tampón de ligasa 10X.

▪ Tubo 2:

- 7 µl de H₂O esterilizada.
- 1 µl (0,5 µg aproximadamente) de *YCplac195* digerido.
- 1 µl de ligasa.
- 1 µl de Tampón de ligasa 10X.

- **Transformación de bacterias**

Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa *XLI-Blue* de (*Stratagene*®) con los ligamientos anteriores según el protocolo detallado en el punto 4.3.2 (*Materiales y métodos*). Se dejaron crecer en placas con medio *LBA* (*X-gal* + *IPTG*), que contiene ampicilina. Como control negativo a una alícuota de células no se le añadió ADN (la ausencia de colonias en estas placas indicaba ausencia de contaminación).

Tras el crecimiento de colonias se seleccionaron y sembraron en placas *LBA* las colonias blancas lo que indica que el gen *lacZα* del plásmido ha sido interrumpido por la inserción del gen *ScABF2* durante el ligamiento. En las placas con los ligamientos control (solo ADN plasmídico sin *ScABF2*) tan solo se obtuvieron 1 colonia azul en el caso de *YCplac33* y 3 en el caso de *YEplac195*, lo que indicaba que existía un número muy bajo de moléculas del plásmido recircularizado.

- **Comprobación de las construcciones mediante PCR**

Se realizaron minipreparaciones (según el punto 4.1.1 de *Materiales y métodos*), de las colonias blancas sembradas en el apartado anterior. El ADN plasmídico obtenido se usó como molde para comprobar las construcciones mediante PCRs que siguieron el esquema de la tabla 5.

	Miniprep YCplac33+ScABF2	Miniprep YEplac195+ScABF2
Molde	1 µl	1 µl
dNTPs	5 µl	5 µl
Tampón 10X	5 µl	5 µl
ScAbf2 F (10µM)	1 µl	1 µl
ScAbf2 R (10µM)	1 µl	1 µl
Taq polimerasa	1 µl	1 µl
H₂O bidestilada	36 µl	36 µl
Volumen total	50 µl	50 µl

Tabla 5.- Cantidades de reactivos utilizadas en la PCR para la comprobación de los ligamientos.

El programa utilizado fue el que se detalla en la figura 4 (pág. 22). Las PCRs se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa y como se muestran en la figura 9 se obtuvo la amplificación del gen de *ScABF2*.

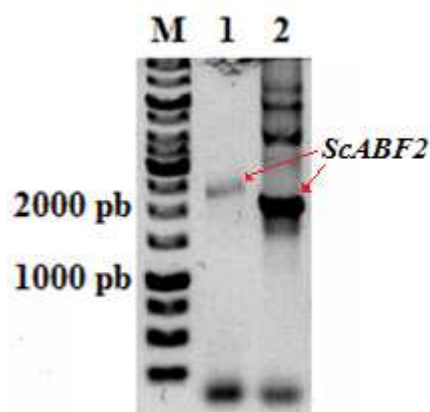


Figura 9.- Electroforesis en gel de agarosa de comprobación de la PCR de los ligamientos *YCplac33+ScABF2* (1) e *YEplac195+ScABF2* (2); M marcador de pesos moleculares.

c. Construcción de los plásmidos *YCplac33+KIABF2* e *YEplac195+KIABF2*

- *PCR divergente utilizando como molde YCplac33+ScABF2 e YEplac195+ScABF2*

Para la construcción de los plásmidos *YCplac33+KIABF2* e *YEplac195+KIABF2* se realizaron dos PCRs divergentes utilizando como molde las minipreparaciones de *YCplac33+ScABF2* e *YEplac195+ScABF2* diluidas 1/10. Estas PCRs divergentes se usaron para eliminar la ORF de *ScABF2*, dejando únicamente la región promotora y terminadora del gen para obtener las siguientes construcciones:

- *YCplac33* + Promotor y Terminador del gen *ScABF2* (*YCplac33* + *P* y *T ScABF2*).
- *YEplac195* + Promotor y Terminador del gen *ScABF2* (*YEplac195* + *P* y *T ScABF2*).

	Miniprep YCplac33+ScABF2	Miniprep YEplac195+ScABF2
Molde	1 µl	1 µl
dNTPs	5 µl	5 µl
Tampón 10X	5 µl	5 µl
invpScAbf2 F (10µM)	1 µl	1 µl
invpScAbf2 R (10µM)	1 µl	1 µl
<i>Pfu</i> polimerasa	1 µl	1 µl
H ₂ O bidestilada	36 µl	36 µl
Volumen total	50 µl	50 µl

Tabla 6.- Cantidades de reactivos utilizadas en la PCR para la obtención de los plásmidos YCplac33 e YEplac195 con el Promotor y Terminador del gen ScABF2.

La polimerasa utilizada fue la *Pfu* (Fermentas®) junto con el Tampón 10X proporcionado por la casa comercial. El programa utilizado en el termociclador es el que se muestra en la figura 10.

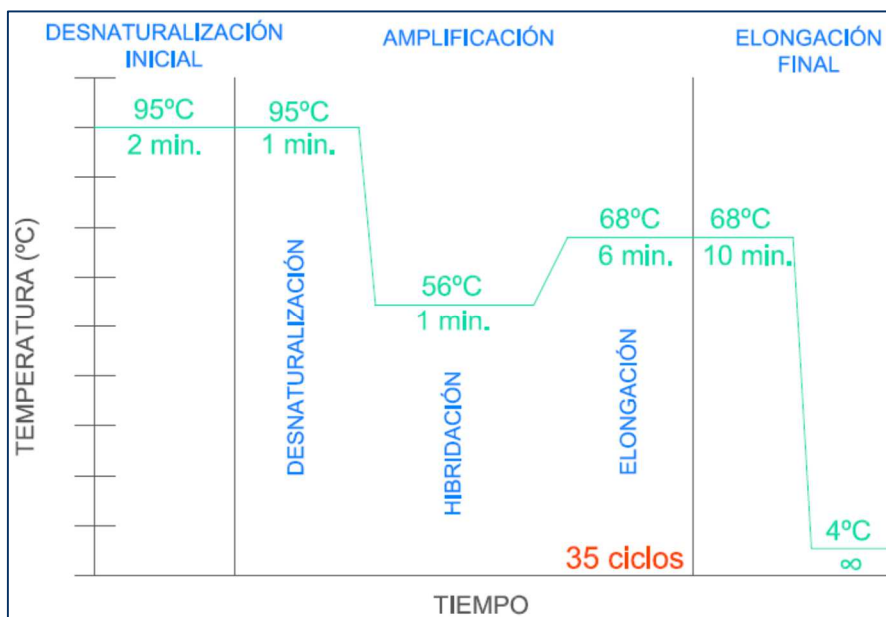


Figura 10.- Esquema de la PCR inversa.

Se realizó un gel para la comprobación de las construcciones de las PCRs como se muestra en la figura 11.

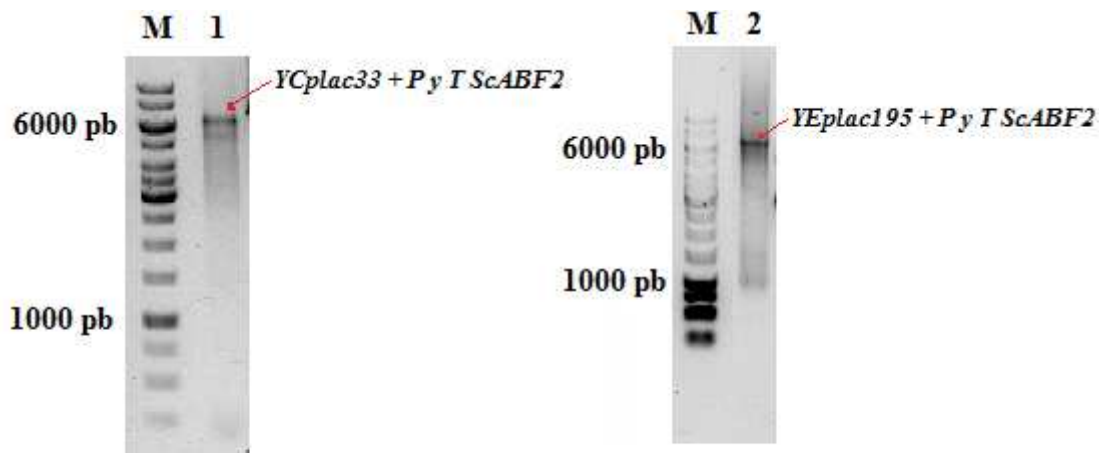


Figura 11.- Electroforesis en gel de agarosa de la comprobación de la PCR inversa.

Se purificaron las PCRs por el kit *GeneJet® PCR purification Kit de Fermentas®* con el protocolo explicado en el punto 4.1.5 (*Materiales y métodos*).

- **Recombinación en levaduras de los productos de la PCR divergente y la ORF de *KIABF2***

A fin de obtener por recombinación las construcciones *YCplac33+KIABF2* e *YEplac195+KIABF2* se transformó la cepa *BJ3505* con 0.5 µg de ADN de cada vector (*YCplac33 + P y T ScABF2* e *YEplac195 + P y T ScABF2*) y 1.5 µg del inserto de ADN (ORF del gen *KIABF2*) utilizando el kit *Frozen-EZ Yeast Transformation II™* (*Materiales y métodos*). En ambos casos se obtuvieron numerosas colonias.

Posteriormente se resembraron una colonia aislada de cada transformación en medio líquido CM-URA a 30°C toda la noche para realizar la extracción de los plásmidos de la levadura que se llevó a cabo siguiendo el protocolo detallado en el punto 4.1.2 (*Materiales y métodos*).

- **Transformación de bacterias**

Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa *XLI-Blue* de (*Stratagene®*) con 5 µl del ADN plásmido obtenido en el apartado anterior y en ambos casos, *YCplac33+KIABF2* e *YEplac195+KIABF2*, se obtuvieron más de 40 colonias. Se seleccionaron diez colonias de cada tipo, se resembraron en placas LBA, se dejaron crecer a 37 °C durante todo un día y se realizaron minipreparaciones para comprobar si los plásmidos obtenidos poseían el gen *KIABF2*.

• *Comprobación de candidatos*

Se realizó una PCR de comprobación de las transformaciones realizadas. Se utilizó como polimerasa la *DreamTaq* y como Tampón 10X el proporcionado por la casa comercial. El esquema usado fue el que se muestra en la tabla 7.

	Miniprep <i>YCplac33 + P y T</i> <i>ScABF2 + KIABF2</i>	Miniprep <i>YEplac195 + P y T</i> <i>ScABF2 + KIABF2</i>
Molde	1 µl	1 µl
dNTPs	5 µl	5 µl
Tampón 10X	5 µl	5 µl
KIAbf2 F (10µM)	1 µl	1 µl
KIAbf2 R (10µM)	1 µl	1 µl
<i>DreamTaq</i>	1 µl	1 µl
H₂O bidestilada	36 µl	36 µl
Volumen total	50 µl	50 µl

Tabla 7.- Cantidades de reactivos utilizadas en la PCR para la comprobación de las construcciones *YCplac33 + KIABF2* e *YEplac195 + KIABF2*.

La PCR se comprobó por una electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la figura 12.

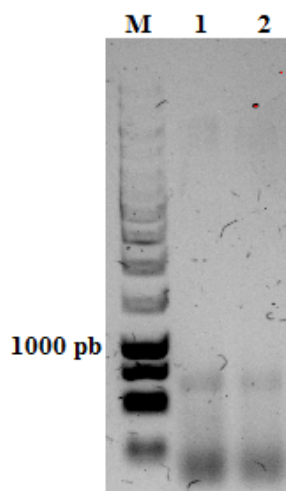


Figura 12.- Electroforesis en gel de agarosa para la comprobación de las construcciones *YCplac33 + KIABF2* (1) e *YEplac195 + KIABF2* (2).

- **Transformación de levaduras (*BY4742* y $\Delta abf2$)**

La levadura *BY4742* (salvaje), que se va a utilizar como control, se transformó con los plásmidos vacíos *YCplac33* y *YEplac195*, y la cepa $\Delta abf2$ (mutante) con los mismos plásmidos vacíos y con las construcciones *YCplac33+KIABF2* e *YEplac195+KIABF2*, utilizando en cada caso 1 μ l de la correspondiente minipreparación y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.3.3 (*Materiales y métodos*). Todas las transformaciones se sembraron en medio CM-URA (ya que todos los plásmidos poseen el gen *URA3* como marcador para levaduras) y después de incubar las placas 2 días a 30°C se obtuvieron más de 50 colonias por placa.

Como control negativo a una alícuota de células de cada levadura no se le añadió ADN (la ausencia de colonias en estas placas indicaba ausencia de contaminación).

2. ENSAYOS FENOTÍPICOS

Se resembró, en CM-URA, una colonia aislada de cada transformación para realizar los análisis fenotípicos.

Como se ha comentado en la introducción la cepa $\Delta abf2$ que crece en un medio fermentable (con glucosa), pierde rápidamente el ADNmt, y en un medio con fuente de carbono no fermentable con etanol o glicerol, se genera una presión selectiva que impide la pérdida de las mitocondrias, pero aun así las células experimentan una disminución de crecimiento importante, es decir en estos medios esta cepa posee un fenotipo de crecimiento más lento que la cepa salvaje isogénica (Yoon *et al.* 2011).

En primer lugar se comprobó que éramos capaces de reproducir el fenotipo descrito por Yoon y colaboradores. Para ello se sembraron la cepa *BY4742* y $\Delta abf2$ en placas con medio YPD (glucosa), YPE (etanol) y YPG (glicerol) comprobándose que efectivamente, al comparar el crecimiento entre las dos cepas, la cepa mutante apenas crece en los medios con fuentes de carbono no fermentables.

El siguiente objetivo era determinar si el gen de *K. lactis* *KIABF2* era funcionalmente homólogo al gen *ABF2* de *S. cerevisiae*. Para ello se sembraron las cepas *BY4742*, $\Delta abf2$ y $\Delta abf2$ transformada con el gen de *KIABF2* clonado en el plásmido *YCplac33* (*YCplac33+KIABF2*) o *YEplac195* (*YEplac195+KIABF2*) en los medios anteriores YPD, YPE y YPG. Como se puede observar en la figura 13, el gen de *KIABF2* no es capaz de complementar la mutación del mutante $\Delta abf2$, ya que las cepas transformadas no recuperan los niveles de crecimiento de la cepa salvaje

BY4742. Además el número de copias del gen *KLABF2* que exista en el interior de una célula no modifica el resultado, ya que, la cepa mutante transformada con la construcción con el plásmido centromérico (*YCplac33+KLABF2*) o episomal (*YEplac195+KLABF2*) poseen el mismo fenotipo.

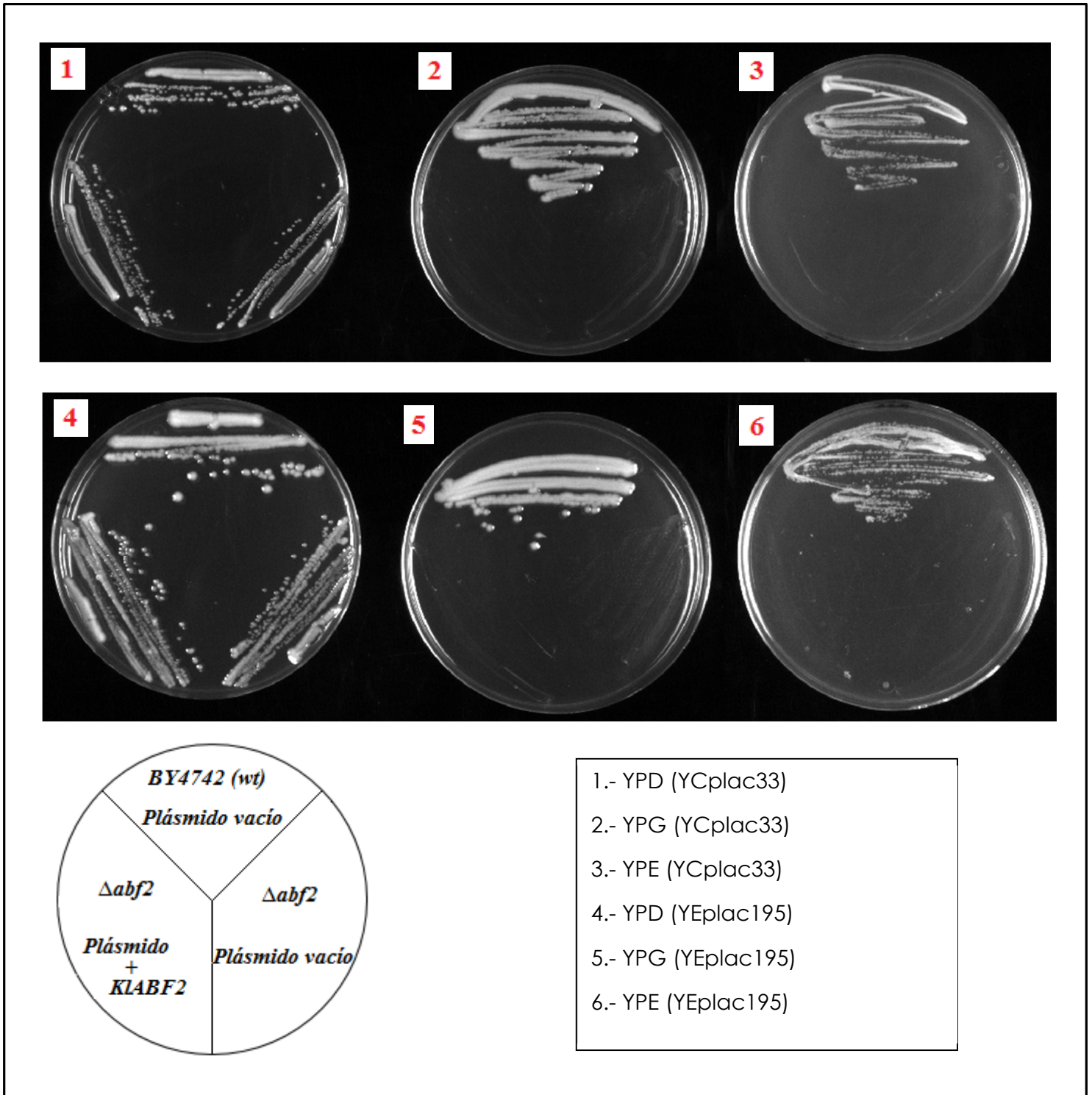


Figura 13.- Crecimiento en placas de las construcciones (*YCplac33* e *YEplac195*) en medios YPD, YPG e YPE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se utilizaron medios ricos porque se quería reproducir el fenotipo del mutante descrito por Yoon y colaboradores y estos fueron los medios utilizados por estos autores, pero la falta de complementación detectada, era posible que se debiera a la pérdida de las construcciones (ya que en estos medios no existe presión selectiva), por lo que se repitió el experimento en medios CM-URA, CM-URA glicerol y CM-URA etanol. Como se observa en la figura 14 el resultado obtenido fue el mismo, *KLABF2* no fue capaz de complementar la mutación del mutante $\Delta abf2$.

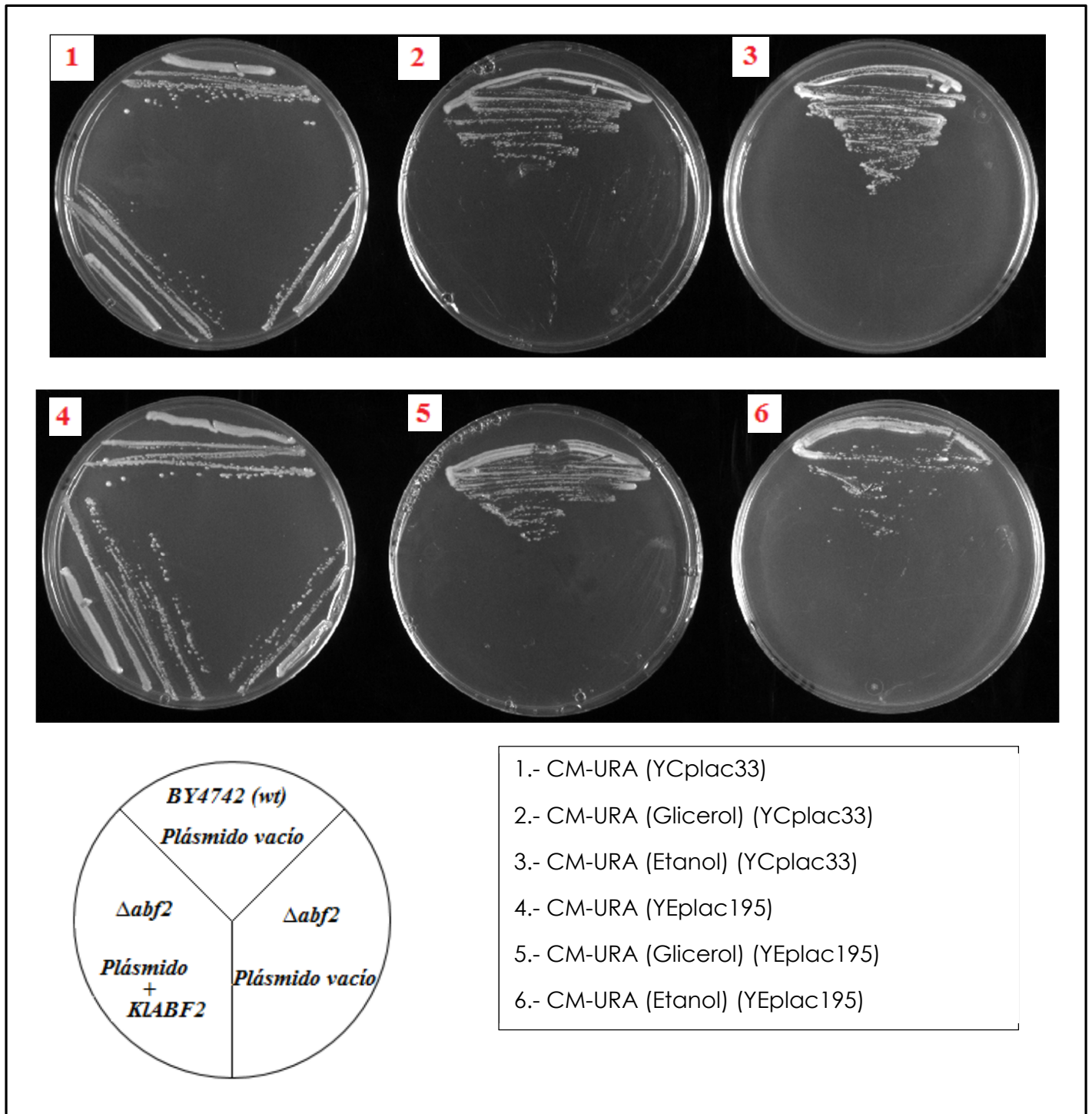


Figura 14.- Crecimiento en placas de las construcciones (YCplac33 e YEplac195) en medios CM-URA, CM-URA (Glicerol) y CM-URA (Etanol).

Las cepas *BY4742*, $\Delta abf2$ están transformadas con los plásmidos vacíos para que puedan crecer en medios –URA (ambas cepas son *URA*⁻).

3. CONCLUSIÓN

Según los resultados obtenidos podemos concluir que, a pesar de la existencia de una homología del 55% (considerando sustituciones entre aminoácidos equivalentes) entre las proteínas *Abf2p* de *S. cerevisiae* y de *K. lactis*, la ORF del gen *KIABF2* (*KLLA0F01485g*) no muestra complementación funcional con la mutación de la cepa $\Delta abf2$.

- Ausubel, F. M. (2002). Current protocols in molecular biology (vol. 2). *Green Pub. Associates and Wiley-Interscience*. ISBN: 978-0-471-50338-5
- Chen, X. J. and R. A. Butow (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*. 6: 815-825.
- Dejean, L., et al. (2000). Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1457(1-2): 45-56.
- Dujon, B., et al. (2004). Genome evolution in yeasts. *Nature* 430(6995): 35-44.
- Gietz, R. D. and A. Sugino (1988). New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74(2): 527-534.
- Goffeau, A., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274(5287): 546, 563-547.
- Gonzalez-Siso, M. I., et al. (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. *Enzyme Microb Technol* 26(9-10): 699-705.
- Kurioiwa, T. (1982). Mitochondrial nuclei. *Int. Rev. Cytol.* 75, 1–59
- Miyakawa, I., et al. (1995). Characterization of DNA-binding proteins involved in the assembly of mitochondrial nucleoids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Cell Physiol* 36(7): 1179-1188.
- Newman, S. M., Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P. S., and Butow, R. A. (1996). Analysis of mitochondrial DNA nucleoids in wild-type and a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* that lacks the mitochondrial HMG box protein *Abf2p*. *Nucleic Acids Res.* 24, 386 – 393
- Sambrook, J. F., T.; Maniatis. (1989). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2° Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. N.Y.* ISBN: 0-87969-576-5
- Wolfe, K. H. and D. C. Shields (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387(6634): 708-713.
- Yoon, Y. G., et al. (2011). Mitochondrial genome-maintaining activity of mouse mitochondrial transcription factor A and its transcript isoform in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 484(1-2): 52-60.

Ade: Adenina.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

Bp: pares de bases (*base pairs*).

CM: medio completo (*Complete Medium*).

DNA: ácido desoxirribonucleico.

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatados.

EDTA: ácido Etilendiamino Tetra-Acético.

EUROSCARF: *EUROpean Saccharomyces Cerevisiae Archive for Functional analysis*.

g: gramo.

GAL4: factor activador de la transcripción.

His: Histidina.

Hz: hercios.

IPTG: IsoPropil- β -D-Galactopiranosido.

kb: kilobases.

KLABF2: gen *ABF2* de *Kluyveromyces lactis*.

Leu: leucina.

l.: litro

LB: Luria Bertani (medio de cultivo).

M: molar, concentración mol/l.

mg: miligramo.

min: minuto.

ml: mililitro.

mM: milimolar.

ng.: nanogramos.

nm: nanómetros, longitud de onda.

°C: grados centígrados.

ORF: pauta abierta de lectura (*Open Reading Frame*).

P: secuencia promotora del gen.

pb: pares de bases

PCIA: fenol + cloroformo + alcohol isoamílico (*Phenol Chloroform Isoamyl Alcohol*).

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

PEG: Polietilenglicol.

pH: potencial de Hidrógeno.

RNasa: ribonucleasa, enzima degradadora de ARN.

rpm.: revoluciones por minuto.

s: segundos.

ScABF2: gen *ABF2* de *Saccharomyces cerevisiae*.

SDS: dodecil sulfato sódico, *Sodium Dodecyl Sulfate*.

T: secuencia terminadora del gen.

t: tiempo.

Trp: triptófano.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

YNB: *Yeast Nitrogen Base*, suplemento para medios CM.

YPD: *Yeast Peptone Dextrose*, medio de cultivo a base de estos tres compuestos.

YPE: *Yeast Peptone Ethanol*, medio de cultivo a base de estos tres compuestos.

YPG: *Yeast Peptone Glycerol*, medio de cultivo a base de estos tres compuestos.

μ g: microgramo.

μ l: microlitro.

μ m: micrómetro.

μ M: micromolar.