

UCH-FC  
Biotecnología  
H477  
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

# **“Implementación de una estrategia molecular para incorporar genes en el genoma de *S. cerevisiae*”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**JOCELYN DAFNA HELLER LINDENBAUM**

Dra. Lorena Norambuena  
Directora del Seminario de Título

Diciembre de 2011  
Santiago - Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **SRTA. JOCELYN DAFNA HELLER LINDENBAUM**.

### **“Implementación de una estrategia molecular para incorporar genes en el genoma de *S. cerevisiae*”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

*Dra. Lorena Norambuena*  
**Directora Seminario de Título**

Firma manuscrita en azul de la Dra. Lorena Norambuena, sobre una línea horizontal.

#### Comisión de Evaluación

*Dr. Marceo Baeza*  
**Presidente Comisión**

Firma manuscrita en azul del Dr. Marceo Baeza, sobre una línea horizontal. A la izquierda de la firma se encuentra un sello circular de la Biblioteca Central de la Facultad de Ciencias de la U. de Chile.

*Dr. Francisco Chavez*  
**Evaluador**

Santiago de Chile, Diciembre de 2011



*Torres del Paine, 2009*

Soy Jocelyn, la mayor de tres hermanos y única hija mujer de Carlos y Jeannette. Nací el 30 de Diciembre de 1984 en Santiago de Chile y siendo la primera nieta e hija desde mis primeros días de vida pasé a ser el centro de atención de mi familia, lo cual claramente marcó para

siempre mi personalidad y ganas de sobresalir por sobre el resto.

Mi educación Pre-Escolar y escolar la realice en el Instituto Hebreo de Santiago de donde me gradué el año 2002 con excelentes notas, lo que me permitió tener la oportunidad de elegir entre muchas carreras que hizo aún mas difícil la elección.

Pero mi inclinación era clara: amo las ciencias naturales y me encantaría trabajar en un laboratorio y descubrir y desarrollar algo importante, por lo que el año 2003 ingresé al programa de Bachillerato en ciencias naturales y exactas de la Universidad de Chile para tener un poco mas de tiempo y experiencia en la universidad que me permitieran tomar la mejor decisión sobre mi futuro. Es así como decidí continuar mis estudios en la carrera de Ingeniería en Biotecnología molecular, de la cual en este minuto entrego este seminario de título.

Terminando esta etapa, siento que cuento con las herramientas para empezar con “mi vida” y tengo plena fe en que todo será aun mejor de lo que siempre he imaginado.





***A mis papis...***





## AGRADECIMIENTOS

Es difícil comenzar mis agradecimientos sin pensar en tantas personas que pasaron y quedaron en mi vida durante todo este proceso.

Agradezco a mis padres por darme la vida y amarme de la manera que siempre lo hicieron.

Mamá, te extraño. Mi vida ha sido realmente diferente a lo que había imaginado para el día que estuviera en la universidad, pero aún así lo logré; estoy agradeciéndote en éste, mi seminario de título en el cual termino esta etapa. Se que me has cuidado todo este tiempo y que me visitas cuando más lo necesito, así que solo espero tenerte presente por siempre. Te quiero mucho!.

Papi: Gracias!. Eres la persona que más quiero en este mundo y aunque lo sabes creo que es bueno recordártelo en este momento. Me lo has dado todo, todo lo que he necesitado, he incluso lo que no. Me has dado todo el amor del mundo, y aunque me cueste compartirlo, se que seguiré recibéndolo por siempre. Si bien a veces no comparto tu forma de pensar y como enfrentas ciertos algunos temas, me atrevo a decir que has hecho un gran trabajo entregándome las herramientas necesarias para que sea hoy la persona que soy.

Agradezco a mi Efi, mi amiga y hermana la cual me ha acompañado desde el colegió, compartiendo infinitos momentos. Gracias por apoyarme siempre, por escucharme y aconsejarme. Por estar cuando te necesité y por mostrarme que no me equivoqué al elegirte como miembro de mi familia.

Gracias Guila, porque desde que apareciste en nuestras vidas he sentido como te preocupas por nosotros y el cariño que constantemente nos entregas. Aprecio muchísimo como me has apoyado y como te has involucrado en este proceso que no ha sido para nada fácil.

Lore, más que una tutora te has convertido en una persona muy cercana, con la cual he compartido momentos tan diversos e importantes de mi vida... Me has dado tantas lecciones que creo que es injusto referirme solo a lo académico. Uno sabe cuando alguien se preocupa, y siento que tu lo haces de verdad. Gracias por TODO.

A mi Team LNM. A los que pasaron: Ale, no se que habría hecho sin tu ayuda, sin tu disposición y tu cariño todo el tiempo que trabajaste con nosotros. El Mati y Andrés, partners de mesón ¡Cuántas veces quise matarlos por el desorden!, pero los adoro. Y los que siguen y seguirán... Mi Lorelia, pucha que te quiero Lorelia! siempre con esa disposición y con ese apoyo. Patito y Carlitos, gracias por todo lindos.

Gracias a la gente del Lab. Al Sebita y la Ange que siempre fueron un 7 conmigo. A los profes por los buenos consejos siempre y gran simpatía. A los niños y niñas: Diego, la Fran, la Sofi, la Yupi, la Claudilla, el Koke, Charlie, Juank y la Pauli por su ayuda y buena onda siempre. A mis amiguis Daniella, Pato Star y Andrew, por hacer, a veces solo con su presencia y cariño, mis días infinitamente felices, LOS QUIERO!.

Y como todo este proceso lo viví principalmente con los amigos que conocí en la U, agradezco a cada uno de ellos. Al Pato y la Caro, el Leo, Johat, la Gabita. Gracias Migui por todos los buenos momentos que compartimos y todas las sonrisas que lograste robarme. Gracias Claudio por el inmenso cariño que me entrega, por haberme ayudado siempre y más con el último impulso. A la Cami le doy gracias por ofrecerme toda la ayuda que puede y ser una persona presente desde los inicios. A mi Chicha, mi amiga y compañera de tantos años, de tantos momentos. Te quiero infinito... No ha sido fácil ni corto amiga, pero estamos terminando!.

Por último quiero darle las gracias a dios, por darme la oportunidad de llegar a este momento; y permitirme estar compartiéndolo con la gente que quiero.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>BIOGRAFIA.....</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>INDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>VII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE ABREVIACIONES.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIV</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>Expresión e integración en el genoma</b>	<b>1</b>
<b>Búsqueda de vectores que integren genes establemente al genoma de <i>S.cerevisiae</i></b>	<b>2</b>
<b>Una levadura que bioacumule cobre</b>	<b>5</b>
<b>Planteamiento del estudio: una levadura bioacumuladora como herramienta en la industria minera</b>	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
<b>Reactivos</b>	<b>8</b>
<b>Medios de cultivo</b>	<b>8</b>
Medios de cultivo para <i>E.coli</i>	<b>8</b>

Medios de cultivo para <i>S.cerevisiae</i>	8
<b>Material Biológico</b>	<b>8</b>
<i>Escherichia coli</i> , DH5 $\alpha$	8
Obtención de células de <i>E. coli</i> electrocompetentes	9
Transformación de <i>E.coli</i> mediante electroporación	9
Purificación del ADN plasmidial de <i>E.coli</i>	10
Digestión de ADN por enzimas de restricción	10
Ligación de los vectores pRs306 y 316 con los insertos de interés	11
Electroforesis en gel de agarosa	11
Purificación de ADN desde geles de agarosa	12
Extracción de RNA desde <i>A.thaliana</i>	12
Transcripción reversa (RT-PCR)	12
Amplificación del gen Athma1 mediante PCR	15
Secuenciación	15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , $\Delta$ <i>ycf1</i>	15
Transformación de <i>S. cerevisiae</i> por electroporación	17
Análisis de colonias de levaduras transformantes	18
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
<b>Construcción del vector pRs306E y del vector pRs316E</b>	<b>19</b>
<b>Análisis de las construcciones pRs306E y pRs316E</b>	<b>21</b>
<b>Construcción de los vectores pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1</b>	<b>23</b>
Amplificación de AthMA1 desde ARN de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Obtención de ADNc de HMA1 desde el vector pGEM-T/HMA1	24
<b>Análisis de las construcciones pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1</b>	<b>26</b>
<b>Obtención de levaduras transformantes con los vectores pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1</b>	<b>30</b>
<b>Análisis de las levaduras: Ensayo de toxicidad a cationes</b>	<b>31</b>



**metálicos**

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>    Ensayos de complementación con cationes</b>	<b>36</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>PROYECCIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>45</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de recombinación homologa del vector Ylp	4
Figura 2	Esquema de los vectores pRs306 y pRs316 utilizados en el presente seminario	6
Figura 3	Digestión enzimática doble de los vectores pGPD426, pRs306 y pRs316	20
Figura 4	Análisis de la presencia del inserto GPD/CYC en los vectores pRs306E y pRs316E	22
Figura 5	Comprobación del estado del ARN extraído desde <i>A.thaliana</i>	23
Figura 6	Comprobación de la presencia del gen AtHMA1 en el vector pGEM-T	25
Figura 7	Esquema de los vectores pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1 generados en este seminario de título	26
Figura 8	Digestión de pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1	27
Figura 9	Alineamiento de secuencias en ClustalW	29
Figura 10	Controles de la transformación de cepa $\Delta ycf$ (DTY167) de <i>S. cerevisiae</i> .	32
Figura 11	Ensayo de tolerancia a cationes metálicos	33

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	<b>Programas de PCR utilizados en este seminario de título</b>	<b>14</b>
<b>Tabla 2</b>	<b>Partidores utilizados en el presente seminario de título</b>	<b>16</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

mARN: ARN mensajero

DEPC: Dietilpirocarbonato

D.O.: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

LB: Luria Bertani

nm: nanometro

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RNasa: Ribonucleasa

rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Transcripción reversa acoplada a reacción de cadena de la polimerasa

UV: Ultra-violeta

μL: Microlitro

μF: Microfaraday

°C: Grados Celsius



## Resumen

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es una herramienta indispensable de la ingeniería genética. La gran mayoría de las estrategias de manipulación génica en esta especie, son de carácter transiente; pero en procesos industriales, es necesaria la integración en el genoma de los genes de interés, para lo cual se utilizan vectores integrativos. En estos vectores, es indispensable la incorporación del gen y los elementos necesarios para una correcta expresión de los mismos. La estabilidad de los vectores integrativos es independiente de la presión de selección, lo que posibilita su uso en procesos de gran escala.

En el presente trabajo planteamos desarrollar una estrategia molecular para integrar y expresar de manera estable genes en el genoma de *S. cerevisiae*.

Se generaron vectores de expresión pRs306E y pRs316E provenientes del vector integrativo en el genoma pRs306 y centromérico pRs316. Para probar su funcionalidad, se sub-clonó en ellos el gen *Athma1* de *A. thaliana* el cual codifica una ATP-asa de tipo P, capaz de otorgarle a la levadura la capacidad de acumular una mayor concentración de cobre que su línea parental y tolerancia a cationes metálicos.

Al realizar los ensayos de tolerancia a cationes metálicos para probar la funcionalidad de los vectores, no se observó crecimiento de colonias en ninguno de los medios suplementados. Esto puede deberse a la presencia de mutaciones encontradas en la secuencia utilizada. La funcionalidad de los vectores generado deberá analizarse en el futuro.

## **Abstract**

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is an indispensable tool of genetic engineering. The vast majorities of gene manipulation strategies in this specie are transient, but in industrial processes is necessary to integrate the genes of interest into the microorganism genome for what integrative vectors are used. In these vectors, the gene must be incorporated with the necessary elements for gene expression. The stability of integrative vectors is independent of selection pressure, allowing its use in large-scale processes.

In this work we propose to develop a molecular strategy for integrating and stably express genes in *S. cerevisiae* genome.

Expression vectors pRs306E and pRs316E were generated from the genome integrative vector pRs306 and the centromeric vector pRs316. To test their functionality, we sub-cloned into them the gene *Athma1* from *A. thaliana* which encodes a P-type ATPase, that confer the ability to yeast to accumulate a higher concentration of copper than the parental line and tolerance to metal cations.

When performing tests of tolerance to metallic cations, to test vectors functionality, there was no growth of colonies in media supplemented. This may be due to the presence of mutations in the cloned sequence.

The functionality of the vectors generated should be analyzed in the future.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Expresión e integración en el genoma.

*Saccharomyces cerevisiae*, siendo el microorganismo eucarionte más estudiado hasta el momento, se ha convertido en una herramienta indispensable de la ingeniería genética. Su versatilidad y capacidad de transformación permiten que se adapte y crezca sin mayores complicaciones, sobreviviendo bajo condiciones de estrés al integrar en su genoma genes de otros organismos por medio de diferentes tipos de vectores, que al expresarse confieren a la levadura nuevas características (González y Valenzuela, 2003). La gran mayoría de las estrategias de manipulación genética, sin embargo, son de carácter transitorio. Esto hace necesario el cultivo en condiciones especiales de selección para mantener dicha característica a través de las generaciones, lo que es impracticable para muchos procesos, especialmente de interés industrial.

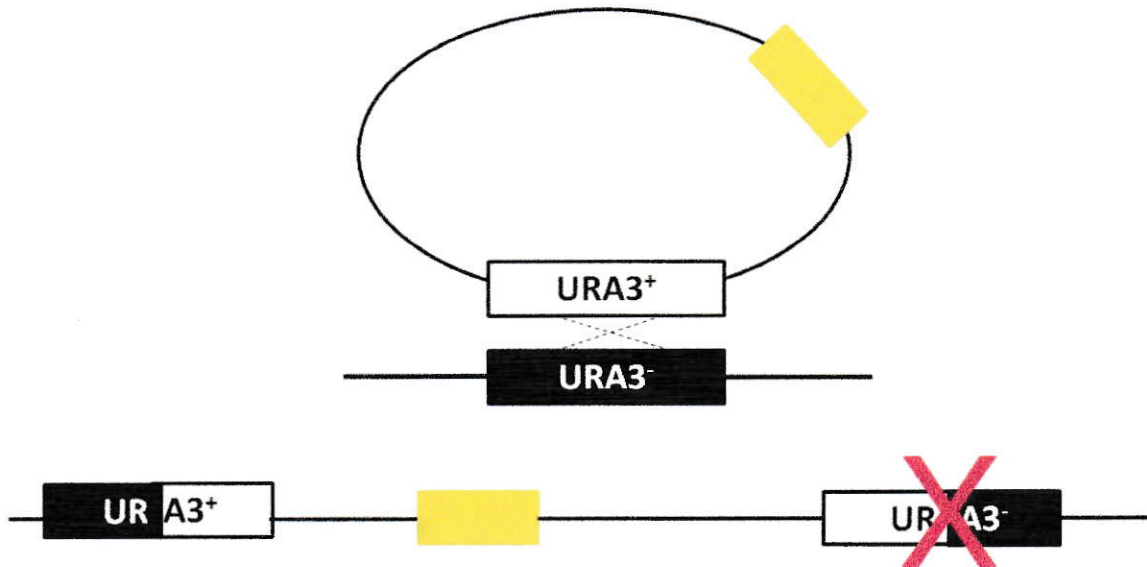
Una posibilidad para remediar esta situación es la integración en el genoma de los genes de interés, para lo cual existen distintos tipos de estrategias. Han sido descritos diferentes tipos de vectores integrativos: Están los plasmidios integrativos de levadura (YIp), los cuales por recombinación homóloga se integran en los cromosomas (Orr-Weaver y col, 1981). Además se han desarrollado los plasmidios Centroméricos de levadura (YCp) que tienen la capacidad de replicarse autónomamente y segregan como un cromosoma al momento de la división celular (Adams y col, 1997). Por otra parte están también los vectores integrativos multicopia que se integran en secuencias repetidas dentro del ADN, como el ADN ribosomal que contiene 120 copias repetidas en tándem (Dujon, 1996); o en secuencias  $\delta$ , correspondientes a varias repeticiones

terminales del retrotransposón Ty1 (Lee y Da Silva, 1997). Estos, sin embargo, no pueden ser usados para expresar genes de manera estable, ya que no poseen los elementos necesarios.

## **1.2 Búsqueda de vectores que integren genes establemente al genoma de *S.cerevisiae***

Los vectores integrativos de levaduras (YIp) son plasmidios híbridos compuestos de secuencias bacterianas y de levadura. Contienen DNA bacteriano codificante para un origen de replicación (*ori*) que le permite replicarse en *E. coli*, y para algún gen de resistencia a antibióticos que permite la selección de la bacteria donde se propaga el vector. Contienen también un gen de auxotrofia de levadura que actúa como marcador genético, el cual permite seleccionar transformantes. Estos vectores se transforman en baja frecuencia, de 1 a 10 transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN (Struhl y col, 1979). Estos vectores no tienen la capacidad de auto replicarse, pero se integran por recombinación homologa como única copia y son altamente estables presentándose una pérdida del vector con una frecuencia menor al 0,1% por generación debido a eventos de retro recombinación. Como tienen esta característica no es necesario crecer la levadura en medio selectivo. Este sistema permite generar integraciones, deleciones o reemplazo de genes de interés (Struhl y col., 1979).



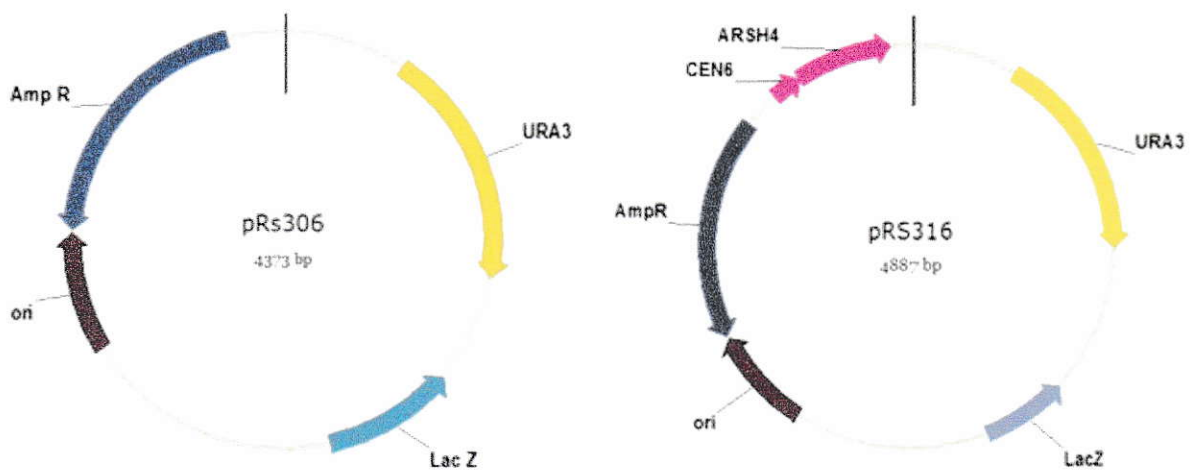


**Figura 1: Esquema de recombinación homologa del vector Yip.** Por reconocimiento de una secuencia en el genoma, el gen de auxotrofia en el vector recombina con su homologo mutado presente en el cromosoma de la levadura. De esta manera se integra todo el vector en el cromosoma y finalmente se expresa el gen de auxotrofia al restituirse su funcionalidad.

Los vectores centroméricos de levadura (YCp), por su parte, contienen además de los elementos mencionados comunes de los vectores integrativos, una secuencia de replicación autónoma en levaduras (ARS) y una secuencia CEN correspondiente a una secuencia que genera un sitio de interacción del cromosoma al huso mitótico al momento de la división celular, otorgando estabilidad al material genético en la segregación de los cromosomas (Cottarel y col, 1989). Estos vectores también se integran en un bajo número de copias (1-3 copias por célula) y al igual que los vectores Yip, son altamente estables al momento de la segregación (Clarke y Carbon, 1980).

Se seleccionaron los vectores mencionados, integrativo y centromérico, ya que como se describe, son capaces de integrarse en un bajo número de copias; lo cual se espera no afecte en el desarrollo normal de la célula o en su viabilidad.

En el año 1989 Robert S. Sikorski y Philip Hieter publicaron un trabajo donde describen la construcción de una serie de vectores (shuttle vectors) de tipo integrativo (serie pRs300) y centroméricos (serie pRs310) que comparten su estructura pero difieren en el marcador de selección de auxotrofia utilizado en cada uno de ellos. En estos vectores fue insertada la zona del sitio de múltiple clonamiento del vector pBLUESCRIPT de *Escherichia coli*, que se caracteriza por poseer un alto número de sitios de restricción (Stratagene).



**Figura 2: Esquema de los vectores pRs306 y pRs316 utilizados en el presente seminario.** Ambos vectores contienen el gen de resistencia a ampicilina, el gen URA3, la secuencia del gen Lac Z y un origen de replicación de *E. coli*. El vector pRs316 contiene a demás una secuencia de auto replicación (ARSH4) y una secuencia centromérica (CEN6).

Se propone entonces el uso del vector integrativo pRs306 y su análogo centromérico pRs316 (Figura 2) como herramienta para integrar los genes de interés, en este caso, generar una levadura con la capacidad de acumular cobre en su interior y tolerar las condiciones de crecimiento. Estos vectores cuentan con el gen URA3

como marcador de selección, ampliamente utilizado en vectores híbridos o bifuncionales (Bach y col., 1979), que permitirá la selección de las levaduras al cultivarlas en un medio deficiente de uracilo. Dentro de la serie completa descrita por los investigadores se eligió los vectores portadores del gen URA3 buscando replicar los ensayos realizados por Moreno y col., los cuales fueron efectuados con vectores con el mismo marcador de selección.

### 1.3 Una levadura que bioacumule cobre.

En un trabajo publicado el año 2008 por Moreno y col. se describió la generación de una levadura *S. cerevisiae* transformada de manera transitoria con el gen *Athma1* de *A. thaliana* capaz de acumular una mayor concentración de cobre que su línea parental (Moreno y col, 2008).

El gen *Athma1* codifica para una bomba ATP-asa de tipo P. Las P-ATPasas son bombas que impulsadas por ATP son capaces de transportar diversos cationes metálicos a través de membranas y las que se caracterizan por formar un intermediario fosforilado durante el ciclo de transporte del catión en cuestión (Axelsen y Palmgren, 2001). Dentro de las P-ATPasas se encuentra un grupo de bombas clasificadas como  $P_{IB}$ -ATPasas, las cuales han sido caracterizadas como reguladoras en la homeostasis y transporte de diversos cationes metálicos como  $Ca^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  y  $Co^{+2}$  en variados organismos (Moller y col, 1996). En particular, HMA1 es una de las ocho proteínas descritas en *A. thaliana* con la característica de ser  $P_{IB}$ -ATPasas; todas las cuales comparten en su estructura un largo dominio N-terminal de unión a cationes metálicos que le otorgan el nombre característico de "Heavy metal ATP-ases" (HMA) (Axelsen y Palmgren, 2001).

En el trabajo de Moreno y Col. se describe que el expresar en levaduras la bomba Athma1 le otorga al microorganismo tolerancia a altas concentraciones de cationes metálicos ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$ , y  $\text{Co}^{+2}$ ). La expresión del gen Athma1 es capaz de aumentar considerablemente la actividad ATP-ásica en presencia de dichos metales, indicando que esta bomba es activada por los cationes en cuestión (Moreno y col., 2008). En ensayos posteriores se demostró que la levadura transformada transitoriamente con el gen Athma1 tiene una mayor capacidad de acumular cobre en su interior, y no otros cationes (Ordenez y col., datos no publicados).

#### **1.4 Planteamiento del estudio: una levadura bioacumuladora como herramienta en la Industria minera.**

La levadura descrita en ese trabajo fue transformada con un vector episomal, lo que implica que necesita crecer en un medio selectivo para no perder el vector y el gen de interés. Esto imposibilita su uso en procesos de gran escala, ya que la mantención de un medio selectivo es económicamente inviable.

La expresión estable sin presión selectiva del gen Athma1 solucionaría este problema, para lo cual es necesario contar con vectores de expresión con capacidad de integración en el genoma.

Para lograr este objetivo se plantea en el presente seminario de título la generación de un vector capaz de integrar y expresar genes de manera estable en el genoma de *S. cerevisiae*. Eventualmente, de ser necesario, su posterior modificación para lograr una correcta expresión de los genes de interés.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Desarrollar una estrategia molecular para integrar y expresar de manera estable genes en el genoma de *S. cerevisiae*.

### **2.2 Objetivos Específicos**

**2.2.1** Construcción de vectores que se integren establemente en el genoma de *S. cerevisiae* y permitan la expresión de los genes de interés.

**2.2.2** Evaluar la funcionalidad de los vectores generados sub-clonando el gen *Athma1* en los mismos.

**2.2.3** Comparar la funcionalidad del gen *Athma1* en células de *S. cerevisiae* transformadas utilizando un vector episomal y los vectores seleccionados.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 REACTIVOS**

Se utilizaron reactivos de pureza apropiada para realizar las técnicas de biología molecular y análisis. Los reactivos fueron adquiridos en Axygen, Fermentas, Merck, Promega, Stratagene.

#### **3.2 MEDIOS DE CULTIVO**

##### **3.2.1 Medios de cultivo para *E.coli***

Luria Bertani (LB): Extracto de levaduras 0,5%, Triptona 2%, NaCl 0,8% . Para medio sólido se adiciona agar 1,5%.

##### **3.2.2 Medios de cultivo para *S. cerevisiae***

YPD líquido: Extracto de levadura 1%, peptona 2%, Glucosa 2%. Para medio sólido se adiciona agar 2%.

Medio mínimo líquido (YMM) libre de uracilo (ura-): Base nitrogenada de levadura 0,17%, sulfato de amonio 0,5%, glucosa 2%, mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas 0,042% (ver Anexo 1). Para medio sólido se adiciona agar 1,5%.

#### **3.3 MATERIAL BIOLÓGICO**

**3.3.1 *Escherichia coli*, DH5 $\alpha$ :** Se creció en medio LB líquido a 37°C por 16 horas. El cultivo en medio sólido fue realizado a 37°C por 16 h. En ambos medios la selección de transformantes se efectuó con ampicilina 100  $\mu$ g/mL.

### **3.3.1.1 Obtención de células de *E. coli* electrocompetentes**

Para la preparación de las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, capaces de aceptar ADN foráneo, se creció un inóculo de cultivo en 5mL de LB suplementado con 50 $\mu$ g de ácido nalidíxico, el cual impide el crecimiento de algún microorganismo que no sea *E. coli* DH5 $\alpha$ , 16-18h a 37°C. Al día siguiente se inóculó 1 mL de cultivo en 100mL de LB en un matraz y se incubó a 37°C con agitación hasta obtener una D.O<sub>600</sub> de 0.6-0.9, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. Se dividió el cultivo en 2 tubos estériles de 50 mL los cuales se centrifugaron a 4°C por 10 min a 6.800 g para luego lavar el sedimento con 50 mL de agua fría estéril. Se suspendió las células cuidadosamente por agitación. Luego se centrifugó por 10 min a 6.800 g a 4°C y se suspendió el sedimento de un tubo con agua fría estéril nuevamente, con el homogenizado suspendió el contenido del siguiente tubo para concentrar las soluciones. Se volvió a centrifugar por 10 min a 6.800 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante con cuidado y se agregó 10 mL de glicerol estéril al 10%. Se centrifugó por 10 min a 6.800 g en frío, se descartó el sobrenadante y se agregó 300 $\mu$ L de glicerol 10% frío estéril. Finalmente alícuotas de 40 $\mu$ L fueron almacenadas a -80°C para su posterior uso.

### **3.3.1.2 Transformación de *E. coli* mediante electroporación**

Para transformar las células mediante electroporación en primer lugar se dializó el ADN en membranas de nitrocelulosa (Millipore) para desionizarlo. Para ello se colocó una gota de 10 $\mu$ L de una muestra de ADN sobre una membrana de nitrocelulosa que flota sobre agua en una placa de petri; se dejó la muestra por 10 min para permitir el intercambio de solutos y se recuperó la gota con el ADN libre de iones. El ADN se mezcló con una alícuota de 40 $\mu$ L de células electrocompetentes. A continuación la

mezcla se traspasó a una cubeta de electroporación (2mm). Se configuró el electroporador Gene Pulser Xcell™ (Bio-Rad) con el protocolo predeterminado para transformar bacterias con una diferencia de potencial de 2,5kV, una capacidad eléctrica de 25µF y 200Ω de resistencia eléctrica. A continuación se creció las células en 1mL de cultivo LB durante 1h a 37° C en agitación. Luego se sembró 100µL de cultivo en medio LB sólido suplementado con ampicilina a una concentración final de 100µg/mL. El cultivo restante (900 µL) se sedimentó a 5.000 g por 3 a 5 min se suspendió en 50 µL de cultivo que fueron sembrados de la misma manera sobre el medio. Se incubó las placas en incubador a 37°C durante 16-20 h. Al transcurrir ese tiempo se procedió a contar el número de colonias obtenidas para calcular la eficiencia de transformación en cada caso utilizando la formula: Número de unidades formadoras colonias (UFC)/ ng de ADN utilizado para transformar.

#### **3.3.1.3 Purificación del ADN plasmidial de *E.coli***

Se realizó la purificación del ADN plasmidial según el protocolo, y utilizando los reactivos del kit Axyprep™ (Axygen) cuyo principio corresponde a una lisis alcalina de la célula bacteriana combinado a una unión selectiva del ADN plasmidial a una columna de purificación. Con el ADN obtenido fueron hechos los análisis de restricción enzimática, amplificación por PCR, las transformaciones de células bacterianas DH5α y las secuenciaciones de ADN.

#### **3.3.1.4 Digestión de ADN por enzimas de restricción**

Siguiendo el protocolo de digestión enzimática recomendado por los fabricantes se utilizaron las enzimas de restricción Fermentas, *EcoRI*, *SacI*, *BamHI*, *BglII*, *KpnI* y *HindIII*. Para liberar el fragmento correspondiente al promotor GPD, al SMC y el



terminador *CYC1*, desde el vector pGPD426 se realizó una doble digestión ([www.fermentas.com/en/tools/doubledigest](http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest)) con las enzimas *SacI* y *KpnI* y con el mismo par de enzimas se linearizó los vectores pRs306 y pRs316. Las enzimas *BamHI* y *EcoRI* fueron utilizadas para linearizar los vectores generados pRs306E y pRs316E. Las enzimas *BglII* y *EcoRI* en una doble digestión lograron liberar el fragmento correspondiente al gen HMA1 desde el vector pGEM-T. Por último la enzima *HindIII* se utilizó para corroborar la presencia del gen en los clones obtenidos.

### **3.3.1.5 Ligación de los vectores pRs306 y 316 con los insertos de interés**

Para las ligaciones de los vectores seleccionados y los insertos correspondientes se efectuó reacciones de un total de 10µL conteniendo: 1,5 U de enzima T4 ligasa (Fermentas), 1X de Buffer T4 (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP), 100ng de vector linearizado y aproximadamente 50ng de inserto. Se incubó la reacción a 22°C por 16 h.

### **3.3.1.6 Electroforesis en gel de agarosa**

La electroforesis de ADN se efectuó en geles de agarosa preparados en solución TAE (Tris/Acetato 40mM, EDTA 1mM) a concentraciones 1% o 0.8% de agarosa. Las muestras fueron mezcladas con el tampón de carga (Azul de bromo fenol 0,25%, xileno cianol 0,25% y glicerol 80%) llevándolo a una concentración 6X, para luego ser cargadas en el gel. Se utilizó un estándar de peso molecular de 1 Kb (Fermentas). La electroforesis fue realizada a una diferencia de potencial de 80 a 100 V con una corriente de 160A por 35 min en geles de agarosa al 0,8 ó 1% dependiendo del tamaño del fragmento esperado a visualizar. A continuación se tñeron los geles en una solución de bromuro de etidio a concentración de 6mg/L por 20 min. Se lavó los geles

en solución TAE y finalmente los geles se fotografiaron en el equipo Syngene con luz ultravioleta.

### **3.3.1.7 Purificación de ADN desde geles de agarosa**

Tras hacer los geles de agarosa y proceder a correr las muestras por electroforesis, se procedió a cortar las bandas de interés, para luego purificar el ADN presente en los fragmentos del gel obtenidos utilizando los reactivos del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) según el protocolo correspondiente. Con este ADN se realizaron las ligaciones con el vector de interés.

### **3.3.2 Extracción de RNA desde *A.thaliana***

Se creció plántulas de *A.thaliana* eco-tipo silvestre (Col-0) por 40 días en medio hidropónico (Anexo 2) (Gibeaut y col, 1997). Se realizó una extracción de RNA desde hojas caulinares de plantas de *A. thaliana* crecidas por 40 días. Se utilizó 30mg de tejido y se aisló el ARN utilizando el kit SV total RNA isolation System (Promega) según el instructivo del fabricante.

#### **3.3.2.2 Transcripción reversa (RT-PCR)**

Para obtener ADNc desde el RNA extraído de plantas de *A. thaliana* se efectuó un RT-PCR para lo cual se utilizó el termociclador MyCycler™ (BIO-RAD). Previo a la reacción de retrotranscripción del ARN se efectuó un tratamiento con DNasa para eliminar cualquier vestigio de contaminación en la muestra. Para esto se mezcló 4µg de ARN (sección 3.3.2), 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 2U de enzima DNasa (Fermentas), 10U de inhibidor de RNAasa RiboLock™ (Fermentas). La mezcla se llevó a un volumen de 10µL con agua DEPC (agua tratada con DEPC que inhibe la

acción de ribonucleasas que degraden el RNA) y se incubó por 20 min a 37°C. Transcurrido el tiempo se pusieron las muestras en hielo y se les agregó 2mM de EDTA para inactivar la RNAsa. La muestra se dividió en dos tubos y rápidamente se agregó a cada tubo 10µM del partidor Oligo AP (Tabla II) y se insertaron los tubos en el termociclador para dar un golpe de calor por 5 min. Transcurrido el tiempo se agregó a cada tubo una mezcla de reacción que contiene una concentración final de: 1X buffer ImProm-II™, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10U de inhibidor de RNAasa RiboLock™ (Fermentas), 0,5mM de dNTP DEPC, 1µL ImProm-II™. Se ejecutó entonces el programa de RT-PCR descrito en la tabla I.



**Tabla I. Programas de PCR utilizados en este seminario de título. A) Programa utilizado para amplificar el gen Athma1. B) Programa de RT-PCR para obtener ADNc mediante retro transcripción de ARN de *A.thaliana*. C) Programa para comprobar la integridad del ADNc utilizando partidores 18S que amplifican la sub-unidad ribosomal18S.**

**A. HMA1**

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Numero de ciclos
1	1	94	4 minutos	1
2	1	94	40 segundos	40
	2	59	30 segundos	
	3	72	100 segundos	
3	1	72	15 minutos	1
4	1	8	∞	1

**B. RT-PCR**

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo
1	1	70	5 minutos
	2	0	5 minutos
	3	25	5 minutos
2	1	42	60 minutos
	2	70	15 minutos
3	1	4	∞

**C. 18S**

Estado	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Numero de ciclos
1	1	94	4 minutos	1
2	1	94	40 segundos	30
	2	52	30 segundos	
	3	72	30 segundos	
3	1	72	2 minutos	1
4	1	8	∞	1

### 3.3.2.3 Amplificación del gen Athma1 mediante PCR

Para amplificar el gen Athma1 se realizó una serie de reacciones de PCR. El protocolo para las reacciones de PCR corresponde a: 1X del buffer de enzima, 0,2µM de partidor sentido FwBgl II (5'- GAACTAGTAGATCTAATTCGTCGACCATGG - 3') (Tm 57.8) y 0,2µM de partidor anti sentido RvHMA1 (5'- ACCTGAAGGGCCCATTCGAACGAAAC - 3') (Tm 63.1), 0,2mM de dNTPs, 1U de Paq500™ DNA polymerase (Stratagene), ADN molde; proveniente de ADNc de *Arabidopsis thaliana*. La reacción se llevó a cabo en 20µL. Como control negativo se utilizó agua y como control positivo ADN plasmidial.

### 3.3.2.4 Secuenciación

Los clones de *E. coli* identificados por análisis de digestión enzimática del ADN plasmidial que presentaron el gen HMA1 fueron secuenciados en MacroGen Co. (Korea), utilizando partidores diseñados para lograr determinar la secuencia completa del gen (Tabla II).

**3.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*,  $\Delta ycf1$ :** Se utilizó la cepa  $\Delta ycf1$  (DTY167) con genotipo Mat  $\alpha$ ; lys2-801; suc2- $\Delta 9$ ; his3- $\Delta 200$ ; leu2-3,-112; trp1- $\Delta 901$ ; ura3-52. Esta cepa es mutante en el transportador Ycf1p (Yeast cadmium factor) y presenta hipersensibilidad frente a cationes metálicos como Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, y Co<sup>+2</sup>. Se creció las levaduras a 30°C en medio YPD. La selección y crecimiento de las levaduras transformantes se realizó en medio mínimo líquido y sólido a 30°C.

**Tabla II. Partidores utilizados en el presente seminario de título.**

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia del partidor (5' - 3')</b>	<b>Descripción</b>
Oligo AP	CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTT TTTTTT	Partidor diseñado para hibridar con la cola de poliA del ARNm en la reacción de retrotranscripción.
Fw18S	TTGATTACGTCCCTGCCCTTT	Partidor directo y partidor inverso que amplifican un fragmento de 196pb del gen que codifica para el ARN ribosomal 18S
Rv18S	ACAATGATCCTCCGCAGGT	
FwHMA1BgIII	GAACTAGTAGATCTAATTCGTGACCATGG	Partidor directo del gen HMA1
RvHMA1	ACCTGAAGGGCCCATTCGAACGAAAC	Partidor inverso del gen HMA1
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Partidor externo al sitio de múltiple clonamiento (SMC) de los vectores pRs306 y pRs316. Se utilizó para secuenciar los clones con la inserción de HMA1
HMA1 560	TCTTGATGGCACTTGCGGCTTT	Partidor directo diseñado para secuenciar los clones desde el sitio 560 del gen HMA1
HMA1 1165	TTTCTCAGCACCGCAGCATGTA	Partidor directo diseñado para secuenciar los clones desde el sitio 1165 del gen HMA1
HMA1 1766	AGGACTTCGTTTCATGCTGCTCT	Partidor directo diseñado para secuenciar los clones desde el sitio 1766 del gen HMA1

### 3.3.3.1 Transformación de *S.cerevisiae* por electroporación

En 15 mL de medio de cultivo YPD se inoculó una colonia de levaduras DTY167 y se dejó creciendo por 16 h en agitación a 30°C. Al día siguiente se inoculó aproximadamente 3 mL de este cultivo en 15 mL de YPD fresco para alcanzar una  $DO_{600}$  de 1.0. Se dejó en agitación a 30°C hasta llegar a una  $DO_{600}$  entre 1,3-1,5. Se centrifugó en un tubo de 50mL a 2.600 g por 5 min y se lavó el sedimento con agua estéril fría. Este proceso se repitió y luego se lavó con la mitad del volumen de agua. Se centrifugó nuevamente y se suspendieron las células en 4mL de Sorbitol 1% estéril y frío. Se centrifugó y se suspendió luego el sedimento en 100 $\mu$ L de Sorbitol 1% obteniéndose las células electro competentes. Alícuotas de 40  $\mu$ L fueron almacenadas a 4°C por el resto del día.

Se mezcló cada alícuota de células competentes con aproximadamente 200ng del ADN previamente dializado en membranas de nitrocelulosa (Millipore). Esta mezcla fue colocada en cubetas de electroporación de 2mm y se procedió con la transformación. Para ello se configuró el electroporador en un programa especial para levaduras con una diferencia de potencial de 1,5KV, una capacidad eléctrica de 25  $\mu$ F y una resistencia de 200 $\Omega$ . Tras transformar se adicionó 1mL de YMM y se creció por 1 h las levaduras en agitación a 30°C. A continuación se centrifugaron las células a 5.000 g por 5 min y se lavaron con 1mL Sorbitol 1%. Se sembró 100 $\mu$ L de este cultivo en placas de 25 mL de YMM (ura-). Luego se centrifugó el remanente y se suspendió las células en aproximadamente 50 $\mu$ L de medio que fue sembrado de igual manera. Se incubaron las placas por 3 días a 30°C.



### **3.3.3.2 Análisis de colonias de levaduras transformantes**

#### **PCR de colinas de *S.cerevisiae* para el gen HMA1**

El PCR de colonia corresponde a una variante del PCR tradicional donde el ADN molde que se utiliza corresponde directamente a un cultivo de levaduras. El protocolo para las reacciones de PCR corresponde al mismo descrito anteriormente cambiando solamente el ADN molde: 1X del buffer de enzima, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2μM de partidor sentido FwBgl II (5'- GAACTAGTAGATCTAATTCGTCGACCATGG - 3') (Tm 57.8°C) y 0,2μM de partidor anti sentido RvHMA1 (5'- ACCTGAAGGGCCCATTCGAACGAAAC - 3') (Tm 63.1°C), 0,2mM de dNTPs, 1U de Paq500<sup>TM</sup> DNA polymerase (Stratagene), ADN molde. La reacción se llevo a cabo en 20μL. Como control negativo se utilizó agua en vez del cultivo de levaduras y como control positivo ADN plasmidial.

#### **Ensayo de tolerancia a concentraciones toxicas de cationes metálicos**

Se prepararon placas de 25ml de YMM (sección 3.2.2) suplementadas, respectivamente, con cobalto, zinc o cobre. La concentración final del catión en cada placa correspondió a 6mM de cobalto, 4mM de cobre y 28mM de zinc.

En cada placa se sembró colonias transformadas con los vectores generados en el presente seminario de título y con vectores vacíos a modo de control. Las placas fueron incubadas por 5 días a 30°C y transcurrido ese tiempo fueron fotografiadas.



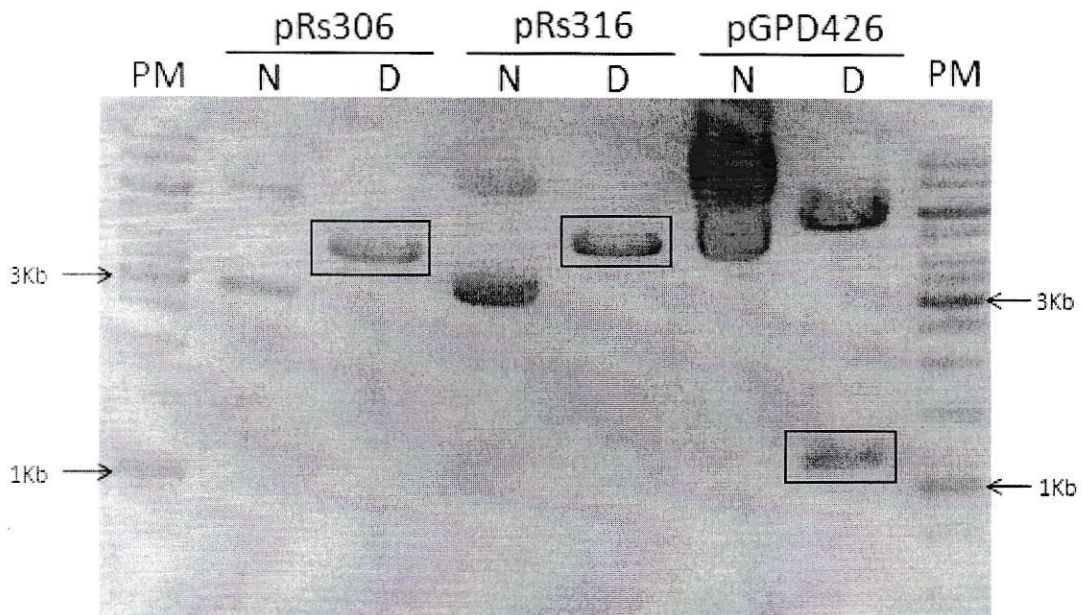
## RESULTADOS

### Construcción del vector pRs306E y del vector pRs316E

Los vectores seleccionados fueron solicitados al laboratorio del Dr. Hieter de la Universidad de British Columbia, Vancouver, Canadá; quien amablemente nos los facilitó. Al contar con los vectores fue necesario incorporar en ellos, una región promotora y una terminadora de la transcripción, elementos fundamentales para la expresión de un gen. Por esta razón se decidió clonar en los vectores pRs306 y pRs316 la región promotora del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD), un promotor constitutivo de levaduras (Bitter y col, 1984); y la secuencia del el terminador CYC1 de la citocromo oxidasa C (isoforma 1) de levaduras (Russo y Sherman, 1989).

Para ello se utilizó las secuencias que contienen el vector episomal de levaduras pGPD426, del cual se escindió el fragmento que contiene el promotor GPD, el sitio de múltiple clonamiento y el terminador CYC1 mediante digestión enzimática con las enzimas *SacI* y *KpnI* (Figura 3). Se liberó un fragmento de aproximadamente 1100pb desde el vector pGPD426, fragmento denominado GPD/CYC, correspondiente al tamaño esperado de los elementos antes mencionados (Figura 3, carril N°7).

Por otra parte se digirió los vectores pRs306 y pRs316 con las mismas enzimas de manera de dejar extremos cohesivos con el fragmento antes liberado. Como se muestra en la Figura 3, se pueden observar las bandas obtenidas en cada digestión. Se observa la linearización de los vectores pRs306 y pRs316 mostrando una banda de aproximadamente 4200pb para el caso del primer vector, y una de aproximadamente 4700pb para el segundo, que corresponden a los tamaños esperados (Figura 3, carril N°3 y N°5, respectivamente).



**Figura 3: Digestión enzimática doble de los vectores pGPD426, pRs306 y pRs316. N: vector nativo. D: vector digerido con las enzimas *SacI* y *KpnI*. PM: estándar de peso molecular de ADN. En la figura se destacan en cuadros las bandas de importancia en los pasos posteriores. Una banda de 4200pb para el caso del vector pRs306, y una de aproximadamente 4700pb del vector pRs316. Para el caso del vector pGPD426 se observa destacada una banda de aproximadamente 1100pb correspondiente al fragmento GPD/CYC.**

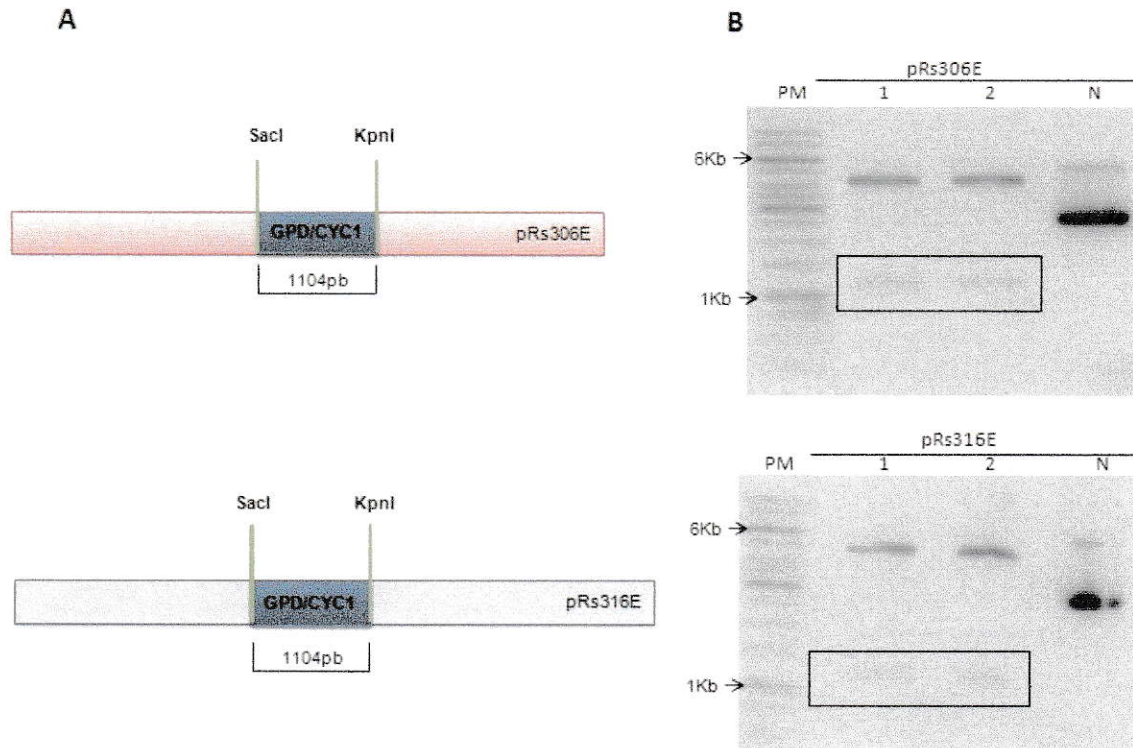
A continuación se efectuó la purificación de las bandas destacadas en la Figura 3, desde geles de agarosa según se describe en la sección de materiales y métodos. Luego se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotometría. Se procedió por tanto a ligar los vectores linearizados con el inserto de interés mediante el empleo de la enzima T4 ligasa (Fermentas) (sección 3.3.1.5) utilizando en la ligación una proporción de 3/4 de la masa del vector pRs316 con el inserto GPD/CYC, y una proporción de 7 a 10 en la ligación del vector pRs306 y el mismo inserto. Con el producto de la ligación se transformó *E. coli* esperando obtener colonias que contengan los vectores conteniendo el inserto GPD/CYC, a los que se denominará pRs306E y pRs316E. Las colonias obtenidas se seleccionaron en medio LB con Ampicilina (sección 2.3.1) y se obtuvo 25 UFC con el vector pRs306E y 28 UFC con el vector pRs316E.

#### **Análisis de las construcciones pRs306E y pRs316E**

Para constatar la presencia del inserto GPD/CYC de 1100pb en los vectores pRs306E y pRs316E, y para descartar la presencia de colonias transformadas con los vectores vacíos debido a una no linearización en el paso anterior, se analizó el ADN plasmidial de dos de los clones obtenidos tras la transformación con el vector pRs306E. Lo mismo se hizo para dos clones obtenidos tras la transformación con el vector pRs316E.

Como se observa en la Figura 4, al cortar los vectores con las enzimas *SacI* y *KpnI* se obtuvo una banda de 1104pb que corresponde al tamaño esperado para el fragmento GPD/CYC proveniente del vector pGPD426, insertado correctamente en los clones analizados.



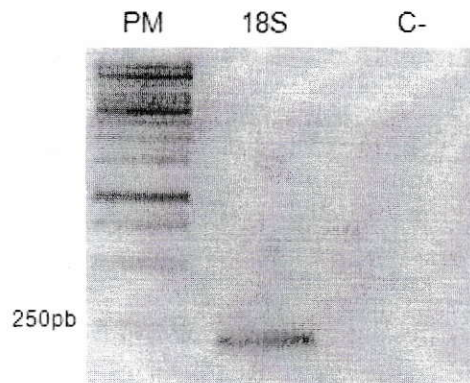


**Figura 4. Análisis de la presencia del inserto GPD/CYC en los vectores pRs306E y pRs316E** A) Esquema de la digestión donde se representa el fragmento de 1104pb liberado desde los vectores pRs306E y pRs316E al hacer la digestión con las enzimas *Sacl* y *KpnI*. B) Electroforesis en geles de agarosa al 1% con Bret. Los carriles 1 y 2 muestran en cada caso la digestión del ADN plasmidial de dos clones (1 y 2) para los vectores pRs306E y pRs316E. N: vector nativo. PM: estándar de peso molecular de ADN.

## Construcción de los vectores pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1.

### Amplificación de AtHMA1 desde ARN de *Arabidopsis thaliana*

Con el fin de obtener un amplificado del gen *Athma1*, se procedió a extraer ARN desde plantas de *A. thaliana* (sección 3.3.2) para luego, a partir de la muestra, obtener ADNc del gen por retro transcripción. Lamentablemente no se logró amplificar el gen desde ARN. Para comprobar la calidad del ARN extraído se amplificó un trozo de la sub unidad 18S del ARN ribosomal, utilizando como molde el ADNc. Se puede observar en la Figura 5 la presencia de una banda de aproximadamente 200pb correspondiente a la región 3' de la subunidad 18S.



**Figura 5: Comprobación del estado del ARN extraído desde *A.thaliana*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%. **PM:** estándar de peso molecular, **18S:** amplificación de un fragmento de la subunidad 18S del ARN ribosomal. **C- :** control negativo sin ADN. El programa de PCR se describe en la Tabla I y los partidores utilizados en la reacción se describen en la Tabla I (sección 3.3.2.3).

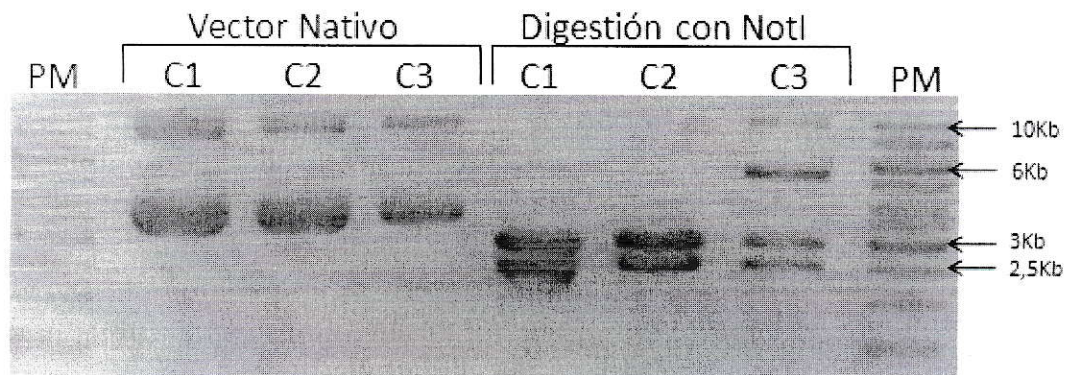


## Obtención de ADNc de HMA1 desde el vector pGEM-T/HMA1

Debido a que no fue posible amplificar la región codificante del gen *Athma1* desde el ARN de *A.thaliana* se decidió proceder con una estrategia alternativa.

Existe un banco de EST (expressed sequence tags), o secuencias nucleotídicas transcritas, de *A.thaliana* los cuales se encuentran clonados en vectores de clonamiento (Seki y col 2002; Seki y col 1998). En este banco de clones se encuentra disponible el EST del gen *Athma1*. El gen fue clonado en un vector de clonamiento, el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega), por el grupo de investigación con el que colaboramos en este proyecto en la Universidad de la Serena.

Tras propagar bacterias transformadas con la construcción mencionada en células DH5 $\alpha$ , se purificó el ADN plasmidial. Con el ADN obtenido se efectuó una digestión con la enzima de restricción *NotI* para corroborar la presencia del gen en el vector pGEM-T (Figura 6). En presencia del gen *Athma1*, la enzima *NotI*, libera 2 fragmentos: uno de 3 Kb y uno de aproximadamente 2,5Kb. En la Figura 6 se puede apreciar el análisis de 3 clones positivos para el gen *Athma1*. En la digestión del ADN del tercer clon, se observan dos bandas de mayor tamaño que las esperadas para una digestión total, pero que corresponden al tamaño de bandas presentes en el carril del vector nativo, lo que sugiere una digestión parcial del ADN.

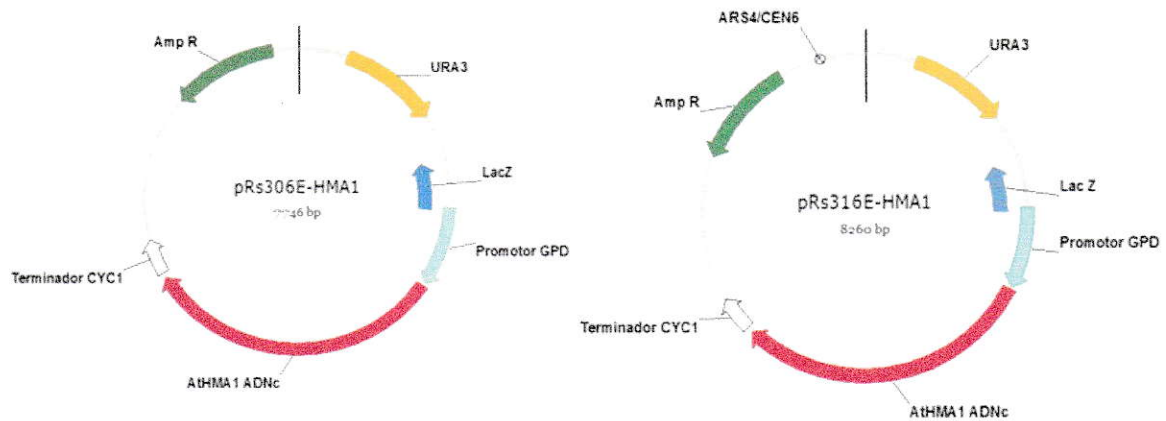


**Figura 6: Comprobación de la presencia del gen Athma1 en el vector pGEM-T.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. C1, C2 y C3 corresponde a tres clones analizados. **PM:** estándar de peso molecular.

Una vez comprobada, por digestión enzimática, la presencia del gen en el vector pGEM-T, se realizó una digestión doble con las enzimas *BglII* y *EcoRI* las cuales flanquean el gen de interés liberando un fragmento de la región codificante del gen Athma1 de aproximadamente 2,5Kb. Este procedimiento se efectuó por duplicado, y tras separar por electroforesis en gel de agarosa los productos de la reacción, se procedió a purificar las bandas desde los geles. A continuación se efectuó la cuantificación del ADN obtenido mediante espectrofotómetro, correspondiendo a un total de 1010ng.

Paralelo a esto se efectuó la digestión de los vectores pRs306E y pRs316E con las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI*. Debido a que las enzimas *BglII* y *BamHI* generan extremos cohesivos entre ellos, al momento de la ligación los extremos de ambos cortes serán fusionados sin mayor inconveniente.

Con el producto de la digestión, correspondiente al gen *Athma1*, se realizó entonces la ligación de los vectores y el gen (sección 3.3.1.5) generando los vectores pRs306E-HMA1 y del vector pRs316E-HMA1 como se describe en el esquema de la Figura 7. Se utilizó alrededor de 100ng de vector y 60ng de inserto en cada ligación. Con el producto de ligación se transformaron células DH5 $\alpha$  para propagar los vectores y se seleccionó las transformantes en medio suplementado con ampicilina. Se obtuvo 19 UCF por con el vector pRs306E-HMA1 y 16 UCF con vector pRs316E-HMA1.



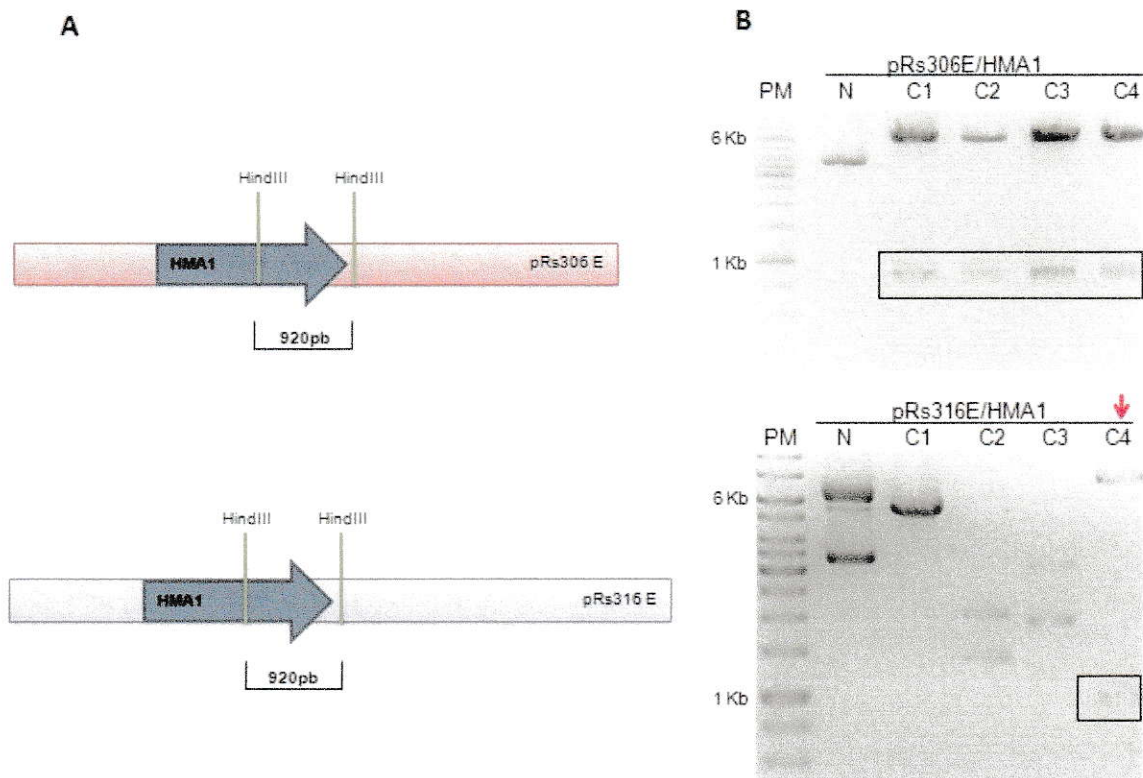
**Figura 7: Esquema de los vectores pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1.** En los vectores pRs306E y pRs316E se clonó el gen HMA1 entre los sitios *Bam*HI/*Bgl*II y *Eco*RI en sentido con la dirección del promotor GPD.

### Análisis de las construcciones pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1

Para corroborar la presencia del gen *Athma1* en los clones obtenidos tras la selección, se efectuaron preparaciones de ADN a partir de 4 colonias obtenidas tras la transformación con el vector pRs306E-HMA1 y de 4 colonias para el vector pRs316E-HMA1. Al ADN obtenido se le realizaron digestiones con las enzimas de restricción *Eco*RI, *Sac*I y *Hind*III. Como se muestra en la Figura 8A, al cortar los vectores con



*HindIII*, se libera un fragmento de 920pb. Los 4 clones correspondientes a la transformación con pRs306E-HMA1 presentan el gen de interés, mientras que en el caso de los clones de pRs316E-HMA1 solo uno presenta la banda esperada (Clon 4). Por lo tanto, en este punto, se ha obtenido clones portadores del vector pRs306E-HMA1 y un clon del vector pRs316E-HMA1, ambos con el gen de interés que permitirán evaluar a continuación la eficacia de la estrategia diseñada.



**Figura 8: Digestión de pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1. A)** Esquema de la digestión donde se representa el fragmento de 920pb liberado por la enzima *HindIII*. **B)** Electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con Bret. Análisis del patrón de digestión de 4 clones (del 1 al 4) para cada vector analizado. **N:** vector nativo. **PM:** estándar de peso molecular. Señalado con flecha roja se representa el único clon positivo para el gen *Athma1* de los vectores pRs316E.

Tras obtener los resultados anteriores se procedió a enviar a secuenciar los clones 1 y 3 con el vector pRs306E-HMA1 y el único clon con el vector pRs316E-HMA1 a Macrogen Co. (Korea). Esto se realizó con 4 partidores diseñados específicamente para este propósito (Tabla II), ya que el marco de lectura abierto del gen Athma1 tiene un tamaño de 2460pb y la secuenciación resuelve correctamente la secuencia hasta 700pb. Los resultados de la secuenciación fueron analizados con el programa BioEdit y luego con el programa ClustalW para alinear las secuencias obtenidas con las presentes en las bases de datos. En la Figura 9 se puede observar un fragmento del alineamiento efectuado en ClustalW. Al analizar la secuencia y alinearla con la descrita para el gen Athma1 en la base de datos se puede observar que el codón de inicio de la traducción de la proteína y el de término, se encuentra sin alteraciones. Si bien se encontró una identidad del 99%, se encontraron diferencias en 3 bases. Hay dos cambios de base, una en el sitio 942 de una adenina por una guanina y un cambio de bases de una timina por una adenina en el sitio 1683. Estos cambios no producen alteraciones en la secuencia aminoacídica.

La siguiente mutación observada en la secuencia, correspondiente a la escisión de una base en el sitio 1159, provoca un corrimiento en el marco de lectura, generando un codón de término 4 pares de base río abajo (Figura 9). Según esta información, hay un codón de término temprano y lo más probable es que el ribosoma detenga la traducción de la proteína en ese codón, lo cual desencadenaría en la síntesis de una proteína trunca. Predecimos por tanto que habrá un transcrito que generará una proteína, sin embargo al ocurrir la traducción se generará una proteína truncada.



```

AtHMA1          TTGTCATACAAAAGCGTTCCTGTGCACAGCGTAGAAGTTGGATCCTATGTTTTGGTTGGA 960
AtHMA1/mRNA     TTGTCATACAAAAGCGTTCCTGTGCACAGCGTAGAAGTTGGATCCTATGTTTTGGTTGGA 960
*****

AtHMA1          ACTGGTGAGATTGTGCCTGTAGATTGCGAAGTCTATCAAGGTAGTGTCTACAATTACAATT 1020
AtHMA1/mRNA     ACTGGTGAGATTGTGCCTGTAGATTGCGAAGTCTATCAAGGTAGTGTCTACAATTACAATT 1020
*****

AtHMA1          GAGCACTTGACTGGGGAAGTCAAGCCGTTGGAGGCCAAAAGCTGGAGATAGAGTGCCTGGT 1080
AtHMA1/mRNA     GAGCACTTGACTGGGGAAGTCAAGCCGTTGGAGGCCAAAAGCTGGAGATAGAGTGCCTGGT 1080
*****

AtHMA1          GGTGCAAGAAATTTGGATGGCAGAATGATTGTAAAGGCTACAAAGGCATGGAATGATTTCG 1140
AtHMA1/mRNA     GGTGCAAGAAATTTGGATGGCAGAATGATTGTAAAGGCTACAAAGGCATGGAATGATTTCG 1140
*****

AtHMA1          ACGCTTAACAAGATTGTTCAGCTGACCGAGGAAGCACATTCTAATAAACCCAAACTTCAG 1200
AtHMA1/mRNA     ACGCTTAACAAGATTGTTCAGCTGACCGAGGAAGCACATTCTAATAAACCCAAACTTCAG 1199
*****

AtHMA1          AGATGGCTGGATGAGTTTGGCGAGAATTACAGCAAGGTTGTGCTGTTTTTGTCACTTGCA 1260
AtHMA1/mRNA     AGATGGCTGGATGAGTTTGGCGAGAATTACAGCAAGGTTGTGCTGTTTTTGTCACTTGCA 1259
*****

AtHMA1          AITGCCTTCCTAGGTCCATTTTTGTTCAAGTGGCCTTTTCTCAGCACCCGAGCATGTAGA 1320
AtHMA1/mRNA     AITGCCTTCCTAGGTCCATTTTTGTTCAAGTGGCCTTTTCTCAGCACCCGAGCATGTAGA 1319
*****

AtHMA1          GGAICTGTTTACAGAGCATTGGGACTTATGGTGGCCGCATCACCATGTGCTCTGGCCGTA 1380
AtHMA1/mRNA     GGAICTGTTTACAGAGCATTGGGACTTATGGTGGCCGCATCACCATGTGCTCTGGCCGTA 1379
*****

```

**Figura 9: Alineamiento de secuencias en ClustalW.** Fragmento del alineamiento entre la secuencia descrita para el gen Athma1 y la secuencia del ADNc de los clones obtenidos en el presente seminario de título. En la caja amarilla se observa la mutación de un cambio de base de adenina por guanina en el sitio 942. En la caja roja se observa la delección de una base en el sitio 1159, que genera el codón de término de la traducción señalado con una línea roja.

Para predecir la estructura de la proteína que posiblemente se está acumulando, se hizo un análisis *in-silico*, ya que para hacer un análisis *in vivo* de la proteína se necesitarían anticuerpos, y no contamos con anticuerpos contra la proteína. Se procedió entonces a hacer análisis bioinformáticos con el programa InterProScan ([www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan](http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan)), el cual predice dominios de las secuencias amino acídicas. Se predijo entonces que la proteína que se traduciría desde el marco de lectura abierto (ORF) clonado sería una proteína de 343 aminoácidos de un total de 819 que contiene la proteína descrita, debido a la mutación que tiene el ORF. El análisis predice que se estarían traduciendo correctamente, un motivo de poli histidinas en el N-terminal, 3 dominios transmembrana y un segmento del sitio E1-E2; todos ellos, motivos característicos e importantes en las ATPasa de tipo P (Williams y Mills, 2005). En este marco de lectura no se estarían traduciendo los sitios de fosforilación, y el "sitio activo" de la proteína no estaría traduciéndose completamente. Sin estos sitios la bomba no sería capaz de formar el intermediario fosforilado necesario para transportar el catión de interés.

#### **Obtención de levaduras transformantes con los vectores pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1**

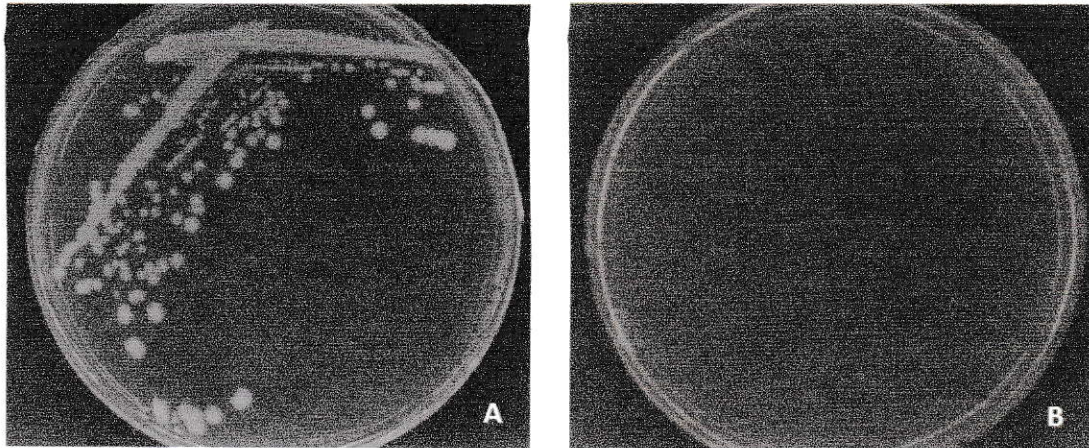
La cepa  $\Delta ycf$  (DTY167) de *S. cerevisiae*, posee una mutación (HisG) en el gen YCF que codifica para un transportador de tipo ABC que transporta cationes metálicos, presentando un fenotipo hipersensible a estos. Se transformó esta cepa con los vectores generados esperando que la expresión del gen *Athma1* le otorgue a la levadura la capacidad de tolerar concentraciones tóxicas de los cationes Cu, Co y Zn; replicando el experimento efectuado por Moreno y col. (2008).

Para ello se transformó la levadura mediante electroporación con los vectores pRs306E-HMA1, pRs316E-HMA1 y también con el vector pGPD426-HMA1 el cual se utilizó como control positivo de la transformación. Se transformó también las levaduras con los correspondientes vectores sin el gen Athma1. Se utilizó aproximadamente 100ng de ADN plasmidial. Las levaduras fueron seleccionadas en placas con medio mínimo (YMM) carente de uracilo y se obtuvieron aproximadamente 10 UCF de levaduras transformadas con el vector pRs316E-HMA1, mientras que no se obtuvo UCF con el vector pRs306E-HMA1.

#### **Análisis de las levaduras: Ensayo de toxicidad a cationes metálicos**

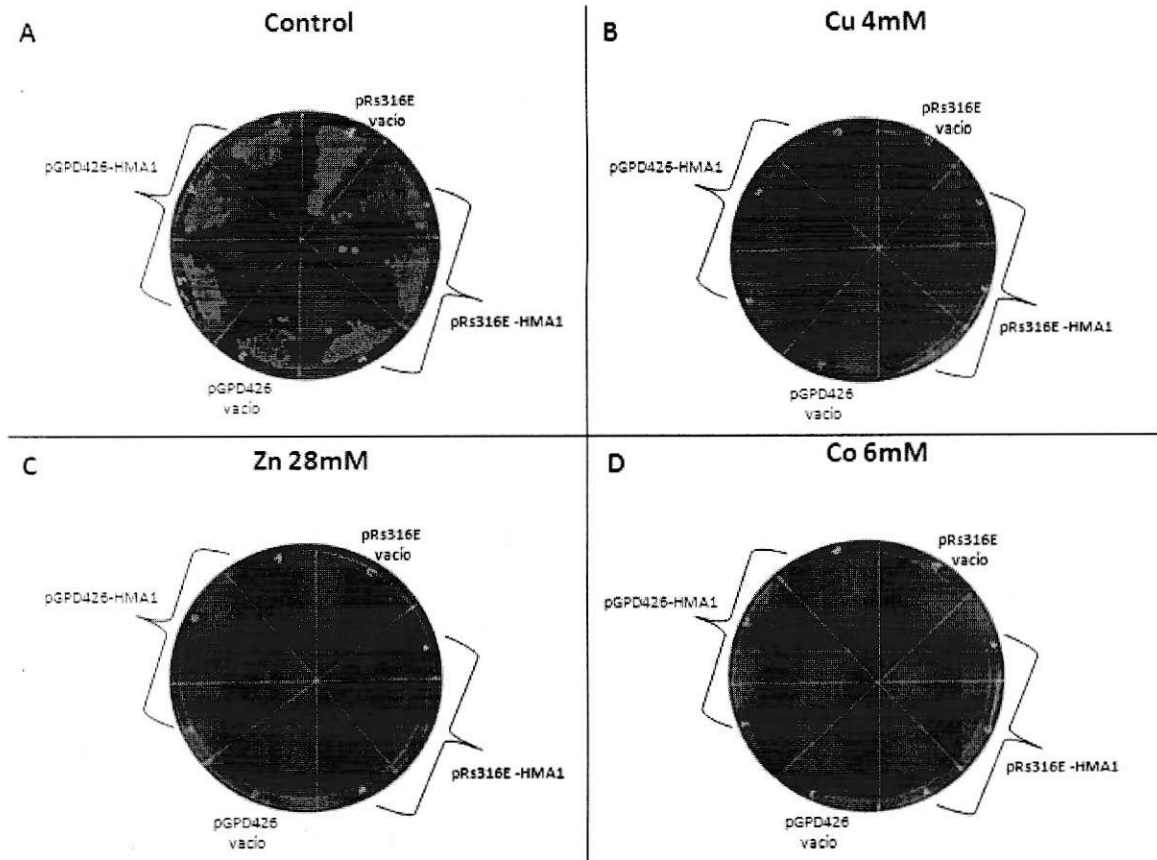
Para determinar si el producto del gen Athma1 complementa el fenotipo de las levaduras mutantes hipersensibles a cationes metálicos, se creció 3 clones con el vector pRs316E-HMA1 y 3 clones con el vector pGPD426-HMA1 en placas de medio mínimo suplementado con 6mM de Co, 4mM de Cu y 28mM de Zn respectivamente. Al mismo tiempo, se sembró un clon con el vector pRs316E vacío y otro con el vector pGPD426 vacío (controles) en mismos medios. El resultado se muestra en la Figura 11 donde se puede apreciar que no hubo crecimiento de colonias en ninguno de los medios suplementados, independiente del vector con el cual fue transformada la levadura. Lo cual indica que la proteína que se está expresando, no es capaz de aumentar la resistencia a cationes.





**Figura 10: Controles de la transformación de cepa  $\Delta ycf$  (DTY167) de *S. cerevisiae*. A) cepa  $\Delta ycf$  sin transformar crecida en medio mínimo (YMM) suplementado con uracilo. B) cepa  $\Delta ycf$  sin transformar crecida en medio mínimo ura- (YMM).**





**Figura 11: Ensayo de tolerancia a cationes metálicos.** A) Medio mínimo (YMM) B) Medio mínimo (YMM) suplementado con 4mM de Cu C) Medio mínimo (YMM) suplementado con 28mM de Zn D) Medio mínimo (YMM) suplementado con 6mM de Co. En cada placa se sembró 8 clones de levadura cepa *Δycf* transformados, tres con el vector pRs316E-HMA1, tres con el vector pGPD426-HMA1, un clon transformado con el vector pRs316E vacio y un clon con el vector pGPD426 vacio.

## DISCUSIÓN

En el presente seminario de título se desarrolló una herramienta molecular que permite la integración de genes en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Primero, se generaron los vectores pRs306E y pRs316E a partir de los vectores pRs306 y 316 descritos por Hieter y col. (1989) mediante la incorporación de elementos constitutivos provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*, como lo son el promotor constitutivo de la transcripción GPD y un terminador de la transcripción CYC1, lo que permite que estos vectores además puedan ser utilizados como vectores de expresión.

Una vez generados los vectores pRs306E y pRs316E, se clonó en ellos el gen *Athma1*, una  $\text{Ca}^{+2}$ /ATPasa que proviene del genoma de *Arabidopsis thaliana* (Moreno y col, 2008). Este gen codifica para una ATPasa de tipo P que está relacionada con el transporte de cationes metálicos. Además como control positivo de la transformación se clonó el gen en el vector episomal pGPD426 (Mumberg y col. 1995), el cual se ha utilizado anteriormente en el laboratorio para la expresión episomal de genes en *Saccharomyces cerevisiae* (Mandujano, 2010).

Luego, con los vectores mencionados, se transformaron levaduras mutantes *Δycf* que carecen de la expresión del transportador *YCF1*, esperando que la integración del gen *Athma1* en el genoma y su expresión funcional permitiera restituir el fenotipo de la mutante. Se obtuvieron colonias positivas para el vector centromérico pRs316E (vacío) y pRs316E-HMA1, sin embargo para el vector integrativo pRs306E (vacío) y pRs306E-HMA1 no se obtuvieron colonias.

Finalmente con los clones obtenidos se procedió a efectuar el ensayo de tolerancia a cationes metálicos para probar la funcionalidad del gen *Athma1* clonado

en los vectores de expresión, lo cual no fue posible de determinar debido a que no se observó crecimiento de colonias en ninguno de los medios suplementados.

Existen 2 vectores comúnmente utilizados para integrar secuencias nucleotídicas de manera estable y en bajo número de copias en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Uno de los puntos en los cuales difieren ambos tipos de vectores es el número de copias que se integran al genoma, una copia para vectores integrativos y entre 1 y 3 para vectores centroméricos (Clarke y Carbon, 1980). Esta eficiencia de integración puede aumentar si es que el vector es previamente linearizando con enzimas de restricción que corten en el sitio de recombinación (Orr-Weaver y col., 1981), la secuencia de selección URA en este caso. Esto se explica mediante el reconocimiento de los extremos generados por el corte de la enzima por la recombinasa, lo que facilita la recombinación con el gen presente en el genoma (Struhl y col., 1979). Para el desarrollo del trabajo intentamos linearizar el vector, más no existía ninguna enzima de restricción de corte único en la secuencia de selección.

Este postulado explicaría el hecho de que se logró obtener levaduras transformantes con el vector centromérico pRs316E y pRs316E-HMA1 pero no se obtuvieron levaduras transformantes con los vectores pRs306E y pRs306E-HMA1. Una forma de corregir por este punto es variar las cantidades de ADN utilizadas en el ensayo, ya que se encuentra reportado en la bibliografía que el uso del orden de 10 veces más de ADN permitiría obtener un mayor número de colonias transformantes con vectores integrativos (Burke y col, 2000).

Se generó entonces una herramienta que al poseer los elementos necesarios para la transcripción de un gen, otorga una ventaja por sobre los vectores integrativos, ya que permite el clonamiento y expresión de genes con solo el marco de lectura abierto del mismo.



Por otro lado, aunque la carga génica que adquiere una célula al ser transformada con un vector episomal es mucho más alta en un que en un vector integrativo o centromérico, el vector episomal requiere de un medio de selección. Una de las ventajas de transformar con vectores integrativos, es que la variante del agente seleccionador es descartada, y puede entonces crecer la levadura en medios no selectivos; aún cuando el número de copias del gen integrado con vectores integrativos es muy bajo (1-2) (Murray y Szostak, 1983).

Revisando posteriormente la literatura se encontró un set de vectores descritos por Alberti y colaboradores el año 2007 donde describen la adaptación de la serie pRs, modificada también en el presente seminario, a la tecnología Gateway®; permitiendo la expresión de genes en forma constitutiva o bien de tipo inducible, dependiendo el promotor elegido (GPD o GAL1). Estos plasmidios permiten también la incorporación de una proteína de fusión al dominio N-terminal o C-terminal de la proteína a sintetizar por el gen de interés, permitiendo el seguimiento de la misma en estudios de localización sub- celular y otros dependiendo del objetivo del trabajo.

Estos vectores son una opción interesante, ya que prometen un sistema de clonación más eficiente y rápido que los vectores convencionales e incluso que los descritos en el presente seminario de título.

### **Ensayos de complementación con cationes**

Para evaluar la funcionalidad del gen expresado de forma heteróloga, se realizaron ensayos de tolerancia a metales en medios mínimos, usando una cepa mutante *Δycf*. El resultado no fue el esperado, ya que no se observó ningún cambio en



el fenotipo de las levaduras (no se observó crecimiento de colonias, Figura 11) en ninguno de los cationes analizados. Considerando un posible problema con el número de copias que son efectivamente integradas en el genoma de *S. cerevisiae*, procedimos a realizar un control positivo de tolerancia, clonando la secuencia de *Athma1* en el constructo episomal pGPD426, previamente reportado como constructo capaz de restituir el fenotipo de las levaduras mutantes  $\Delta ycf$  (Moreno y cols, 2008). El resultado también fue negativo en este caso, donde tampoco se pudieron observar incrementos en la tolerancia a ninguno de los cationes analizados ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ ). A raíz de estos resultados, podemos descartar algún efecto del número de copias como responsable de la ausencia de recuperación del fenotipo, y nos indica algún posible problema en la secuencia del gen de interés, debido a que los vectores contienen un mismo promotor y terminador además del sitio de múltiple clonamiento.

Al analizar la secuencia del inserto del ADNc de *Athma1*, se detectaron 3 mutaciones puntuales, dos de las cuales resultaron ser silentes (sin modificación del aminoácido codificado) y una tercera, correspondiente a una delección que genera un codón de término temprano. Esto conllevaría la generación de una proteína trunca, al parecer no funcional.

Sin embargo, una región que si se traduciría y que se ha descrito como dominio de unión a cationes metálicos, es una región rica en histidinas, poli-His (presente en el extremo amino terminal); altamente conservada en las bombas de tipo P (Williams & Mills, 2005). Esta región podría ser suficiente para quelar el cobre presente dentro de la célula y evitar su disponibilidad en el medio, disminuyendo la toxicidad del catión en cuestión y a su vez mantenerlo asociado a la membrana (Verret, 2005). La falta de función de la proteína trunca podría deberse a un problema de plegamiento. En otra proteína de la familia HMA, HMA4, se ha reportado que la

presencia del dominio enriquecido en histidinas (11), poli-His, es suficiente para aumentar la tolerancia a metales (Papoyan y Kochian, 2004).

Todo lo anterior apunta a un problema en la secuencia del gen clonado como el factor causante de la falta de recuperación de fenotipo en levaduras *Δycf*. Análisis adicionales como RT-PCR o Western Blot podrían dilucidar si existe algún problema en los niveles de ARNm o si efectivamente se está generando una forma trunca de la proteína.

Existe otra alternativa para integrar genes en el genoma de *S. cerevisiae*, la cual consiste en clonar los genes en vectores multicopia dirigidos a las regiones ribosomales del ADN de la levadura, con lo cual se obtendría un alto número de copias, comparable con la utilización de vectores de expresión de levaduras (Yeast Expression Vectors) los que señalan la integración de a lo menos 100 copias del gen de interés, con la estabilidad mitótica de un vector integrativo (López y col., 1989). En el presente seminario se considero el riesgo que corre este procedimiento de generar una acumulación tan alta de proteínas que afecte en el metabolismo de la levadura; o bien un estrés a la célula que pudiese intervenir en la función que se espera desempeñe en algún proceso específico, para el caso de AtHMA1, la acumulación de cobre y la tolerancia a cationes metálicos en el medio de cultivo. En un sistema donde es necesaria la remoción de cationes y la expresión de proteínas de membrana (como es el caso de AtHMA1), es necesario evaluar si una gran carga génica (100 copias) tiene algún efecto adverso sobre el microorganismo.

## CONCLUSIONES

- Se clonó el promotor GPD del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y el terminador CYC1 de la citocromo oxidasa C (isoforma 1) de levaduras en los vectores integrativo y centromérico; generando los vectores de expresión pRs306E y pRs316E.
- Se sub-clonó el gen AtHMA1 en los vectores pRs306E y pRs316E, generando los constructos pRs306E-HMA1 y pRs316E-HMA1.
- La secuencia del gen Athma1 clonada en los vectores generados contiene una mutación que genera un codón de término temprano de la transcripción. Por lo que no fue posible probar la funcionalidad de los vectores.

## PROYECCIONES

Uno de los objetivos es evaluar la integración estable en levaduras, pero es necesario para ello evaluar la transcripción, para analizar la actividad de los elementos de expresión integrados en los vectores seleccionados. Con el fin de evaluar la expresión del gen se propone un estudio de RT-PCR. Tras este ensayo es necesario evaluar la cantidad de proteína que se está generando, para ellos se proponen ensayos de Western-Blot, para lo cual habría que producir también anticuerpos de reconocimiento de la proteína HMA1. Por otra parte, hacer algún ensayo de funcionalidad diferente a la complementación de mutantes podría darnos luces de la actividad de la proteína que se esté generando, como un ensayo para medir la actividad ATP- asica de la bomba.

Eventualmente se podrían modificar los otros vectores de la serie de shuttle vectors (Sikorski y Hieter, 1989); correspondientes a vectores integrativos y centroméricos con diferentes marcadores de selección de genes de auxotrofia, como Histidina, Triptófano y Leucina (HIS3, TRP1, LEU2). Se pretende insertarles, al igual que en el caso de los vectores pRs306 y pRs316, el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y el terminador de la transcripción del citocromo oxidasa C (CYC1).



## BIBLIOGRAFÍA

**Adams A.**, Gottschling D.E., Kaiser C.A., Stearns T. 1997. Methods in yeast genetics. pp 41-46. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York.

**Axelsen K.**, Palmgren M. 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. Plant Physiol. **126**: 696–706.

**Bach ML.**, Lacroutet F., Botstein D. 1979. Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the yeast structural gene cloned in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sc. USA **76**: 386-390

**Bitter GA.**, Egan K. 1984. Expression of heterologous genes in *Saccharomyces cerevisiae* from vectors utilizing the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter. Gene. **32**: 263-274.

**Burke D.**, Dawson D., Stearns T. 2000 Edition. Methods in yeast genetics. pp. 39-43. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

**Clarke L.**, Carbon J. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. Nature. **287**: 504-509

**Cottarel G.**, Shero J., Hieter P., Hegemann J. 1989. A 125-Base-Pair *CEN6* DNA fragment is sufficient for complete meiotic and mitotic centromere functions in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. and cellular biology. **9**: 3342-3349.

**Dujon B.** 1996. The yeast project: what did we learn. Trends. Genet. **7**: 263-270

**Frommer W. B.** and Ninnemann O. 1995. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **46**: 419–444.

**Funk M.**, Neidenthal R., Mumberg D., Brinkmann K., Ronicke V., Henkel T. 2003. Vector systems for heterologous expression of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology*. **350**: 248-257.

**Gibeaut D.**, Hulett J., Cramer G., and Seemann J. 1997. Maximal Biomass of *Arabidopsis thaliana* Using a Simple, Low-Maintenance Hydroponic Method and Favorable Environmental Conditions. *Plant Physiol*. **115**: 317-319

**González A. y Valenzuela L.** 2003. *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Autonoma de México. Disponible en [www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16](http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap16).

**Kawachi M.**, Kobae Y., Mimura T. and Maeshima M. 2008. Deletion of a Histidine-rich Loop of AtMTP1, a Vacuolar Zn<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter of *Arabidopsis thaliana*, Stimulates the Transport Activity. *J. Biol. Chem*. **283**: 8374–8383.

**Lee F.** and Da Silva N. 1997. Improved efficiency and stability of multiple gene insertions at the  $\delta$  sequences of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **48**: 339-345.

**Lopez S.**, Klootwijk J., Veenstra A., Van der Aar P., van Heerikhuizen. 1989. High-copy-number integration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: a new vector for high level expression. *Gene* **79**: 199-206

**Mandujano P.**, 2010. Localización sub-celular y caracterización bioquímica de AtSDL una probable sorbitol deshidrogenasa.

**Moller J.V.** , Juul B, le Maire M. 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*. **1286**: 1-51.

**Moreno I.**, Norambuena L., Maturana D., Toro M., Vergara C., Orellana A., Zurita-Silva A., and Ordenes V. 2008.: AtHMA1 Is a Thapsigargin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ /Heavy Metal Pump. *J. Biol. Chem.* **283**: 9633–9641.

**Murray A.W.** and Szostak J. W., 1983, Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell*. **34**: 961-970

**Orr-Weaver T.**, Szostak J., Rothstein R. 1981. Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **78**: 6354-6358.

**Papoyan A.** and Kochian L.V. 2004. Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. *Plant Physiol.* **136**: 3814-3823.

**Russo P.**, Sherman F. 1989. Transcription terminates near the poly(A) site in the *CYC1* gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8348-8352.

**Seki M.**, Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carnicini, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A., Shinozaki, K. 2002. Functional Annotation of a Full-Length Arabidopsis cDNA Collection. *Science* **296**:141-145.

**Sikorski R., Hieter P.** 1989. A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27

**Struhl K., Stinchcomb D.T., Scherer S. Davis R.W.** 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *PNAS*. **76**: 1035-1039.

**Universidad de la Serena-CEAZA.** Proyecto INNOVA-CORFO 08-CM01-12:

“Bioacumulación de cobre en levaduras genéticamente modificadas: Potenciando una herramienta biotecnológica para la extracción de cobre”

**Verret F., Gravot A., Auroy P., Preveral S., Forestier C., Vavasseur A., Richaud P.** 2005. Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His<sub>11</sub> stretch. *FEBS*. **579**: 1515-1522

**Williams L., Mills R.** 2005. P<sub>1B</sub>-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends in Plant Science*. **10**: 491-502.

**Yu-Young K., Hyunju C., Shoji S., Hyung-Taeg C., Enrico M., Masayoshi M. and Youngsook L.** 2009. AtHMA1 contributes to the detoxification of excess Zn (II) in *Arabidopsis*. *Plant J*. **58**: 737-53.



**Anexo 1:** Cantidad de aminoácidos y bases nitrogenadas presentes en la mezcla para la preparación de medio mínimo de levaduras.

Aminoácido	Masa
Isoleucina	0,45g
Valina	2,25g
Adenina	0,30g
Arginina	0,30g
Histidina	0,30g
Leucina	0,45g
Lisina	0,45g
Metionina	0,30g
Fenilalanina	0,75g
Triptófano	0,30g
Tirosina	0,45g

## Anexo 2: Elaboración de medio Hidropónico 100X

- Los reactivos se deben agregar en el orden que se encuentran en la tabla secuencialmente.
- El reactivo  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  debe disolverse en agua destilada antes de agregarlo a la mezcla.
- Antes de agregar el  $\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$ , el volumen total debe ser de 4,5L y se lleva a pH 5 la solución con KOH 10M.
- El pH final de la solución debe ser 6.

Reactivo	Concentración final	1L
$\text{KNO}_3$	125 mM	12.640
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	150 mM	35.430
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	75 mM	18.490
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	50 mM	6.800
KCl	5 mM	0.370
$\text{H}_3\text{BO}_3$	5 mM	0.310
$\text{MnSO}_4$	1 mM	0.150
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	200 $\mu\text{M}$	0.060
$\text{CuSO}_4$	150 $\mu\text{M}$	0.024
$\text{Na}_2\text{O}_3\text{Si}$	10 mM	1.22
Fe/DTPA	10 mM	3.640