



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
REGISTRE GENERAL
ENTRADA

29 OCT. 2003

N.º 156847

HORA 10.45

OFICINA AUXILIAR NÚM. 14

Caracterización de la respuesta a estrés por frío en levaduras de panadería



Memoria presentada por Sonia Rodríguez Vargas para optar al grado de Doctora en Bioquímica.

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES

Nº Registre 22134

DATA 19-I-2004

SIGNATURA
TD-B 00725

Nº LIBIS: 1408176

Valencia, Octubre 2003.

24 m.

UMI Number: U607703

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607703

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

T D-B
00725



50001408176
Biblioteca de Ciències

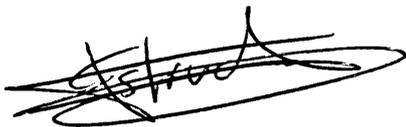
R.22134

El Dr. Francisco Estruch Ros, Profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València y la Dra. Francisca Randez Gil, Científica Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos de Valencia,

Certifican:

Que D^ª. Sonia Rodríguez Vargas, licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Caracterización de la respuesta a estrés por frío en levaduras de panadería" que presenta para optar al grado de Doctora en Bioquímica por la Universitat de València.

Valencia, 20 de Octubre de 2003



Dr. Francisco Estruch Ros



Dra. Francisca Randez Gil

A mis padres, por vuestra dedicación.

A Joel, por tu apoyo incondicional.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	
1.- La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo de interés industrial y organismo modelo en investigación básica	11
2.- El proceso de panificación	12
2.1.- Características genéticas de las cepas industriales de levadura de panadería	13
2.2.- Nuevas tecnologías en la industria panadera	14
2.3.- Las masas congeladas	14
2.4.- Retos de la industria de las masas congeladas	16
3.- La respuesta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a estrés por frío y congelación	17
3.1.- Efectos de la congelación	17
3.2.- La respuesta molecular a frío y congelación	18
3.3.- Factores celulares implicados en la adquisición de criorresistencia	20
4.- <i>Toluraspota delbrueckii</i>	22
4.1.- <i>Toluraspota delbrueckii</i> como levadura panadera	23
4.2.- <i>Toluraspota delbrueckii</i> como sistema modelo	23
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	
1.- MATERIAL BIOLÓGICO Y TÉCNICAS DE CULTIVO	29
1.1.- Cepas	29
1.2.- Condiciones de crecimiento y medios de cultivo	29
1.2.1.- Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	29
1.2.2.- Crecimiento de levaduras	30
1.3.- Medidas del crecimiento de las levaduras	31
1.3.1.- Medida del crecimiento en medio líquido	31
1.3.2.- Ensayos de viabilidad celular	31
2.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA	31
2.1.- Técnicas generales	31
2.1.1.- Obtención de DNA genómico	31
2.1.2.- Obtención de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	32
2.1.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32

2.1.4.- Clonación	34
2.1.5.- Transformación de <i>E. coli</i>	34
2.1.6.- Transformación de levaduras	35
2.2.- <i>Differential display</i>	35
2.3.- Hibridación de filtros de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	37
2.3.1.- Yeast GeneFilters® (Research Genetics)	37
2.3.2.- Filtros de DNA del Servei Central de Suport a la Investigació (Universitat de València)	39
3.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE RNA	40
3.1.- Obtención de RNA de células de levadura	40
3.2.- <i>Northern blot</i>	41
4.- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS	43
4.1.- Determinación de Acetoacetyl-CoA tiolasa	43
5.- DETERMINACIÓN DE METABOLITOS	43
5.1.- Mediante cromatografía de alta resolución (HPLC)	43
5.2.- Mediante cromatografía de gases	44
6.- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	45
6.1.- Geles bidimensionales de proteínas	45
6.2.- Tinción de los geles bidimensionales	46
6.3.- Análisis de los geles bidimensionales	47
6.4.- Identificación de proteínas por espectrometría de masas	48

CAPÍTULO I. Identificación de genes modifican su expresión por frío o congelación en *Saccharomyces cerevisiae*.

RESULTADOS	53
1.- Análisis diferencial de la expresión génica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en condiciones de frío y congelación	53
1.1.- Patrón de expresión diferencial en levaduras de panadería sometidas a distintas condiciones de estrés.	53
1.2.- Identificación de genes inducidos por frío	56
1.3.- Confirmación de la inducción por frío mediante <i>northern blot</i>	57
1.4.- La inducción de <i>TPI1</i> y <i>ERG10</i> se correlaciona con la criorresistencia de cepas de levadura de panadería	58
2.- Análisis global de la expresión génica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en condiciones de frío y congelación	60
2.1.- Hibridación de filtros de DNA de levadura	60

2.2.- Clasificación funcional de los genes que modifican su expresión por frío o por congelación	61
2.2.1.- Genes que modifican su expresión por frío	63
2.2.2.- Genes que modifican su expresión por congelación	74

DISCUSIÓN	92
------------------	----

CAPÍTULO II. Respuestas metabólicas y fisiológicas de levaduras a frío o congelación

RESULTADOS	95
-------------------	----

1.- Implicación del metabolismo de esteroides en la respuesta a frío y congelación en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	95
1.1.- Sobre-expresión y delección del gen <i>ERG10</i> , que codifica el primer enzima de la ruta de biosíntesis de ergosterol	96
1.1.1.- Determinación de niveles de ergosterol en cepas sobre-expresantes del gen <i>ERG10</i>	97
1.1.2.- La sobre-expresión de <i>ERG10</i> mejora la supervivencia tras congelación y el crecimiento a bajas temperaturas	101
1.2.- Sobre-expresión del gen <i>ERG1</i> , que codifica el enzima escualeno epoxidasa	104
1.2.1.- Determinación de niveles de ergosterol en cepas que sobre expresan el gen <i>ERG1</i>	105
1.2.2.- Efecto sobre el crecimiento a bajas temperaturas y la supervivencia tras congelación-descongelación de la sobre-expresión de <i>ERG1</i> y <i>ERG1+ERG10</i>	108
2.- Metabolismo de ácidos grasos. Importancia de las desaturasas en la respuesta a frío	110
2.1.- La mayor rigidez de la membrana mimetiza la respuesta celular producida por bajas temperaturas	111
2.2.- Expresión de dos isoformas de una $\Delta 12$ -desaturasa de girasol en <i>S. cerevisiae</i>	112
2.3.- Composición de ácidos grasos en células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con los genes <i>FAD2</i> . Influencia de la temperatura en la composición de ácidos grasos	114
2.4.- Crecimiento a bajas temperaturas y tolerancia a congelación-descongelación en células de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con los genes <i>FAD2</i> de <i>Helianthus annuus</i> .	115
2.5.- Análisis global de la expresión en células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que expresan el gen <i>FAD2-3</i> de <i>H. annuus</i>	117
2.5.1.- Hibridación de filtros de DNA de <i>S. cerevisiae</i>	118

3.- Caracterización del crecimiento y la aclimatación a bajas temperaturas de las levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Torulaspota delbrueckii</i>	123
3.1.- Modelización del crecimiento a diferentes temperaturas de las levaduras <i>S. cerevisiae</i> y <i>T. delbrueckii</i>	124
3.2.- Estudio de la aclimatación de las levaduras <i>S. cerevisiae</i> y <i>T. delbrueckii</i> al crecimiento a temperaturas sub-óptimas	127
3.3.- Estudio de la tolerancia a la congelación de células previamente crecidas a temperaturas sub-óptimas	133
DISCUSIÓN	136
CAPÍTULO III. Caracterización del perfil de proteínas de levaduras crecidas a bajas temperaturas.	
RESULTADOS	147
1.- Perfil de proteínas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> crecida a bajas temperaturas	147
1.1.- Análisis cuantitativo de proteínas inducidas y reprimidas durante el crecimiento en frío de <i>S. cerevisiae</i>	148
2.- Perfil de proteínas de la levadura no convencional <i>Toluraspora delbrueckii</i> .	152
2.1.- Mapa de proteínas de <i>Toruraspora delbrueckii</i>	152
2.1.1.- Identificación de proteínas de <i>T. delbrueckii</i> mediante espectrometría de masas	154
3.- Perfil de proteínas de <i>T. delbrueckii</i> crecida a bajas temperaturas	161
3.1.- Crecimiento a bajas temperaturas de diferentes cepas de <i>T. delbrueckii</i>	161
3.2.- Análisis cuantitativo del perfil de proteínas de cepas con distinta tolerancia a frío de <i>T. delbrueckii</i>	162
3.3.- Perfil de proteínas de la cepa IGC5321 de <i>T. delbrueckii</i> a 10°C	164
DISCUSIÓN	166
CONCLUSIONES	173
PERSPECTIVAS	177
BIBLIOGRAFÍA	183

AGRADECIMIENTOS

Los últimos años he dedicado una gran parte de mi vida a formarme como investigadora y a trabajar para defender mi tesis doctoral. Durante este tiempo ha habido muchas personas que me han ayudado a avanzar y sin las cuales no habría conseguido mis objetivos, a todas ellas, quiero expresarles mi sincero agradecimiento, y en especial:

A Paco Estruch, que me admitió en su grupo dándome la posibilidad de presentar hoy este trabajo, gracias por su experiencia, sus consejos y la revisión de este trabajo.

A Paqui, por compartir conmigo su bancada y enseñarme a trabajar en mis primeros momentos en un laboratorio, por su paciencia, por la dedicación en supervisar mi trabajo y sobre todo, por confiar en mí.

A Jose Antonio, por estar siempre disponible para escuchar y ayudarme.

Al Dr. Anders Blomberg, por poner a mi disposición todos los medios disponibles en su laboratorio. A mis compañeros en Göteborg, especialmente a Ellinor, por su ayuda técnica en el laboratorio y en la tarea, nada fácil, de integrarme un poquito en la sociedad sueca.

Al Dr. Juanjo Calvete, por su colaboración en la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

A todos mis compañeros de laboratorio con los que convivo tantas horas, Amalia, Mariajo, Quino, Elena, Claudia, Edu: gracias, sobre todo, por hacer agradable el llegar cada día a trabajar.

A mi familia, que han soportado los primeros mis malos momentos y han compartido conmigo los buenos, gracias a todos por su apoyo constante. A mis padres, por darme la posibilidad de estudiar y animarme siempre a avanzar. A Diana, mi peque, por su alegría y por ser el mejor ejemplo de perseverancia y superación y a Santi, por su buen humor.

A Joel, gracias por tu ayuda, como bioquímico, pero sobre todo como persona. Gracias por caminar a mi lado siendo mi apoyo, empujándome cuando lo necesito y enriquecido mi vida con tu presencia.

ABREVIATURAS

- ATP:** Adenosina trifosfato.
- C_{16:0}:** Ácido palmítico.
- C_{16:1}:** Ácido palmitoleico.
- C_{16:2}:** Ácido palmitoléico.
- C_{18:0}:** Ácido esteárico.
- C_{18:1}:** Ácido oleico.
- C_{18:2}:** Ácido linoleico.
- cDNA:** DNA copia (de RNA).
- CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo.
- CFU:** Unidades formadoras de colonia.
- CoA:** Coenzima A.
- dATP:** deoxi-adenosina trifosfato
- dCTP:** deoxi-citidina trifosfato
- DEPC:** Di-etil piro carbonato.
- dGTP:** deoxi- guanosina trifosfato
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico.
- dNTPs:** deoxi-nucleótidos tri-fosfato.
- DO:** Densidad óptica.
- dTTP:** deoxi-timidina trifosfato
- GPI:** Glucosil Fosfatidil Inositol.
- HMG:** β -Hidroximetil β -glutaril.
- HOG:** Ruta de respuesta a alta osmolaridad.
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.
- HSP:** Proteína de choque térmico.
- IFI:** Instituto de Fermentaciones Industriales.
- LDS:** Sistema modelo de crecimiento que mimetiza una masa panaria.
- MAP:** Proteína activada por mitógeno.
- MAPK:** Quinasa de la MAP.
- MAPKK:** Quinasa de la MAPK.
- MIPS:** Centro de información de secuencias de proteínas (Munich)
- mRNA:** RNA mensajero.
- NAD(H):** Dinucleótido de β -nicotinamida-adenina (reducido).
- NADP(H):** Dinucleótido fosfato de β -nicotinamida-adenina (reducido).
- o/n:** toda la noche. (del inglés *over night*).
- ORF:** Pauta abierta de lectura.
- P:** Fosfato
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- PEG:** Polietilen glicol.
- PKA:** Proteína quinasa A.
- PMSF:** Fluoruro de fenil-metil-sulfonilo.
- RNA:** Ácido ribonucleico.
- rpm:** revoluciones por minuto.
- rRNA:** RNA ribosomal.
- ss-DNA:** DNA de una cadena.
- STRE:** Elemento de respuesta a estrés.
- TCA:** Ácido tricloro acético.
- TFA:** Ácido trifluoro acético.
- tRNA:** RNA de transferencia.
- UDP:** Uridina difosfato.

INTRODUCCIÓN

Introducción

La relación entre las levaduras y la civilización humana, se inicia hace miles de años. Históricamente, las levaduras se han utilizado para la producción de alimentos y bebidas de consumo diario como el pan (Demain y Solomon 1981; Chen y Chiger 1985; Trivedi et al., 1986), el vino (Robinson 1994; Pretorius 2000) y la cerveza (Corran 1975).

Paralelamente a su uso, el hombre ha intentado seleccionar las cepas de levadura que se adaptaran mejor a cada proceso. Con la llegada de la biotecnología se pone de manifiesto que la óptima utilización y aplicación de la levadura a la industria sólo es posible tras el conocimiento detallado de su fisiología y, por lo tanto, de los procesos que controlan su crecimiento y metabolismo. Por otra parte, la utilización industrial de la levadura implica unas condiciones totalmente diferentes a las de su ambiente natural y el valor biotecnológico de una cepa de levadura también vendrá determinado por su capacidad de adaptarse a ambientes cambiantes, así como por su robustez y resistencia a diversos tipos de estrés.

Las propiedades fenotípicas, que han determinado la selección de una cepa como idónea para un proceso industrial dado, son consecuencia de sus características genéticas. Por lo tanto, el nuevo reto de la biotecnología es la identificación de los factores genéticos específicos que determinan una mejora susceptible de ser utilizada en procesos industriales. Sólo así será posible la construcción de nuevas cepas que combinen propiedades que no reúnen las cepas naturales de levaduras y las hagan idóneas para su uso industrial.

1.- La levadura *Saccharomyces cerevisiae* como organismo de interés industrial y organismo modelo en investigación básica.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos modelo más utilizados en la investigación básica. Sus características de crecimiento, facilidad de transformación y de análisis genético, han contribuido a esclarecer múltiples rutas de transducción de señal y redes que funcionan en respuesta a estímulos extracelulares, disponibilidad de nutrientes y cambios ambientales (Winderickx et al., 2003). La secuenciación completa del genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau

Introducción

et al., 1997) ha generado mucha información con un gran potencial, pero que es necesaria descifrar. En esta tarea resultan de gran utilidad las nuevas técnicas de genómica y proteómica que permiten el análisis funcional (estudio de la función y el impacto) de muchos genes o proteínas presentes simultáneamente en una determinada condición fisiológica (Que y Winzeler 2002).

Las cepas industriales no son tan accesibles para el análisis y la manipulación genética como las cepas de uso habitual en laboratorio. Las causas que determinan esta baja accesibilidad, son probablemente las que determinan su buen comportamiento en los procesos industriales. La dificultad del análisis genético es en gran medida consecuencia de su aneuploidía, que implica una baja frecuencia de esporulación, inviabilidad de las esporas y baja eficiencia de conjugación. Por otro lado, la ausencia de marcadores auxotróficos ha dificultado su transformación. No obstante, aunque con mayor dificultad, la manipulación de las cepas industriales es hoy día factible y abre la posibilidad de una mejora genética dirigida que permita optimizar su comportamiento biotecnológico.

2.- El proceso de panificación

El pan es el producto final de la fermentación y horneado de la harina procedente de algún cereal. El método tradicional de preparación de la masa panaria consiste en la mezcla de los ingredientes, harina, agua, levadura y sal. Tras el amasado, la masa se deja fermentar, durante este proceso la principal función de la levadura es la producción de CO₂, vía la fermentación alcohólica de los azúcares presentes en la masa. El CO₂ es retenido por la red de gluten aumentando el volumen de la masa, además la levadura también contribuye substancialmente al sabor del pan mediante la formación de compuestos volátiles y precursores del aroma durante la fermentación, así como en las propiedades reológicas y en la formación de los alvéolos de la miga.

La fermentación de la masa puede suceder de manera espontánea, aunque es más común la adición de levadura de panadería como elemento fundamental para garantizar la calidad del producto final y la reproducibilidad del proceso.

Introducción

El proceso culmina con el horneado de la masa, en él se lleva a cabo la lisis térmica de la levadura y la inactivación de las enzimas empleadas en el proceso.

2.1.- Características genéticas de cepas industriales de levadura de panadería.

Se consideran cepas industriales de *S. cerevisiae* aquellas que generan como resultado de la fermentación productos aceptables para el consumo. Estas cepas poseen en común, la eficiente utilización de azúcares, generación de aromas y sabores, alto rendimiento y capacidad fermentativa y sobre todo, una elevada estabilidad genética que garantice la reproducibilidad de los productos finales (Benítez et al., 1996; Gasent-Ramírez et al., 1999).

Las levaduras comerciales de panadería son cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas por el hombre durante años y optimizadas para su aplicación en panadería. Una cepa comercial de levadura de panadería debe cumplir dos requisitos: (i) crecimiento rápido y alto rendimiento en producción de biomasa en melazas y (ii) elevada actividad fermentativa en masas panarias (Stear, 1990). La mayoría de las cepas son homotéticas con un elevado e irregular grado de poliploidía y heterocigosis (Codón et al., 1998). Su capacidad de esporulación es baja y raramente se consiguen ascas de cuatro esporas, siendo la mayoría de ellas inviables (Evans 1990; Codón et al., 1998). Además poseen polimorfismos en la longitud cromosomal y reordenaciones cromosómicas con múltiples translocaciones (Codón et al., 1997).

La presión selectiva ejercida por los productores de levaduras industriales para seleccionar cepas resistentes, con una alta tasa de crecimiento y gran capacidad fermentativa, ha contribuido al establecimiento de las características genéticas de las levaduras de panadería. Aunque no se conocen los genes responsables de todas estas propiedades, en todas las cepas industriales se ha favorecido un alto nivel de ploidía (van Hoek et al., 2000; Higgins et al., 2001).

2.2.- Nuevas tecnologías en la industria panadera

El sector de la panadería mueve en España casi 4000 millones de Euros al año, lo que supone cerca del 30% de la industria alimentaria del país. Este sector está afrontando una gran reestructuración debido a la aparición de los productos semielaborados, como las masas congeladas y los panes precocidos. En España el 13,6% de los empresarios fabrican pastelería y bollería congelada y el 4,5% masas congeladas (Datos de Intersicop 2003). En Francia el 25% del mercado nacional de panadería fabrica productos semielaborados, siendo la mitad masas congeladas.

La producción de masas congeladas ha tenido un considerable desarrollo en el mundo durante los últimos 15 años debido a las ventajas que proporciona tanto para productores como para consumidores. Así, la industria ha conseguido una producción racional y centralizada de las piezas de masa congelada. La masa es mezclada e inmediatamente dividida, moldeada, congelada y almacenada en el mismo sitio de producción; a continuación es transportada congelada a los puntos de fermentación y horneado. Por otra parte, los consumidores acceden a pan y bollería "fresca" en cualquier momento del día.

El considerable aumento de los puntos de horneado, donde es posible conseguir pan y bollería recién horneada en supermercados, grandes áreas comerciales y de entretenimiento, así como los servicios de "catering", han favorecido en gran medida el desarrollo de la industria de las masas congeladas.

2.3.- Las masas congeladas

Se entiende por masa congelada aquella que una vez realizado el formado de la pieza es sometida a ultracongelación, se conserva en estado congelado y más tarde se descongela, se fermenta y se hornea. La fabricación de las masas congeladas no difiere demasiado del proceso tradicional, pero hay que tener en cuenta determinadas consideraciones para conseguir un producto de buena

Introducción

calidad. El principal problema que posee actualmente la tecnología de producción de masas congeladas, es la disminución de la capacidad de elevación de la masa que presentan éstas, después de haber sido congeladas y que está directamente relacionado con el tiempo de almacenamiento en congelación. Esta pérdida de volumen se debe principalmente a dos causas (Gélinas *et al.*, 1993, Randez-Gil *et al.*, 1999): (i) La disminución de la capacidad de retención de CO₂, debido a los daños en la red de gluten producido durante la congelación y (ii) la pérdida de viabilidad y de capacidad fermentativa de la levadura.

La formación de cristales de hielo y el propio tratamiento de la masa a temperaturas bajo cero, causa un daño en el gluten que hace que la masa sea porosa y pierda la capacidad de subir durante la fermentación. Por otro lado, la capacidad fermentativa de la levadura disminuye debido a la degradación mecánica de las membranas celulares, siendo la integridad de las membranas vital para el mantenimiento de las funciones celulares. Los daños en las estructuras membranosas se producen por la formación de cristales de hielo durante la congelación del agua intra y extra-celular y como consecuencia de la disminución del potencial hídrico extracelular. Esta disminución es equivalente a un aumento importante de la presión osmótica, lo cual también daña la membrana celular. Por último durante el proceso de amasado se inicia la fermentación en la masa, que genera la movilización de la trehalosa, disacárido de conocida función osmoprotectora y la producción de etanol, tóxico para la levadura a las concentraciones elevadas que se alcanzan durante la congelación.

Con el fin de paliar los efectos que causa la congelación sobre la calidad del producto final, la industria ha tenido que realizar modificaciones sobre el proceso tradicional de panificación. Estas modificaciones van dirigidas principalmente a aumentar la capacidad de retención de CO₂ por la masa y a prevenir el inicio de la fermentación antes de la congelación, para preservar la viabilidad de las levaduras.

Introducción

Respecto a la composición de la masa, las modificaciones que se llevan a cabo pasan por la utilización de harinas con un mayor contenido en gluten, así como la adición de coadyuvantes de la congelación.

El amasado, así como la división y moldeado de las piezas se realiza en frío para evitar que se inicie la fermentación. Además, en la congelación de las piezas, es importante pasar lo más rápido posible el punto eutéctico, temperatura a la cual el agua libre pasa a estado sólido, de esta manera se disminuye el tamaño de los cristales de hielo. La temperatura de almacenamiento debe estar entre -18 y -20°C.

A pesar de estas modificaciones tecnológicas, no se obtiene un producto de calidad, por lo que la cantidad de levadura debe aumentarse, entre el 2% y el 8% respecto a la cantidad utilizada en el proceso tradicional.

En resumen, la producción de masas congeladas es un proceso en el cual se deben cuidar multitud de factores con el fin de conseguir una calidad aceptable del producto final y que traen como consecuencia un incremento del coste del proceso. La evaluación del producto final por catadores especialistas pone de manifiesto una disminución en el sabor y la calidad del producto debido principalmente a la utilización de un amasado fuerte, un menor volumen del producto final y la alta dosis de levadura utilizada.

2.4.- Retos de la industria de masas congeladas

Como se ha descrito en el apartado anterior, a pesar del creciente desarrollo de la tecnología de producción de masas congeladas existen todavía varios factores que necesitan ser mejorados.

Un factor crítico, del que depende la tasa de producción de CO₂ en la masa, es la resistencia a varios tipos de estrés en las levaduras de panadería. Durante el proceso de producción de masas congeladas se somete a las levaduras a estrés por congelación y estrés osmótico, debido a la reducción en el potencial hídrico de la masa, que es incluso mayor cuando se trata de masas dulces

Introducción

congeladas. La exposición de células de levadura a alta presión osmótica resulta en una deshidratación celular que limita su crecimiento y capacidad de producción de CO₂. Por último, ya hemos descrito que la congelación tiene un efecto negativo sobre la levadura, consecuencia de la ruptura de estructuras celulares (Attfield 1997; Randez-Gil et al., 1999).

El desarrollo de cepas de levadura de panadería con mejor capacidad de producción de gas en masas dulces y masas congeladas, es de gran interés económico en la industria panadera. Actualmente no existen cepas industriales de levadura de panadería que satisfagan estos requisitos y no resulta probable poder obtenerlas mediante técnicas de genética clásica. De hecho, a partir de los datos fisiológicos y genéticos disponibles, es posible deducir que estas características se encuentran bajo el control de diferentes mecanismos de regulación y que en ellos están implicados múltiples genes (Estruch 2000; Hohmann 2002). La aplicación de técnicas de genómica y proteómica a estudios de la respuesta a estrés por frío y congelación puede resultar en la identificación de genes y rutas implicadas en procesos tecnológicamente importantes, rutas potencialmente modificables mediante la utilización de técnicas de DNA recombinante en levaduras de panadería (Randez-Gil et al., 1999; Dequin 2001).

3.- La respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* a estrés por frío y congelación

3.1.- Efectos de la congelación

La primera condición de estrés a la que se ve sometida la levadura durante la producción de masas congeladas es estrés por frío, generado durante el amasado a bajas temperaturas. Las bajas temperaturas afectan al funcionamiento de la membrana plasmática cuya fluidez se reduce, a la maquinaria transcripcional por la estabilización de las estructuras secundarias de DNA y RNA (Thieringer et al., 1998, Inouye 1999) y a la síntesis de proteínas, la cual aumenta con el fin de proporcionar a la célula mecanismos de supervivencia bajo esta condición de estrés por frío (Sahara et al., 2002). Recientemente se ha demostrado que una disminución en la temperatura de

Introducción

30°C a 10°C induce genes de respuesta a estrés oxidativo en levadura (*SOD1*; *CTT1*; *GSH1* y *YAP1*) así como un aumento en los niveles intracelulares de H₂O₂, apuntando este resultado a la generación de estrés oxidativo por bajas temperaturas (Zhang *et al.*, 2003).

Los daños producidos por la congelación dependen de la velocidad a la que ésta se realice. La congelación a alta velocidad daña las células a causa de la formación intracelular de cristales de hielo, produce ruptura de membranas y desnaturalización de macromoléculas (Morris *et al.*, 1988, Kaul *et al.*, 1992b). Cuando la tasa de congelación es lenta, se congela primero el agua extracelular, aumentando la concentración de sales del medio. Las células son sometidas a un estrés osmótico que causa la pérdida de turgencia de la célula y flujo de agua a través de la membrana (Wolfe y Bryant 1999). Durante el almacenamiento de las masas congeladas el crecimiento de los cristales de hielo causa daños mecánicos en las células de levadura.

Finalmente, durante el proceso de descongelación las células sufren daños bioquímicos producidos por estrés oxidativo (Hermes-Lima y Storey 1993).

Todas estas observaciones indican que la congelación es una condición compleja y multifactorial, durante la cual se producen varias situaciones de estrés para las levaduras y que generan diversos tipos de respuestas. Es por lo tanto probable que la adquisición de tolerancia a la congelación implique el funcionamiento coordinado de varios mecanismos.

3.2.- La respuesta molecular a frío y congelación

El estudio de la respuesta molecular de *Saccharomyces cerevisiae* a frío y congelación ha recibido poca atención hasta el momento. Existen evidencias de que células de *S. cerevisiae* con un metabolismo adaptado a bajas temperaturas poseen mayor resistencia cuando son sometidas a estrés por congelación (Teunissen *et al.*, 2002; este trabajo), lo cual ha sido demostrado en otras levaduras (Thammavongs *et al.*, 2000). Es por lo tanto interesante revisar qué genes se inducen por frío o son esenciales para el crecimiento a

Introducción

bajas temperaturas a la hora de abordar el estudio de la adquisición de criorresistencia.

Mediante un *screening* diferencial en cepas de levadura de laboratorio se han identificado varios genes inducidos por frío (Kondo e Inouye 1991), *TIP1* (*Temperature Induced Protein*) y tres homólogos *TIR1*, *TIR2* y *TIR4* (Kowalsky et al., 1995) que codifican proteínas con un dominio C-terminal rico en serinas, sin embargo la disrupción de estos genes no posee ningún fenotipo aparente a bajas temperaturas (Kowalski et al., 1995). En un estudio similar realizado por Zhang et al., (2001) se identificaron varios genes inducidos cuando se producía una disminución en la temperatura desde 30°C a 10°C: *YKL183w*, *YLR011w*, *FBA1* (*Fructosa Bifosfato Aldolasa*), *RPL2B* (proteína de la unidad ribosomal 60S) y *NOP1* (*Proteína nucleolar implicada en la biogénesis de ribosomas*). De ellos, el mutante *rpl2b* resultó ser sensible a frío. Estos resultados se han confirmado en estudios globales de expresión génica en células sometidas a una disminución en la temperatura ambiental (Gasch et al., 2000).

Recientemente se ha realizado un amplio análisis de expresión génica de células de levadura sometidas a 10°C durante distintos tiempos (hasta un total de 8 horas) (Sahara et al., 2002). El análisis de estos resultados muestra la inducción de genes relacionados con la síntesis de rRNA, de proteínas ribosomales y de protección frente al estrés, siendo esta inducción dependiente del tiempo de exposición a frío.

En general todos estos resultados muestran la importancia de la maquinaria traduccional y de la estructura secundaria de los ácidos nucleicos en la respuesta de la célula a frío.

Con el fin de identificar genes responsables de conferir criorresistencia en cepas industriales se ha realizado un estudio con *microarrays* que compara la expresión de una cepa sensible y otra tolerante a la congelación, AT25, obtenidas a partir de una cepa industrial (Tanghe et al., 2002). La comparación de la expresión génica de ambas cepas mostró la represión de 15 genes y la inducción de 67 genes en la cepa criotolerante.

Introducción

3.3.- Factores celulares implicados en la adquisición de criorresistencia.

Hasta la fecha las cepas de levadura de panadería más criorresistentes se han conseguido por selección, tras sucesivos ciclos de congelación y descongelación (Oda y Tonomura 1993, Almeida y Pais 1996a) o construidas por hibridación (Nakagawa y Ouchi 1994, Codón *et al.*, 2003) o mutación (Takagi *et al.*, 1997, van Dijck *et al.*, 2000, Teunissen *et al.*, 2002). El estudio de las características fisiológicas de estas cepas ha permitido correlacionar la criorresistencia con algunos factores celulares.

I.- Crecimiento respirativo. Las células poseen diferente tolerancia al estrés en función de la fase de crecimiento en la que se encuentran. En el caso de estrés por congelación, la máxima tolerancia se consigue durante el crecimiento respirativo en etanol (Lewis *et al.*, 1993, Park *et al.*, 1997). Mutantes deficientes en respiración son más sensibles al estrés por congelación-descongelación, probablemente por la incapacidad de hacer frente al estrés oxidativo generado durante la descongelación (Hermes-Lima y Storey 1993).

II.- Trehalosa. Altos niveles intracelulares de trehalosa se han correlacionado con la resistencia a congelación y a etanol (van Dijck *et al.*, 1995, Kim *et al.*, 1996, Lewis *et al.*, 1997). El papel de la trehalosa como osmolito compatible ha sido descrito por Sano *et al.* (1999). Por ello, en la industria se utilizan condiciones de propagación de las levaduras de panadería que favorezcan la acumulación de trehalosa, con el fin de evitar su lisis y mejorar su capacidad de elevar una masa. La disrupción de la trehalasa ácida vacuolar (*ATH1*) aumenta la concentración intracelular de trehalosa y mejora la supervivencia de cepas de levadura de laboratorio después de someterlas a congelación y descongelación (Kim *et al.*, 1996). De forma similar la disrupción de la trehalasa neutra (*NTH1*) también ha proporcionado mutantes *nth1* de cepas de levaduras comerciales con mejor criorresistencia y niveles de trehalosa intracelular más elevados (Shima *et al.*, 1999).

III.- Acumulación de aminoácidos. Se conoce que tanto en levadura como en otros organismos, la acumulación de aminoácidos cargados, glutamato, lisina y arginina, genera mayor tolerancia a la congelación (Takagi *et*

Introducción

al., 1997). Estos aminoácidos probablemente actúan recubriendo la superficie de las proteínas y previniendo su desnaturalización.

La disrupción del gen *CAR1*, que codifica el enzima arginasa, en cepas de levadura de panadería da como resultado células que acumulan glutamato y que poseen una supervivencia de 10 a 1000 veces superior que la cepa salvaje tras varios ciclos de congelación-descongelación y mayor capacidad de fermentar una masa después de un corto periodo de almacenamiento en congelación (Shima *et al.*, 2003).

La prolina también posee efecto crioprotector, protege las membranas durante la congelación y actúa como carabina molecular en el plegamiento de proteínas (Samuel *et al.*, 2000). Células de *S. cerevisiae* con mutaciones en los genes *PRO1* y *PRO2* que aumentan la actividad de los enzimas γ -glutamil quinasa y γ -glutamil fosfato reductasa, respectivamente acumulan prolina y son tolerantes a la congelación en periodos cortos de almacenamiento (Takagi *et al.*, 1997; Morita *et al.*, 2003). La disrupción del gen *PUT1* (prolina oxidasa) provoca un efecto similar (Takagi *et al.*, 2000).

IV.- Composición lipídica. Un descenso en la temperatura provoca una transición en la membrana plasmática de su estado líquido-cristalino habitual a estado gel. Esta disminución en la fluidez de la membrana afecta a su función, por ejemplo, induciendo la agregación de proteínas (James y Branton 1973), reduciendo la actividad de enzimas asociadas a la membrana (Ushio y Watabe 1993), disminuyendo la tasa de fusión lateral (Goversriemlag 1992) y aumentando la permeabilidad a cationes y agua (Singer 1981).

Una respuesta generalizada frente a la disminución de la temperatura es la insaturación de ácidos grasos, ya que fosfolípidos con mayor nivel de insaturación en las cadenas de ácidos grasos poseen temperaturas de fusión menores y mayor flexibilidad. Otros cambios que pueden suceder son el acortamiento de las cadenas de ácidos grasos (Sandercock y Russel 1980), aumento de ácidos grasos ramificados o variación en las ramificaciones (Klein 1999) y disminución en la proporción de ácidos grasos cíclicos (Russel 1984).

Introducción

Muchos organismos han desarrollado mecanismos para compensar la transición de fase aumentando el número de insaturaciones, con el fin de mantener la fluidez de la membrana a pesar de las condiciones ambientales, a esta respuesta se le denomina adaptación homeoviscosa (Hazel 1995). La capacidad de las células de modular el grado de insaturación de las membranas está determinada por la actividad enzimática de las desaturasas.

Saccharomyces cerevisiae posee una única desaturasa codificada por el gen *OLE1*, es una $\Delta 9$ -desaturasa que actúa sobre los ácidos palmítico ($C_{16:0}$) y esteárico ($C_{18:0}$), esterificados con Coenzima-A, para rendir los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleico ($C_{16:1}$) y oleico ($C_{18:1}$) (Stukey et al., 1989, 1990). Se ha demostrado que la transcripción del gen *OLE1* se activa transitoriamente por un descenso en la temperatura de 30°C a 10°C, aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados (Nakagawa et al., 2002).

En cepas comerciales de levadura de panadería, el análisis de la composición lipídica de cepas con diferente tolerancia a la congelación, ha revelado la existencia de una correlación positiva entre la proporción de esteroides frente a fosfolípidos de la membrana plasmática y criotolerancia de la cepa. Sin embargo la cantidad total de esteroides y fosfolípidos, así como el índice de insaturación, no se ha correlacionado con la criotolerancia en cepas de levadura de panadería (Gélinas et al., 1991; Murakami et al., 1996).

4.- *Torulaspota delbrueckii*

Torulaspota delbrueckii es una levadura no convencional que filogenéticamente se clasifica en un taxón diferente al de *S. cerevisiae* debido a diferencias en la formación del asca (Vaughan-Martin y Martini 1998). Mediante electroforesis en campo pulsante es posible resolver seis cromosomas (Oda y Tonomura 1995), posee una morfología globular-oval, su tamaño es menor que el de las cepas comerciales de levadura de panadería de *S. cerevisiae*. A pesar de la diferencia entre *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, ambas se encuentran genealógicamente próximas, como se ha podido demostrar por comparación de secuencias (James et al., 1996, Oda et al., 1997, Belloch et al., 2000).

Introducción

4.1.- Torulaspota delbrueckii como levadura panadera.

La propiedad fundamental que debe poseer una levadura de panadería es la capacidad de fermentar los azúcares presentes en la masa. Algunas cepas de *T. delbrueckii* son capaces de asimilar y fermentar fuentes de carbono como la maltosa, siendo por lo tanto capaces de levantar una masa (Kurtzman 1998).

Una de las principales características que hace de *T. delbrueckii* una levadura interesante para su uso en panificación, es la resistencia que presenta frente a varios tipos de estrés, especialmente a estrés osmótico y estrés por congelación. Esto ha impulsado el aislamiento de cepas de *T. delbrueckii* con potencial para ser utilizadas en panadería a partir de masas caseras de maíz y centeno (Hahn y Kawai 1990; Almeida y Pais 1996a).

Las cepas de *T. delbrueckii* IGC5321 e IGC5323 poseen gran resistencia a la congelación, ya que su capacidad de fermentar una masa no se ve alterada después de haber sido congeladas y descongeladas, mientras que el mismo tratamiento en *S. cerevisiae* disminuye su capacidad fermentativa en un 40% (Almeida y Pais 1996b). Los efectos deletéreos del almacenamiento en congelación también fueron menores en *T. delbrueckii* que en otras levaduras comerciales, además, estas cepas son resistentes a la toxicidad producida por el Na⁺ (Hernández-López 2003a). Cabe destacar su capacidad de fermentar tanto masas saladas como dulces (Randez-Gil et al., 2002), lo que constituye una ventaja para la industria, al poder utilizar eficientemente una única cepa de levadura para múltiples aplicaciones.

4.2.- Torulaspota delbrueckii como sistema modelo.

Como se ha comentado anteriormente, a diferencia de *Saccharomyces*, *Torulaspota* posee una excepcional resistencia a estrés osmótico y a estrés por congelación-descongelación, lo cual hace de esta levadura un potencial modelo de estudio de los mecanismos que confieren la tolerancia a estos estreses.

Introducción

El inconveniente que nos encontramos a la hora de abordar este estudio es el desconocimiento de la fisiología y genética de esta levadura, así como la falta de herramientas moleculares para su manipulación genética. Sin embargo estos inconvenientes están siendo superados con la reciente construcción de una genoteca de DNA genómico de *T. delbrueckii* (Hernández-López *et al.*, 2002) y la selección de cepas auxótrofas para uracilo de la cepa IGC5323 (Hernández-López *et al.*, 2003b).

Objetivos

OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los hábitos alimenticios de la población están cambiando y con ellos las exigencias del consumidor. En el campo de la panificación este hecho se ha traducido en un aumento de la demanda de productos “listos para su consumo”. Como consecuencia, la producción de masas congeladas para la elaboración de productos de panadería y bollería ha experimentado un fuerte crecimiento. Este tipo de productos, como ya se ha comentado tiene grandes ventajas tanto económicas como sociales. A pesar de esto, el auge y expansión de este sector productivo se ha visto en parte limitado por los problemas tecnológicos derivados de la no disponibilidad de cepas de levadura de panadería tolerantes a la congelación.

En este trabajo se ha iniciado el estudio de la respuesta a estrés por frío y por congelación en *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii*, con el objeto de obtener información básica sobre los mecanismos moleculares que subyacen en la respuesta a estas condiciones de estrés. Para ello se han seguido dos estrategias, basadas en la utilización de técnicas de genómica y proteómica. La aplicación de la información obtenida, nos ha permitido ensayar aproximaciones de ingeniería metabólica y analizar su efecto en la tolerancia a estrés en levadura. Así, los objetivos de este trabajo son:

- 1.- Identificar genes implicados en la respuesta de *S. cerevisiae* a frío y congelación.
- 2.- Estudiar la implicación de estos genes en la tolerancia a estas condiciones de estrés en *S. cerevisiae*
- 3.- Caracterizar el crecimiento de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* a temperaturas sub-óptimas.
- 4.- Establecer el perfil de proteínas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* a bajas temperaturas.

MATERIALES Y MÉTODOS



Materiales y métodos

1.- MATERIAL BIOLÓGICO Y TÉCNICAS DE CULTIVO

1.1.- Cepas

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* utilizadas en este trabajo se detallan en la [tabla 1](#) y [tabla 2](#) respectivamente, indicándose su genotipo o descripción y su procedencia.

Tabla 1: Cepas de *S. cerevisiae*

Cepa	descripción	procedencia
W303-1A	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1, can 1-100; GAL; mal; SUC3</i>	Thomas y Rothstein 1989
CEN.PK2-1C	<i>MATa; ura3-52; his3-D1; leu2-3,112; trp1-289; MAL 2-8^c, SUC3</i>	Entian y Kotter 1998.
13bxV4	CECT10837 [10a12-13x28b4] <i>trp1</i>	Randez-Gil y Sanz 1994
Cinta Roja	Levadura de panadería comercial	Burns Philp
Plus Vital	Levadura de panadería comercial	Lesaffre
JRY4145	<i>MATα; ade2; his3-11,15; leu2-3,112; ura3-1</i>	Hiser et al., 1994.
JRY4274	<i>MATα; ade2; his3-11,15; leu2-3,112; ura3-1; erg10Δ::LEU2.</i>	Hiser et al., 1994.

Tabla 2: Cepas de *T. delbrueckii*.

Cepa	descripción	procedencia
CECT1680	Aislada de uva "Pedro Ximenez" (Montilla)	Leal I. (IFI)
IGC5321	Aislada de masas de pan de trigo y centeno	Almeida y Pais 1996a
IGC5323	Aislada de masas de pan de trigo y centeno	Almeida y Pais 1996a

1.2.- Condiciones de crecimiento y medios de cultivo.

1.2.1.- Crecimiento de *Escherichia coli*.

Se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli* para transformar con plásmidos "lanzadera" como paso previo a la introducción, por transformación, del plásmido en *S. cerevisiae*. Las bacterias se crecieron a 37°C. Los medios líquidos se agitaron a 200 rpm en un agitador orbital.

Materiales y métodos

Medio de cultivo LB (Luria Bertani): extracto de levadura 0.5%; bacto-triptona 1% y NaCl 1%. Para medios sólidos se añade 2% de agar bacteriológico.

Para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos que contiene el gen de selección *Ap^r* se añaden 50 mg/L de ampicilina al medio LB, (medio LBA).

Para la selección de plásmidos en los que se ha clonado un fragmento de DNA y poseen como marcador el gen *LacZ* se añadió X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) (Promega) a las placas de LBA, [20 μ l (50 mg/ml) por placa de LBA].

SOC: Medio de recuperación de *E. coli* tras transformación por electroporación. Extracto de levadura 0,5%, peptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM. El medio se esteriliza autoclavándolo antes de añadir la glucosa, la cual se esteriliza por filtración y se adiciona al medio estéril y frío.

1.2.2.- Crecimiento de levaduras.

Las distintas cepas de *S. cerevisiae* y de *T. delbrueckii* se crecieron a 30°C en condiciones control. En los experimentos de aclimatación y en los que realiza un estrés por frío las células se crecen a las temperaturas que se especifican en los correspondientes apartados de resultados. El crecimiento en medio líquido se realizó en agitación a 200 rpm. Los diferentes medios utilizados han sido:

YPD: Compuesto de, extracto de levadura 1%, bacto-peptona 2% y glucosa 2%. Para el crecimiento de las cepas mutantes *erg10* el medio YPD se suplementó con 5 mg/ml de DL-mevalonolactona (mevalonato, Sigma)

MM, medio mínimo compuesto de Yeast Nitrogen Base 0,2% (sin aminoácidos ni sulfato amónico), (NH₄)₂SO₄ 0,5%, glucosa 2%, y los requerimientos de aminoácidos de cada cepa a las concentraciones recomendadas por Sherman et al. (1995).

LDS (Liquid Dough System), sistema modelo que mimetiza las condiciones de crecimiento en una masa panaria. Se compone de: glucosa 3%, maltosa 9%, sorbitol 12%, extracto de levadura 0,5% y aminoácidos (Sherman et al., 1995), disueltos en solución de nutrientes. La solución de nutrientes se

Materiales y métodos

compone de: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g/L, KCl 1,6 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 9,4 g/L y solución de vitaminas [tiamina (B_1) 0,8 mg/L, piridoxina (B_6) 0.8 mg/L y ácido nicotínico 8 mg/L] disueltos en tampón citrato 0,15M pH 5,5.

En todos los casos para realizar medios sólidos se añadió 2% de agar bacteriológico.

1.3.- Medidas del crecimiento de las levaduras.

1.3.1.- Medida del crecimiento en medio líquido. La determinación crecimiento en medio líquido se realizó midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm (DO_{600}).

1.3.2.- Ensayos de viabilidad celular. Mediante recuento de unidades formadoras de colonia (CFU) en placa: se realizaron diluciones seriadas del cultivo o de las células tras ser sometidas a condiciones de estrés, por ejemplo congelación-descongelación, y se plaquearon dos diluciones con el fin de poder realizar un recuento entre [30-300] CFU por placa. Cada dilución se plaqueó por triplicado.

En algunos casos la viabilidad celular se ensayó por goteos en placas: se realizaron diluciones seriadas del cultivo en condiciones control y de las células estresadas y se depositaron gotas de 3 μl de cinco de las diluciones.

2.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA.

2.1.- Técnicas generales.

2.1.1.- Obtención de DNA genómico. El DNA genómico de levadura se utilizó como molde para la amplificación por PCR de fragmentos de DNA que se utilizaron como sondas o para la clonación de genes. Se utilizó el protocolo rápido descrito por Hoffman y Winston (1987), que básicamente consiste en: crecer un cultivo de 10 ml de levaduras en medio YPD o/n; recoger las células por centrifugación y resuspender en 100 μl de agua, añadir 200 μl de tampón de lisis [2% tritón X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$], 200 μl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 500 μl de perlas de vidrio (425-600 μm de diámetro, Sigma). Romper las células mediante

Materiales y métodos

agitación con el vortex durante 2 minutos a intervalos de 30 segundos dejando enfriar en hielo entre cada ciclo de agitación. Centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos para separar las fases y recoger la fase acuosa. Precipitar los ácidos nucleicos añadiendo 1 ml de etanol absoluto frío. Centrifugar a 12000 rpm durante cinco minutos y resuspender el precipitado en 400 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1mM) con 3 μ l de RNasa A (10 mg/ml). Incubar 30 minutos a 37°C. Añadir 4 μ l de acetato amónico 4M y 1 ml de etanol absoluto. Recoger el precipitado por centrifugación, secar y resuspender en 50 μ l de TE.

2.1.2.- Obtención de DNA plasmídico de *E. coli*. Se crecieron las células de *E. coli* transformadas en 2 ml de medio LBA y se extrajo el plásmido mediante el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979): recoger las células de 1,5 ml de un cultivo de *E. coli* y se resuspenden en 100 μ l de solución de lisis [Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8]. Añadir 200 μ l de solución 2 [NaOH 0,2M, SDS 1%]. Añadir 150 μ l de solución 3 [acetato potásico 3M pH 5,5]. Centrifugar y descartar el precipitado. Añadir 1 ml de etanol absoluto frío al sobrenadante y dejar precipitar a -20°C 1 hora. Recoger el precipitado por centrifugación y resuspender tras secarlo en 40 μ l de TE o agua.

2.1.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se utilizó para la obtención de fragmentos de DNA que se utilizaron como sondas tras ser marcados con 32 P y en la amplificación de genes para su clonación en vectores de expresión en levadura. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Eppendorf) en un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción consiste en: 100 ng de DNA genómico o 10 ng de DNA plasmídico, 50 pmoles de cada oligonucleótido utilizado como cebador, 0,5 mM de dNTPs, MgCl₂ 4 mM, 1 U de DNA polimerasa y el tampón recomendado por la casa comercial.

Las condiciones de reacción fueron: 2 minutos a 94°C para desnaturalizar el DNA tras los cuales se añade la DNA polimerasa y se comienzan los ciclos de síntesis, que oscilan entre 25 y 30 en función de la cantidad de DNA que se desee obtener. Los ciclos consisten en, 30 segundos a 94°C, 30 segundos a una temperatura entre [45-55]°C en función de la temperatura de hibridación de los cebadores y un paso de elongación a 72°C que puede oscilar entre 30

Materiales y métodos

segundos y 1 minuto en función de la longitud del fragmento a amplificar. Tras acabar los ciclos se realiza una última elongación de dos minutos a 72°C.

En la tabla 3 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las distintas reacciones de PCR llevadas a cabo durante este trabajo.

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

Oligos	Secuencia	Utilización
IPP1	5'AAGGATGGTAAGCCAGTTTCTGCC3'	Sonda del gen <i>IPP1</i>
IPP2	5'TTGTCAATTGGAGCATCTGCC3'	
ERG10-1	5'ACGATTAATGgATccGAGAGGT3'	Clonación del gen <i>ERG10</i> en el vector YEplac195.
ERG10-4	5'gAgAAGAgCATGcGAAAATCG3'	
ERG10-2	5'ACAATGTAAAGCTTCTGAGACAT3'	Sonda del gen <i>ERG10</i> (junto con el oligo ERG10-4)
ACT1-S1	5'GGTATGTTCTAGCGCTTG3'	Sonda del gen <i>ACT1</i>
ACT1-S2	5'TCTGGGGCTCTGAATCTT3'	
IMH1-1	5'ATTGGCCTATTTTAACGG3'	Sonda del gen <i>IMH1</i>
IMH1-2	5'CTTCAGAGACATAACCAG3'	
TPI1-2	5'CGACAAAGAAGGATCCAGCCATT3'	Sonda del gen <i>TPI1</i>
TPI1-3	5'GGCAATATAAAAAAGCTTTCCG3'	
OLE1-1	5'CGTACTGGTTTGAATAAG3'	Sonda del gen <i>OLE1</i> .
OLE1-2	5'TTCAAGTCGTATGCTAGA3'	
ScDed1-S1	5'TGAGCGAACAAGTGCAAA3'	Sonda del gen <i>DED1</i> .
ScDed1-S2	5'CAACATTCTATCAGCTTC3'	
ScTip1-S1	5'AAATAGTACATTGGCAGC3'	Sonda del gen <i>TIP1</i> .
ScTip1-S2	5'GACAGAAGAAGAAACGGC3'	
ERG1-1	5'AAATCTCTTCTCGAGTATGG3'	Clonación del gen <i>ERG1</i> en el vector YEplac112.
ERG1-2	5'GGCAAGCTTGATTTAATATC3'	

Materiales y métodos

2.1.4.- Clonación: Los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR se clonaron en vector pGEM-T-Easy (Promega) realizando la reacción de ligación según las instrucciones del proveedor.

La clonación en otros vectores de expresión en levadura se llevó a cabo siguiendo los siguientes pasos: Digestión enzimática del vector y del fragmento de DNA a clonar mediante endonucleasas de restricción (utilizando el tampón y las indicaciones sobre condiciones óptimas de reacción proporcionadas por la casa comercial para cada enzima). Reacción de ligación: mezclar aproximadamente 50 ng de vector y una cantidad de inserto equimolar o tres veces superior, 1 µl del tampón proporcionado por el proveedor y 1 µl de DNA ligasa, en un volumen final de 10 µl. Llevar a cabo la reacción o/n a 16°C.

Tabla 4: Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Origen
YEplac112	Vector episomal de expresión en <i>S. cerevisiae</i> Marcadores de selección: <i>TRP1</i> ; <i>Ap^r</i> , <i>LacZ</i>	Gietz y Sugino (1988)
YEplac195	Vector episomal de expresión en <i>S. cerevisiae</i> Marcadores de selección: <i>URA3</i> ; <i>Ap^r</i> , <i>LacZ</i>	Gietz y Sugino (1988)
YE _p ERG10	Plásmido YEplac195 con un inserto de DNA de 2.8 Kb, correspondiente al gen <i>ERG10</i> con su promotor y su terminador, clonado en los sitios de restricción <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III.	Este trabajo
YE _p ERG1	Plásmido YEplac112, con un inserto de DNA de 3 Kb, correspondiente al gen <i>ERG1</i> con su promotor y su terminador, clonado en los sitios de restricción <i>Sal</i> I/ <i>Hind</i> III.	Este trabajo
pVT102-U-HaFAD2-1	Plásmido construido a partir del vector pVT-102-U (marcador de selección <i>URA3</i>), en el que se ha clonado (en <i>Bam</i> HI) un inserto de 1.15 Kb correspondiente al gen <i>FAD2-1</i> de <i>Helianthus annuus</i> , bajo el control del promotor <i>ADH1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	Martínez-Rivas JM
pVT102-U-HaFAD2-3	Plásmido construido a partir del vector pVT-102-U (marcador de selección <i>URA3</i>), en el que se ha clonado (en <i>Bam</i> HI) un inserto de 1.15 Kb correspondiente al gen <i>FAD2-3</i> de <i>Helianthus annuus</i> , bajo el control del promotor <i>ADH1</i> de <i>S. cerevisiae</i> .	Martínez-Rivas JM

2.1.5.-Transformación de *E. coli*. Se utiliza la transformación por electroporación. Las células de *E. coli* se crecen en medio LB y se tratan para obtener células competentes (Sambrook *et al.*, 1989) con capacidad de ser transformadas. Células competentes junto con 2 µl de la reacción de ligación se someten a una descarga de 1700 V en un electroporador (Electroporator 2510,

Materiales y métodos

Eppendorf). Se recuperan las células durante 45 minutos a 37°C en 1 ml de medio SOC y se plaquean en medio LBA, con X-gal si el plásmido posee el gen *LacZ* utilizado como marcador de la presencia de inserto.

2.1.6.- Transformación de levaduras. Las levaduras se transformaron mediante el protocolo descrito por Agatep et al. (1998) disponible en la página web: <http://tto.trends.com>.

En líneas generales la transformación se lleva a cabo de la siguiente manera: crecer las células de levadura en medio YPD hasta fase logarítmica de crecimiento ($DO_{600} \sim 1$). Recoger 50 ml de cultivo por centrifugación y lavar las células con agua estéril, lavar con 1 ml de LiAc 100mM, resuspender en un volumen final de 500 μ l con LiAc 100 mM y utilizar 50 μ l para cada transformación. Antes de añadir la mezcla de transformación, centrifugar los 50 μ l de suspensión celular y eliminar el LiAc del sobrenadante. Añadir a las células (siguiendo el orden indicado): 240 μ l de PEG (50% p/v); 36 μ l de LiAc 1 M; 50 μ l de ss-DNA (2 mg/ml); DNA plasmídico (0,1-10 μ g); en un volumen final de 360 μ l de H₂O estéril. Incubar la mezcla de transformación 30 minutos a 30°C y realizar un choque térmico de 30 minutos a 42°C, tras el cual se recogen las células por centrifugación, se lavan con agua estéril y se plaquean en dos placas de medio mínimo (MM) con los requerimientos necesarios de la cepa transformada excepto la auxotrofia que se ha complementado mediante la transformación.

2.2.- *Differential Display*.

La técnica del *differential display* fue descrita por Liang y Pardee (1992). El protocolo utilizado, que se detalla a continuación, se basa en el descrito por éstos autores.

Tratamiento de las células de levadura con diferentes condiciones de estrés. Células de la cepa de panadería 13bxV4 se crecieron en YPD hasta fase logarítmica ($DO_{600} \sim 3$), parte del cultivo celular se recogió (células control), el resto se trató con diferentes tipos de estrés: (1) Choque térmico a 42°C durante 30 minutos. (2) Parte de las células tratadas por choque térmico se sometieron además a estrés por congelación-descongelación, congelando a -20°C o/n y

Materiales y métodos

descongelando en hielo durante dos horas o (3) a 30°C 15 minutos. (4) Parte del cultivo celular de células control fue sometido a estrés por congelación-descongelación directamente (sin otro tipo de estrés previo) de la misma manera [-20°C y descongelación a 0°C (5) o 30°C (6)]. El estrés por frío se realizó transfiriendo parte del cultivo de células control a 10°C durante 16 horas (o/n) (7). Las células control o células tratadas con diferentes tipos de estrés se recogieron, se lavaron con agua destilada, se congelaron con N₂(l) y se mantuvieron a -80°C hasta que se realizó la extracción de RNA. TTTTTTTTTTTT[AC]T3

Extracción de RNA total de levadura. Se siguió el procedimiento habitual de extracción de RNA de levadura que se detalla a continuación (ver apartado de "Técnicas de manipulación de RNA").

Síntesis de cDNA. Se realizó una reacción de transcripción inversa del RNA total extraído de las células control y sometidas a los diferentes tipos de estrés, según el protocolo descrito por Liang y Pardee (1992). Se utilizó la transcriptasa inversa Superscript (Gibco BLR, San Diego, California) y como cebadores del extremo 3' de los mRNA cuatro oligonucleótidos de secuencia arbitraria consistente en una cola poli-dT y dos nucleótidos al azar (tabla 5). La reacción se llevó a cabo a 65°C 5 minutos, 37°C 60 minutos y 75°C 5 minutos.

Tabla 5: Secuencia de los cebadores 3'.

T1	5'TTTTTTTTTTTT[AC]G3'
T2	5'TTTTTTTTTTTT[AC]A3'
T3	5'TTTTTTTTTTTT[AC]C3'
T4	5'TTTTTTTTTTTT[AC]T3'

Los cDNAs sintetizados se amplificaron por PCR combinando los oligonucleótidos poli-dT con 5 oligonucleótidos de secuencia arbitraria como cebadores del extremo 5' (tabla 6) y utilizando [α -³⁵S]dATP con el fin de marcar radioactivamente los fragmentos. De esta manera se sintetizaron 20 grupos de cDNAs para cada muestra de RNA. Las condiciones de la reacción de PCR fueron: 40 ciclos de, 94°C 30 segundos, 40°C 2 minutos, 72°C 30 segundos y una elongación final de 5 minutos a 72°C.

Materiales y métodos

Tabla 6: Secuencia de los cebadores 5'.

AP1	5'AGCCAGCGAA3'
AP2	5'GACCGCTTGT3'
AP3	5'AGGTGACCGT3'
AP4	5'CGTACTCCAC3'
AP5	5'GTTGCGATCC3'

Separación de los cDNAs por electroforesis. Los cDNAs se resolvieron en función de su tamaño molecular en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 6%. La electroforesis se desarrolló durante 3,5 horas aproximadamente (hasta que el colorante xilen cianol alcanza el final del gel) a 60W y un voltaje que no excediera los 1700 V. El gel se adhiere a un papel de filtro 3M, se cubre con un plástico fino y se seca a 80°C durante 1 hora

La imagen se visualizó mediante autorradiografía con una película Kodax BioMAX MR film. Los fragmentos marcados se compararon visualmente entre cada condición.

Clonación y secuenciación de los fragmentos de cDNA. Las bandas de cDNA seleccionadas se cortaron del gel de poliacrilamida seco y se eluyeron del gel en agua a 100°C. Se realizó una reacción de PCR utilizando como molde el cDNA eluido del gel y como cebadores el mismo par de oligonucleótidos utilizados para obtener el cDNA.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega, Madison Wis.) y se secuenciaron mediante un kit de secuenciación (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont Buckinghamshire, UK).

Las secuencias obtenidas se compararon en las bases de datos de secuencias de *S. cerevisiae* con el fin de obtener el gen al que corresponde el fragmento de cDNA amplificado.

2.3.- Hibridación de filtros de DNA de *S. cerevisiae*.

2.3.1.- Yeast GeneFilters[®] (Research Genetics). La síntesis de cDNA e hibridación de los filtros se realizó siguiendo el protocolo recomendado por Research Genetics (<http://resgen.com>).

Materiales y métodos

Tratamiento de las células con estrés por frío o por congelación. Células de la cepa W303-1A de *S. cerevisiae* se crecieron en medio YPD hasta fase logarítmica ($DO_{600} \sim 0.5$), se recogió parte de cultivo (células control) y el resto se dividió en dos partes, que se trataron con estrés por frío, a 4°C durante 15 horas (o/n) en el medio YPD en agitación (200 rpm) o con estrés por congelación-descongelación, congelando 25 unidades de DO en 5 ml de YPD a -20°C durante 15 horas (o/n) y descongelando a 30°C durante 15 minutos.

Obtención de RNA: El RNA total de las muestras de levadura se obtuvo por el procedimiento habitual, descrito en el apartado "Técnicas de manipulación de RNA".

Síntesis de las sondas de cDNA marcado con ^{33}P . Se utilizaron 10 µg de RNA total para sintetizar sondas de cDNA de cada muestra con el siguiente procedimiento: Se incubó el RNA junto con un oligonucleótido poli-dT₁₅, utilizado como cebador, en un volumen final de 10 µl a 70°C durante 10 minutos. Para la reacción de elongación se adicionó a la mezcla anterior, 6.5 µl de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP 2,5 mM dCTP 1,25 mM), 1 µl de DTT (0,1M), 1 µl de transcriptasa inversa (Superscript II, Invitrogen) y [$\alpha^{33}P$]dCTP (10 µCi/µl, Amersham Biosciences). La reacción se llevó a cabo durante 90 minutos a 42°C.

Las sondas de cDNA sintetizadas se purificaron con una columna de exclusión molecular MicroSpin™ S-300 HR (Amersham Biosciences) y el porcentaje de incorporación de nucleótidos marcados se midió en un contador de centelleo (Wallac 1409). Las sondas se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos.

Hibridación de los filtros. En primer lugar se prehibridaron los filtros en un horno de hibridación giratorio (Amersham Pharmacia Biotech), a 42°C durante un mínimo de 2 horas, en 5 ml de solución de hibridación: Formamida 50%; SDS 1%; SSC 5X; Denhart 5X y Poli dA (1mg/ml) (Roche). Transcurido el tiempo de prehibridación se añadieron las sondas desnaturalizadas (el total del marcaje realizado) a los tubos conteniendo la solución de hibridación y se incubaron en el horno giratorio a 42°C durante 16-18 horas.

Lavado de los filtros, exposición y lectura de los datos. Los filtros se lavaron en primer lugar en los tubos de hibridación con la solución de lavado 1

Materiales y métodos

(2X SSC, 0,1% SDS) a 65°C durante 20 minutos dos veces y por último con la solución de lavado 2 (0,2X SSC, 0,1% SDS) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se espera que los filtros emitan entre 5 y 10 cpm antes de su exposición, lo cual se comprueba con el contador Geiger.

Los filtros se envuelven para su exposición en plástico fino, junto con una hoja de papel de filtro 3M húmeda. Debe impedirse que los filtros se sequen para favorecer la eliminación de las sondas posteriormente. Los filtros se exponen durante 3 días en pantallas Bas-IP MP 2040 (Fuji Foto Film Co., LTD). La imagen digital se obtuvo con un analizador de imagen FLA-3000 (FujiFilm) utilizando el programa Image Gauge Version 3.12 (FujiFilm).

Antes de volver a hibridar los filtros se eliminan las sondas lavándolos con una solución de fosfato sódico 5mM (pH 7) y 0,1% de SDS a 100°C. Los filtros se exponen antes de otra hibridación para comprobar que no se detecta ninguna señal.

Las imágenes se analizaron con el programa ArrayVision. Tras eliminar posibles artefactos en los resultados, los datos cuya inducción/represión fue significativa se clasificaron manualmente en categorías funcionales basadas en la clasificación de la base de datos del MIPS (<http://mips.gsf.de>).

2.3.2.- Filtros de DNA del Servei Central de Suport a la Investigació (Universitat de València)

Crecimiento de las células de levadura: Células de *S. cerevisie* que expresan el gen *FAD2-3* de *H. annuus* (transformadas con el plásmido pVT102-U-*FAD2-3*) y células control (transformadas con el plásmido YEplac195) se crecieron hasta fase estacionaria temprana en medio mínimo.

Obtención de RNA: El RNA total de las muestras de levadura se obtuvo por el procedimiento habitual, descrito en el apartado "Técnicas de manipulación de RNA".

Síntesis de sondas de cDNA marcadas con ³³P. La síntesis de cDNAs marcados se realizó por hibridación con hexanucleótidos al azar. En primer lugar 10 µg de RNA total (1µg/µl) se trataron con DNAasa RNAasa-free (Roche)

Materiales y métodos

a 37°C durante 30 minutos. La DNasa se inactivó térmicamente a 72°C durante 10 minutos. Para la síntesis del cDNA se adicionó a la mezcla anterior 3 µl de hexanucleótidos al azar (500u/µl) (Roche); 1 µl de inhibidor de RNAsas RNAGuard™ (34,9 u/ml) (Amersham Biosciences); 2 µl de mezcla de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP 16 mM, dCTP 100 µM); 4 µl de α-[³³P]-dCTP (10 µCi/µl, Amersham Biosciences); 6 µl de tampón 5X, 3 µl de DTT 0,1M y 1 µl (200 U) de transcriptasa inversa RNasaH- Superscript™II (Invitrogene), en un volumen final de reacción de 30 µl.

La reacción se llevó a cabo durante 60 minutos a 42°C. Las sondas de cDNA se purificaron con una columna de exclusión molecular MicroSpin™ S-300 HR (Amersham Biosciences) y el porcentaje de incorporación de nucleótidos marcados se midió en un contador de centelleo (Wallac 1409). Las sondas se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos.

Hibridación de los filtros. En primer lugar se prehibridaron los filtros en un horno de hibridación para tubos (Amersham Pharmacia Biotech), a 42°C durante un mínimo de 2 horas, en 5 ml de solución de hibridación: Formamida 50%; SDS 1%; SSC 5X; Denhart 5X y 100 µg/ml de DNA de esperma de arenque desnaturalizado (Roche). Transcurrido el tiempo de prehibridación se añadió todo el marcaje de cDNAs a los tubos conteniendo la solución de hibridación y se incubaron en el horno giratorio a 42°C durante 36 horas.

Lavado de los filtros, exposición y lectura de los datos. Se realizó igual que con los filtros de Research Genetics (apartado 2.3.1).

3.- TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE RNA.

3.1.- Obtención de RNA de células de levadura.

Para la obtención de RNA total a partir de células de levadura se utilizó un procedimiento basado en el método descrito por Sherman *et al.* (1995).

Todo el material y tampones utilizados durante la extracción se han autoclavado dos veces a 121°C, 20 minutos. El agua utilizada para los tampones y la resuspensión del RNA debe tratarse con DEPC (0,01%; 1 hora a

Materiales y métodos

37°C y autoclavarse). Con el fin de evitar la acción de las RNAsas la extracción se lleva a cabo con guantes y manteniendo siempre los tubos en hielo.

Rotura de las células: Se rompen entre 15 y 20 unidades de DO de células de levadura con perlas de vidrio mediante agitación con vortex durante 2 minutos a intervalos de 30 segundos, enfriando las muestras entre cada ciclo de rotura. Se utilizan 500 µl de perlas de vidrio (425-600 µm de diámetro, Sigma), 250 µl de tampón LETS (0,1M LiCl, 0,01M EDTA, 0,01M Tris-HCl pH 7,4, 0,2% SDS) y 250 µl de fenol para RNA (pH 4,5).

Fenolización: Tras la rotura de las células se separan las fases por centrifugación (5 minutos 12000 rpm) y se recoge a fase acuosa. La eliminación de proteínas del extracto celular se realiza mediante sucesivas fenolizaciones con fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) hasta que no se obtiene interfase. En último lugar se realiza una extracción con cloroformo-isoamílico (24:1).

Precipitación: El RNA se precipita mediante la adición de KAc 20% (1/20) y dos volúmenes de etanol absoluto a la fase acuosa. Se deja precipitar durante 1 hora a -20°C.

Cuantificación: Tras precipitar el RNA se recoge mediante centrifugación (10 minutos, 12000 rpm), se lava con EtOH 70% y se resuspende en 50 µl de agua estéril tratada para RNA. La cantidad de RNA se mide en un espectrofotómetro a 260 nm. La relación entre la absorbancia a 260/280 nm indica la pureza del RNA y debe dar un valor próximo a 2.

3.2.- Northern blot.

La técnica del *northern blot* se realizó basándose en el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Básicamente consiste en:

Electroforesis de RNA. La electroforesis de RNA se realiza en geles de agarosa desnaturantes. El gel se preparó con agarosa al 1,2% en formaldehído 2,2M y tampón MOPS 1X (MOPS 5X: MOPS 0,1M pH 7,5, acetato sódico 40 mM, EDTA 5 mM pH 8). En general, las muestras se prepararon con 5 µg de RNA (1 µg/µl) en un volumen final de 20 µl en tampón de muestra (10 µl de formamida, 3 µl de formaldehído, 2 µl de MOPS 5x). El RNA se desnaturaliza a 65°C durante 10 minutos. La electroforesis se desarrolló a 80 V durante [1,5-2]

Materiales y métodos

horas. Tras la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio (1µg/ml) en agua y de destiño en agua destilada durante 1 hora aproximadamente.

Transferencia del RNA a membrana. La transferencia se realizó por capilaridad a membranas de nylon (Hybon-N, Amersham). El tampón utilizado para transferencia fue SSC 6X [20X SSC: 3M NaCl, 0,3M Citrato sódico pH 7]. El RNA se fijó a los filtros mediante luz ultravioleta.

Marcaje de sondas radioactivas. Los filtros se hibridaron con sondas marcadas radioactivamente con ³²P. El marcaje radioactivo se llevó a cabo por "random priming" utilizando [α ³²P]-dCTP y los kits de marcaje *Ready To Go* (Amersham) o *High Prime* (Roche) indistintamente. Las sondas marcadas se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular con las columnas MicroSpin™ S-300 HR (Amersham Biosciences).

Hibridación. En primer lugar se prehibidaron las membranas con solución de hibridación [Formamida 50%; SDS 1%; SSC 5X; Denhart 5X y 100 µg/ml de DNA de esperma de arenque (Roche) desnaturalizado] durante un mínimo de 2 horas a 42°C en un horno de hibridación giratorio (Amersham Pharmacia Biotech). Transcurrido el tiempo de prehibridación se añadió la sonda desnaturalizada a la solución de hibridación y se hibridaron las membranas durante 16-18 horas a 42°C.

Lavado de las membranas, exposición y cuantificación. Las membranas se lavaron dos veces con la solución 1 (2X SSC; 0,1% SDS) a 65°C durante 15 minutos en el tubo de hibridación. El tercer lavado se realiza con la solución 2 (0,2X SSC; 0,1% SDS) a temperatura ambiente y comprobando con el contador geiger la señal emitida por las membranas.

Las membranas se envolvieron en un plástico fino y se expusieron de dos formas alternativas:

Con películas, X-Omat S o BioMax (Kodak) en cassettes Kodak X-Omatic con pantallas intensificadoras Kodak X-Omatic regular o BioMax. Las autorradiografías se desarrollaron a -80°C durante un período comprendido entre 1-5 días en función de la intensidad de la señal radioactiva. Las películas fotográficas se revelaron automáticamente con la máquina Agfa Curix 60.

Materiales y métodos

Con pantallas Bas-IP MP 2040 (Fuji Foto Film Co., LTD) a temperatura ambiente. La imagen digital se obtuvo con un analizador de imagen FLA-5000 (FujiFilm) utilizando el programa Image Gauge Version 3.12 (FujiFilm).

La cuantificación de la señal se realizó en ambos casos a partir de la imagen digitalizada con el programa Image Gauge 3.12.

4.- DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS.

4.1.- Determinación de Acetoacetyl-CoA tiolasa.

Extracto celular: Se recogieron 10 unidades de DO_{600} por centrifugación y se lavaron las células con agua. Las células se resuspendieron en 300 μ l de tampón de homogenización (Tris-HCl 50 mM pH 8, PMF 1 mM) y se rompieron con 1 g de perlas de vidrio (425-600 μ m de diámetro, Sigma) agitando con vortex durante tres minutos a intervalos de 1 minuto enfriando en hielo entre cada ciclo de rotura. Se recoge el sobrenadante por centrifugación (12000 rpm 10 minutos) y se utiliza para el análisis enzimático. La cantidad total de proteína se midió por el método Bradford utilizando el reactivo BioRad (BioRad Protein Assay).

Ensayo enzimático. Se realizó como describe Hiser *et al.* (1994). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en la mezcla de reacción: CoA 150 μ M, acetoacetyl-CoA 150 μ M, Tris HCl 50 mM pH 8. La reacción se inició con la adición de extracto celular y la actividad acetoacetyl-CoA tiolasa se midió espectrofotométricamente (Shimadzu UV1603) siguiendo la disminución en la absorbancia a 303 nm debida al acetoacetyl-CoA. Una unidad de actividad enzimática se define como 1 μ mol de acetoacetyl-CoA consumido por minuto, siendo el coeficiente de extinción molar del acetoacetyl-CoA 3600.

5.- DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

5.1.- Mediante cromatografía de alta resolución (HPLC).

Las determinaciones de ergosterol y escualeno se realizaron mediante cromatografía de fase inversa utilizando HPLC.

Materiales y métodos

Obtención de células de levadura. Células de *S. cerevisiae* sobre-expresantes del gen *ERG1* y/o *ERG10*, así como células control se crecieron en medio mínimo hasta fase logarítmica ($DO_{600} \sim 0.5$) o fase estacionaria ($DO_{600} \sim 2$). Se recogieron 80 unidades de densidad óptica y se lavaron las células con agua Mili-Q tres veces.

Extracción de esteroides. Se realizó basándose en el protocolo descrito por Quail y Kelly (1996). Se añadió a las células 2 ml de pirogallol 0,5% en metanol, 3 ml de metanol, 2 ml de KOH y 200 μ g de β -sitosterol (patrón interno) y se incubó a 90°C durante 2 horas. Los esteroides se extrajeron con 5 ml de n-heptano tres veces. La calidad de la extracción se valoró realizando un espectro de absorbancia entre 220 y 300 nm de una dilución 1/10 del extracto en n-heptano, ya que el ergosterol posee tres picos de absorbancia a 271 nm, 281 nm y 293 nm. El n-heptano se evaporó con un rotavapor calentando a 60°C. El residuo se disolvió en 100 μ l de isopropanol.

Cromatografía de fase inversa. La cantidad de ergosterol y escualeno se analizó mediante cromatografía de fase inversa, utilizando una columna C18 de 5 μ m de diámetro (JT Baker) y un HPLC (HP series 1100, Hewlett Packard). Se inyectaron 20 μ l de muestra, la elución se realizó utilizando como fase móvil metanol a un flujo de 1 ml/minuto. El ergosterol, escualeno y β -sitosterol se detectaron midiendo la absorbancia a 210 nm. La cuantificación se realizó en función del área de los picos obtenidos, normalizando los resultados respecto al patrón interno β -sitosterol.

5.2.- Mediante cromatografía de gases.

Las determinaciones de ácidos grasos se realizaron mediante cromatografía líquida de gases según el método propuesto por Garcés y Mancha (1993). Brevemente,

Obtención del material biológico: Células de *S. cerevisiae* que expresan los genes *FAD2-1* y *FAD2-3* de girasol y células control se crecieron en medio mínimo hasta fase estacionaria ($DO_{600} \sim 2$). Se recogieron 15 unidades de densidad óptica y se lavaron las células dos veces con agua Mili-Q.

Materiales y métodos

Extracción de lípidos y esterificación de ácidos grasos: Se añadió a las células de levadura 3,3 ml de metanol-tolueno-dimetoxipropano- H_2SO_4 (39:20:5:2, vol/vol/vol/vol) y 1,7 ml de heptano; la mezcla se incubó a $80^\circ C$ durante 1 hora. Tras enfriar la mezcla se separó la fase superior, que contiene los ésteres de metilo de los ácidos grasos, se lavó con 5 ml de Na_2SO_4 6,7% y se evaporó con nitrógeno hasta secar.

Cromatografía de gases: Los ésteres de metilo se disolvieron en heptano y se analizaron por cromatografía líquida de gases con un HP-5890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), equipado con una columna capilar (30 m de longitud; 0,32 mm diámetro; 0,20 mm grosor de la película) de sílice fundido (Supelco, Bellefonte, PA) y un detector FID. Se utilizó hidrógeno con una tasa lineal de 28 cm/s y una tasa de reparto de 1/50. La temperatura del inyector y el detector fue $220^\circ C$ y la del horno $170^\circ C$.

6.- TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

6.1.- Geles bidimensionales de proteínas.

Los geles bidimensionales se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Blomberg (2002).

Extractos de proteínas. Los extractos de proteínas se obtuvieron de forma diferente para geles analíticos y geles preparativos.

La obtención de proteínas para la realización de geles analíticos se realizó rompiendo las células con perlas de vidrio. Se recogen 5 unidades de DO y se añaden 0,2 g de perlas de vidrio y 160 μl de agua Mili-Q fría. Las células se rompen mediante agitación con el vortex durante 2 minutos a intervalos de 30 segundos. A continuación se añaden 20 μl de tampón 1 [SDS 0,3 g, β -mercaptoetanol 5 ml, Tris-HCl 0,44 g, Tris-base 0,26 g; en un Vf=10 ml) y se incubó a $100^\circ C$ durante 5 minutos. Enfriar en hielo y añadir 20 μl del tampón 2 [Tris-base 1,5M 80 μl ; Tris-HCl 1,5M 1,58 ml, $MgCl_2$ 1M 250 μl , DNasa 5 mg; RNasa A 1,25 mg; en un Vf=5 ml), incubar en hielo 10 minutos. Centrifugar y recoger el sobrenadante. La cantidad de proteína se determinó por precipitación con TCA (Sigma).



Materiales y métodos

La obtención de proteínas para geles preparativos se realizó por sonicación: se añadió 240 μ l de tampón de rehidratación [Urea 4,2 g, tiourea 1,52 g, NonidetP-40 100 μ l, Pharmalite 3-10 100 μ l, DTT 20 mg en un Vf=10 ml] a las células y se sonicó durante 6 segundos. El extracto se mantuvo en agitación o/n a temperatura ambiente.

Isoelectroenfoque. La primera dimensión de los geles se realizó en tiras "immobiline (IPG) DryStrips" de 18 cm con un gradiente de pH no lineal de 3-10 (Amersham Biosciences). En los geles analíticos se cargó 100 μ g de proteína y en los preparativos 1,2 mg. Las tiras se rehidrataron o/n en 0,5 ml de tampón de rehidratación (coloreado con azul de bromofenol) junto con la cantidad adecuada de proteínas. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un aparato Ettan IPCphor (Amersham Biosciences) con el siguiente programa: (1) Gradiente lineal de 0 a 500V en 5 horas; (2) 5 horas a 500V; (3) Gradiente lineal de 500 a 3500V en 9,5 horas; 2-4 horas a 3500V. El amperaje y la potencia se mantienen constantes a 1mA y 5W respectivamente. En este punto es posible continuar con la segunda dimensión o congelar las tiras de la primera dimensión (-20°C).

Separación en función del peso molecular de las proteínas. La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de acrilamida 12,5% T; 2,1% C (Duracryl 0,65% Bis; ELCR 2DC 070). Los geles se formaron en un "gel caster" (Amersham Biosciences) para 13 geles.

Las tiras de la primera dimensión se equilibraron en tampón durante 30 minutos. Tampón de equilibrado: Tris HCl 50 mM pH 8,8, SDS 2%, Urea 6M, glicerol 30%, DTT 1M; coloreado con azul de bromofenol. La electroforesis se desarrolló durante 20 horas a una potencia constante de 13 W (aproximadamente 1000 mW/gel, con la fuente y la cubeta de electroforesis EttanDALT twelve (Amersham Biosciences) para doce geles.

6.2.- Tinción de los geles bidimensionales

La tinción de los geles varía en función de la finalidad de éstos, así, para geles analíticos (aproximadamente 100 μ g de proteína total) se realiza una tinción con el colorante fluorescente Sypro[®]Rubi cuando se va a cuantificar la cantidad de proteína; la tinción con plata no es adecuada para cuantificar, sin embargo

Materiales y métodos

se obtienen mejores imágenes de los geles. La tinción de geles preparativos se realiza con azul Coomassie, colorante que permite el análisis posterior de las proteínas por espectrometría de masas.

Tinción con Sypro[®] Rubi. La tinción se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (*Molecular Probes*). Fijación, incubando los geles durante 30 minutos en metanol 10%-acético 7%. A continuación se incubaron los geles o/n en 250 ml de Sypro[®] Rubi. Los geles se lavaron con metanol 10%-acético 7% durante un período de 20 minutos a 2 horas y finalmente se lavaron con agua destilada durante 1 hora. Las imágenes se obtuvieron escaneando los geles en un *Molecular Imager FX* (BioRad).

Tinción con plata. Se llevó a cabo basándose en el protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (1996). Los geles se fijaron en etanol 50%-acético 10% durante al menos 2 horas y se lavaron tres veces durante 20 minutos con agua Mili-Q. A continuación se trataron con una solución de DTT al $5,2 \cdot 10^{-4}$ % durante 30 minutos y con nitrato de plata 0,2% durante 30 minutos. Para el revelado de los geles, se enjuagaron con agua durante 30 segundos, se añadió 200 ml de solución de carbonato sódico 3,5% con formaldehído 0,05% (agitar 10-20 segundos y tirar la solución), se incubaron los geles en 500 ml de la solución anterior hasta que se visualizaron las proteínas (5-6 minutos), la reacción se paró con acético 3%. Las imágenes se recogieron utilizando un escáner de luz blanca.

Tinción con azul Coomassie. La tinción se basa en el protocolo descrito por Rosenfeld *et al.* (1992). Los geles se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue G250 0,2% en metanol 20% y acético 0,5% durante 30 minutos. Los geles se destiñeron con metanol 30% hasta alcanzar el contraste deseado.

6.3.- Análisis de los geles bidimensionales.

El análisis de las imágenes de los geles teñidos con Sypro[®] Rubi se realizó utilizando el programa PDQuest (V6.1.0 BioRad). El programa detecta automáticamente puntos en el gel y permite el procesamiento de las imágenes (sustracción del fondo, eliminación de puntos artefactuales); la comparación de los puntos entre geles pertenecientes a diferentes condiciones se realiza manualmente. La cuantificación de los puntos se normalizó en función del total

Materiales y métodos

de puntos válidos en cada gel y se obtuvo el valor de la media y la desviación estándar de tres réplicas independientes de cada muestra. Se realizó un análisis estadístico de t-student ($p < 0,05$) para la detección de cambios significativos entre diferentes condiciones.

6.4.- Identificación de proteínas por espectrometría de masas.

La identificación de proteínas de la levadura no convencional *Torulaspora delbrueckii* se realizó mediante espectrometría de masas a partir de puntos cortados de los geles bidimensionales preparativos teñidos con azul Coomassie.

Tripsinización. La tripsinización de las proteínas presentes en una pieza del gel de aproximadamente 5 mm² se realizó sin que estas fueran eluidas del gel (*in-gel digestion*). Para las digestiones se utilizó tripsina de pancreas bovino (Roche) a 20 ng/μl en bicarbonato amónico pH 8,3 y se llevaron a cabo en el tripsinizador automático ProGest (Genomic Solutions) siguiendo las instrucciones del proveedor. Antes de la tripsinización se realizó una reducción con DTT (10 mM, 15 minutos, 65°C) y/o una alquilación con yodoacetamida (100mM, 30 minutos, a temperatura ambiente).

Las mezclas de péptidos trópticos se secaron al vacío en un SpeedVac y se resuspendieron en 5 μl de acetonitrilo 50%-TFA 0,1%.

MALDI-TOF. Se depositaron 0,85 μl de la mezcla de péptidos en un soporte para muestras y sobre cada una de ellas se depositó un volumen igual de solución saturada de la matriz, α-ciano-4-hidroxi-cinámico (Sigma) en acetonitrilo 50%-TFA 0,1%.

La muestra se analizó con un espectrómetro de masas Voyager-DE Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems). Se utilizó como patrón de calibración [450-3300 Da.] una mezcla de péptidos obtenidos de la tripsinización de la lectina de semillas de *Cratylia floribunda* (SwissProt P81517).

El espectro de péptidos trópticos obtenido se comparó con el disponible para proteínas conocidas de otras levaduras, principalmente *S. cerevisiae*, en las bases de datos (SwissProt o NCBIInr, Febrero 2003) utilizando la herramienta de búsqueda MS-Fit del programa ProteinProspector (v. 3.4.1, University of California, SF) disponible en <http://prospector.uscf.edu/>. Las búsquedas se realizaron con una tolerancia de 150 ppm en la masa de los péptidos.

Materiales y métodos

Electrospray. Algunas de las muestras fue necesario analizarlas mediante espectrometría de masas en serie (MS/MS). Para la secuenciación de la los fragmentos trípticos, la muestra se cargó en un capilar de *nanospray* y se sometió a una espectrometría de masas con ionización por *electrospray* utilizando un espectrómetro QTrap (Applied Biosystems) equipado con una fuente de *nanospray* (Protana, Denmark). Los iones doblemente cargados se seleccionaron tras el análisis MS/MS (*Enhanced Resolution MS analysis*) y se fragmentaron con la opción *Enhanced Product Ion* con Q_0 (250 amu/s).

Los espectros obtenidos se interpretaron manualmente o utilizando el programa MASCOT *online* en <http://www.matrixscience.com>.

CAPÍTULO I

**Identificación de genes que modifican su
expresión por frío o congelación en
Saccharomyces cerevisiae.**

RESULTADOS

1.- Análisis diferencial de la expresión génica de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de frío y congelación.

Las células de levadura de panadería se ven sometidas a varios tipos de estrés durante su producción y aplicación industrial (Randez *et al.*, 1999). En concreto, durante la producción de masas congeladas las células son sometidas al estrés que genera la congelación, el almacenamiento a -20°C y la descongelación. Como se ha comentado en la introducción, los daños generados en las levaduras de panadería durante la producción de masas congeladas poseen un gran impacto tecnológico y económico.

Hasta la fecha, los estudios a nivel molecular de la respuesta a estrés por frío y congelación en células de levadura de panadería han recibido poca atención.

En este trabajo hemos aplicado la técnica del *differential display* al estudio de la expresión diferencial de genes de una cepa de levadura de panadería, 13bxV4 (Randez y Sanz 1994), en condiciones de estrés por frío y por congelación con el objetivo de dilucidar posibles mecanismos de acción de la célula para protegerse de estos estreses y encontrar genes cuya manipulación mejore las características de resistencia al estrés de las cepas de levadura de panadería.

1.1.- Patrón de expresión diferencial en levaduras de panadería sometidas a distintas condiciones de estrés.

La técnica de *differential display* (Liang y Pardee 1992) proporciona patrones de expresión génica bajo diferentes condiciones fisiológicas y permite identificar pautas abiertas de lectura específicas de cada condición. El método se basa en la transcripción inversa de mRNAs, con cebadores cuya secuencia es un oligo dT con dos nucleótidos en el extremo 3', que hibridan con el principio de la cola poliA, seguida de una reacción de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), en presencia de un segundo cebador de secuencia arbitraria. El resultado es un conjunto de cDNAs amplificados que corresponden a la región 3' de los mRNAs, los cDNAs son separados en un gel de poliacrilamida de alta

Capítulo I

resolución. El objetivo de este protocolo es obtener secuencias de 100 a 300 pares de bases, lo cual es suficientemente largo para identificar el mRNA al que corresponde y suficientemente corto para poder ser separadas de otras en función de su tamaño.

En este trabajo analizamos muestras de RNA de células de la cepa de panadería 13bxV4 sometidas a diferentes tipos de estrés. En primer lugar, estrés por frío mediante incubación de las células a 10°C. El estrés por congelación se realizó congelando las células a -20°C y descongelándolas a 0°C ó 30°C para estudiar el patrón de expresión tras estrés por congelación y descongelación rápida (a 30°C) o lenta (0°C). En *S. cerevisiae*, se han descrito algunos casos de protección cruzada entre diferentes tipos de estrés, así por ejemplo, un pretratamiento con estrés osmótico suave confiere resistencia a choque térmico (Mager y Kruijff 1995), mientras que, un pretratamiento con H₂O₂, cicloheximida, choque térmico suave y NaCl mejoran la tolerancia a congelación (Park *et al.*, 1997). Con el fin de determinar la especificidad de las respuestas a estrés por frío o congelación, así como para comprobar si la exposición previa a estrés por altas temperaturas modificaba esta respuesta, se analizaron muestras de células sometidas a un estrés térmico (42°C) durante 30 minutos y de células congeladas tras el choque térmico. Una descripción detallada de los tratamientos de estrés empleados se encuentra en el apartado de materiales y métodos.

En la [figura 1](#) se muestran los resultados de dos conjuntos de cDNAs obtenidos con distintas combinaciones de oligonucleótidos (A y B). En general, fue posible resolver entre 40 y 140 bandas de cDNAs por línea. Como cabe esperar, el tratamiento con choque térmico (línea 2) provoca la aparición de una serie de fragmentos no observados en el control (crecimiento exponencial a 30°C; línea1). El patrón de expresión obtenido para estrés por frío o congelación (líneas 5 a 7) difiere claramente del observado para las células control o sometidas a choque térmico. En respuesta a estrés por frío o congelación la intensidad de la mayoría de los fragmentos disminuye. Este efecto es más acusado en las muestras sometidas a congelación (líneas 5 y 6) que a 10°C (línea 7) y es, probablemente, debido a una disminución en la tasa de transcripción.

Entre los 20 conjuntos de cDNAs sintetizados con diferentes combinaciones de oligonucleótidos se encontraron entre 40 y 60 bandas de cDNA inducidas por estrés por frío o congelación (líneas 5 a 7). La mayoría de estos fragmentos varía de forma similar en respuesta a estrés por frío y choque térmico, lo que sugiere que, en parte, la respuesta a estrés por frío podría estar mediada por mecanismos de respuesta general al estrés (Estruch 2000). Las células sometidas a ambos tipos de estrés, congelación y choque térmico (líneas 3 y 4), no presentan más abundancia de fragmentos de cDNA que aquellas que han sido sometidas solo uno de ambos estreses.

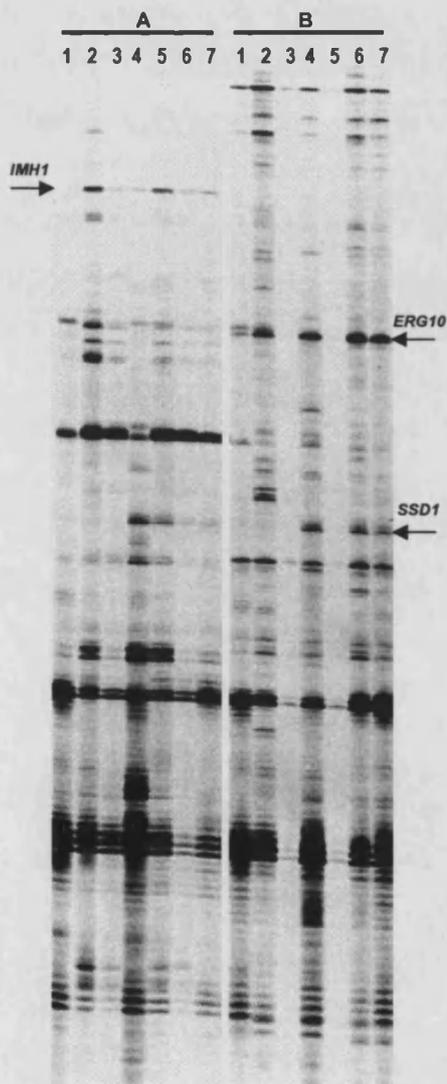


Figura 1: Análisis diferencial de la expresión génica de muestras sometidas a estrés por frío. En la figura se muestra una sección del gel de poliacrilamida utilizado para separar dos conjuntos de cDNAs (A y B) en los que se ha utilizado diferentes cebadores para la transcripción inversa y PCR de muestras de RNA de células crecidas en diferentes condiciones. Línea 1, células control de la cepa de levadura de panadería 13bxV4 crecidas en YPD hasta fase exponencial (DO_{600} [3-8]); línea 2, choque térmico (42°C , 30 minutos); líneas 3 y 4, choque térmico y congelación a -20°C (18 h), descongelación a 0°C durante 2 horas (línea 3) o a 30°C (línea 4); líneas 5 y 6, células control congeladas a -20°C (18 h) y descongeladas a 0°C durante 2h (línea 5) o a 30°C (línea 6); línea 7, 10°C (18 h).

Capítulo I

1.2.- Identificación de genes inducidos por frío.

De las bandas de cDNA que presentaban inducción, tanto en frío como en congelación, se seleccionaron 18 fragmentos para su identificación. La secuenciación de estos fragmentos de cDNA clonados, reveló que algunos correspondían a fragmentos de diferente tamaño del mismo gen, pudiendo ser identificados nueve genes: *TPI1*, *MMS2*, *PAK1*, *ERG10*, *SEC11*, *SSD1*, *IMH1*, *CAF120* e *YFL030w*.

Atendiendo a la función molecular descrita en las bases de datos, estos genes podrían agruparse en tres categorías principales: reparación de DNA, transporte de proteínas e integrantes de diferentes rutas metabólicas. Pertenecen al primer grupo, *MMS2* y *PAK1*. *MMS2* codifica una proteína tipo ubiquitina miembro de la ruta de reparación post-replicación (Broomfield et al., 1998). *PAK1* codifica una proteína-quinasa, supresora en multicopia de mutaciones en la α -DNA polimerasa (Hovland et al., 1997). Recientemente, se ha encontrado que Pak1p también participa en la represión por glucosa, siendo capaz de asociarse con la proteína quinasa Snf1p y participar en su activación (Nath et al., 2003). Los genes *IMH1* (Tsukada et al., 1999) y *SEC11* (YaDeau et al., 1991; Bohni 1988) codifican proteínas implicadas en transporte celular en levadura. Por último, dentro del tercer grupo encontramos, los genes *TPI1*, que codifica la triosa fosfato isomerasa (Alber y Kawasaki 1982); *ERG10*, gen del enzima acetoacetyl-CoA tiolasa (Hiser et al., 1994) e *YFL030w*, cuya secuencia es similar a varias transaminasas; todos ellos poseen funciones esenciales en el metabolismo celular de hidratos de carbono, biosíntesis de esteroides y de aminoácidos, respectivamente.

El gen *SSD1* codifica una proteína con capacidad de unión a RNA, es miembro de la familia de la RNasa II y está implicado en la tolerancia a altas concentraciones de Ca^{2+} (Tsuchiya et al., 1996). Finalmente, *CAF120*, (CCR4 Associated Factor 120kDa) posee una función molecular desconocida y parece estar implicado en la regulación de la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II (Hampsey y Reinberg 1999).

1.3.- Confirmación de la inducción por frío mediante *northern blot*.

Con el fin de confirmar los resultados de inducción por frío obtenidos, se realizaron análisis de *northern blot* utilizando como sondas los fragmentos de cDNA clonados de estos genes identificados.

Como se muestra en la figura 2 los genes *TPI1*, *ERG10* e *IMH1* aumentan su nivel de expresión tras ser sometidas células de la cepa de levadura de panadería, 13bxV4, a estrés por frío y congelación-descongelación en las mismas condiciones utilizadas para el *differential display*.

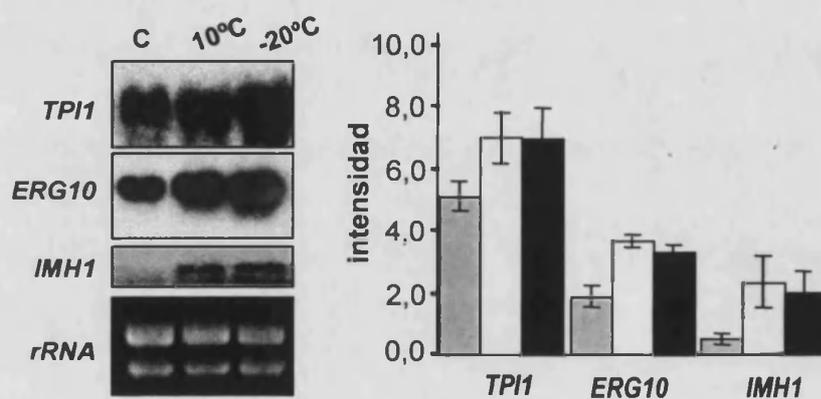


Figura 2: Análisis mediante *northern blot* de genes inducidos por frío identificados en el *differential display*. Células de la cepa de levadura de panadería 13bxV4 se crecieron y fueron sometidas a estrés por frío (10°C) y congelación-descongelación (-20°C y 0°C) igual que se describe en la figura 1. Las sondas de los genes *TPI1*, *ERG10* e *IMH1* se generaron con los fragmentos de cDNA clonados a partir del *differential display*. Se analizaron 10 µg de RNA total de células control (línea C y barras de puntos), células sometidas a estrés por frío (línea 10°C y barras blancas) y a estrés por congelación (línea -20°C y barras negras). El gráfico de barras representa la cuantificación de los niveles de mRNA normalizados respecto al RNA ribosomal.

Sin embargo, no se detectó ningún cambio en la expresión de los genes *MMS2*, *SEC11* e *YFL030w*, ni al exponer a las células a frío, ni tras la congelación-descongelación. Para los genes *PAK1*, *SSD1* e *YNL278w* no fue posible detectar señal en ninguna de las condiciones ensayadas, lo cual indica una expresión demasiado baja de éstos genes para ser detectada mediante *northern blot*. Estos resultados confirman que el *differential display* es una técnica que permite la detección de mRNA presentes en un bajo número de copias en la célula y

Capítulo I

capaz de identificar la expresión diferencial de mRNAs independientemente de la prevalencia de éstos en la muestra (Wang *et al.*, 1996).

1.4.- La inducción de *TPI1* y *ERG10* se correlaciona con la crioresistencia de cepas de levadura de panadería.

Los cambios encontrados en el perfil de expresión de células de levadura cuando se someten a estrés por frío y/o congelación-descongelación muestran que el reajuste de rutas metabólicas puede ser esencial en la respuesta celular a estrés por bajas temperaturas. Por lo tanto, hemos profundizado en el estudio de los genes *TPI1* y *ERG10* analizando sus niveles de expresión en dos cepas comerciales de levadura de panadería, Cinta Roja (CR), utilizada para la producción de masas frescas y Plus Vital (PV), utilizada para la producción de masas congeladas, especialmente masas dulces. La viabilidad de estas cepas tras ser sometidas a congelación difiere considerablemente, siendo superior para PV que para CR, en las dos fases de crecimiento analizadas (tabla 1).

Tabla1: Susceptibilidad de células de levadura de panadería a la congelación.

Cepa	Fase de crecimiento	Supervivencia (%)	
		7 días	14 días
CR	exponencial	1.0 ± 0.5	0.03 ± 0.02
	Post-díauxica	30 ± 10	15 ± 7
PV	exponencial	14 ± 9	0.5 ± 0.4
	Post-díauxica	88 ± 20	84 ± 23

Células de dos cepas de levaduras de panadería, Cinta Roja (CR) y Plus Vital (PV), se crecieron en YPD, se recogieron en fase logarítmica ($DO_{600} = 3,0$) o fase post-díauxica ($DO_{600} = 16,0$) y se congelaron a -20°C . Tras 7 y 14 días de almacenamiento en congelación, se descongelaron a 0°C y las diluciones adecuadas se plaquearon en YPD para cuantificar el número de células viables.

En la figura 3 se muestran los niveles de expresión de los genes *TPI1* y *ERG10* en células de ambas cepas industriales de levadura, para muestras control (30°C) y tras someter las células a estrés por frío (10°C) o por congelación (-20°C). Los niveles de expresión alcanzados para *TPI1* y *ERG10* por la cepa PV, en condiciones de frío y congelación, son significativamente superiores a los de la cepa CR. Sin embargo, para las células en condiciones control no existen diferencias en la expresión de estos genes entre ambas cepas.

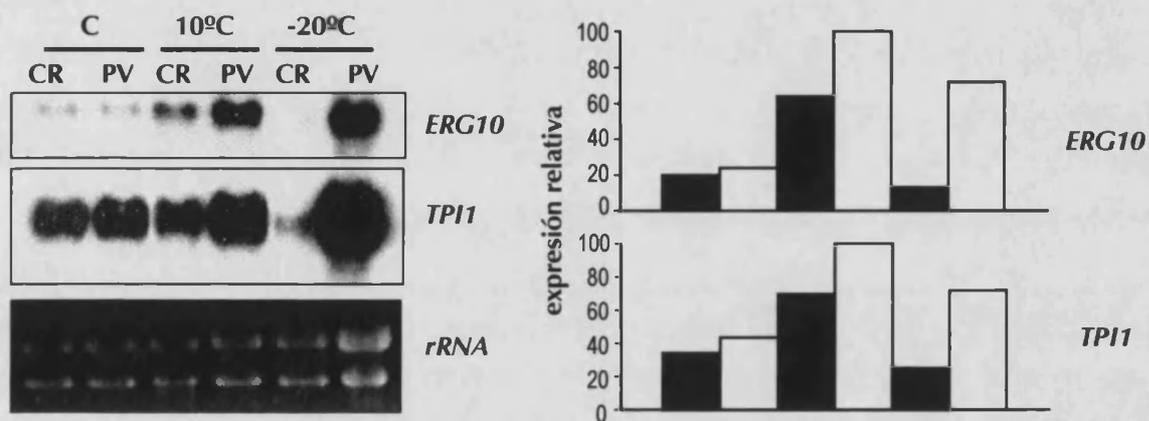


Figura 3: Northern blot de los genes *TPI1* y *ERG10* en cepas de levadura de panadería con diferente tolerancia a la congelación. Se analizaron 10µg de RNA total extraído de células de levadura de panadería de la cepa CR (barras negras) y PV (barras blancas). Control (C), las células se recogieron en fase logarítmica tras crecer en YPD, parte de las células se estresaron por frío (10°C) y por congelación-descongelación (20°C y 0°C). El gráfico de barras representa la cuantificación de los niveles de mRNA normalizados con la cantidad de RNA ribosómico.

Inicialmente, hemos trabajado con cepas de levadura de panadería, analizando la expresión diferencial de genes en distintas condiciones de estrés. A la vista de los problemas encontrados, falsos positivos o la identificación de genes con niveles muy bajos de mRNAs en la célula, se decidió recurrir a técnicas de análisis global de la expresión, para estudiar la respuesta de *S. cerevisiae* a frío y congelación.

Capítulo I

2.- Análisis global de la expresión génica de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de frío y congelación.

2.1.- Hibridación de filtros de DNA de levadura.

La secuenciación completa del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau et al., 1997) abrió las puertas al análisis funcional a gran escala de los genes de levadura. Así, es posible analizar miles de secuencias de DNA simultáneamente mediante experimentos de hibridación e identificar genes, cuya expresión depende de determinadas condiciones genéticas y/o fisiológicas. El análisis global de la expresión génica en microorganismos industriales resulta también de particular interés ya que proporciona información que puede ser aplicada en ingeniería metabólica, mejora de los microorganismos como factorías celulares y caracterización de su respuesta al estrés (Kuipers 1999).

En este apartado, nos planteamos realizar un análisis global de la expresión génica de *S. cerevisiae* cuando es sometida a condiciones de frío o tras congelación, con el fin de identificar genes que modifican su expresión en estas condiciones de estrés.

Los filtros de DNA comerciales contienen inmovilizadas 6144 ORFs de *S. cerevisiae* provenientes de la secuenciación de una cepa de levadura de laboratorio. Dado que las cepas industriales son poliploides, más concretamente aneuploides, es difícil interpretar los resultados obtenidos, ya que los genes pueden variar en su secuencia y en su regulación respecto a las cepas de laboratorio. Por todo ello, decidimos trabajar con cDNAs obtenidos a partir de muestras de RNA procedentes de células de una cepa de levadura de laboratorio en condiciones control, de células mantenidas a 4°C durante 90 minutos o de células congeladas -20°C y descongeladas a 30°C. Estas condiciones de estrés fueron escogidas ya que representan la temperatura de almacenamiento de las levaduras en forma prensada y las condiciones de descongelación empleadas en la elaboración de masas congeladas.

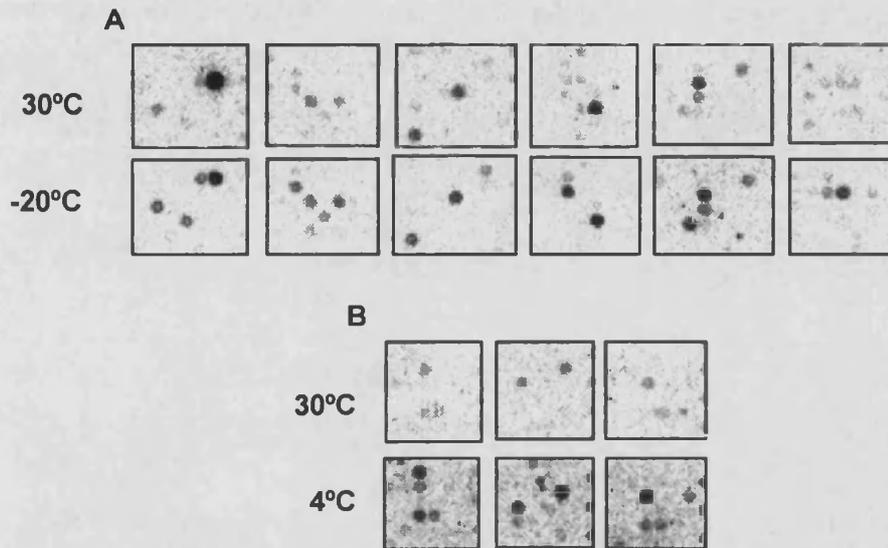


Figura 4: Hibridación de filtros de DNA. Se muestran fragmentos de los filtros hibridados con cDNAs obtenidos de células crecidas a 30°C o tras ser sometidas a estrés por congelación, -20°C, (A) o por frío, 4°C, (B). La obtención del RNA e hibridación de los filtros se realizó como se detalla en el apartado de materiales y métodos.

2.2.- Clasificación funcional de los genes que modifican su expresión por frío o por congelación.

El análisis de las imágenes obtenidas con la hibridación de los filtros de DNA, da como resultado una amplia lista de genes inducidos y reprimidos en las condiciones de frío o congelación. Para interpretar los resultados de este experimento de análisis global de la expresión génica, se requiere una clasificación funcional de los genes cuya expresión se ve modificada y que por lo tanto, deben poseer una función relevante en el proceso de adaptación y respuesta a estas condiciones de estrés.

En general, se han encontrado 85 genes con una inducción superior a 2 tras el tratamiento a 4°C y 206 tras la congelación a -20°C y descongelación a 30°C. El número de genes que disminuye su expresión es menor, habiéndose encontrado 84 genes reprimidos a 4°C y 43 tras la congelación-descongelación. En la [figura 5](#) se muestra la distribución de los genes inducidos y reprimidos significativamente más de dos veces; como vemos, el número de genes reprimidos e inducidos a 4°C es muy similar (panel A), a diferencia de los

Capítulo I

resultados obtenidos tras congelación-descongelación en los que el número de genes inducidos es mayor que el de reprimidos (panel B). Esto refleja, probablemente, la inducción de genes del metabolismo durante la descongelación a 30°C y de genes implicados en la reparación de daños producidos en la célula durante la congelación.

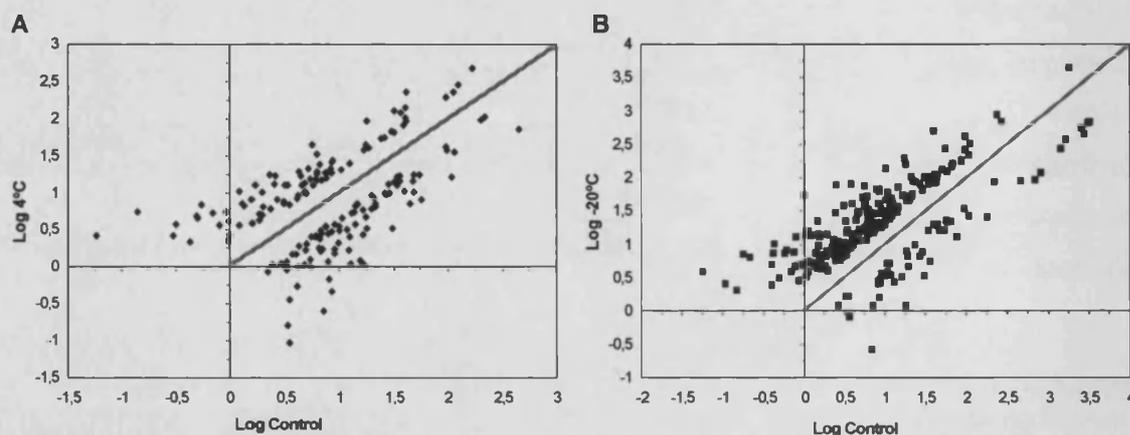


Figura 5: Comparación del perfil global de expresión génica en levadura creciendo a 30°C con el mostrado por células sometidas a estrés por frío (A) o congelación (B). Se representa la relación entre la intensidad de la señal, en valor logarítmico, obtenida tras la hibridación de los filtros con muestras de células sometidas a 4°C (A) o tras congelación-descongelación (B) y la intensidad obtenida con la muestra control. La representación incluye solo los puntos cuya inducción o represión es significativa (igual o superior a 2 veces). Los puntos por encima de la diagonal representan los genes inducidos y por debajo los genes reprimidos.

Hemos clasificado estos genes según las categorías funcionales descritas en la base de datos del MIPS [Munich Information Center for Protein Sequences; <http://mips.gsf.de>] (Mewes et al., 2002). Como se muestra en la [figura 6](#) un gran número de funciones celulares distintas están implicadas en la respuesta a estrés por frío y congelación. En el caso de las células tratadas a 4°C, la mayoría de genes afectados en su expresión están implicados en biosíntesis de proteínas y metabolismo celular. Tras la congelación-descongelación, además de genes con función metabólica, incrementan su expresión un número considerable de genes implicados en el procesamiento de proteínas.

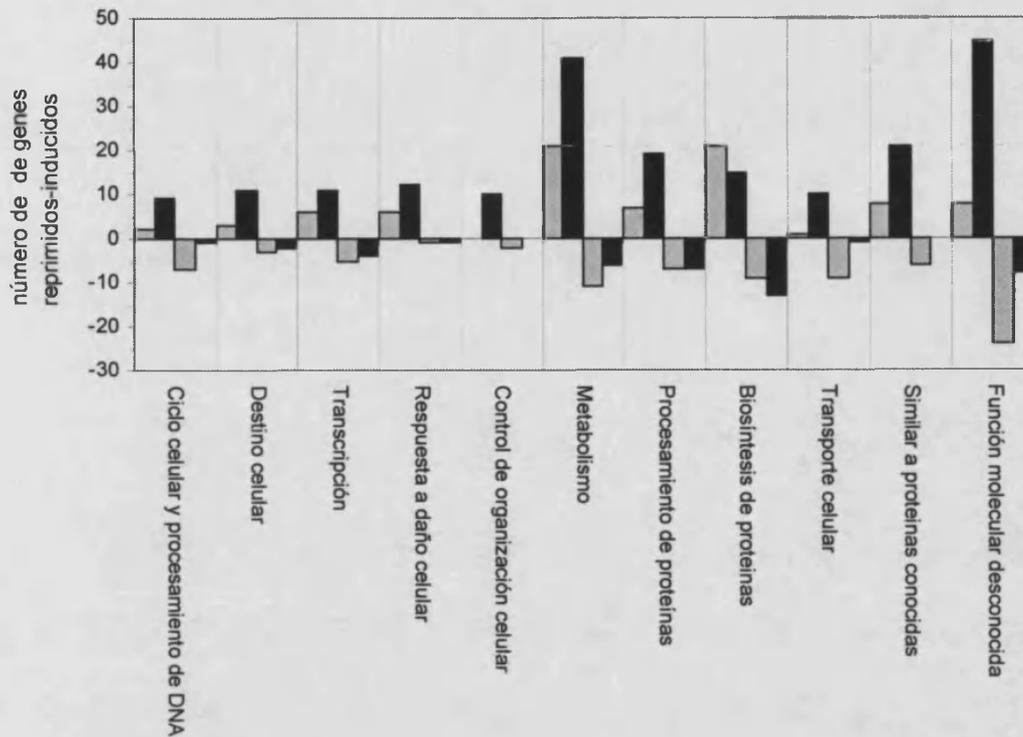


Figura 6: Distribución de genes implicados en la respuesta a estrés por frío o congelación en categorías funcionales. Representación del número de genes, clasificados en categorías funcionales, que se encuentran inducidos (valores positivos) y reprimidos (valores negativos) de forma significativa en las condiciones de frío, 4°C (barras grises) o congelación-descongelación, -20°C/30°C (barras negras).

2.2.1.- Genes que modifican su expresión por frío.

Los genes cuya expresión se ve modificada tras someter a las células a un estrés por frío, se han clasificado en categorías funcionales, detallándose su función y el nivel de inducción (tabla 2) o de represión (tabla 3).

Tabla 2: Genes inducidos por frío en la cepa W303-1A de *S. cerevisiae*.

Ciclo celular y procesamiento de DNA	ORF	Gen	Ind.	Función
Síntesis de DNA y replicación	YBL035c	POL12	2,4	DNA polimerasa α . Subunidad B.
Control del ciclo celular	YIL123w	SIM1	2,0	Regulación del ciclo celular y envejecimiento.
Destino celular	ORF	Gen	Ind.	Función
Respuesta a feromonas	YHR066w	SSF1	39,6	Unión a rRNA. Función en conjugación.
	YNR044w	ACA1	2,1	Anclaje de α -aglutinina. PC ¹ .

Capítulo I

Gemación, polaridad celular	YDR309c	GIC2	3,1	Cdc42-GTPasa. Crecimiento polarizado de la célula.
Transcripción	ORF	Gen	Ind.	Función
Procesamiento mRNA	YGL122c	NAB2	3,2	Proteína nuclear de unión a colas Poli(A). Exportación de mRNAs.
Control transcripcional	YHR056c	RSC30	3,8	Regulación de la transcripción
	YOR344c	TYE7	4,1	Factor transcripcional tipo hélice-vuelta-hélice. Implicado en transcripción de genes glicolíticos como ENO2 y ADH2.
	YOR047c	STD1	2,5	(MSN3) Modulador de la represión por glucosa.
	YKL109w	HAP4	9,1	Activador transcripcional de CYC1. Regulador de funciones respiratorias.
	YOL068c	HST1	2,7	Proteína silenciadora con actividad histona desacetilasa.
Respuesta a daño celular	ORF	Gen	Ind.	Función
Respuesta a estrés	YHR064c	PDR13	2,3	Familia HSP70. Carabina molecular.
	YOL105c	WSC3	5,2	Integridad de la PC.
	YJL159w	HSP150	2,5	(PIR2). Glicoproteína de secreción. Constituyente de la PC.
	YKL164c	PIR1	2,0	Respuesta a choque térmico. Componente de la PC.
	YBR067c	TIP1	2,1	Esterasa. Protección membrana plasmática.
	YLR113w	HOG1	12,8	MAPK de la ruta de transcripción de respuesta a alta osmolaridad.
	YJL128c	PBS2	2,4	MAPKK de la ruta de transcripción de respuesta a alta osmolaridad.
Metabolismo	ORF	Gen	Ind.	Función
Metabolismo de carbohidratos	YEL071w	DLD3	5,6	D-Lactato deshidrogenasa.
	YGR254w	ENO1	2,2	Enolasa 1. Glucólisis y gluconeogénesis
	YHR174w	ENO2	2,9	Enolasa 2. Glucólisis y gluconeogénesis
	YER178w	PDA1	5,3	Piruvato deshidrogenasa.. Subunidad E1 α .
	YOL136c	PFK26	2,8	Síntesis de Fructosa 2,6-bisfosfato.
	YOR095c	RKI1	2,9	Ribosa-5-fosfato cetol-isomerasa. Ruta de las pentosas fosfato.
	YOL086	ADH1	2,0	Alcohol deshidrogenasa.
	YLR134w	PDC5	2,2	Piruvato descarboxilasa, isoenzima 2.
	YOR107w	RGS2	9,8	Proteína activadora de GTPasa. La sobre-expresión suprime la señal de cAMP inducida por glucosa.
	YMR011w	HXT2	4,1	Transportador de hexosa de alta afinidad.
Lípidos, ácidos grasos e isoprenoides	YGR175c	ERG1	3,1	Escualeno epoxidasa. Biosíntesis ergosterol.
	YGL055c	OLE1	6,6	Δ 9 desaturasa de ácidos grasos.
	YHR179w	OYE2	2,5	NADH deshidrogenasa, isoforma 2. Metabolismo de esteroides.
	YPL231w	FAS2	6,8	Sintetasa de ácidos grasos

Capítulo I

Utilización del fosfato	YHR215w	PHO12	2,4	Fosfatasa ácida.
Metabolismo de aminoácidos.	YGL009c	LEU1	2,2	Isopropilmalato DH ² . Biosíntesis de Leucina.
	YLR355c	ILV5	2,0	Biosíntesis de aa ³ ramificados.
	YGL077c	HNM1	3,6	Permeasa de colina y nitrógeno.
	YKR039w	GAP1	4,1	Permeasa general de aminoácidos.
Metabolismo de nucleótidos	YOR360c	PDE2	4,5	cAMP fosfodiesterasa de alta afinidad.
	YNL141w	AAH1	2,0	Adenina desaminasa.
Procesamiento de proteínas	ORF	Gen	Ind.	Función
Plegamiento y estabilización	YIL142w	CCT2	3,0	Carabina molecular, asiste el plegamiento de actina y tubulina.
	YJL008c	CCT8	2,5	Carabina molecular asiste el plegamiento de actina y tubulina.
	YOR145c	PNO1	3,0	Carabina, plegamiento de proteínas.
	YLL024c	SSA2	2,9	Familia de HSP70. Plegamiento proteínas.
Modificación de proteínas	YGL038c	OCH1	2,1	α -1,6-manosiltransferasa
	YBR034c	HMT1	5,9	Arginina metiltransferasa.
	YJR143c	PMT4	7,5	Transfiere manosas. O-glicosilación.
Biosíntesis de proteínas	ORF	Gen	Ind.	Función
Procesamiento de tRNA	YFL022c	FRS2	2,2	Fenilalanina-tRNA ligasa
	YDL048c	STP4	2,2	Incorporación de aa. ramificados. Pre tRNA <i>splicing</i> .
	YKR056w	RNC1	3,3	tRNA metiltransferasa
Traducción	YOR204w	DED1	9,5	RNA-helicasa dependiente de ATP. Inicio traducción
	YER025w	GCD11	2,6	Factor inicio de la traducción eIF-2 γ .
	YPR080w	TEF1	2,0	Factor de elongación EF-1 α .
	YBR118w	TEF2	2,3	Factor de elongación EF-1 α .
	YLR249w	TEF3	5,5	Factor de elongación EF-3.
	YKL081w	TEF4	2,3	Factor de elongación EF-1 γ .
	YOR133w	EFT1	2,1	Factor de elongación EF-2.
Biogénesis de ribosomas.	YIL018w	RPL5A	2,9	Proteína ribosomal L2B (L5B).
	YOL120c	RPL18A	2,1	Proteína ribosomal L18A (rp28A).
	YLR075w	RPL10	2,9	Proteína ribosomal L10.
	YNL301c	RPL18B	45,6	Proteína ribosomal L18B.
	YLR439w	MRPL4	2,6	Proteína ribosomal mitocondrial L4.
	YML074c	NPI46	2,9	Plegamiento de proteínas ribosomales.
	YKR081c	RPF2	5,1	Formación y mantenimiento de la subunidad ribosomal grande.
Procesamiento de rRNA	YOR294w	RRS1	11,7	Regulador de la biosíntesis de ribosomas
	YNL061w	NOP2	5,1	Proteína nucleolar. RNA metiltransferasa.
	YLR197w	NOP56	2,5	Proteína snoRNP ⁴ U3.
	YOR310c	NOP58	2,1	snoRNP. Formación del rRNA 18S.
Transporte celular	ORF	Gen	Ind.	Función
Transporte de iones	YGL008c	PMA1	2,1	H ⁺ -ATPasa. Regulación del pH celular
Similares a proteínas conocidas	ORF	Gen	Ind.	Función

Capítulo I

	YKR013w	PRY2	3,5	Homólogo a proteína de plantas PR ⁵ 1
	YOL041c	NOP12	5,1	Similar a proteínas nucleolares con unión a colas poli(A).
	YHR020w		2,1	Similar a prolina t-RNA ligasa.
	YLR089c		8,5	Similar a alanina transaminasas.
	YOL027c	MDM38	2,5	Similar a MRS7, supresor de la mutación mrs2-1
	YLR196w	PWP1	7,7	Similar a factor de inicio de la traducción de humanos.
	YMR049c	ERB1	2,5	Proteína eucariota implicada en biogénesis de ribosomas
	YPL093w	NOG1	5,3	Similar a proteína nucleolar de unión a GTP.
Función molecular desconocida	ORF	Gen	Ind.	Función
	YBL081w	-	2,3	Desconocida
	YDR101c	ARX	5,3	Desconocida
	YDR133c	-	3,2	Desconocida
	YDL211c	-	2,1	Desconocida
	YLL066c	-	3,9	Desconocida
	YOL057w	-	4,2	Desconocida
	YOL124c	-	8,9	Desconocida
	YML133c	-	2,8	Desconocida

*(1): Pared Celular; (2): DesHidrogenasa.; (3): aminoácidos; (4): *small nucleolar RiboNucleoProtein*;
(5): *Pathogen Related*.

Tabla 3: Genes reprimidos por frío en la cepa W303-1A de *S. cerevisiae*.

Ciclo celular y procesamiento de DNA	ORF	Gen	Rep.	Función
	YHR205w	SCH9	3,2	Protein-quinasa, controla crecimiento.
	YAL041w	CDC24	5,8	Factor de liberación de GDP de <i>Cdc42p</i>
Control del ciclo celular	YMR276w	DSK2	6,1	Necesaria para duplicación del centrosoma junto con <i>RAD23</i> .
	YLR212c	TUB4	3,9	γ -tubulina. Parte del centrosoma.
	YML085c	TUB1	2,8	α -tubulina. Parte del centrosoma.
	YOR327c	NDD1	3,6	Activas transcripción específica de fase G2/M.
	YMR055c	BUB2	2,1	Control de mitosis.
Destino celular	ORF	Gen	Rep.	Función
Crecimiento celular y morfogénesis	YBR212w	NGR1	2,4	Regulador negativo del crecimiento.
	YPL032c	SVL3	2,8	Endocitosis.
	YNL138w	SRV2	2,5	Organización de citoesqueleto.
Transcripción	ORF	Gen	Rep.	Función
Control transcripcional	YHR099w	TRA1	2,9	Regula transcripción de genes transcritos por RNA-polimerasa II.
	YGL025c	PGD1	2,2	Mediador de la transcripción de la RNA polimerasa II.
	YPL089c	RLM1	2,7	Regulación de la transcripción de la RNA polimerasa II.
Procesamiento de mRNA	YGL173c	KEM1	5,3	5'-3'-exonucleasa. Degradación mRNA.
	YJL133w	MRS3	2,3	Corte-empalme de mRNAs.
Respuesta a daño celular	ORF	Gen	Rep.	Función
Respuesta a estrés	YPL059w	GRX5	7,5	Glutarredoxina. Respuesta a estrés osmótico y oxidativo.

Control de organización celular	ORF	Gen	Rep.	Función
Pared celular	YJL201w	ECM25	2,5	Orgnización y biogénesis de la PC ¹
	YOR109w	INP53	2,9	Inositol polifosfato 5-fosfatasa.
Metabolismo	ORF	Gen	Rep.	Función
Metabolismo de carbohidratos	YBR196c	PGI1	2,1	Glucosa-6-fosfato isomerasa
	YNL071w	LAT1	5,3	Dihidrolipoamida S-acetiltransferasa. Subunidad de la Piruvato DH ² .
	YOR136c	IDH2	4,6	Isocitrato deshidrogenasa.
Metabolismo del nitrógeno	YFL021w	GAT1	2,6	Necesario para expresión de genes reprimidos por nitrógeno.
Lípidos ácidos grasos e isoprenoides	YCR034w	ELO2	2,1	1,3-β glucano sintasa. Elongación de ácidos grasos.
	YKL192c	ACP1	2,7	Transportador de acilos mitocondrial.
Utilización de fosfato	YPL031c	PHO85	11,1	Protein-quinasa. Regula niveles de fosfato.
Biosíntesis de aminoácidos	YIR034c	LYS1	2,9	Sacaripina DH. Síntesis de lisina.
	YOL064c	MET22	2,1	Biosíntesis de metionina
Metabolismo de nucleótidos	YML058w	SML1	3,3	Inhibidor de ribonucleótido reductasa
Metabolismo secundario	YOL052c	SPE2	2,9	Biosíntesis de aminas.
Procesamiento de proteínas	ORF	Gen	Rep.	Función
Plegamiento y estabilización	YDR155c	CPH1	3,3	Pepetidil-prolil cis-trans isomerasa.
	YCR069w	CPR4	15,4	Pepetidil-prolil cis-trans isomerasa.
	YJL073w	JEM1	4,3	Carabina molecular.
	YDR214w	AHA1	6,7	Carabina molecular.
Modificación de proteínas	YEL036c	ANP1	2,4	Manosiltransferasa.
	YBR082c	UBC4	3,0	Ubiquitinación.
	YOR067c	ALG8	2,6	Glicosiltransferasa.
Biosíntesis de proteínas	ORF	Gen	Rep.	Función
Traducción	YOR260w	GCD1	2,2	Factor de inicio de la traducción.
	YOR276w	CAF20	2,4	Reprime el inicio de la traducción dependiente de CAP.
Biogénesis de ribosomas	YDR012w	RPL2B	6,3	Proteína ribosomal L4B
	YGL031c	RPL30A	2,6	Proteína ribosomal L24A
	YOR234c	RPL33B	4,0	Proteína ribosomal L33B
	YNL162w	RPL42A	2,2	Proteína ribosomal L42A
	YPL081w	RPS9A	2,3	Proteína ribosomal S9A
	YOR096c	RPS7A	9,3	Proteína ribosomal S7A
	YJL136c	RPS21B	2,1	Proteína ribosomal S21B
Transporte celular	ORF	Gen	Rep.	Función
Transporte vacuolar	YFR051c	RET2	2,3	Transporte entre RE ³ y Golgi.
	YPR028w	YOP1	2,0	Regula el tráfico de vesículas.
	YOL082w	CVT19	2,9	Transporte del citoplasma a vacuola
Transporte nuclear	YLR018c	POM34	9,6	Proteína del poro nuclar.
	YMR091c	NPL6	20,2	Etiquetado y transporte de proteínas al núcleo.
Tansporte mitocondrial	YOR045w	TOM6	2,6	Translocador mitocondrial
	YKL120w	OAC1	2,8	Translocador de Oxaloacetato de MMI ⁴
	YNL055c	POR1	4,8	Canal de aniones de la MME ⁵
	YNL064c	MET22	2,1	Entrada de proteínas a mitocondria
Similar a proteínas conocidas	ORF	Gen	Rep.	Función
	YIL166c	-	3,6	Similar a permeasa de alantoato.
	YBR287w	-	11,4	Putativo transportador

Capítulo I

	YBR086c	IST2	3,3	Similar a canales de Na ⁺ y K ⁺
	YBR214w	SDS24	3,8	Similar a proteína de ciclo celular de <i>S. pombe</i> .
	YOL111c	-	2,5	A proteína tipo ubiquitina de humanos.
	YLR356w	-	4,1	Similar a <i>Scm4p</i> .
Función molecular desconocida	ORF	Gen	Rep.	Función
	YEL001c	-	2,1	Desconocida
	YFL010c	WWM1	3,7	Desconocida
	YHR213w	-	2,1	Desconocida
	YHR097c	-	2,1	Desconocida
	YBR016w	-	6,9	Desconocida
	YBR287w	-	11,4	Desconocida
	YGR137w	-	6,2	Desconocida
	YJR115w	-	3,3	Desconocida
	YNR046w	-	2,6	Desconocida
	YOR091w	-	2,1	Desconocida
	YNR298w	-	7,1	Desconocida
	YNL338w	-	36,6	Desconocida
	YOR331c	-	2,7	Desconocida
	YLL023c	-	3,5	Desconocida
	YOR112w	-	4,4	Desconocida
	YOR248w	TOS11	2,3	Desconocida
	YOR042w	CUE5	2,4	Desconocida
	YLR194c	-	28,1	Desconocida
	YMR099c	-	2,2	Desconocida
	YNL058c	-	2,5	Desconocida
	YKR088c	TVP38	6,6	Desconocida. Proteína vacuolar.
	YOR277c	-	2,3	Desconocida.
	YMR099w	-	5,1	Desconocida
	YJL097w	-	17,8	Desconocida.

(1) PC: Pared Celular. (2) DH: Deshidrogenasa. (3) RE: Retículo Endoplasmático. (4): MMI: Membrana Mitochondrial Interna. (5) MME: Membrana Mitochondrial Externa.

Entre los genes cuyo nivel de transcrito se modifica como consecuencia de un tratamiento a 4°C merece la pena destacar los correspondientes a las siguientes categorías funcionales:

Biosíntesis de proteínas. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que una fracción importante (alrededor del 18%) de los genes inducidos a 4°C se pueden clasificar dentro de esta categoría funcional. Se ha descrito previamente que la capacidad traduccional se reduce a bajas temperaturas, debido a la formación de estructuras secundarias de RNA y la inactivación de ribosomas (Jones e Inouye 1996). En esta categoría funcional encontramos genes relacionados con el inicio de la traducción (*GCD11*) y la elongación

Capítulo I

(*TEF1*, *TEF2*, *TEF3*, *TEF4* y *EFT1*) así como genes que codifican proteínas ribosomales e implicadas en el procesamiento de RNA ribosomal y de transferencia. Estos resultados parecen indicar que a bajas temperaturas la célula responde a la ralentización de la actividad celular incrementando la maquinaria de biosíntesis de proteínas. Evidencias previas de que la biosíntesis de proteínas es esencial en la inducción de tolerancia a congelación han sido descritas por Lewis *et al.*, (1995). Este trabajo muestra que células tratadas con cicloheximida mantienen cierto nivel de tolerancia a sal y choque térmico, pero pierden completamente la tolerancia a congelación. La inducción a bajas temperaturas de genes que codifican proteínas ribosomales se ha descrito también por Sahara *et al.* (2002), e interpretado como un mecanismo para compensar la actividad traduccional reducida en esta condición de estrés.

Procesamiento de proteínas. Dentro de esta categoría funcional se encuentran tanto genes que codifican proteínas con función en el plegamiento y estabilización (como las carabinas moleculares *CCT2*, *CCT8*, *SSA2*, *PNO1*, *NPI46*) como los que participan en la modificación post-traduccional de proteínas.

La inducción de *CCT2* y *CCT8*, carabinas del complejo TCP, a baja temperatura ha sido también observada por Somer *et al.* (2002), que han descrito un aumento en los mensajeros de las cadenas Cct α p y Cct β p a bajas temperatura (10°C y 4°C). En cuanto a *SSA2*, codifica una proteína que pertenece a la familia de Hsp70p. Las proteínas tipo Hsp (Heat shock protein) responden a choque térmico y otros estreses (Sánchez *et al.*, 1992; Amorós y Estruch 2001) y además, se ha descrito que pueden actuar como crioprotectores biológicos (Kaul *et al.*, 1992a).

Entre los genes implicados en la modificación de proteínas que se inducen a bajas temperaturas, destaca la presencia de varias manosiltransferasas; *OCH1*, *PMT4* y *HMT1*. La mayor parte de las glicoproteínas son proteínas extracelulares unidas a membrana, con funciones estructurales o catalíticas, siendo otras transportadores u hormonas. En muchos casos se les ha relacionado con la recepción y procesamiento de señales extracelulares. Merece la pena resaltar que algunas de las glicoproteínas producidas por

Capítulo I

levaduras en condiciones de estrés salino poseen un efecto crioprotector cuando se utilizan como aditivos (Breierova 1997).

Respuesta a daño celular. Dentro de esta categoría encontramos genes que también se inducen por otros tipos de estrés. Entre ellos hay genes que codifican proteínas implicadas en el mantenimiento de la integridad de la pared celular: *WSC3*, *HSP150* (*PIR2*) y *PIR1*. Las proteínas codificadas por los genes *PIR* se han localizado en la pared celular (Yun et al., 1997) y se han descrito como necesarios en la tolerancia a altas temperaturas (Thoe et al., 1993). Los resultados aquí mostrados indican un papel importante de esta familia de genes también en la tolerancia a bajas temperaturas y apunta de nuevo a la pared celular como un elemento clave en la protección frente a bajas temperaturas.

Otro gen inducido en estas condiciones de estrés, *PDR13*, codifica una proteína de la familia de *HSP70*, cuya delección genera un fenotipo de sensibilidad a frío (Niedenthal et al., 1999).

Por último, destacar la presencia en este subgrupo de genes los *HOG1* y *PBS2* que codifican, respectivamente, la *MAPK* y la *MAPKK* de la ruta de transducción de señal de respuesta a alta osmolaridad.

Metabolismo de la pared celular. Entre los genes reprimidos a 4°C se han identificado *ECM25* e *INP53*. La función de ambos genes está relacionada con la organización de la pared celular; *INP53* codifica una inositol polifosfato 5-fosfatasa, perteneciente a la misma familia que *INP51* e *INP52* (Stolz et al., 1998a). Se ha descrito que la delección del gen *INP51* da lugar a un fenotipo de tolerancia a frío, permitiendo un crecimiento a 15°C significativamente más rápido que el de la cepa parental (Stolz et al., 1998b).

Metabolismo de hidratos de carbono. Otro de los grupos más representativos es el que incluye genes implicados en el metabolismo de hidratos de carbono. Tras someter las células a 4°C se inducen genes del metabolismo de glucosa como *PFK26* que codifica una enzima que sintetiza fructosa 2,6-bisfosfato,

Capítulo I

conocida molécula activadora de la enzima glucolítica *PFK1*. En esta misma ruta encontramos inducidos los genes *ENO1*, *ENO2* y *PDA1*. La actividad de estas enzimas lleva a la síntesis de acetil-CoA, molécula de partida de varias rutas metabólicas entre las que se encuentran la biosíntesis de esteroides y de aminoácidos, así como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (figura 7).

Las enzimas piruvato descarboxilasa (*PDC5*) y alcohol deshidrogenasa (*ADH1*), que llevan a cabo la fermentación alcohólica, también se inducen a 4°C, así como la enzima lactato deshidrogenasa (*DLD3*), que posibilita la utilización de lactato como fuente de carbono rindiendo piruvato. La inducción del transportador de hexosas de alta afinidad *HXT2* (Kasahara y Kasahara 2003), localizado en la membrana plasmática en condiciones de baja disponibilidad de glucosa (Kruckeberg et al., 1999), puede estar relacionada con la disminución en la fluidez de la membrana plasmática que se produce a bajas temperaturas y que puede afectar a la actividad de los transportadores, así como a la difusión transmembrana de metabolitos.

La represión a 4°C de la enzima fosfoglucoisomerasa (*PGI1*) podría estar relacionada con la producción de una mayor cantidad de glucosa-6-fosfato, metabolito de partida para la biosíntesis de nucleótidos y de la ruta de los fosfatos de pentosa, y utilizado en reacciones de glicosilación y en la biosíntesis de la pared celular. En este sentido se ha descrito que la disrupción de este gen provoca un aumento en la cantidad de intracelular de glucosa-6-fosfato y de glucógeno en fase exponencial (Corominas et al., 1992).

Otro de los genes inducidos es *RK11* que codifica la D-ribosa-5-cetol isomerasa, enzima de la ruta de los fosfatos de pentosas, cuya función principal es la formación de ribosa-5-fosfato para la biosíntesis de nucleótidos y la producción de NADPH, molécula reductora que se utiliza en la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides y que protege a las células de daños oxidativos. *RK11* ha sido clonado y caracterizado por Miosga y Zimmermann (1996) y con anterioridad (Marchler et al., 1993) se había identificado una potencial secuencia de respuesta a estrés (CCCCT) en su promotor.

En la levadura *S. cerevisiae* la ruta de señalización de la PKA (proteína quinasa dependiente de cAMP) se ha relacionado con el metabolismo de carbohidratos y con la respuesta a estreses ambientales (de Winde et al., 1997). En nuestro estudio hemos encontrado inducción a baja temperatura del gen *RGS2*, que

Capítulo I

codifica una proteína reguladora de proteína G participante en esta ruta (Versele *et al.*, 1999). Se ha descrito que la sobre-expresión de *RGS2* da lugar a una actividad PKA baja, que determina el aumento de la acumulación de trehalosa y glucógeno, la tolerancia a choque térmico, así como el incremento de la expresión de genes controlados por elementos STRE (Versele *et al.*, 1999). Esta inducción a baja temperatura ha sido también descrita por Sahara *et al.*, (2002).

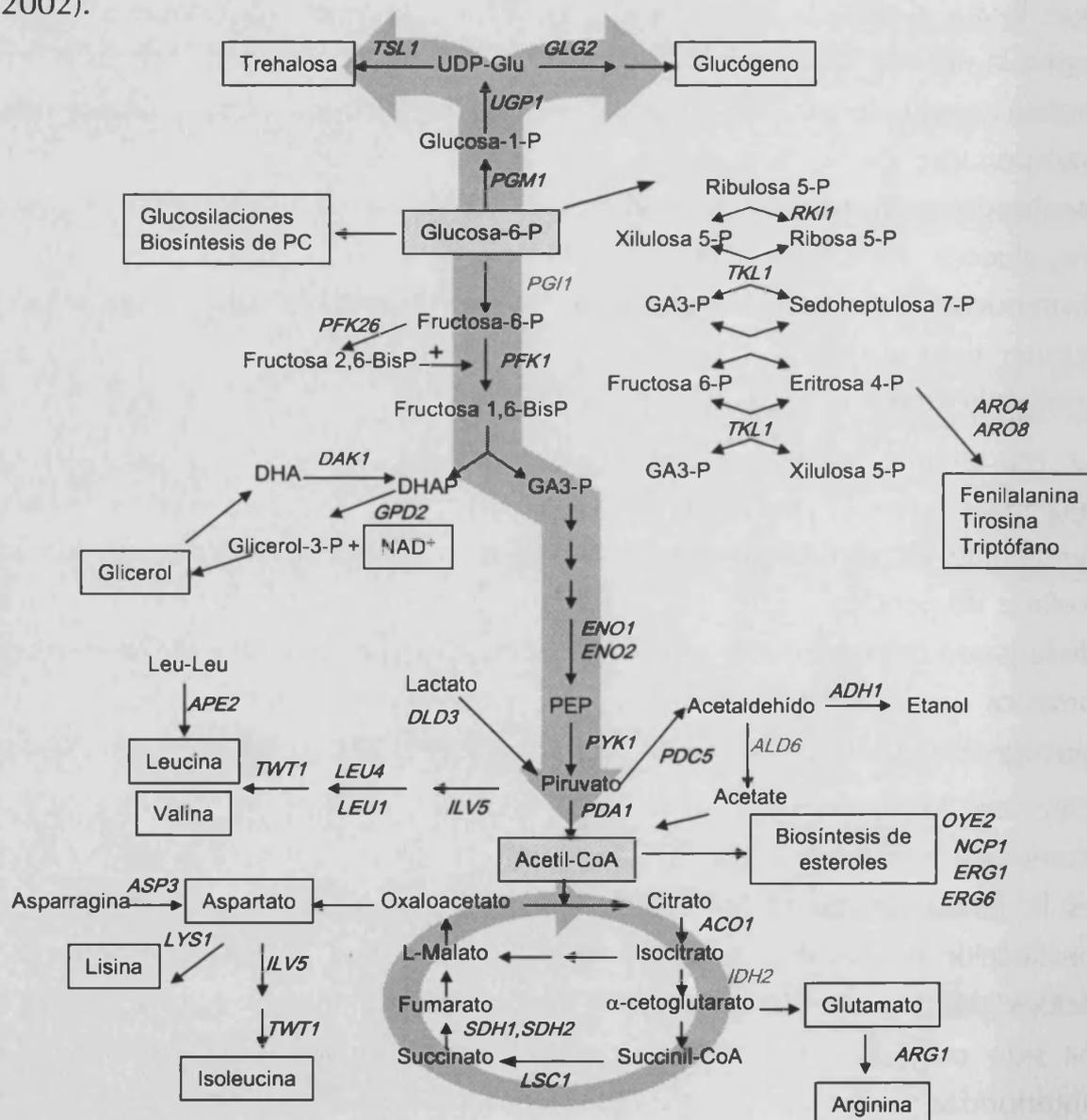


Figura 7: Ruta central del metabolismo de hidratos de carbono y ramificaciones. Se representa la ruta de la glucólisis y ciclo de los ácidos tricarboxílicos con las principales ramificaciones que parten de metabolitos intermediarios, resaltando los pasos catalizados por genes identificados implicados en la respuesta a frío o congelación-descongelación.

Capítulo I

Metabolismo de lípidos. Un mecanismo muy generalizado de adaptación a las bajas temperaturas es el cambio en la composición lipídica de las membranas (Thieringer *et al.*, 1998) para compensar el aumento de rigidez de las membranas celulares en esta condición de estrés. En este trabajo hemos encontrado inducidos por frío varios genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos y esterol. *OLE1*, codifica una desaturasa que genera ácidos grasos monoinsaturados $C_{16:1}$ y $C_{18:1}$. Se ha demostrado que la disminución de la temperatura de 30°C a 10°C induce la expresión de este gen en *S. cerevisiae* aumentando la proporción de ácidos grasos insaturados (Nakagawa *et al.*, 2002). Resultados similares de inducción se han descrito para *OLE1* en el análisis realizado por Sahara *et al.*, (2002).

Los esterol son conocidos moduladores de la fluidez y permeabilidad de las membranas biológicas, sintetizando la levadura ergosterol como único esterol (Parks y Casey 1995). Un amplio estudio realizado por Calcott y Rose (1982) relaciona la tolerancia a congelación y a frío con la composición lipídica de la membrana plasmática, demostrando que son más resistentes poblaciones de levaduras cuyas membranas están enriquecidas, por adición exógena, en ergosterol y estigmasterol frente a colesterol o campesterol y en residuos linoleicos frente a oleicos. El ergosterol también se ha relacionado con la adquisición de tolerancia a etanol y calor mediante la estabilización de la membrana (Swan y Watson 1998).

En este estudio hemos encontrado inducidos genes implicados en la biosíntesis de ergosterol: *OYE2* y *NCP1*, que codifican una NADH deshidrogenasa y una NADPH reductasa respectivamente. Finalmente, dentro del subgrupo de genes implicados en el metabolismo de ácidos grasos se ha encontrado una reducción de los niveles de transcrito a 4°C del gen *ELO2*, homólogo a *ELO1*, un gen implicado en la elongación de ácidos grasos de $C_{14:0}$ a $C_{16:0}$ (Oh *et al.*, 1997). El acortamiento de las cadenas de ácidos grasos está descrito como otra respuesta a las bajas temperaturas (Sandercock y Russel 1980).

Metabolismo de aminoácidos. En este apartado cabe destacar la inducción de dos permeasas *HNM1* y *GAP1*. La inducción de la permeasa general de aminoácidos *GAP1* puede estar relacionada con los cambios en la fluidez de la

Capítulo I

membrana, que como se ha comentado, afecta al transporte y a la difusión a través de la misma, así como con la necesidad de una mayor incorporación de aminoácidos bajo esta condición ambiental.

2.2.2.-Genes que modifican su expresión por congelación.

Los genes cuya expresión se ve modificada tras someter a las células a un estrés por congelación-descongelación, se han clasificado en categorías funcionales, detallándose la función y el nivel de inducción (tabla 4) o represión (tabla 5) para cada gen.

Tabla 4: Genes inducidos por congelación en la cepa W303-1A de *S. cerevisiae*.

Ciclo celular y procesamiento de DNA	ORF	Gen	Ind.	Función
Reparación de DNA	YML058w	SML1	2,5	Inhibidor de la ribonucleótido reductasa
	YAL019w	FUN30	12,1	Helicasa de la familia Snf2/Rad54
	YDR545w	YRF1-1	22,9	Helicasa Y'.
Control del ciclo celular	YGR023w	MTL1	5,1	Transduce, junto con <i>Mid2p</i> señales de estrés de la PC ¹
	YIL123w	SIM1	13,2	Regulación del ciclo celular y envejecimiento.
	YAL040c	CLN3	2,5	Ciclina G1. Función en control del punto START del ciclo celular
	YML085c	TUB1	2,1	α -tubulina
	YKR042w	UTH1	5,0	Determina la longevidad celular
	YLR286c	CTS1	2,4	Endoquitinasa
Destino celular	ORF	Gen	Ind.	Función
Respuesta a feromonas	YKL185w	ASH1	2,1	Proteína con dedos de Zn. Inhibidor de la transcripción HO.
	YJL079c	PRY1	7,9	Homologo a PR ² -1 de plantas.
	YJL078c	PRY3	2,7	Homologo a PR-1 de plantas.
	YNR044w	AGA1	4,1	Anclaje a la PC de la α -aglutinina.
Crecimiento y morfogénesis	YBR015c	TTP1	2,2	α -1,2-manosiltransferasa
	YCR088w	ABP1	3,8	Proteína de unión a actina.
Gemación y polaridad celular	YFL039c	ACT1	2,2	Actina.
	YDR309c	GIC2	5,3	GTPasa de unión a <i>Cdc42p</i> .
	YLR229c	CDC42	17,6	Establecimiento del sitio de gemación y polaridad celular.
	YOR122c	PFY1	2,6	Profilina, proteína de unión a actina.
	YPL049c	DIG1	2,6	Regulador negativo del crecimiento invasivo.
Transcripción	ORF	Gen	Ind.	Función
Funciones generales	YDL140c	RPO21	2,5	Subunidad grande RNA-polimerasa II.
	YOR230w	WTM1	2,6	Modulador transcripcional.

Capítulo I

	YOL051w	GAL11	5,6	RNA-polimerasa II dirigida por DNA.
Procesamiento de mRNA	YIR001c	SGN1	3,2	Actividad de unión a colas poli(A)
	YOR250c	CLP1	3,9	Procesamiento del extremo 3'.
	YLR116w	MSL5	4,6	Corte-empalme de mRNA.
	YIL101c	XBP1	53,5	Factor transcripcional de respuesta a estrés. Localizado en el núcleo.
Control transcripcional	YGL209w	MIG2	26,3	Represión por glucosa de la expresión de <i>SUC2</i> .
	YCR084c	TUP1	31,8	Represor general de la transcripción.
	YNL251c	NRD1	2,6	Regula la cantidad de pre-mRNA.
	YML051w	GAL80	2,5	Regulador negativo de la expresión de genes inducidos por galactosa.
Respuesta a daño celular	ORF	Gen	Ind.	Función
Respuesta a estrés	YNL160w	YGP1	14,0	Respuesta a limitación de nutrientes.
	YOL105c	WSC3	3,3	Integridad de la pared celular.
	YJL158c	CIS3	2,2	Alta similitud con Pir1/Hsp150/Pir3.
	YJL159w	HSP150	11,2	Glucoproteína de secreción de la PC
	YPL059w	GRX5	2,5	Glutarredoxina. Respuesta a estrés osmótico y oxidativo.
	YOL151w	GRE2	3,1	Oxidoreductasa. Inducida por estrés osmótico.
	YLR006c	SSK1	3,6	Sensor osmótico. Sistema de transducción de dos componentes.
	YKL164c	PIR1	2,7	Tolerancia a choque térmico.
	YBR067c	TIP1	3,0	Esterasa. Protección membrana plasmática.
Detoxificación	YML116w	ATR1	3,6	Resistencia a 4-nitroquinolina y aminotriazol
	YOL052c	SPE2	2,3	Precursor de adenosilmetionina decarboxilasa.
	YKR066c	CCP1	7,5	Precursor de citocromo-C peroxidasa
	YJR104c	SOD1	3,5	Superóxido dismutasa.
Control de organización celular	ORF	Gen	Ind.	Función
Pared Celular	YEL040w	UTR2	2,3	Biogénesis y organización de la PC.
	YBR078w	ECM33	2,4	Biogénesis y organización de la PC.
	YKR076w	ECM4	2,2	Biogénesis y organización de la PC.
	YLR390w	ECM19	5,5	Biogénesis y organización de la PC.
	YKL096w	CWP2	3,7	Constituyente de la PC. Estabilización.
	YLR110c	CCW12	2,4	Manoproteína.
	YGR282c	BGL2	2,1	Endo- β -1,3-glucanasa de pared celular.
	YLR342w	FKS1	2,3	1,3- β -D-glucano sintetasa.
	Núcleo	YPL127c	HHO1	3,0
Centrosoma	YKR037c	SPC34	2,5	Componente de los centriolos.
Metabolismo	ORF	Gen	Ind.	Función
Metabolismo de carbohidratos	YER120w	SCS2	3,8	Metabolismo de inositol.
	YIL154c	IMP2	2,9	FT ⁴ uso de maltosa, galactosa y rafinosa.
	YIL162w	SUC1	3,3	Invertasa.
	YAL038w	PYK1	3,2	Piruvato quinasa.
	YML100w	TSL1	4,0	Trehalosa-6-fosfato sintasa/fosfatasa. Subunidad reguladora.
	YML070w	DAK1	3,1	Dihidroxiacetona quinasa.
	YKL127w	PGM1	3,8	Fosfoglucomutasa.

Capítulo I

	YOL059w	GPD2	10,6	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD ⁺) mitocondrial.
	YOR126c	IAH1	2,4	Hidrólisis de isoamilacetato.
	YOL086c	ADH1	2,9	Alcohol deshidrogenasa I.
	YLR134w	PDC5	7,3	Piruvato decarboxilasa, isoenzima 2.
	YPR074c	TKL1	2,9	Transcetolasa 1. Ruta pentosas fosfato.
	YLR304c	ACO1	4,2	Aconitasa. Biosíntesis de Glutamato.
	YOR142w	LSC1	5,5	Succinil-CoA ligasa.
	YKL148c	SDH1	2,6	Succinato deshidrogenasa.
	YLL041c	SDH2	2,5	Succinato deshidrogenasa.
	YKL035w	UGP1	5,2	UTP-Glucosa-1-P uridiltransferasa.
	YJL137c	GLG2	3,4	Iniciador biosíntesis de glucogeno.
Metabolismo del nitrógeno	YFL021w	GAT1	2,0	Factor transcripcional para regulación del nitrógeno.
	YHR042w	NCP1	4,8	Citocromo P450 reductasa (NADP). Biosíntesis de ergosterol.
	YKL192c	ACP1	3,6	Proteína transportadora de grupos acilo. Biosíntesis de ácidos grasos.
	YMR008c	PLB1	2,6	Fosfolipasa B.
	YKL004w	AUR1	10,3	Inositol fosfoceramida sintasa. Biosíntesis de esfingolípidos.
	YKL019w	RAM2	4,8	Farnesiltransferasa.
	YML008c	ERG6	2,4	SAM-Δ24-esterol-c-metiltransferasa. Biosíntesis de ergosterol.
	YJL145w	SFH5	3,0	Putativa proteína de transferencia de fosfatidilinositol
	YLR099c	ICT1	6,2	Putativa lipasa.
	YBR177c	EHT1	4,5	Alcohol acil transferasa.
	YAL012w	CYS3	4,9	Cistationina-y liasa. Síntesis de cisteína.
	YIR034c	LYS1	2,6	Sacaripina DH. Síntesis de lisina.
	YBR249c	ARO4	2,2	Biosíntesis de aminoácidos aromáticos.
	YHR208w	TWT1	2,4	Transaminasa de aa. ramificados.
	YGL202w	ARO8	2,7	Aminotransferasa de aa. aromáticos.
	YKL157w	APE2	2,2	Leucil-aminopeptidasa. Obtención de Leucina de dipéptidos extracelulares.
	YOL058w	ARG1	3,9	Arginosuccinato sintetasa. Síntesis de Arginina.
Biosíntesis de aminoácidos	YLR180w	SAM1	9,4	S-adenosilmetionina sintetasa 1.
	YNL104c	LEU4	12,5	2-isopropilmalato sintasa. Síntesis de leucina.
Degradación de aminoácidos	YLR155c	ASP3	3,7	L-Asparraginasas II.
	YLR157c	ASP3	4,1	L-Asparraginasas II.
	YLR158c	ASP3	3,1	L-Asparraginasas II.
Grupos prostéticos	YOR176w	HEM15	3,1	Precursor de ferroquelatasa. Biosíntesis del grupo hemo.
Procesamiento de proteínas	ORF	Gen	Ind.	Función
Plegamiento y estabilización	YIL142w	CCT2	3,4	Carabina molecular, asiste el plegamiento de actina y tubulina.
	YCR069w	CPR4	3,3	Peptidil proil cis-trans isomerasa.
	YLR216c	CPR6	2,1	Peptidil proil cis-trans isomerasa.

Capítulo I

	YLL024c	SSA2	3,3	Carabina molecular, familia de Hsp70p.
Degradación de proteínas	YDL126c	CDC48	13,9	Necesaria para proteólisis dependiente de ubiquitina.
	YBR286w	APE3	2,5	Aminopeptidasa.
	YCL008c	STP22	3,8	Putativo receptor de ubiquitina.
	YNL239w	LAP3	2,5	Aminopeptidasa.
	YMR297w	PRC1	13,7	Carboxipeptidasa Y. Degradación de péptidos pequeños.
	YLR121c	YPS3	6,5	Proteasa anclada a GPI.
	YOR117w	YTA1	3,3	Probable subunidad de la proteasa 26S.
	YPL154c	PEP4	2,6	Proteinasa A vacuolar.
Modificación de proteínas	YBL082c	RHK1	2,5	α -1,3-manosiltransferasa. Glicosilación.
	YOR321w	PMT3	5,2	Manosiltransferasa.
	YJR143c	PMT4	16,4	O-manosiltransferasa.
	YLR195c	NMT1	2,4	N-miristoil transferasa.
	YOR099w	KTR1	4,4	O,N-Manosiltransferasa.
	YLR120c	YAP3	29,9	Aspergillopepsina.
Formación de complejos proteicos	YKR048c	NAP1	3,2	Formación del nucleosoma.
Biosíntesis de proteínas	ORF	Gen	Ind.	Función
Traducción	YOR204w	DED1	2,4	RNA-helicasa dependiente de ATP. Inicio traducción
	YLR249w	TEF3	2,6	Factor elongación 3 (eEF-3)
	YPRO80w	TEF1	3,4	Factor elongación 1 (eEF-1)
	YPL048w	CAM1	11,4	Homologo a EF-1. Unión a calcio y fosfolípidos.
	YLR203c	MSS51	2,4	Necesario para traducción de COX1.
Biogénesis de ribosomas	YLR439w	MRPL4	5,0	Proteína ribosomal mitocondrial L4.
	YJL063c	MRPL8	2,4	Proteína ribosomal mitocondrial L8.
	YNL067w	RPL9B	2,4	Proteína ribosomal L9B
	YPL090c	RPS6A	2,3	Proteína ribosomal S6A
	YPL131w	RPL1	2,1	Proteína ribosomal L5.e.
	YNL301c	RP28B	67,9	Proteína ribosomal L18.e.
Procesamiento de tRNA	YLL018c	DPS1	2,5	Aspartil-tRNA sintetasa
	YAL043c	PTA1	8,7	Procesamiento de pre-tRNA
	YDL048c	STP4	2,4	Corte-empalme de pre-tRNA. Incorporación de aa ³ ramificados.
	YHR070w	TRM5	2,1	Metilación de tRNA.
Procesamiento de rRNA	YLR059c	YNT20	2,8	Exonucleasa de RNA.
Transporte celular	ORF	Gen	Ind.	Función
Transporte vesicular	YGL225w	GOG5	3,5	Transporte de GDP-manosa al lumen del Golgi.
	YNL263c	YIF1	3,3	Transporte del RE ⁵ al Golgi.
	YKR068c	BET3	3,7	Transporte del RE al Golgi.
	YOL062c	APM4	3,4	Proteína asociada a clatrina.
Transporte mitocondrial	YDL198c	SMH1	12,2	Proteína transportadora mitocondrial.
	YNL055c	POR1	3,6	Flujo de NADH por la MME ⁶ .
	YNL064c	YDJ1	3,2	Entrada de proteínas a Mit. ⁷ y RE
Transporte nuclear	YOR098c	NUP1	3,1	Proteína del complejo del poro nuclear.
Transporte de iones	YOR332w	VMA4	2,6	Dominio V1 de la ATPasa vacuolar. Mutante es sensible a frío.

Capítulo I

	YLR130c	ZRT2	3,2	Transportador de Zn de baja afinidad.
Similar a proteínas conocidas	ORF	Gen	Ind.	Función
	YHL002w	HSE1	18,4	Proteína transductora de señal de mamíferos.
	YHR188c	GPI16	2,2	Proteína de <i>C. elegans</i> , posible componente de ciclo TCA ⁹ .
	YGR279c	SCW4	4,1	Similar a glucanasa. Conjugación.
	YPL116w	HOS3	23,7	Putativa histona desacetilasa.
	YPL252c	YAH1	8,5	Similar a adrenodoxina y ferredoxina.
	YDR179c	CSN9	9,6	Proteína de <i>D. melanogaster</i> . Relacionada con conjugación.
	YHL021c	-	31,9	γ -butirotetaina de <i>Pseudomonas</i>
	YBR214w	SDS24	12,6	Similar a SDS23 de <i>S. pombe</i> .
	YHR074w	QNS1	2,1	Proteína de esporulación de <i>B. subtilis</i>
	YIL169c	-	6,5	Similar a glucano α -1,4-glucosidasa.
	YOL111c	-	2,4	Proteína tipo ubiquitina humana.
	YOL072w	THP1	13,9	Similar a proteína de <i>C. elegans</i> .
	YOL155c	-	2,4	Similar a glucano α -1,4-glucosidasa.
	YOR285w	-	4,7	Similar a HSP67B2 de <i>D. melanogaster</i> .
	YOR286w	-	2,4	Similar a HSP67B2 de <i>D. melanogaster</i> .
	YLR356w	-	4,4	Similar a <i>Scm4p</i>
	YMR110c	-	4,2	Similar a aldehído deshidrogenasa.
	YKR075c	-	13,4	Similar al regulador negativo Reg1p.
	YOL022c	-	6,1	Proteína de apoptosis RP8. de rata
	YOL030w	GAS5	2,8	Similar a la glicoproteína Gas1p.
Función molecular desconocida	ORF	Gen	Ind.	Función
	YCL028w	RNQ1	3,2	Desconocida.
	YDR157w	-	3,2	Desconocida. Putativa ORF.
	YDR544c	-	20,7	Desconocida.
	YBR287w	-	8,7	Desconocida.
	YGR250c	-	2,0	Desconocida.
	YAR068w	-	3,2	Desconocida.
	YEL001c	-	2,4	Desconocida.
	YBR162c	-	3,3	Desconocida.
	YGR086c	PIL1	2,1	Desconocida.
	YDR133c	-	7,3	Desconocida.
	YHR097c	-	3,8	Desconocida.
	YGR160w	FVV13	4,8	Desconocida.
	YHR214A	-	5,3	Desconocida.
	YGR161c	RTS3	61,6	Desconocida.
	YKL030w	-	6,8	Desconocida. Putativa ORF.
	YKR012c	-	40,5	Desconocida.
	YLL066	-	5,3	Desconocida.
	YOR081c	-	2,1	Desconocida.
	YLL067c	-	23,7	Desconocida.
	YOR305w	-	3,1	Desconocida.
	YPR044c	-	2,6	Desconocida.
	YKR046c	-	4,9	Desconocida.
	YNL338w	-	2,6	Desconocida.
	YLR050c	-	2,5	Desconocida.
	YLR194c	-	3,0	Desconocida.
	YOR084w	-	5,1	Desconocida.

Capítulo I

YOR164c	-	6,6	Desconocida.
YML072c	-	3,2	Desconocida.
YML132w	COS3	3,1	Desconocida.
YNL058c	-	2,8	Desconocida.
YOR277c	-	2,0	Desconocida.
YKL051w	-	14,2	Desconocida.
YLL023c	-	6,9	Desconocida.
YOL092w	-	5,5	Desconocida.
YLR339c	-	8,9	Desconocida.
YPL251w	-	4,7	Desconocida.
YJL152w	-	15,2	Desconocida.
YML052w	SUR7	3,6	Relacionada con esporulación.
YMR148w	-	6,3	Desconocida.
YMR190w	-	2,0	Relacionada con respuesta a desecación.
YOR248w	TOS11	4,3	Desconocida.
YML053c	-	4,2	Desconocida.
YKRO45c	-	2,6	Desconocida.
YOR382w	FIT2	12,8	Relacionada con transporte de hierro.
YPL004c	LSP1	3,5	Desconocida.

(1) PC: Pared Celular; (2) PR: Pathogen Related; (3) aa.: aminoácidos; (4) FT: Factor de Transcripción; (5) RE: Retículo Endoplásmico; (6) MME: Membrana Mitocondrial Externa; (7) Mit.: Mitocondria; (8) TCA: TriCarboxilic Acids.

Tabla 6: Genes reprimidos tras congelación en la cepa W303-1A de *S. cerevisiae*.

Ciclo celular y procesamiento de DNA	ORF	Gen	Rep.	Función
Control del ciclo celular	YLR321c	SFH1	4,5	Forma parte del complejo remodelador de la cromatina (RSC).
Destino celular	ORF	Gen	Rep.	Función
Respuesta a feromonas	YOR212w	STE4	3,3	Proteína de unión a GTP de la ruta de respuesta a feromonas.
Crecimiento celular y morfogénesis	YJL174w	KRE9	3,2	Proteína de síntesis de pared celular.
Transcripción	ORF	Gen	Rep.	Función
Control transcripcional	YLR256w	HAP1	6,8	Activador transcripcional de CYC1 y CYC3.
	YJL140c	HIR3	2,9	Co-represor transcripcional. Ciclo celular.
	YPRO65w	ROX1	4,1	Represor transcripcional de genes de hipoxia.
Procesamiento de mRNA	YER172c	BRR2	5,1	Helicasa. Corte-empalme de mRNA
Respuesta a daño celular	ORF	Gen	Rep.	Función
Reparación DNA	YKLO54c	DEF1	3,6	Factor de degradación de RNA polimerasa II.
Metabolismo	ORF	Gen	Rep.	Función
Metabolismo de carbohidratos	YPL061w	ALD6	2,5	Aldehído deshidrogenasa citosólica.
	YGR143w	SKN1	6,5	Glucano sintasa.
Biosíntesis de aminoácidos	YOL061w	PRS5	5,9	Ribosa-P pirofosfatasa.
	YOR184w	SER1	2,8	Fosfoserina transaminasa
Metabolismo de nucleótidos	YGL173c	KEM1	14,9	Nucleasa multifuncional.
Vitaminas, cofactores y grupos	YOR209c	NPT1	3,3	Ruta de biosíntesis de NAD.

Capítulo I

prostéticos.				
Procesamiento de proteínas	ORF	Gen	Rep.	Función
Plegamiento y estabilización	YPL106c	SSE1	2,2	Carabina molecular, familia de Hsp70p
Degradación de proteínas	YNR022w	QRI8	2,1	Proteína de unión a ubiquitina.
	YBR082c	UBC4	3,3	Proteína de unión a ubiquitina
Etiquetado y translocación	YLR378c	SEC61	2,2	Complejo de translocación del RE ¹
	YOR254c	SEC63	2,7	Complejo de translocación del RE
	YBR283c	SSH1	3,8	Similar a SEC61.
	YNR006w	VPS27	2,3	Translocación de proteínas de RE a vacuola.
Biosíntesis de proteínas	ORF	Gen	Rep.	Función
Traducción	YMR012w	CLU1	4,6	Factor de inicio traducción eIF3
Procesamiento de tRNA	YKL205w	LOS1	2,4	Pre t-RNA corte-emplame
	YGL105w	ARC1	3,9	Salida del tRNA del núcleo.
Procesamiento de rRNA	YOR310c	NOP58	5,3	snoRNP ²
Biogénesis de ribosomas	YOR234c	RPL37B	26,7	Proteína ribosomal L33B
	YML063w	RPS1B	2,5	Proteína ribosomal S1B
	YLR441c	RPS1A	2,7	Proteína ribosomal S1A
	YPL081w	RPS9A	2,0	Proteína ribosomal S9A
	YOR096w	RPS30	8,9	Proteína ribosomal S30
	YHL015w	RPS20	5,7	Proteína ribosomal S20
	YGL135w	RPL1B	2,7	Proteína ribosomal de la subunidad 60S
	YBR191w	RPL21A	2,8	Proteína ribosomal L21.e
	YHR203c	RPS4B	2,8	Proteína ribosomal S4.e.c8
Transporte celular	ORF	Gen	Rep.	Función
Transporte de iones	YML123c	PHO84	2,6	Transportador de fosfato inorgánico.
Función molecular desconocida	ORF	Gen	Rep.	Función
	YMR163c	-	5,0	Desconocida
	YNR021w	-	2,4	Desconocida
	YDR266c	-	3,1	Desconocida
	YJL012c	VTC4	3,0	Desconocida
	YGR136w	LSB1	2,1	Desconocida
	YGR137w	-	2,2	Desconocida
	YDR361c	BCP1	2,8	Desconocida
	YDR417c	-	6,2	Desconocida

(1) RE: Retículo Endoplasmático.

En el caso de estrés por congelación-descongelación, los grupos funcionales más relevantes de genes cuyo nivel de transcrito se modifica son los siguientes:

Procesamiento de proteínas: A las peptidil-prolil *cis-trans* isomerasas se les atribuye un papel en el plegamiento de proteínas a bajas temperatura y se ha descrito que estas proteínas se inducen por frío en procariontas (Graumann et al., 1996). Los genes *SSC3* y *CPR6*, inducidos por congelación, codifican proteínas de esta familia (Dolinski et al., 1997,1998). Otra de las proteínas

Capítulo I

inducida en condiciones de congelación es Hsp12p para la que se ha descrito una asociación con la peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa Cpr1p (Ho *et al.*, 2002).

Respuesta a estrés: Dentro de este grupo, encontramos inducido *SSK1*, que codifica un sensor osmótico que participa en la ruta HOG de señalización por alta osmolaridad (Hohmann 2002). Además, se inducen genes implicados en procesos de detoxificación (*SPE2* y *ATR1*) y de protección contra daño oxidativo (*SOD1*, *CCP1* y *GRX5*). La generación de radicales libres como consecuencia de la congelación y descongelación ha sido demostrada y en la resistencia frente a este estrés se ha comprobado la importancia de la protección contra daño oxidativo que lleva a cabo la superóxido dismutasa, codificada por los genes *SOD1* y *SOD2* (Park *et al.*, 1998). Como se ha comentado en la introducción, la congelación es un proceso que genera diversas condiciones de estrés en la levadura, los resultados aquí mostrados concuerdan con las observaciones previas que relacionan la generación de estrés osmótico (Wolfe y Briant 1999; Myers y Attfield 1999) y oxidativo (Hermes-Lima y Storey 1993) con el proceso de congelación.



Control de la organización celular. En esta categoría encontramos genes específicamente inducidos tras congelación-descongelación y no en frío, cuya función es la biogénesis, organización y estabilización de la pared celular. Estos genes son: *UTR2*, *ECM4*, *ECM19* y *ECM33*, éste último codifica una proteína de pared celular unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) cuya disrupción causa termosensibilidad (Terashima *et al.*, 2003). El anclaje a través de módulos GPI también lo encontramos en las proteínas codificadas por los genes *BGL2* y *CPW2*, (Kalebina *et al.*, 2002; van der Vaart *et al.*, 1995). *Cpw2p* y *Ccw12p* (Mrsa *et al.*, 1999) son manoproteínas con una importante función en la estabilización de la pared celular. Otro de los genes inducidos es *FKS1*, que codifica una glucano sintasa encargada de la síntesis de β -1,3-glucano, el principal componente estructural de la pared celular. La disrupción de este gen da lugar a la activación de rutas de señalización implicadas en la síntesis de otras proteínas de pared celular con el fin de mantener la integridad de ésta (Terashima *et al.*, 2000). El elevado número de genes implicados en la síntesis y

Capítulo I

organización de la pared celular cuya expresión se modifica tras la congelación de las células, son indicativos de la íntima relación de estos procesos con la capacidad de supervivencia tras la congelación.

Metabolismo de hidratos de carbono. Tras someter a las células a congelación y descongelación se observa la inducción de diversos genes implicados en la biosíntesis de glucógeno y de trehalosa, carbohidratos que se han relacionado con la respuesta a numerosos estreses (Elbein *et al.*, 2003; Francois y Parrou 2001). Así los genes *PGM1* (glucosa-6-fosfato mutasa) y *UGP1* participan la síntesis de UDP-glucosa a partir de glucosa-6-fosfato, siendo la UDP-glucosa el metabolito de partida para la biosíntesis tanto de glucógeno como de trehalosa (figura 7). El gen *GLG2* es un factor de inicio de la biosíntesis de glucógeno capaz de auto-glicosilarse, actividad totalmente necesaria para la biosíntesis de glucógeno (Cheng *et al.*, 1995). En el estudio realizado por Sahara *et al.*, (2002) se identifica a *GLG1*, con gran similitud con *GLG2*, como inducido por bajas temperaturas. El gen *TSL1* forma parte del complejo enzimático trehalosa-6-fosfato sintasa. Los genes *PGM2* (isoforma de *PGM1*), *UGP1*, *GLG1* y *TSL1* han sido identificados como inducidos por frío en el trabajo realizado por Sahara *et al.* (2002), lo cual confirma que la biosíntesis de glucógeno y trehalosa también podría estar estimulada por estrés por frío.

Otros genes que encontramos inducidos tras congelación-descongelación pertenecen al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el cual es el centro del metabolismo aerobio (figura 7). *LSC1*, succinil-CoA ligasa, cataliza la conversión de succinil-CoA a succinato y se ha descrito su inducción durante crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (Przybyla-Zawislak *et al.*, 1998). También encontramos inducida el siguiente enzima de la ruta, la succinato deshidrogenasa codificada por los genes *SDH1* y *SDH2*. *ACO1* codifica la aconitasa, y forma parte tanto del ciclo de los ácidos tricarboxílicos como del ciclo del glioxalato, se ha descrito también que la disrupción de este gen produce auxotrofia para glutamato (Gangloff *et al.*, 1990). Recordemos que la acumulación de glutamato posee un efecto crioprotector (Shima *et al.*, 2003).

El gen *GPD2* codifica un isoenzima de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, a diferencia del gen *GPD1*, la expresión de *GPD2* no se afecta por cambios en la

Capítulo I

osmolaridad del medio y es independiente de la ruta HOG. Sin embargo la transcripción de *GPD2* se estimula en condiciones de anoxia y cuando se induce la acumulación de NADH intracelular por adición de bisulfito en aerobiosis. Así, la producción de glicerol dependiente de *GPD2* parece necesaria para consumir el exceso de NADH intracelular (Ansell et al., 1997).

Metabolismo de lípidos. Entre los genes inducidos en condiciones de congelación se ha identificado *ERG6*, que codifica la esterol C-24 metiltransferasa, un enzima que cataliza una de las últimas etapas de la biosíntesis de ergosterol, cuyo papel en el control de la fluidez de la membrana se ha descrito con anterioridad. El mutante *erg6* posee un defecto en la localización de la permeasa de triptófano en la membrana plasmática, resultado que sugiere que la composición en esteroides es crucial también en la ruta de secreción de proteínas (Umebayashi y Nakano 2003). Además, una cepa que combina la mutación *erg6* con defectos en la síntesis de triptófano, muestra un fenotipo de sensibilidad a distintos tipos de estrés como frío y alta concentración de sal (MIPS).

Otros genes relacionados con metabolismo de lípidos que aumentan su expresión son, *PLB1*, *ACP1* y *AUR1*. Plb1p es una proteína necesaria para la actividad fosfolipasa B en *S. cerevisiae*, aunque su función biológica no ha sido determinada (Lee et al., 1994). Acp1p es una proteína transportadora de grupos acilo implicada en biosíntesis de ácidos grasos y que curiosamente encontramos inducida tras congelación-descongelación y reprimida a 4°C. *AUR1* codifica una inositol fosfoceramida sintasa implicada en la biosíntesis de esfingolípidos, compuestos esenciales para el transporte de proteínas ancladas a fosfatidilinositol que son importantes componentes de la pared celular (Skrzypek et al., 1997).

Metabolismo de aminoácidos. El metabolismo de varios aminoácidos también se ve significativamente alterado tras la exposición de las células a un proceso de congelación y descongelación. Así, tras la congelación encontramos inducidos genes de la biosíntesis de lisina (*LYS1*) y arginina (*ARG1*). Curiosamente, el gen *LYS1* está reprimido a 4°C. Se ha descrito que la

Capítulo I

acumulación de aminoácidos cargados, glutamato, lisina y arginina, genera mayor tolerancia a la congelación (Takagi *et al.*, 1997), probablemente actúan protegiendo la superficie de las proteínas y previniendo su desnaturalización. También se ha descrito que la acumulación de glutamato en células de levadura de panadería mutantes en el enzima arginasa (*car1*) aumenta la supervivencia de las células tras tres ciclos de congelación-descongelación (Shima *et al.*, 2003).

Los genes *ARO4* y *ARO8* implicados en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, tirosina, triptófano y fenilalanina, así como otros genes necesarios para la síntesis de aminoácidos ramificados como *ILV5*, *TWT1* e *APE2*, también son inducidos en condiciones de congelación-descongelación.

DISCUSIÓN

Las levaduras comerciales de panadería son cepas domesticadas de *Saccharomyces cerevisiae* que han sido seleccionadas y optimizadas para su utilización en panificación. Ahora bien, los cambios sufridos en los últimos años en la industria de panadería ha generado la demanda de cepas comerciales con nuevas características, que los métodos tradicionales de hibridación y mutagénesis no han permitido obtener. La capacidad de transformar levadura de panadería por técnicas de DNA recombinante ha abierto la posibilidad de manipular un gen o rutas génicas sin alterar otras características relevantes para la utilización tecnológica de estas levaduras comerciales.

La identificación de genes diana y de rutas de regulación implicadas en la respuesta a estrés por frío y congelación, supondrá una valiosa herramienta a la hora de diseñar modificaciones genéticas que mejoren la tolerancia a estas condiciones. Para ello es necesario utilizar aproximaciones de análisis diferencial o global de la expresión génica, en condiciones de estrés que mimetizan las situaciones que sufren las levaduras comerciales durante la producción de masas congeladas. Esto nos proporcionará el conocimiento básico de los mecanismos moleculares que utiliza la levadura para soportar estas condiciones.

La adaptación a estrés por frío en plantas y bacterias ha sido ampliamente estudiada, pero este problema ha merecido poca atención en levaduras. En este trabajo, mediante la aplicación de la técnica de *differential display*, se demuestra que la levadura de panadería *S. cerevisiae* posee un patrón de expresión diferencial cuando es sometida a estrés por congelación-descongelación o por frío. La congelación-descongelación es una condición de estrés poco habitual, pero de gran relevancia industrial en el campo de la

Capítulo I

panificación. En términos generales, esta condición de estrés se traduce en la reducción de la expresión de numerosos genes, reflejada en la menor abundancia de muchos fragmentos de cDNA. Estos cambios pueden indicar la parada de crecimiento que experimentan las células. Al margen de este patrón general, algunos genes aparecen inducidos. Un total de nueve genes han sido identificados, aunque la comprobación de su inducción por *northern blot* sólo ha sido posible en tres de ellos. Este resultado puede ser consecuencia del elevado número de falsos positivos que genera esta técnica (Wang *et al.*, 1996) o que estos cDNAs correspondan a mRNAs de bajo número de copias en la célula.

La inducción de genes implicados en rutas metabólicas como glucólisis o biosíntesis de esteroides, parecen indicar la necesidad de ajustar estas rutas a la nueva condición ambiental a la que está sometida la célula. Todas las situaciones de estrés en las que se induce *TPI1* tienen en común una parada temporal del crecimiento celular, la exposición a estrés osmótico, térmico, ayuno de fuente de carbono o presencia de hierro (Rodríguez-Vargas *et al.*, 2002; Krieger y Ernst 1994). *Tpi1p* es una enzima clave, que controla la acumulación de triosas fosfato dirigiendo el flujo desde el tramo inicial de la glucólisis al tramo final. El nivel de dihidroxiacetona fosfato es clave en la síntesis de glicerol, metabolito requerido tanto en condiciones de estrés osmótico como para regular el balance redox en la célula. En efecto, por cada mol de glicerol producido se reoxida un mol de NADH a NAD⁺, que entra a formar parte de reacciones catalizadas en el tramo inferior de la ruta glucolítica. En particular, se ha descrito que la disrupción de *TPI1* aumenta la producción de glicerol y por tanto la reoxidación de NADH (Compagno *et al.*, 1996). Por ello, podemos especular que la inducción de *TPI1* podría funcionar como un mecanismo de control de la producción de NAD⁺ en situaciones donde hay

Capítulo I

una baja demanda de energía y por tanto de ATP generado en el tramo inferior de la ruta glucolítica.

La inducción de *ERG10* puede reflejar el requerimiento en la membrana plasmática de niveles más elevados de ergosterol, o de algún metabolito intermediario de esta ruta, en estas condiciones de estrés. Cambios bruscos en la temperatura ambiente causan modificaciones en la estructura de la membrana que le hacen perder su función fisiológica (Russell 1984; Vigh *et al.*, 1998). Así, la exposición a bajas temperaturas reduce la fluidez de la membrana plasmática, es decir, la membrana adopta una estructura más ordenada o rígida (Vigh *et al.*, 1993; Cossins *et al.*, 2002). Nuestros resultados apuntan a que la presencia de un mayor contenido de ergosterol, o de algún intermediario de la ruta de biosíntesis de este compuesto, puede interferir en la transición de la membrana a un estado más ordenado y mantener la estructura de ésta en condiciones fisiológicamente funcionales.

Un resultado interesante, que apoya la posible función de estos genes en la respuesta a estrés por frío, es que su nivel de expresión muestra una correlación directa con el nivel de tolerancia en cepas industriales. En efecto, el nivel de mRNA de *TPI1* y *ERG10* en células de una cepa, habitualmente utilizada en masas congeladas, fue claramente superior al encontrado en una cepa empleada en masas frescas. Este dato refleja que la selección empírica llevada a cabo por los productores de levadura de panadería se corresponde con un perfil de expresión génica más favorable para tolerar estrés, como demuestran los experimentos de viabilidad llevados a cabo con ambas cepas.

Los genes identificados en este trabajo aparecieron pues, como claras dianas a manipular con el objeto de mejorar la respuesta a frío y congelación en levaduras de panadería. La sobre-expresión de *TPI1* no ofrece ninguna ventaja a la célula para sobrevivir en estas condiciones de estrés, aún más, tiene un efecto negativo en el crecimiento celular incluso en condiciones óptimas (datos

Capítulo I

no presentados). Sin embargo, como se expondrá en detalle en el capítulo II, la sobre-expresión de *ERG10* aumenta la tolerancia a la congelación en *S. cerevisiae*.

La observación de estos resultados y de las diferencias en el patrón de expresión en cepas industriales, nos llevó a abordar el estudio de la respuesta a estrés por frío y congelación-descongelación mediante técnicas de análisis global, en el convencimiento de que este estudio básico podría aportar información útil para diseñar estrategias de modificación génica y mejorar la tolerancia a este estrés. Para ello decidimos utilizar filtros de DNA, una técnica con elevada capacidad de diagnóstico (Lockhart y Winzeler 2000) y dirigir nuestra atención a aquellas situaciones de estrés más habituales con las que se encuentran las levaduras de panadería. Así, la levadura prensada se almacena a 4°C y las masas congeladas se conservan a -20°C siendo descongeladas a 30°C.

De los resultados obtenidos tras estrés por frío, sorprende que tan sólo 84 genes aparezcan como reprimidos (tabla 3), ya que parece lógico pensar, que el descenso en temperatura debería inhibir la actividad de la mayoría de sistemas enzimáticos, y entre ellos de la maquinaria transcripcional. No obstante, resultados similares han sido observados en otros análisis de la respuesta a frío en *S. cerevisiae* (Sahara *et al.*, 2002) y en otros organismos, por ejemplo, en *Bacillus subtilis*, tan sólo un 1% de genes aparecen como menos inducidos en respuesta a frío (Kaan *et al.*, 2002). Esta situación, se ha atribuido a la aparición, a medida que desciende la temperatura, de estructuras secundarias en el mRNA, que impedirían la actividad hidrolítica de RNAsas (Kaan *et al.*, 2002).

Esta situación es todavía más evidente en el análisis de muestras sometidas a estrés por congelación-descongelación, en el que se observa una transcripción reducida para sólo 43 genes (tabla 5). No obstante, la identificación de al

Capítulo I

menos 85 genes con niveles de mRNA más elevados a 4°C, refuerza la idea derivada del análisis mediante *differential display*, de que existe una respuesta al frío en *S. cerevisiae* y que el producto de algunos genes puede ser requerido para hacer frente a este estrés.

Si observamos la clasificación en categorías funcionales de los genes cuya expresión se ve alterada, nos damos cuenta que múltiples funciones celulares están afectadas, destacando en ambos casos la biosíntesis de proteínas y el metabolismo. La elevada proporción de genes inducidos implicados en la biosíntesis de proteínas puede ser interpretada como un mecanismo de compensación de la menor actividad general de las células en estrés por frío, siendo necesario aumentar el nivel de proteínas para compensar dicha disminución (Jones e Inouye 1996; Sahara *et al.*, 2002).

Otro grupo de genes que se encuentran inducidos es el relacionado con el metabolismo de hidratos de carbono, dentro del cual cabe destacar la inducción de la proteína activadora Rgs2p. Se ha descrito que una elevada actividad de esta proteína induce la acumulación de trehalosa y glucógeno, metabolitos relacionados con la protección frente a varios tipos de estrés (Elbein *et al.*, 2003, Francois y Parrou 2001).

Como ya se ha comentado, el descenso de la temperatura ambiental produce un aumento en la rigidez de las membranas plasmáticas, lo que afecta, entre otros, a la función de proteínas transmembrana. La inducción de varios genes que codifican proteínas cuya función es transportar metabolitos al interior celular, como Hxt2p, Gap1 y Hnm1p, refleja probablemente la necesidad de compensar la pérdida de actividad de estos transportadores, y sugiere de nuevo, que el aumento de la síntesis de proteínas es una respuesta general al frío en *S. cerevisiae*.

Capítulo I

Cuando la fluidez de la membrana se reduce por una disminución de la temperatura, plantas y cianobacterias responden introduciendo dobles enlaces en los ácidos grasos de sus lípidos, devolviendo a la membrana a un estado más fluido (Vigh et al., 1993). La inducción del gen *OLE1*, concuerda con la inducción de estas enzimas en otros organismos anteriormente estudiados (Murata y Los 1997; Cossins et al., 2002), indicando la existencia de una respuesta común al frío en todos ellos, que implica el restablecimiento de la fluidez de la membrana plasmática.

En el análisis mediante *differential display* de la respuesta a estrés por frío en *S. cerevisiae*, *ERG10* fue identificado como un gen inducido en estas condiciones. Sin embargo, el empleo de filtros de DNA no confirmó la inducción de *ERG10* en cepas de levaduras de laboratorio. Este resultado podría atribuirse a diferencias en el diseño experimental empleado en cada caso, ya que otras enzimas de la ruta de biosíntesis de esteroides y esfingolípidos, *ERG1* y *ERG6*, aumentan claramente su expresión en el rastreo mediante filtros. De nuevo, estos resultados apuntan a los esfuerzos que hace la célula para devolver a la membrana plasmática su función.

La mayoría de los genes inducidos a 4°C, no apareció como tal, al analizar la respuesta a congelación-descongelación. Este resultado podría parecer sorprendente, pues el descenso de temperatura, forma parte integrante del estrés por congelación. Sin embargo, el estrés analizado implica también una fase de descongelación, elevándose la temperatura hasta los 30°C. Así, el resultado observado podría atribuirse a una respuesta transcripcional recíproca, es decir, a una vuelta a los niveles de expresión iniciales a 30°C. Este efecto ha sido claramente demostrado por Gasch et al. (2000), en diferentes condiciones de estrés, como estrés iónico o estrés térmico. Así, el conjunto de cambios

Capítulo I

observado tras congelación-descongelación es, en gran medida, específico e independiente del observado a 4°C.

La respuesta celular al estrés por congelación-descongelación parece estar dirigida a la reparación de los daños producidos en esta condición, induciéndose genes de respuesta a daño oxidativo y detoxificación. Esto indica que alguno de los daños causados por congelación y descongelación son debidos a la presencia de especies reactivas de oxígeno y que la inducción de defensas contra estos agentes oxidantes, contribuiría a la respuesta a estrés por congelación. En este sentido, se ha demostrado previamente, que niveles elevados de actividad superóxido dismutasa confieren resistencia a la congelación tanto en plantas (McKersie *et al.*, 1993) como en levaduras (Park *et al.*, 1998).

No obstante, la respuesta mayoritaria está relacionada con el metabolismo, siendo esta categoría funcional la que engloba el mayor número de genes inducidos tras congelación-descongelación, seguida de organización y biogénesis de la pared celular. Este resultado, sugiere que la reactivación del metabolismo celular (de lípidos, hidratos de carbono y proteínas) así como la síntesis y organización de la pared celular, son factores esenciales en el establecimiento de la capacidad de supervivencia de las células tras la descongelación. Es de resaltar, el aumento de los niveles de inducción de genes implicados en los últimos pasos de la glucólisis y, en especial, en la producción de etanol y en la conversión de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos hasta la producción de oxalacetato. Esto indica que las células, tras el proceso de descongelación, son capaces de reanudar la fermentación de los azúcares presentes en el medio.

Otro dato que cabe resaltar es la inducción de un número significativo de genes implicados en la síntesis de aminoácidos aromáticos y ramificados.

Capítulo I

Conviene recordar que existen evidencias experimentales del papel de glicina y de aminoácidos cargados, en tolerancia a congelación (Takagi *et al.*, 1997). Sin embargo, es la primera vez que fenilalanina, tirosina, triptofano, leucina, valina o isoleucina, aparecen relacionados de algún modo con la respuesta a frío y/o congelación. Esto sugiere que, en general, el incremento en el contenido de aminoácidos libres puede tener una función relevante en estas condiciones de estrés, no descrita previamente por otros autores.

Por último hay que destacar que varias de las respuestas que muestran las células a frío o congelación-descongelación no son específicas de estas condiciones, sino que se han descrito también para otros tipos de estrés. Por ejemplo, las proteínas de respuesta a choque térmico (Hsp150p, Pir1p, Ssa2p) (Toh-e *et al.*, 1993), genes de respuesta a estrés osmótico (*HOG1*, *PBS2*, *SSK1*, *GRE2*) (Hohmann 2002) o de respuesta a estrés oxidativo y detoxificación (*SOD1*, *CCP1*, *GRX5*) (Park *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2003; Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que las proteínas codificadas por estos genes, o los metabolitos producidos por ellas, juegan un papel importante en la tolerancia a distintos tipos de estrés. No obstante, estos resultados podrían interpretarse como indicativos de una respuesta general a estrés (Estruch 2000), también activada por frío.

CAPÍTULO II

Respuestas metabólicas y fisiológicas de levaduras a frío o congelación.

RESULTADOS

1.- Implicación del metabolismo de esteroides en la respuesta a frío y congelación en *Saccharomyces cerevisiae*.

En microorganismos, la membrana plasmática posee un papel esencial en la resistencia a estrés por frío y por congelación, en concreto, en *S. cerevisiae* se ha demostrado que la composición de la membrana plasmática en esteroides y ácidos grasos es importante para mantener la viabilidad después de haber sido sometida a varios ciclos de congelación-descongelación y tras estrés por frío (Calcott y Rose 1982). Los esteroides son componentes lipídicos esenciales de la membrana plasmática de células eucariotas sin los cuales no pueden mantener su viabilidad; son responsables de múltiples propiedades físicas de la membrana así como importantes reguladores de su permeabilidad y fluidez. El ergosterol es el único esteroide sintetizado por la levadura, posee propiedades químicas diferentes al colesterol, esteroide propio de membranas animales, del que se diferencia en las insaturaciones que posee en las posiciones C-7,8 del anillo y en C-22 de la cadena lateral, así como en la presencia de un grupo metilo en la cadena lateral (figura 8).

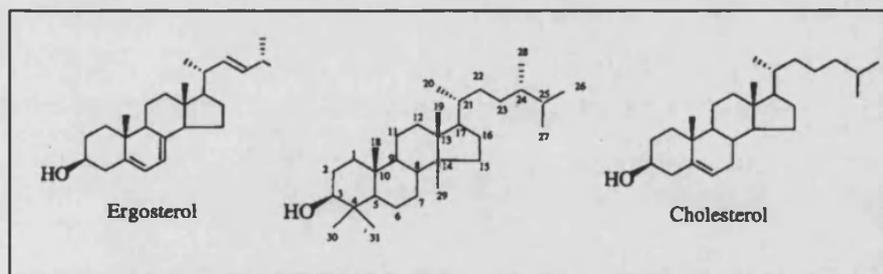


Figura 8: Estructura química de esteroides. El ergosterol, esteroide presente en las membranas de levaduras es diferente en su fórmula y estructura química al colesterol, esteroide presente en las membranas lipídicas de células animales.

En los estudios realizados en este trabajo sobre la expresión diferencial y global de *S. cerevisiae* en frío o tras congelación-descongelación se han encontrado inducidos varios genes relacionados con la biosíntesis de ergosterol, así, se identificó el gen *ERG10*, cuya inducción ha sido comprobada por *northern blot*

Capítulo II

en cepas de levadura de panadería (figuras 2 y 3) y, mediante la hibridación de filtros de DNA, se identificaron los genes *OYE2*, *ERG6*, *ERG1* y *NCP1* (tablas 2 y 4). Estos resultados, aportan nuevas evidencias sobre la importancia de la presencia de ergosterol o de un precursor en la membrana plasmática de *S. cerevisiae* para la supervivencia de las células tras ser sometidas a estas condiciones de estrés.

En este apartado se presenta el efecto de la modificación, mediante manipulación genética, de la ruta de biosíntesis de ergosterol en la tolerancia de levaduras a estrés por frío o congelación.

1.1.- Sobre-expresión y delección del gen *ERG10*, que codifica el primer enzima de la ruta de biosíntesis de ergosterol.

La biosíntesis de ergosterol parte de acetil-CoA e implica 20 reacciones enzimáticas que se dividen en dos tramos, la primera (figura 9), conocida también como ruta del mevalonato o de los isoprenoides, termina con la formación de farnesil pirofosfato (FPP), el cual es importante en la modificación post-traducciona de proteínas que se anclan a la membrana, el FPP es un intermediario a partir del cual se ramifican múltiples rutas esenciales como la síntesis del grupo hemo, quinonas y dolicoles, además de la síntesis de ergosterol; debido a esto cualquier mutación en un enzima de esta ruta resulta letal. La acetoacetil-CoA tiolasa, que es el primer enzima de esta ruta, cataliza la formación de acetoacetil-CoA a partir de dos moléculas de acetil Co-A y está codificada por el gen *ERG10*.

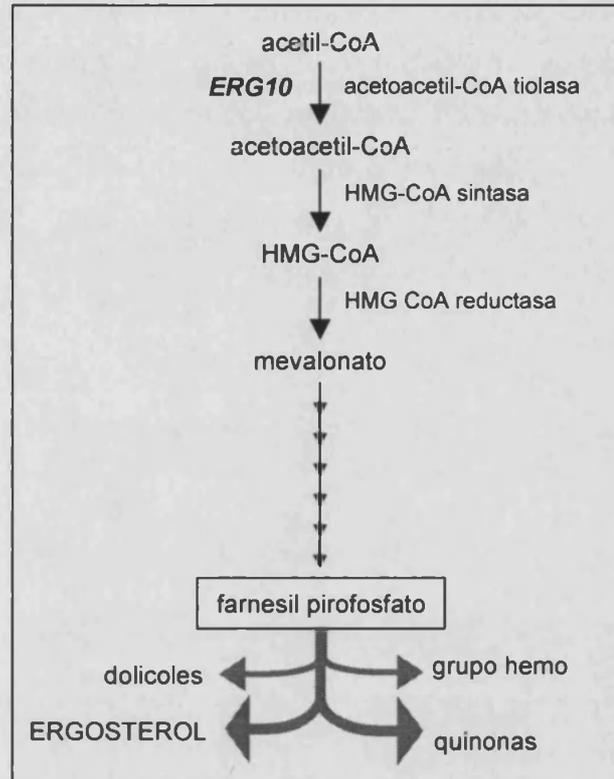


Figura 9: Primera etapa de la ruta de biosíntesis de ergosterol. La biosíntesis de ergosterol parte de acetil-CoA. A esta primera etapa también se la conoce como ruta del mevalonato o de los isoprenoides y termina con la síntesis de farnesil pirofosfato.

1.1.1.- Determinación de niveles de ergosterol en cepas sobre-expresantes del gen ERG10

Resultados anteriormente presentados, (figura 3 y tabla 1), sugieren una correlación positiva entre la inducción del gen *ERG10* y la tolerancia a la congelación en cepas de levadura de panadería comerciales. Decidimos analizar el efecto de la sobre-expresión y la delección de *ERG10* en cepas de levadura de laboratorio. En la tabla 6 se muestran los valores de actividad acetoacetil-CoA tiolasa en dos cepas de levadura de laboratorio (JRY4145 y W303-1A) transformadas con un plásmido control (YEplac195) y con el plásmido que sobre-expresa el gen *ERG10* (YEp-*ERG10*), así como en el mutante nulo *erg10::LEU2*. La sobre-expresión del gen *ERG10* provoca un aumento en la actividad acetoacetil-CoA tiolasa intracelular en ambas cepas, siendo el incremento en la actividad enzimática del sobre-expresante en la

Capítulo II

cepa JRY4145 superior a diez veces mientras que para la cepa W303-1A la actividad aumenta cinco veces. Este resultado indica que la sobre-expresión del gen *ERG10* en ambas cepas es funcional y que aumenta significativamente el nivel de enzima activa respecto a la cepa control. También se ha comprobado que el nivel de actividad enzimática en el mutante nulo es despreciable.

Tabla 6: Actividad enzimática acetoacetyl-CoA tiolasa en cepas de levadura de laboratorio sobre-expresantes del gen *ERG10*.

	Actividad enzimática (U/mg prot.)	
	JRY 4445	W303-1A
YEplac195	51±1	44±10
YEp- <i>ERG10</i>	709±9	214±7
<i>erg10::LEU2</i>	1,2±0	-

La actividad del enzima acetoacetyl-CoA tiolasa se midió en extractos celulares mediante una reacción acoplada como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Se define una unidad de actividad como 1 μ mol de acetoacetyl-CoA consumido por minuto (Hiser et al., 1994). Los resultados mostrados son la media de tres réplicas independientes.

Con el fin de determinar el efecto del aumento de actividad acetoacetyl-CoA tiolasa en la síntesis de ergosterol, se midió la cantidad producida de este metabolito mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna de fase inversa C-18 y β -sitosterol como patrón interno. En la [figura 10](#) se muestra un ejemplo de los espectros cromatográficos obtenidos para las cepas transformadas con el plásmido control (YEplac195) y las que sobre-expresan el gen *ERG10* (YEp-*ERG10*). El pico correspondiente al ergosterol eluye a los 7,8 minutos. Llama la atención que la cepa sobre-expresante de *ERG10* no produce más ergosterol que el control, a pesar de los niveles significativamente superiores de acetoacetyl-CoA tiolasa, sin embargo observamos el aumento del área del pico que eluye a los 13,6 minutos.

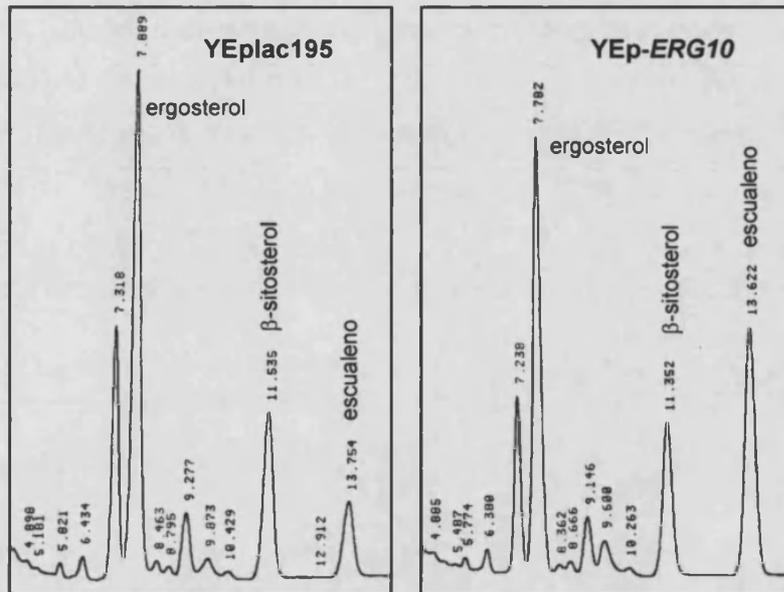


Figura 10: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de extractos de células que sobre-expresan el gen *ERG10*. En la figura se muestra una sección de los espectros de HPLC obtenidos de muestras de células que sobre-expresan el gen *ERG10* (YEp-*ERG10*) y células control transformadas con el plásmido YEplac195. Los extractos celulares se realizaron como se detalla en el apartado de materiales y métodos. Se utilizó una columna de fase inversa C-18 y β -sitosterol como patrón interno.

El análisis mediante espectrometría de masas de este compuesto lo identificó como escualeno (figura 11), primer compuesto que se sintetiza en la segunda etapa de la ruta de biosíntesis de ergosterol a partir de farnesil pirofosfato en una reacción catalizada por la enzima escualeno sintasa (figura 16).

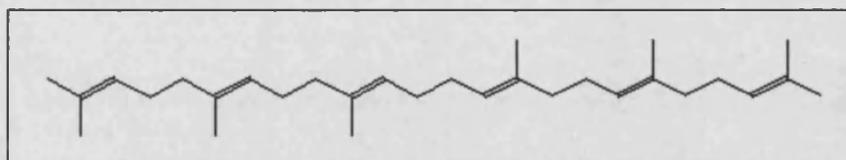


Figura 11: Estructura química del escualeno ($C_{30}H_{50}$). El escualeno es el primer compuesto de la segunda etapa de biosíntesis de ergosterol y se forma a partir de la condensación de dos moléculas de farnesil pirofosfato.

Los niveles de ergosterol y escualeno se analizaron en las dos cepas de levadura de laboratorio en distintas fases de crecimiento. Los resultados (figura 12) muestran que la sobre-expresión de *ERG10* implica una disminución de los niveles de ergosterol intracelulares en las distintas fases de crecimiento analizadas, aunque los niveles totales de ergosterol intracelular van

Capítulo II

umentando conforme el cultivo alcanza la fase estacionaria. Los niveles de escualeno intracelular en la cepa W303-1A aumentan con la sobre-expresión del gen *ERG10* y también se acumulan, tanto en la cepa control como en la sobre-expresante conforme se alcanza la fase estacionaria. En la cepa JRY4145, a pesar de detectarse más actividad acetoacetyl-CoA tiolasa, los niveles de ergosterol y escualeno son menores en la cepa sobre-expresante de *ERG10*.

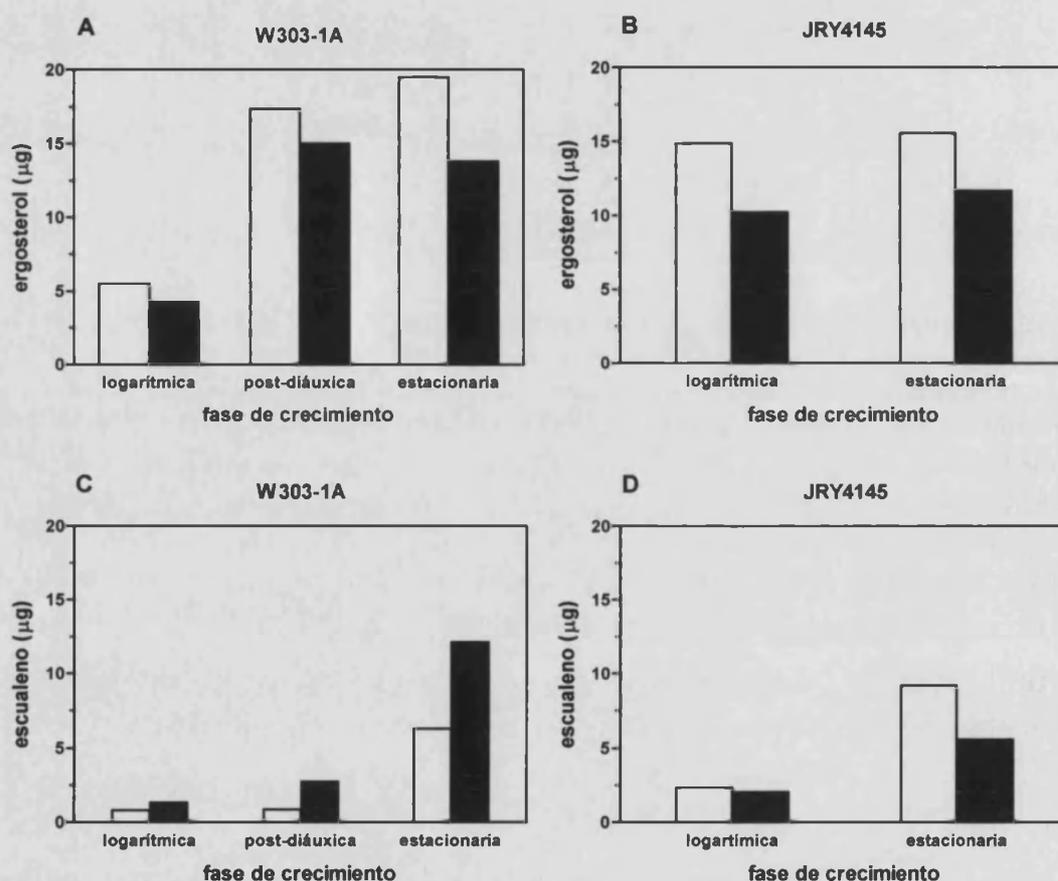


Figura 12: Niveles de ergosterol y escualeno intracelular. Los niveles de ergosterol (A y B) y de escualeno (C y D) intracelular fueron determinados por cromatografía (HPLC) de fase reversa en las cepas W303-1A y JRY4145 transformadas con el plásmido control YEplac195 (barras blancas) o con el plásmido YEp-*ERG10* (barras negras). Los resultados mostrados son medias de tres determinaciones independientes.

El hecho de que un aumento de la actividad de acetoacetyl-CoA tiolasa no provoque un aumento en la cantidad de ergosterol sintetizado por la célula sugiere una regulación tipo *feed-back* de este enzima. Existen estudios previos que sugieren este tipo de regulación para la acetoacetyl-CoA tiolasa, en los que la disminución en los niveles de isoprenos y esteroides causada por la inhibición química de los enzimas HMG-CoA reductasa (figura 9) y escualeno sintasa

Capítulo II

(figura 16), causan aumento en la actividad acetoacetyl-CoA tiolasa y de los niveles de mRNA del gen *ERG10* (Dimster-Denk y Rine 1996). Es posible además que otro enzima de la ruta catalice un paso limitante y que sea necesario inducir éste otro enzima para aumentar la biosíntesis de ergosterol. La acumulación de escualeno en los sobre-expresantes de *ERG10* apunta a los enzimas escualeno sintasa y escualeno epoxidasa como posibles pasos regulados de la ruta.

1.1.2.- La sobre-expresión de *ERG10* mejora la supervivencia tras congelación y el crecimiento a bajas temperaturas.

Una vez construidas las cepas y analizados los niveles de los diferentes metabolitos, se analizó el efecto que la sobre-expresión del gen *ERG10* y su disrupción (*erg10::LEU2*) posee en el crecimiento a bajas temperaturas y en la supervivencia tras congelación. Se realizó un seguimiento del crecimiento de cultivos líquidos de las cepas sobre-expresantes del gen *ERG10* y del mutante nulo *erg10* a 10°C el cual se comparó con el crecimiento de las correspondientes cepas control (figuras 14 y 15).

Se puede observar que la sobre-expresión del gen *ERG10* no tiene efecto sobre el crecimiento a 30°C, mientras que permite un crecimiento más rápido a 10°C, disminuyendo en dos horas el tiempo de generación de las células sobre-expresantes de *ERG10* frente a las transformadas con el plásmido control (figura 13).

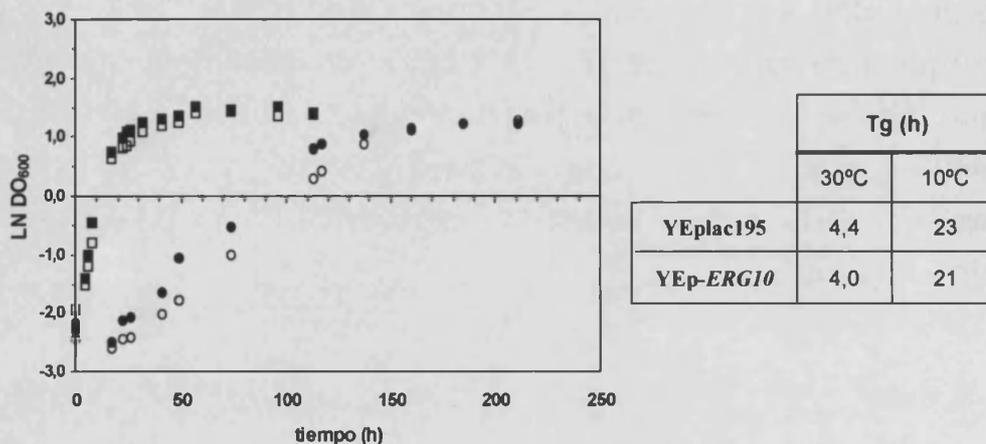


Figura 13: Crecimiento en medio líquido de células sobre-expresantes del gen *ERG10*. Crecimiento en medio mínimo a 30°C (cuadrados) y 10°C (círculos) de células de la cepa W303-1A transformadas con el plásmido control YEplac195 (símbolos blancos) y sobre-expresantes del gen *ERG10* (símbolos negros). En la tabla adjunta se muestra los tiempos de generación calculados a partir de las curvas de crecimiento.

Cuando analizamos un mutante *erg10*, observamos una deficiencia en el crecimiento de las células incluso a 30°C, temperatura a la cual el mutante *erg10* disminuye su tasa de crecimiento respecto al control. Este efecto se ve incrementado cuando las células se crecen a 10°C produciéndose un aumento del tiempo de generación del mutante *erg10* de 37 horas respecto a la cepa parental (figura 14).

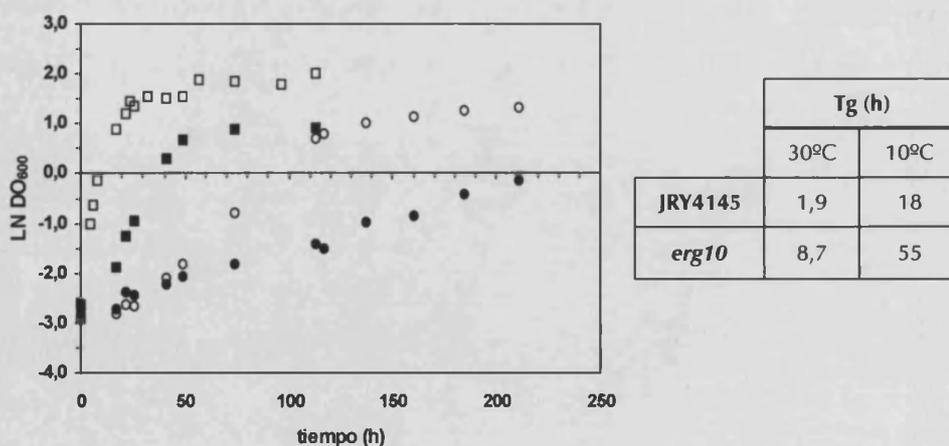


Figura 14: Crecimiento en medio líquido de células mutantes en el gen *erg10*. Crecimiento en medio YPD suplementado con mevalonato a 30°C (cuadrados) y 10°C (círculos) de células de la cepa control JRY4145 (símbolos blancos) y JRY4274 (*erg10*) (símbolos negros). En la tabla adjunta se muestra los tiempos de generación calculados a partir de las curvas de crecimiento.

Con el fin de comprobar el efecto que posee la sobre-expresión del gen *ERG10* en la supervivencia de las células tras congelación, se analizó su crecimiento tras ser almacenadas durante 5 días a -20°C . La sobre-expresión del gen *ERG10* mejora sensiblemente la supervivencia de las células en ambas cepas (figura 15-A).

La disrupción del gen *ERG10* posee un efecto drástico sobre la viabilidad celular tras el proceso de congelación-descongelación, mostrando esta cepa una supervivencia prácticamente residual en relación con la cepa parental (figura 15-B)

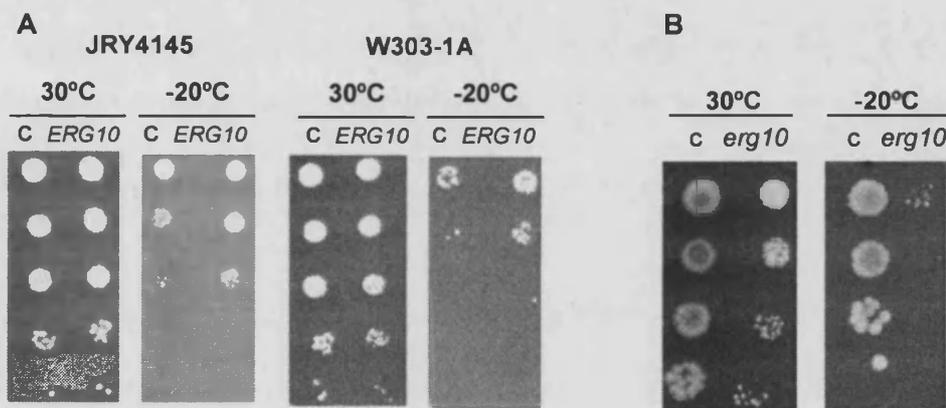


Figura 15: Efecto de la sobre-expresión y delección del gen *ERG10* en el crecimiento tras congelación de cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*. Las células se crecieron hasta fase exponencial y se gotearon en placas de medio sólido que se incubaron a 30°C ; las células se almacenaron congeladas a -20°C durante 5 días tras los cuales se descongelaron y se gotearon en el mismo medio. (A) Cepas JRY4145 y W303-1A transformadas con el plásmido control YEplac195 (c) y YEp-*ERG10* (*ERG10*) crecidas y goteadas en medio mínimo suplementado con las correspondientes auxotroffías. (B) Cepas JRY4145 (c) y JRY4274 (*erg10*) crecidas en YPD e YPD con mevalonato respectivamente y goteadas en placas de YPD+mevalonato.

Así pues, la sobre-expresión de *ERG10* proporciona una ventaja en el crecimiento tras congelación en las dos cepas de levadura analizadas (W303-1A y JRY4145), a pesar del efecto diferente que la sobre-expresión de *ERG10* posee sobre la ruta de biosíntesis en ambas cepas, aumentando la cantidad de escualeno en la cepa W303-1A pero no en JRY4145.

Capítulo II

1.2.- Sobre-expresión del gen *ERG1* que codifica el enzima escualeno epoxidasa.

El segundo tramo de la ruta de biosíntesis de ergosterol parte de farnesil pirofosfato y rinde ergosterol, tras 11 reacciones enzimáticas (figura 16). La primera reacción de este tramo, es la síntesis de escualeno, catalizada por la enzima escualeno sintasa. El escualeno es el sustrato del enzima escualeno epoxidasa, codificada por el gen *ERG1*. Esta enzima necesita oxígeno molecular además de NADPH y FAD para catalizar la reacción de epoxidación (Jahnke and Klein 1983), lo cual impide la síntesis de ergosterol en anaerobiosis. La reacción catalizada por Erg6p, C-24 metiltransferasa, es particularmente interesante ya que es un paso específico de la biosíntesis de ergosterol, y no de colesterol, por lo que es posible que confiera alguna función particular en levaduras (Daum et al., 1998).

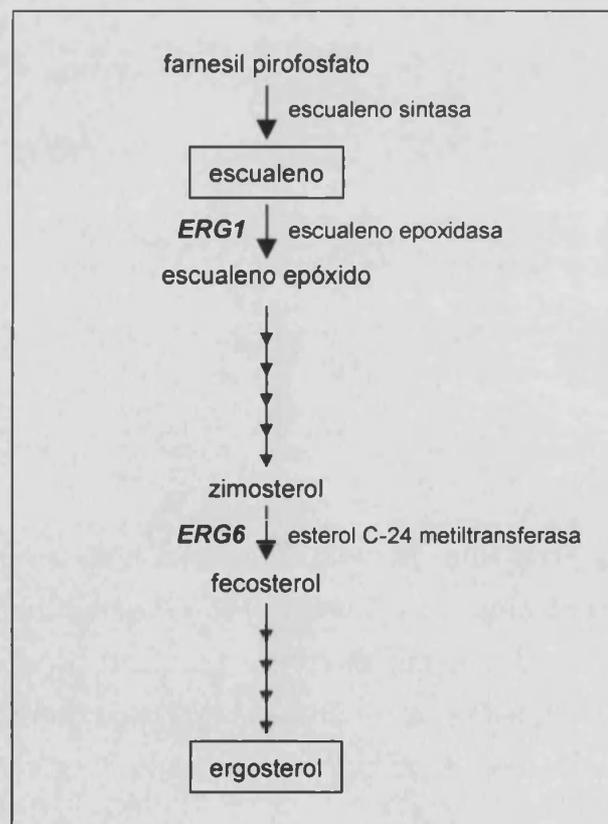


Figura 16: Segundo tramo de la ruta de biosíntesis de ergosterol. Esta etapa comienza a partir de farnesil pirofosfato y finaliza con la síntesis de ergosterol.

1.2.1.- Determinación de niveles de ergosterol en cepas que sobre-expresan el gen *ERG1*.

Como se ha comentado en la introducción de este apartado la enzima escualeno epoxidasa utiliza como sustrato escualeno. Dado que la sobre-expresión del primer enzima de la ruta de biosíntesis de ergosterol (Erg10p) no produce un aumento en la síntesis de ergosterol en la célula, pero sí una acumulación del metabolito intermediario, escualeno, decidimos sobre-expresar el gen *ERG1* así como *ERG1* y *ERG10* conjuntamente y estudiar el efecto que poseen sobre la síntesis de ergosterol.

La sobre-expresión de *ERG1* mediante la transformación de la cepa W303-1A con un plásmido multicopia aumenta significativamente los niveles de RNA mensajero de este gen en las células (figura 17).

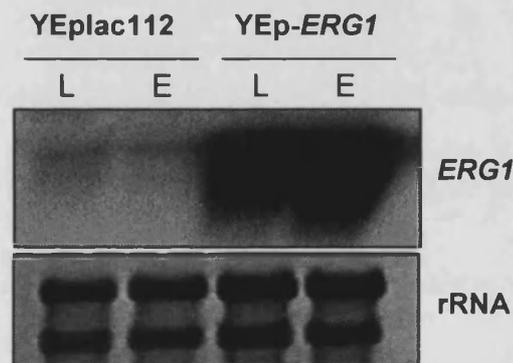


Figura 17: Detección de la expresión del gen *ERG1* mediante *northern blot*. Se crecieron células de la cepa W303-1A transformadas con el plásmido control YEplac112 y sobre-expresantes del gen *ERG1*, transformadas con el plásmido YEp-*ERG1* en medio mínimo y se recogieron nuestras en fase logarítmica (L) y estacionaria (E). Se utilizaron 10 µg de RNA total en el análisis por *northern blot*. La digestión con el enzima *EcoRV* de la ORF del gen *ERG1* clonada en el vector pGemT-easy libera un fragmento de 520 pb que se utilizó como sonda tras ser marcado con [α^{32} P]-dCTP.

Los niveles de ergosterol y escualeno se determinaron mediante HPLC utilizando una columna de fase inversa C-18 y β -sitosterol como patrón interno.

Capítulo II

La sobre-expresión del gen *ERG1* no produce, como cabría esperar, un aumento en la cantidad de ergosterol presente en las membranas celulares (figura 18). Curiosamente, la sobre-expresión de *ERG1* mantiene iguales los niveles de escualeno independientemente de la fase de crecimiento, en contraposición a lo observado para la cepas control, W303-1A y JRY4145 (ver figuras 12C y 12D), en las que el escualeno se acumula en fase estacionaria, así, en fase logarítmica los niveles de escualeno presentes en el sobre-expresante de *ERG1* son superiores a los de la cepa control.

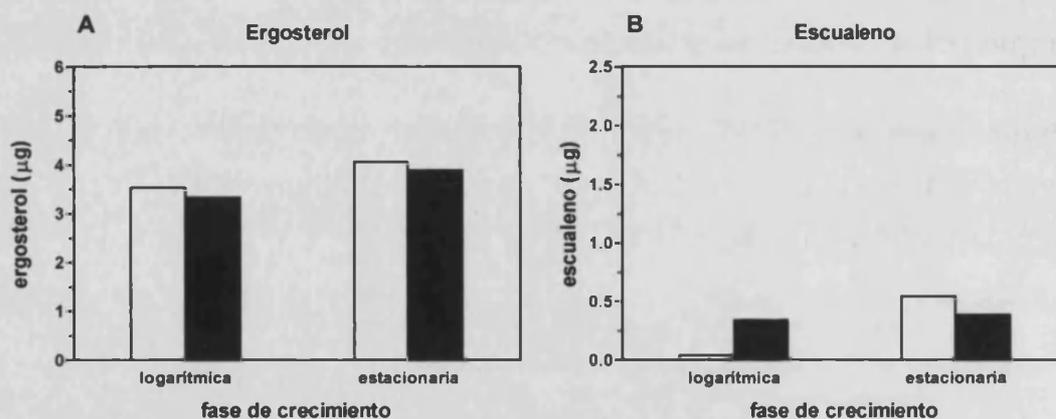


Figura 18: Niveles de ergosterol y escualeno en células sobre-expresantes del gen *ERG1*. Se midieron los niveles de ergosterol (A) y escualeno (B) mediante HPLC de células de la cepa W303-1A transformadas con el plásmido YEp-*ERG1* (barras negras) y con el plásmido control YEplac112 (barras blancas) crecidas en medio mínimo suplementado con las correspondientes auxotrofías hasta fase logarítmica y fase estacionaria.

La sobre-expresión del gen *ERG1* junto con el gen *ERG10* (figura 19) anula la acumulación de escualeno que se produce (figura 19-B), especialmente en fase estacionaria, cuando se sobre-expresa sólo el gen *ERG10* en la cepa W303-1A (ver figura 12-C). Sin embargo, esta disminución en los niveles del metabolito intermediario, no se traduce en un aumento de la cantidad de ergosterol sintetizado (figura 19-A).

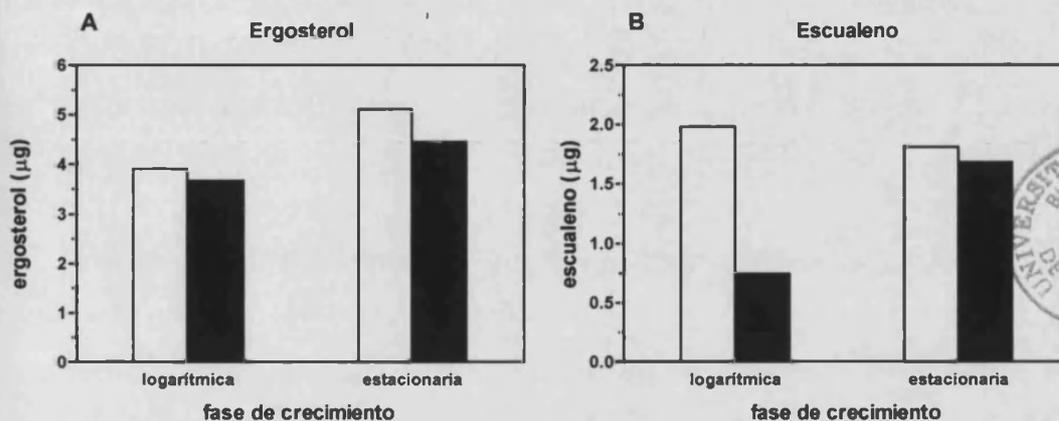


Figura 19: Niveles de ergosterol y escualeno en sobre-expresantes de los genes *ERG1+ERG10*. Se midieron los niveles de ergosterol (A) y escualeno (B) mediante HPLC de células de la cepa W303-1A transformadas con los plásmidos YEp-*ERG1*+YEp-*ERG10* (barras negras) o con los plásmidos control YEplac112+YEplac195 (barras blancas) crecidas en medio mínimo suplementado con las correspondientes auxotrofías hasta fase logarítmica y fase estacionaria.

El intento de forzar el desarrollo del segundo tramo de biosíntesis de ergosterol, mediante la sobre-expresión de la escualeno epoxidasa, no consigue incrementar los niveles intracelulares de ergosterol, apuntando de nuevo este resultado a una estricta regulación de la ruta.

En resumen, la sobre-expresión de las enzimas acetoacetyl-CoA tiolasa, codificada por el gen *ERG10* y/o escualeno epoxidasa, codificada por el gen *ERG1*, no modifica los niveles de ergosterol presentes en las membranas celulares; al sobre-expresar *ERG10* o *ERG1* en la cepa W303-1A, se ha detectado la acumulación de escualeno, el primer compuesto sintetizado en el segundo tramo de biosíntesis de ergosterol, esta acumulación desaparece si sobre-expresamos en la misma cepa los genes *ERG1+ERG10*.

Respecto a la regulación de la enzima escualeno epoxidasa (Erg1p), se ha descrito que mutaciones en los genes que catalizan las primeras reacciones de la ruta, provocan un aumento en su actividad, indicando que es un enzima esencial de esta ruta y que cataliza probablemente la reacción limitante en la biosíntesis de ergosterol (M'Baya *et al.*, 1989). La inhibición de las últimas enzimas de la ruta de biosíntesis de ergosterol, provoca un aumento en la expresión del gen *ERG1*, lo cual sugiere que este gen está regulado positivamente a nivel de transcripción por la disminución del nivel intracelular

Capítulo II

de ergosterol (Leber *et al.*, 2001). Así, el paso catalizado por la enzima escualeno epoxidasa está regulado tanto a nivel de actividad enzimática como de expresión génica. Sin embargo, cuando se intentan incrementar los niveles de ésta enzima, la célula responde manteniendo los niveles de ergosterol aproximadamente constantes, coincidiendo con los resultados de Jahnke y Klein (1983), estos autores describen un aumento en la actividad de la escualeno epoxidasa de dos veces en condiciones de oxigenación pero sólo un ligero aumento en la síntesis de ergosterol.

1.2.2.- Efecto sobre el crecimiento a bajas temperaturas y la supervivencia tras congelación-descongelación de la sobre-expresión de *ERG1* y *ERG1+ERG10*.

A continuación, se analizó si la sobre-expresión del gen *ERG1* así como la doble sobre-expresión *ERG1+ERG10* tenían algún efecto sobre el crecimiento a bajas temperaturas, para ello, se realizó un seguimiento del crecimiento a 15°C en medio líquido de las cepas sobre-expresantes. Los resultados muestran que ni la sobre-expresión del gen *ERG1* (figura 20-A) ni la de los genes *ERG1* y *ERG10* (figura 20-B) conjuntamente, mejora significativamente el crecimiento de estas cepas respecto a sus controles en las mismas condiciones de crecimiento. Así, la cepa sobre-expresante del gen *ERG1* posee un tiempo de generación 20 minutos menor a la cepa transformada con el plásmido control. En el caso de la cepa sobre-expresante de *ERG1+ERG10* crece con un tiempo de generación 40 minutos mayor que su control.

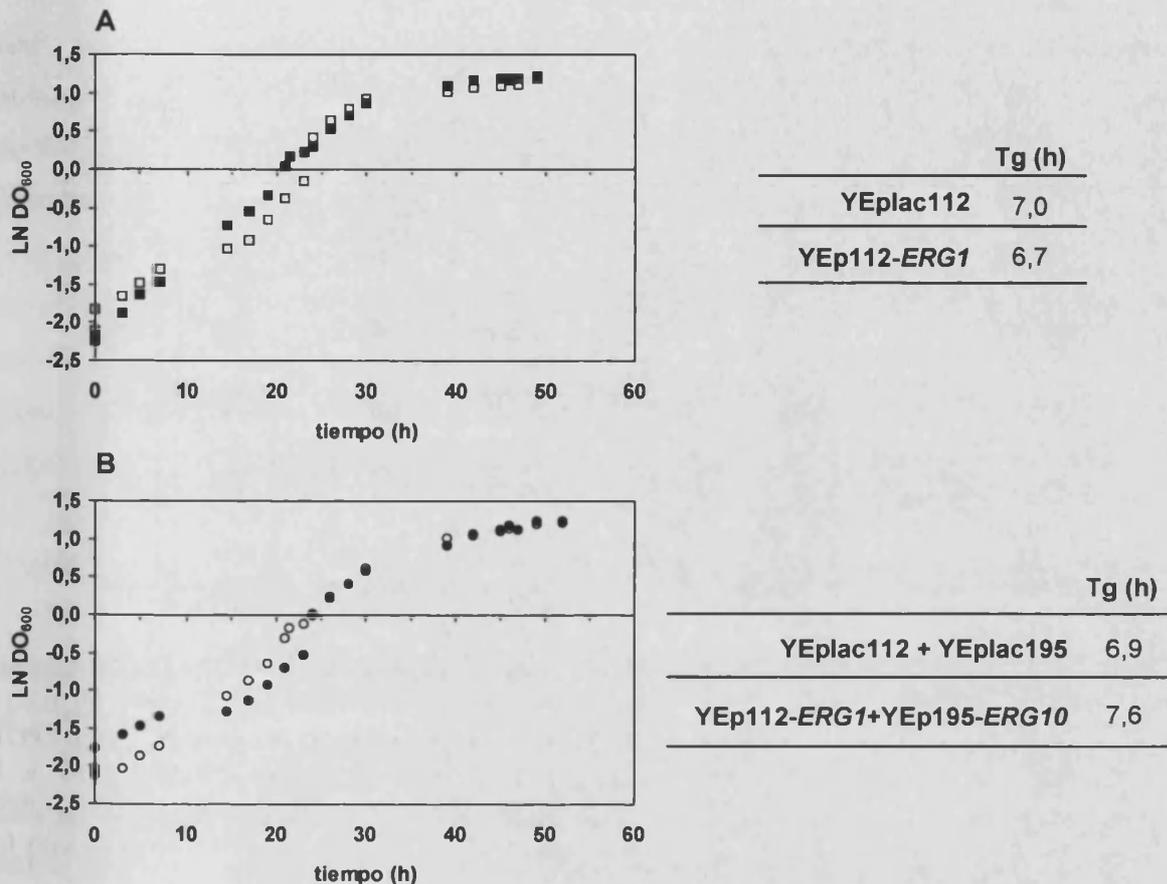


Figura 20: Crecimiento en medio líquido a 15°C de cepas sobre-expresantes del gen *ERG1* y *ERG1+ERG10*. Las células de la cepa W303-1A se crecieron en medio mínimo suplementado con los correspondientes requerimientos. (A) Células transformadas con el plásmido control YEplac112 (cuadrados blancos) y sobre-expresantes de *ERG1*, YEp-*ERG1* (cuadrados negros). (B) Células control transformadas con los plásmidos YEplac112 y YEplac195 (círculos blancos) y sobre-expresantes de *ERG1+ERG10*, YEp-*ERG1+YEp-ERG10* (círculos negros). Los tiempos de generación calculados para a partir de las curvas de crecimiento se muestran en el interior de las gráficas.

Respecto a la supervivencia tras congelación-descongelación de las cepas sobre-expresantes del gen *ERG1*, o *ERG1* junto con el gen *ERG10*, se analizó por goteos el crecimiento de estas cepas tras haber sido congeladas a -20°C durante cinco días, ([figura 21](#)).

Los resultados muestran que la viabilidad disminuye tras cinco días de congelación tanto para la cepa control como la cepa sobre-expresante del gen *ERG1* o *ERG1+ERG10*. Por lo tanto, a diferencia de lo que sucede al sobre-expresar sólo el gen *ERG10*, la sobre-expresión de los genes *ERG1* o *ERG1+ERG10*, no mejora la viabilidad de las células tras congelación.

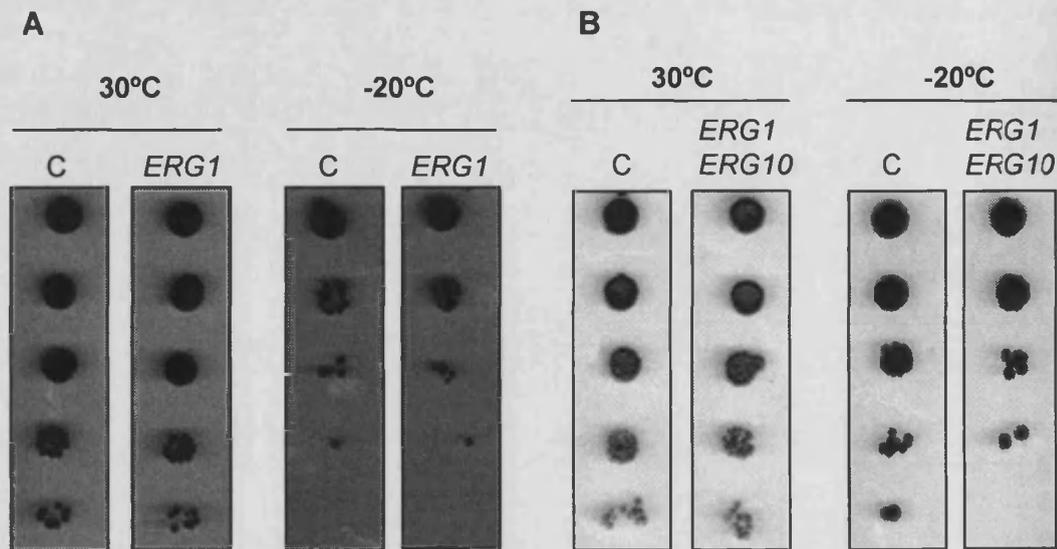


Figura 21: Crecimiento de células sobre-expresantes del gen *ERG1* o *ERG1+ERG10* tras ser sometidas a congelación y descongelación. Se crecieron células de la cepa W303-1A transformadas con el plásmido control (YEplac112) y sobre-expresantes del gen *ERG1* (YEplac-*ERG1*) (A), hasta fase logarítmica o células sobre-expresantes de los genes *ERG1+ERG10* y la correspondiente cepa control (YEplac112+YEplac195). Tras cinco días de congelación a -20°C las células se descongelaron y se gotearon en placas de medio mínimo suplementado con los correspondientes requerimientos de la cepa.

En resumen, la modificación del metabolismo de biosíntesis de ergosterol mejora la viabilidad tras congelación sólo de las células que sobre-expresan el gen *ERG10*. Sin embargo, la sobre-expresión de *ERG1* o ambos genes *ERG1+ERG10* no modifica la viabilidad celular tras congelación.

2.- Metabolismo de ácidos grasos. Importancia de las desaturasas en la respuesta a frío.

Como se ha comentado en la introducción, la membrana plasmática es una estructura crítica para la supervivencia de las células cuando son sometidas a bajas temperaturas así como durante los procesos de congelación-descongelación. El descenso en la temperatura produce un cambio de fase en la membrana, que pasa de su estado líquido-cristalino habitual a estado gel, alterándose varias funciones celulares. Los fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos insaturados poseen puntos de fusión más bajos y mayor flexibilidad, muchos organismos han adaptado mecanismos que compensan la transición de

Capítulo II

fase, aumentando el número de insaturaciones de las cadenas laterales de los ácidos grasos, manteniendo así una adecuada fluidez de la membrana a pesar de la disminución en la temperatura (Hazel 1995). La capacidad de las células para modular el grado de insaturación en la membrana viene determinada principalmente por la acción de las desaturasas. *S. cerevisiae* posee una única desaturasa codificada por el gen *OLE1*, es una $\Delta 9$ desaturasa que actúa sobre los ésteres de ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0) rindiendo los ácidos grasos mono-insaturados palmitoleico (16:1) y oleico (18:1). Sin embargo, otros organismos poseen desaturasas capaces de introducir múltiples insaturaciones en las cadenas de ácidos grasos, así por ejemplo, las semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) son ricas en los ácidos grasos insaturados oleico (18:1) y linoleico (18:2), la enzima responsable de la desaturación de ácido oleico a linoleico es una $\Delta 12$ desaturasa codificada por el gen *FAD2* (Martínez-Rivas et al., 2001).

En este apartado presentamos los resultados del estudio de la relación existente entre la respuesta a frío y los efectos fisiológicos que posee la expresión heteróloga de desaturasas de girasol en la tolerancia a frío y congelación de *S. cerevisiae*.

2.1.- La mayor rigidez de la membrana mimetiza la respuesta celular producida por bajas temperaturas.

Se ha descrito que las bajas temperaturas provocan un aumento en la rigidez de la membrana plasmática. Con el fin de comprobar si la señal que desencadena la respuesta a estrés por frío está relacionada con el aumento en la rigidez de la membrana, hemos comparado, mediante *northern blot*, el nivel de expresión de tres genes, *OLE1*, *TIP1* y *DED1*, descritos previamente como inducidos por frío (Nakagawa et al., 2002; Kondo e Inouye 1991; Gong et al., 2002), en células expuestas a bajas temperaturas y tratadas con dimetil sulfóxido (DMSO), un agente químico que aumenta la rigidez de las membranas (Sangwan et al., 2002).

Capítulo II

La exposición de células de *S. cerevisiae* a 12°C induce la expresión de estos genes (figura 22). Tras el tratamiento con DMSO los niveles de expresión en los tres genes analizados son superiores a los que muestran en células crecidas a 30°C, siendo las concentraciones menores de DMSO las que producen una inducción mayor.

Este resultado indica que al menos en parte, la respuesta a bajas temperaturas de las células de levadura viene determinada directa o indirectamente por el grado de rigidez de la membrana plasmática.

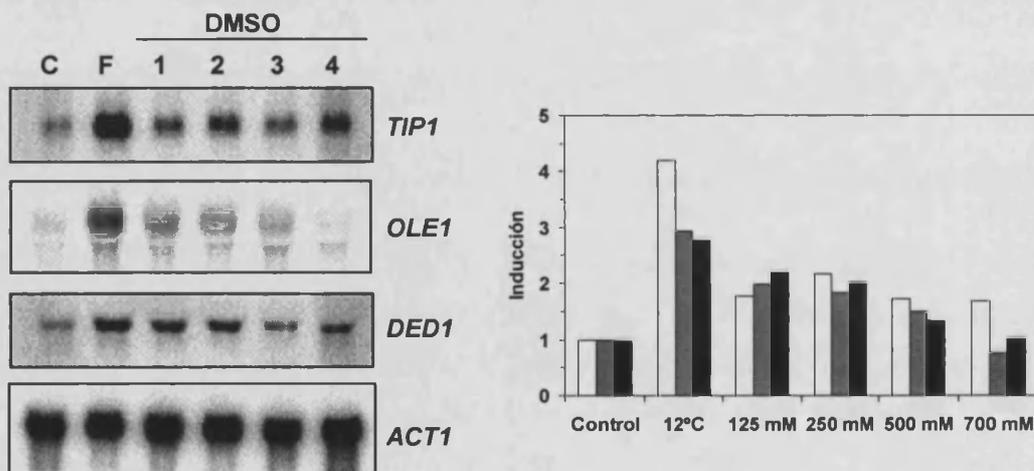


Figura 22: Análisis mediante *northern blot* de la expresión de los genes *OLE1*, *TIP1* y *DED1* a bajas temperaturas y tras el tratamiento con DMSO. Células de la cepa W303-1A de *S. cerevisiae* fueron crecidas a 30°C hasta fase logarítmica (C). El cultivo se dividió en alícuotas y las células fueron expuestas a 12°C (F) o tratadas con diferentes concentraciones de DMSO durante 1h, (1) 125mM, (2) 250 mM, (3) 500 mM, (4) 700 mM. El gráfico de barras representa los niveles de expresión para los genes *TIP1* (barras blancas), *OLE1* (barras grises) y *DED1* (barras negras) normalizados respecto al gen *ACT1* y relativos a la expresión en las células control.

2.2.- Expresión de dos isoformas de una $\Delta 12$ -desaturasa de girasol en *S. cerevisiae*.

El aumento en la rigidez de la membrana posee efectos deletéreos sobre las funciones celulares, como pueden ser, el agrupamiento de proteínas de membrana y reducción de la difusión lateral, la disminución en la actividad de

Capítulo II

enzimas asociadas a membrana y el efecto sobre los canales iónicos, transportadores transmembrana y la difusión pasiva.

Una alternativa para mejorar la tolerancia a frío y a congelación sería aumentar el número de insaturaciones en los ácidos grasos de los fosfolípidos que componen las membranas de *S. cerevisiae*. Con este fin, expresamos en *S. cerevisiae* dos isoformas de la $\Delta 12$ -desaturasa de girasol (*Helianthus annuus* L.) y analizamos sus efectos sobre la fisiología de la levadura.

El gen *FAD2* codifica una oleato desaturasa microsomal (1-acil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina $\Delta 12$ desaturasa); se han aislado y caracterizado tres secuencias que codifican el gen *FAD2* (Martínez-Rivas *et al.*, 2001), *FAD2-1* posee una expresión alta y exclusiva de embriones, mientras *FAD2-2* y *FAD2-3* se expresan más débilmente en todos los tejidos estudiados. Se seleccionaron las isoformas *FAD2-1* y *FAD2-3* para su expresión heteróloga en *S. cerevisiae*, utilizándose los plásmidos pVT102-U-*FAD2-1* y pVT102-U-*FAD2-3*, en los que la expresión de los genes *FAD2* está dirigida por el promotor del gen *ADH1* (cedidos por JM Martínez Rivas). La expresión de estos genes en *S. cerevisiae* se confirmó mediante *northern blot* en células crecidas en fase logarítmica o fase estacionaria ([figura 23](#)) detectándose una única banda de hibridación usando sondas correspondientes a estos genes. No se detectó ninguna señal en las células transformadas con el plásmido control YEplac195. La cuantificación de los resultados muestra que los niveles de RNA mensajero del gen *FAD2-3* son superiores a los del gen *FAD2-1*, tanto en fase logarítmica como fase estacionaria.

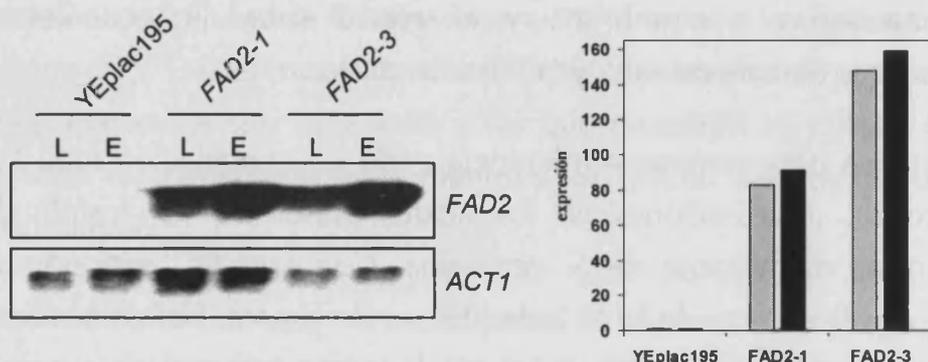


Figura 23: Expresión heteróloga de los genes *FAD2-1* y *FAD2-3* de girasol en *S. cerevisiae*. Se transformó cepa W303-1A con el plásmido control YEplac195 y los plásmidos que expresan los genes *FAD2*. La expresión de estos genes se detectó mediante *northern blot* utilizando como sonda estos genes, marcados con ^{32}P . El gráfico de barras muestra la cuantificación de la hibridación con los genes *FAD2* normalizada respecto a la expresión del gen *ACT1*.

2.3.- Composición de ácidos grasos en células de *S. cerevisiae* transformadas con los genes *FAD2*. Influencia de la temperatura en la composición de ácidos grasos.

Con el fin de determinar la funcionalidad de las desaturasas de girasol expresadas en *S. cerevisiae*, se analizó la composición en ácidos grasos de las células transformadas, crecidas a 30°C hasta fase estacionaria (tabla 7).

Tabla 7: Composición en ácidos grasos de células de *S. cerevisiae* transformadas con los genes *FAD2* crecidas a diferentes temperaturas.

Plásmido	Temperatura (°C)	Composición en ácidos grasos (%)						I.I.
		C16:0	C16:1	C16:2	C18:0	C18:1	C18:2	
YEplac195	30	20.1	33.5		10.5	35.8		0.71±0.02
	15	19.8	34.5		8.9	36.8		0.71±0.01
pVT-U-HaFAD2-1	30	20.2	30.3	1.57	10.8	29.1	7.9	0.8±0.01
	15	20.3	23.0	6.0	12.3	18.0	20.4	0.94±0.02
pVT-U-HaFAD2-3	30	21.5	27.1	5.2	12.0	15.7	18.5	0.94±0.04
	15	20.1	26.7	5.0	10.5	15.4	22.3	0.98±0.02

Células de la cepa W303-1A se transformaron con el plásmido control YEplac195 y los plásmidos que expresan los genes *FAD2-1* y *FAD2-3*. La composición en ácidos grasos de lípidos totales de las células crecidas a 30°C y 15°C se determinó mediante cromatografía de gases. Se muestran los índices de insaturación (I.I.) para cada cepa a ambas temperaturas.

Capítulo II

Sólo las células que expresan los genes *FAD2* poseen ácidos grasos poli-insaturados, palmitoléico (16:2) y linoleico (18:2), la cantidad de ácidos grasos mono-insaturados se reduce en estas cepas respecto a la transformada con el plásmido control (YEplac195). Esto indica que el enzima oleato desaturasa de girasol es funcional en las células de levadura y que actúa sobre los ácidos grasos mono-insaturados palmitoleico (16:1) y oleico (18:1)

Se ha descrito un aumento de la actividad desaturasa a bajas temperaturas (Martínez-Rivas et al., 2000). Con el fin de determinar si las bajas temperaturas modifican la composición en ácidos grasos, se analizaron células crecidas a 15°C hasta fase estacionaria. En células que expresan los genes *FAD2*, (tabla 7), la composición en ácidos grasos dienoicos es superior tras crecer a 15°C que a 30°C. Así, los índices de insaturación calculados para estas son superiores a 15°C que a 30°C mientras que no varían con la temperatura en la cepa control.

La actividad de las enzimas heterólogas expresadas en *S. cerevisiae* es superior a 15°C que a 30°C, sin embargo, la temperatura no afecta por igual a ambas desaturasas. En células transformadas con el gen *FAD2-1* la proporción de ácidos grasos dienoicos aumenta de un 9,5% a 30°C a un 26,4% a 15°C, mientras que en células transformadas con *FAD2-3* la diferencia en la proporción de ácidos grasos con dos insaturaciones varía de un 23,7% a 30°C a un 27,3% a 15°C. Aunque la actividad de *FAD2-3* varía menos de forma dependiente de la temperatura, la cantidad de insaturaciones introducidas por esta desaturasa es siempre superior a las conseguidas con el gen *FAD2-1*, así el índice de insaturación alcanzado en las células transformadas con *FAD2-3* es mayor que en las transformadas con *FAD2-1* tanto a 30°C como a 15°C.

2.4.- Crecimiento a bajas temperaturas y tolerancia a congelación-descongelación en células de *S. cerevisiae* transformadas con los genes *FAD2* de *H. annuus*.

Como se ha demostrado en el apartado anterior la expresión de los genes *FAD2* de girasol en *S. cerevisiae* produce un aumento en los índices de insaturación

Capítulo II

de los lípidos de membranas, siendo además el nivel de insaturación más elevado cuando las células se crecen a temperaturas bajas.

A continuación, estudiamos el efecto que posee el incremento en el grado de insaturación de la membrana sobre el crecimiento de la levadura a bajas temperaturas. Para ello se comparó, por goteos, la capacidad de crecimiento a 10°C de células transformadas con los plásmidos pVT102-U-*FAD2-1* y pVT102-U-*FAD2-3* frente a la cepa control, no siendo posible detectar ninguna diferencia (datos no mostrados). Posteriormente se realizó un seguimiento del crecimiento a 15°C y 12°C en medio líquido de estas mismas cepas, sin encontrarse diferencias en la tasa de crecimiento de las células transformadas con los genes *FAD2* respecto al control (datos no mostrados). Así, la expresión del enzima oleato desaturasa de girasol en células de levadura y el consiguiente incremento en las insaturaciones en sus membranas, no confiere ninguna ventaja relativa al crecimiento a bajas temperaturas en las condiciones probadas en este trabajo.

Se determinó si la expresión de la desaturasa de girasol, mejora la supervivencia de las células tras ser almacenadas en congelación en medio LDS (*liquid dough system*), que mimetiza las características de una masa panaria (figura 24).

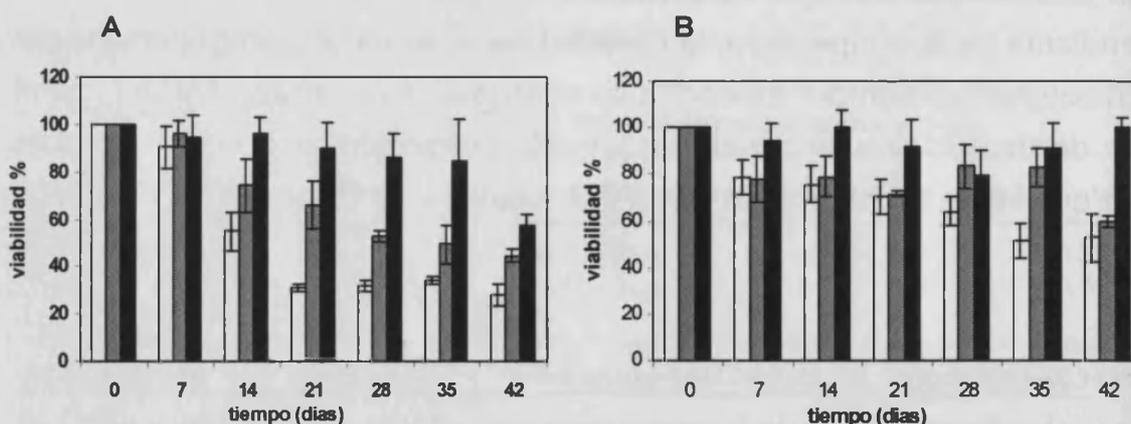


Figura 24: Viabilidad tras congelación de células de *S. cerevisiae* que expresan los genes *FAD2* de *H. annuus*. Células de la cepa W303-1A transformadas con el plásmido YEplac195 (barras blancas) y que expresan los genes *FAD2-1* (barras grises) o *FAD2-3* (barras negras) se crecieron en medio mínimo a 30°C (A) y a 15°C (B) hasta fase estacionaria. La viabilidad se calculó como porcentaje de células vivas tras la congelación y descongelación en periodos de tiempo de siete días. Los resultados son medias de tres experimentos independientes.

Capítulo II

En general, la viabilidad de las células que expresan los genes *FAD2* crecidas tanto a 30°C como a 15°C es mayor que la de las células control durante todo el tiempo de almacenamiento. Los resultados también muestran que a ambas temperaturas las células que expresan el gen *FAD2-3* mantienen una mayor viabilidad tras la congelación que las células que expresan el gen *FAD2-1*. Estos resultados correlacionan un mantenimiento más elevado de la viabilidad tras el almacenamiento a -20°C con un mayor índice de insaturación (tabla 7), el cual se determinó que era superior para las células que expresan el gen *FAD2-3*.

Los resultados muestran la misma tendencia para las células crecidas a 30°C y a 15°C, aunque existen diferencias notables cuando nos fijamos en los porcentajes de supervivencia a tiempos largos de almacenamiento, por ejemplo, tras 42 días de almacenamiento en congelación las células crecidas a 30°C poseen unos porcentajes de viabilidad del 28%, 44% y 58% para las células control, y las que expresan *FAD2-1* y *FAD2-3* respectivamente, mientras que para las células crecidas a 15°C éstos porcentajes son más elevados siendo del 52% para las células control, el 60% para las células que expresan el gen *FAD2-1* y alrededor del 100% para las que expresan el gen *FAD2-3*. Así, la viabilidad se mantiene más elevada en las células que han crecido previamente a 15°C.

Cabe destacar que para las células control, se ha detectado también una mayor viabilidad cuando las células se han crecido a 15°C que cuando se crecen a 30°C, lo cual sugiere que la protección contra el proceso de congelación-descongelación no es sólo debido a la expresión de la $\Delta 12$ -desaturasa de girasol en la levadura e indica que existen otros factores que protegen a las células del estrés por congelación-descongelación y que se adquieren cuando las células han sido expuestas previamente a bajas temperaturas.

2.5.- Análisis global de la expresión en células de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan el gen *FAD2-3* de *Helianthus annuus*.

La disminución en la fluidez de la membrana es uno de los primeros efectos que se detectan a bajas. En la cianobacteria *Synechocystis* la percepción de

Capítulo II

bajas temperaturas, induce la expresión de desaturasas (Suzuki *et al.*, 2000). El cambio en la fluidez de la membrana parece ser la primera señalización celular de la disminución de la temperatura ambiental, ya que la hidrogenación catalítica de ácidos grasos de membrana, mimetiza la inducción de la transcripción del gen *desA* observada a bajas temperaturas (Vigh *et al.*, 1993). Más recientemente se ha demostrado que la expresión de genes inducida por frío en *Synechocystis* se incrementa al aumentar la rigidez las membranas mediante la disrupción de desaturasas (Inaba *et al.*, 2003).

En *S. cerevisiae*, la alteración de la composición en ácidos grasos de la membrana mediante la expresión el gen *OLE1* ($\Delta 9$ desaturasa) bajo el control de diferentes promotores, induce la transcripción de genes de respuesta a choque térmico (Carratu *et al.*, 1996). Estos resultados sugieren que la composición en ácidos grasos de la membrana está implicada en la percepción de cambios en la temperatura y que la modificación de su estado físico genera una señal que afecta a la transcripción.

2.5.1.- Hibridación de filtros de DNA de *S. cerevisiae*.

Como se ha demostrado previamente, la expresión de la desaturasa Fad2-3p de *H. annuus* modifica la composición de la membrana de *S. cerevisiae* enriqueciéndola en ácidos grasos poli-insaturados. Con el fin de determinar cómo afecta este cambio físico en la membrana a la expresión génica de *S. cerevisiae*, hemos realizado un análisis global de la expresión de células de *S. cerevisiae* que expresan el gen *FAD2-3*.

El análisis de los resultados obtenidos tras la hibridación de los filtros mostró que 62 genes, el 1% aproximadamente del genoma de *S. cerevisiae*, modifican su expresión en las células que expresan el gen *FAD2-3* respecto a las células control, en un factor superior a 2. En 42 de los genes la expresión aumenta en las células que expresan el gen *FAD2-3*, mientras que sólo se reduce en 21 genes.

Los genes inducidos se clasificaron en base a su función. Llama la atención la inducción de varios genes relacionados con la regulación de los niveles

Capítulo II

intracelulares de ATP mediante la actividad de ATPasa mitocondrial y un transportador ATP/ADP (tabla 8).

Tabla 8: Genes de regulación de los niveles de ATP inducidos en células que expresan el gen *FAD2-3*.

Función	ORF	Gen	Ind.	Descripción
Regulación de niveles de ATP	YBR039w	ATP3	3,8	Subunidad reguladora del complejo ATPasa
	YML081c-A	ATP18	2,6	Subunidad de la ATPasa mitocondrial.
	YDL181w	INH1	3,5	Inhibidor de la ATPasa mitocondrial
	YGR008c	STF2	2,4	Factor estabilizador de la ATPasa.
	YBR085w	AAC3	3,1	Transportador ATP/ADP

ATP3, codifica la subunidad γ de la ATPasa mitocondrial, la cual posee una doble función, estabilizar el complejo F_1-F_0 y regular la actividad ATP hidrolasa/sintasa (Paul *et al.*, 1994). *ATP18*, codifica la subunidad i de la ATPasa mitocondrial, estudios realizados con el mutante nulo sugieren que su función no es estructural si no que está relacionada con la fosforilación oxidativa (Vaillier *et al.*, 1999).

INH1, codifica una proteína inhibidora de la ATPasa. Su función es inhibir la hidrólisis de ATP cuando el potencial de membrana decae (Ichikawa 1990). La función de *Inh1p* parece estar muy relacionada con el producto del gen *STF2*, el cual codifica un factor estabilizador de la ATPasa mitocondrial que se une a la subunidad F_0 facilitando la unión del inhibidor *Inh1p* a F_1 . Se ha descrito que en mutantes *sfh2* la pérdida del potencial de membrana induce la hidrólisis de ATP (Yoshida *et al.*, 1990).

AAC3, codifica uno de los tres transportadores ATP/ADP conocidos de la membrana mitocondrial interna. El ATP es sintetizado en la matriz mitocondrial, sin embargo, la mayoría del ATP es consumido en el citoplasma. Debido a que la membrana mitocondrial interna es impermeable a ATP, las proteínas transportadoras son necesarias para que el ATP salga de la mitocondria, mediante una translocación ATP/ADP.

Estos resultados muestran, que la célula responde al aumento en las insaturaciones en la membrana, promoviendo la síntesis de ATP, inhibiendo su hidrólisis y facilitando su transporte al citoplasma. Esta situación podría reflejar

Capítulo II

una depleción de ATP en el citoplasma y/o por una disminución en el potencial de las membranas celulares. Una situación similar se ha descrito por Gasch *et al.* (2000); tras realizar un análisis global de la expresión de células sometidas a choque térmico, estos autores explican sus resultados argumentando una depleción de ATP en el citoplasma causada por la elevada actividad de las carabinas moleculares en el plegamiento de proteínas.

Otro grupo de genes que se inducen en las células que expresan el gen *FAD2-3*, están relacionadas con gluconeogénesis y el metabolismo respirativo (tabla 9)

Tabla 9: Genes con función en respiración y gluconeogénesis, inducidos en células que expresan el gen *FAD2-3*.

Función	ORF	Gen	Ind.	Descripción
Respiración y gluconeogénesis	YGL191w	COX13	6,0	Citocromo-C oxidasa cadena VIa
	YMR256c	COX7	4,0	Citocromo-C oxidasa cadena VII.
	YMR280c	CAT8	2,2	Factor transcripcional implicado en gluconeogénesis.

La inducción de genes implicados en respiración y en la utilización de fuentes de carbono alternativas a la glucosa ha sido descrita también para células sometidas a un choque térmico (Gasch *et al.*, 2000).

La gluconeogénesis es la ruta metabólica capaz de sintetizar glucosa-6P a partir de otras fuentes de carbono. El gen *CAT8* codifica un factor transcripcional cuya fosforilación es necesaria para la activación de los genes gluconeogénicos (Randez-Gil *et al.*, 1997).

Los genes COX codifican subunidades del complejo Citocromo-C oxidasa, el cual es el último componente la cadena de transporte de electrones y cataliza la reducción de O₂ a H₂O, además de bombear protones al espacio periplásmico contribuyendo a la generación del potencial de membrana. El gen *COX13*, codifica la cadena VIa de este complejo. Se ha descrito que su función es mediar en la activación del complejo IV, cuando la fuerza iónica disminuye por debajo de niveles fisiológicos normales (Beauvoit *et al.*, 1999). Recientemente se ha descrito la inducción de los genes *COX5B* y *COX6* por choque térmico (Causton *et al.*, 2001).

Capítulo II

Se ha demostrado que un estrés térmico genera estrés oxidativo, el cual puede ser en último término, el causante de la letalidad del choque térmico (Davidson *et al.*, 1996). La inducción de los genes COX podría tener una función protectora contra el estrés oxidativo debido a la reacción de reducción de O₂ a H₂O que catalizan.

Entre los daños que produce el estrés oxidativo generado tras un choque térmico se encuentran mutaciones en el DNA y una alta frecuencia de recombinación. Dos de los genes inducidos por la expresión de la desaturasa Fad2-3p en *S. cerevisiae* poseen una función relacionada con la reparación de DNA (tabla 10).

Tabla 10: Genes inducidos en células que expresan el gen FAD2-3 con función en reparación de DNA.

Función	ORF	Gen	Ind.	Descripción
Reparación de DNA	YDR004w	RAD57	3,7	Recombinación y reparación de DNA.
	YHR120w	MSH1	4,4	Recombinación y reparación de DNA.

Del resto de genes inducidos por la expresión de esta desaturasa (tabla 11), caben destacar, genes de respuesta a estrés, entre los que se encuentran la proteína Hsp30p cuya función es modular la actividad de la H⁺ATPasa de membrana plasmática, disminuyendo su velocidad tras un choque térmico (Braley y Piper 1997), y un factor transcripcional (Mga1p) de respuesta a choque térmico. Otro grupo de genes inducidos posee una función relacionada con el procesamiento de RNA, la inducción de genes con esta función se ha observado recientemente en respuesta a estrés por calor (Causton *et al.*, 2001).

Tabla 11: Genes inducidos en células que expresan el gen FAD2-3 relacionados con varias funciones celulares.

Función	ORF	Gen	Ind.	Descripción
Metabolismo de aminoácidos	YCL018w	LEU2	8,7	β-isopropil malato deshidrogenasa
	YDL131w	LYS21	2,9	Homocitrato sintasa
Metabolismo de hidratos de carbono	YFR015c	GSY1	4,0	UDP-glucosa glucosiltransferasa. Biosíntesis de glucógeno.
	YJL153c	INO1	2,5	Myo-inositol fosfato sintasa
Respuesta a estrés	YCR021c	HSP30	3,3	Disminuye la velocidad de la ATPasa tras choque térmico.
	YGR249w	MGA1	8,5	Similar a "heat shock transcription factors"
Procesamiento de RNA	YGL044c	RNA15	2,3	Procesamiento de pre-mRNA
	YGR075c	PRP38	3,0	Procesamiento de pre-mRNA
	YHR065c	RRP3	2,6	Procesamiento de pre-rRNA

Capítulo II

Organización celular	YER150w	<i>SPI1</i>	2,5	Organización pared celular
	YGL029w	<i>CGR1</i>	3,7	Biogénesis de ribosomas
	YIL136w	<i>OM45</i>	3,3	Proteína de membrana mitocondrial externa.
Otras	YOR003w	<i>YSP3</i>	6,5	Degradación de proteínas. Proteasa tipo subtilisina
	YNL325c	<i>FIG4</i>	3,7	Similar a inositol fosfatasa y a proteínas de secreción.
	YIL080w	-	6,0	Similar a TY3B (elemento transponible)
	YDL240w	<i>LRG1</i>	3,5	Activador de la GTPasa
	YCR027c	<i>RHB1</i>	2,8	Regulación del crecimiento.
Función desconocida	YDR381c-A	-	5,4	Desconocida
	YER033c	<i>ZRG8</i>	7,3	Desconocida
	YER188w	-	2,5	Similar a RNA replicasa viral.
	YGL007w	-	9,0	Desconocida
	YGL037c	<i>PNC1</i>	2,1	Similar a piracinamidasa/nicotinamidasa
	YKL053w	-	3,4	ORF cuestionable.
	YML131w	-	2,2	Similar a leucotrieno hidroxideshidrogenasa de humanos.
	YMR068w	-	4,3	Similar a TF de ratón.
	YMR135c	-	2,7	Desconocida
	YNL134c	-	3,4	Desconocida
	YNL206c	<i>RTT106</i>	5,8	Similar a proteínas de reconocimiento de estructuras.
	YOR088w	-	5,5	Similar a canal de entrada de Ca ²⁺ en humanos.
	YPR037c	<i>ERV2</i>	2,7	Desconocida
YPR114w	-	2,3	Similar a YJR116w	

Del total de genes que modifican su expresión en las células que expresan *FAD2-3*, solo un pequeño número reduce su abundancia (tabla 12).

Tabla 12: Clasificación de genes reprimidos en células que expresan el gen *FAD2-3*.

Función	ORF	Gen	Rep.	Descripción
Transporte de proteínas	YJL205c-A	<i>NCE101</i>	-2,9	Ruta de exocitosis y secreción de proteínas
	YKL209c	<i>STE6</i>	-4,2	Transportador (tipo ABC) del factor α .
Gemación	YDL151c	<i>BUD30</i>	-4,5	Selección del sitio de selección de la gema
	YNL271c	<i>BNI1</i>	-3,8	Regulador de la gemación.
Transcripción	YML114c	<i>TAF8</i>	-4,6	Factor asociado a TBP (TATA box binding protein)
	YBL005w	<i>PDR3</i>	-2,5	"pleiotropic drug resistance regulatory protein"
Síntesis de proteínas	YGR165w	<i>MRPS35</i>	-3,1	Proteína ribosomal mitocondrial
Metabolismo de hidratos de carbono	YHR210c	-	-2,4	Similar a UDP-glucosa-4-epimerasa
Ciclo celular	YOR298w	<i>MUM3</i>	-2,8	Necesario para la meiosis.
Función desconocida	YAR033w	<i>FUN59</i>	-2,2	Desconocida
	YAL014c	<i>FUN34</i>	-3,4	Similar a syntaxina de mamíferos
	YCR022c	-	-3,3	Desconocida
	YIL090w	-	-3,1	Desconocida
	YJL051w	-	-5,2	Desconocida
	YJL084c	-	-3,5	Desconocida

YKL030w	-	-3,4	ORF cuestionable
YKR015c	-	-2,8	Desconocida
YLR095c	IOC2	-3,5	Similar a proteína de <i>C. elegans</i>
YLR426w	-	-4,1	Similar a proteína transportadora de grupos acilo de <i>E. coli</i>
YLL037w	-	-3,1	Similar a proteína de humanos
YER135c	-	-2,4	Desconocida

Cabe destacar la represión en los genes implicados en gemación (*BUD30* y *BNI1*), lo cual indica una parada en el crecimiento celular, y en los genes implicados en rutas de secreción de proteínas, *NCE101* y *STE6*.

Estos resultados muestran que la expresión de una desaturasa de *H. annuus* en *S. cerevisiae* afecta la expresión génica de la levadura. Los genes cuya expresión se ve modificada, en parte, coinciden con genes de respuesta a choque térmico, sugiriendo que un incremento en la fluidez de la membrana mimetiza la situación fisiológica que se produce cuando la célula se encuentra en esta situación de estrés.

3.- Caracterización del crecimiento y la aclimatación a bajas temperaturas de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii*.

Todos los organismos vivos poseen la capacidad de responder a modificaciones en la temperatura ambiente y de hacer frente a las nuevas condiciones ambientales (Groß 1999). Se ha demostrado que la exposición a un estrés leve puede generar una mejor resistencia a un estrés letal, fenómeno al cual se denomina adaptación. Así por ejemplo, para bacterias se ha descrito que la letalidad causada por congelación disminuye si éstas han sido previamente incubadas a una temperatura sub-óptima (Panoff *et al.*, 1995; Thammavongs *et al.*, 1996).

En este apartado del trabajo describimos en primer lugar la relación entre la temperatura y la tasa de crecimiento para dos levaduras de diferente especie, *Saccharomyces cerevisiae* (cepa CEN.PK) y *Torulaspora delbrueckii* (cepa IGC5321). En segundo lugar estudiamos si la exposición a temperaturas sub-

Capítulo II

óptimas mejora la tasa de crecimiento a bajas temperaturas y finalmente si el estrés generado por frío mejora la supervivencia de éstas células a un estrés por congelación.

3.1.- Modelización del crecimiento a diferentes temperaturas de las levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*.

Las levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* difieren en varias características pero la más significativa es, la especial tolerancia a frío y congelación que poseen algunas cepas de *T. delbrueckii* como IGC5321 (Almeida y Pais 1996b; Hernández-López 2003a).

En Microbiología, se ha aplicado tradicionalmente la ley de Arrhenius para describir el efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano, modificando la ecuación de manera que la energía de activación (E_a) es sustituida por una temperatura característica (k). Así la ecuación quedaría como $\mu = A \cdot e^{-k/RT}$, donde μ es la tasa de crecimiento. Sin embargo otros autores consideran que la aplicación de la ley de Arrhenius al crecimiento bacteriano respecto a la temperatura no es adecuada, así, Ratkowsky *et al.*, (1982) han propuesto un nuevo modelo que define la dependencia del crecimiento con la temperatura, cuando ésta es inferior a la temperatura óptima. La ecuación propuesta por Ratkowsky establece una relación lineal entre la raíz cuadrada de la tasa de crecimiento (r) y la temperatura (T): $\sqrt{r} = b(T - T_0)$, donde b es la pendiente de la recta y T_0 es una temperatura conceptual, sin significado metabólico, la cual es una propiedad intrínseca del organismo. Esta ecuación fue ampliada posteriormente con el fin de abarcar un rango de temperaturas más amplio, en el que se representara el crecimiento del microorganismo, no sólo a temperaturas por debajo de la óptima, sino también por encima (Ratkowsky *et al.*, 1983). Así, se propuso un nuevo modelo de regresión no lineal:

$$\sqrt{r} = b(T - T_{\min}) \{1 - e^{[c(T - T_{\max})]}\} \quad \text{Ecuación [1]}$$

donde T_{\min} y T_{\max} son las temperaturas mínima y máxima, respectivamente, a las cuales el crecimiento es nulo y (c) es un parámetro adicional que permite al modelo ajustarse a las temperaturas por encima de la óptima de crecimiento. La T_{\min} puede ser una temperatura conceptual, con significado metabólico para termófilos, ya que la ecuación sólo es válida si la actividad del agua no cambia debido a la formación de hielo. Este modelo se aplicó con éxito en al menos 30 especies diferentes de bacterias.

En este trabajo hemos aplicado esta ecuación a la caracterización del crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* en un amplio rango de temperaturas. Se realizó un seguimiento del crecimiento de ambas levaduras en YPD a temperaturas comprendidas entre 4°C y 40°C. El crecimiento se midió como aumento de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en función del tiempo y se representó para cada temperatura en una gráfica logarítmica, $\ln DO_{600} = f(t)$. A partir de la pendiente de las curvas de crecimiento en su tramo lineal, calculamos la tasa de crecimiento (r) para ambas levaduras a cada temperatura. La raíz cuadrada de las tasas de crecimiento (\sqrt{r}) representadas en función de la temperatura (figura 25), genera curvas a las cuales se ha aplicado el modelo de la Ratkowsky (ecuación [1]) para calcular los parámetros característicos del crecimiento de cada levadura.

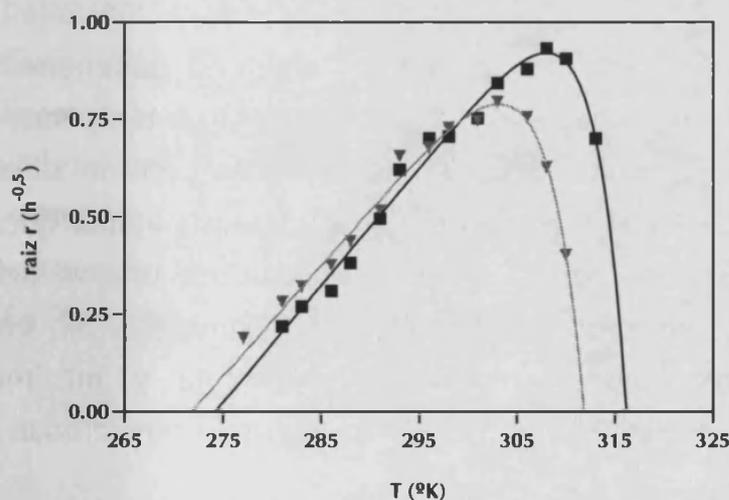


Figura 25: Representación de Ratkowsky de la relación entre el crecimiento y la temperatura. Ajuste según el modelo de Ratkowsky de los datos experimentales del crecimiento de *S. cerevisiae* (cuadrados negros) y *T. delbrueckii* (triángulos grises) a diferentes temperaturas.

Capítulo II

El ajuste de los datos experimentales a este modelo se realizó mediante una regresión no lineal por el método de Gauss-Newton, calculando la significación de los ajustes mediante un test F. En la tabla 13 se muestra el número de iteraciones necesarias en el ajuste de cada curva, el valor de su test F, su nivel de significación (valor P) y las estimaciones de los parámetros de la ecuación ajustada con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 13: Parámetros obtenidos de la aplicación del modelo de Ratkowsky a datos experimentales de crecimiento de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*.

$\sqrt{r} = b(T - T_{\min}) \{1 - e^{[c(T - T_{\max})]}\}$		<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>
Ajuste de la ecuación	nº de iteraciones	7	3
	valor F	1349.5	1467.7
	Valor P	< 0.0001	< 0.0001
Parámetros estimados	b	0.030 ± 0.002	0.028 ± 0.002
	c	0.29 ± 0.07	0.25 ± 0.04
	T _{min} (°K)	274.2 ± 1.05	271.8 ± 1.2
	T _{max} (°K)	316.2 ± 0.8	311.9 ± 0.3

En la tabla se muestran los parámetros estimados para la ecuación [1] y su error estándar.

El modelo propuesto por Ratkowsky, es apropiado también para definir el crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* frente a la temperatura, ya que los datos experimentales se ajustan bien y se obtienen buenos parámetros estadísticos. La temperatura mínima teórica calculada para ambas levaduras está incluida dentro del rango de [270-280] °K, que para bacterias, se ha descrito que caracteriza a organismos mesófilos (Ratkowsky et al., 1982).

De la aplicación de éste modelo hemos obtenido parámetros característicos para cada levadura, las pendientes de crecimiento a temperaturas inferiores a la óptima (parámetro b) y superiores (parámetro c) no difieren de forma significativa entre las dos levaduras (tabla 13), esto indica que el efecto que posee la temperatura sobre el crecimiento produce una variación igual en la tasa de crecimiento para *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Sin embargo, sí que existen diferencias en las temperaturas mínima y máxima teóricas de crecimiento, así como en la temperatura óptima entre ambas especies (tabla 14).

Tabla 14: Temperaturas características del crecimiento de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*.

Temperatura (°C)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>
Tmin	1.2	-1.2
Tmax	43.2	38.9
Topt	35	30

Así, se observa que *S. cerevisiae* es más termófila respecto a *T. delbrueckii* ya que es capaz de crecer hasta 43°C mientras que *T. delbrueckii* sólo hasta 40°C, además, la T_{opt} de crecimiento de *S. cerevisiae* es 5 grados superior a la de *T. delbrueckii*. Respecto a las mínimas teóricas calculadas, obtenemos una temperatura por debajo de 0°C para *T. delbrueckii*, la cual no posee significado biológico. Experimentalmente no ha sido posible detectar crecimiento por debajo de 2°C para ninguna de las dos especies de levadura.

3.2.- Estudio de la aclimatación de las levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* al crecimiento a temperaturas sub-óptimas.

Tras caracterizar el crecimiento de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* en un amplio rango de temperaturas, nos planteamos estudiar si las levaduras son capaces de aclimatarse a bajas temperaturas, de manera similar a la descrita en plantas o en bacterias (Guy 1990; Hughes y Dunn 1996; Thammavongs et al., 1996;) para ello, analizamos si el crecimiento de la levadura a una temperatura sub-óptima, le confiere una ventaja de crecimiento a una temperatura más restrictiva. Así, células creciendo activamente ($DO_{600}=1$) a 30°C se transfirieron a un medio atemperado a una temperatura menor y se siguieron las curvas de crecimiento. En la tabla 15 se presenta un esquema del planteamiento experimental.

Tabla 15: Planteamiento del experimento de aclimatación.

T_i (°C)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	
$T_{ad.}$ (°C)	-	23	-	20	-	20	-	12	-	10	-	4
T_f (°C)	18	18	15	15	12	12	10	10	4	4	2	2

Para cada temperatura final de crecimiento las células se crecieron previamente a 30°C o a una temperatura intermedia que denominamos temperatura de aclimatación (T_{ad}).

A 2°C no fue posible detectar crecimiento para ninguna de las dos levaduras. Se calcularon las tasas de crecimiento a las temperaturas finales indicadas para las dos situaciones: “no aclimatadas” cuando provenían de 30°C y “aclimatadas” cuando el cultivo había crecido previamente a una temperatura sub-óptima. En la figura 26 se muestra la representación de Ratkowsky de los resultados.

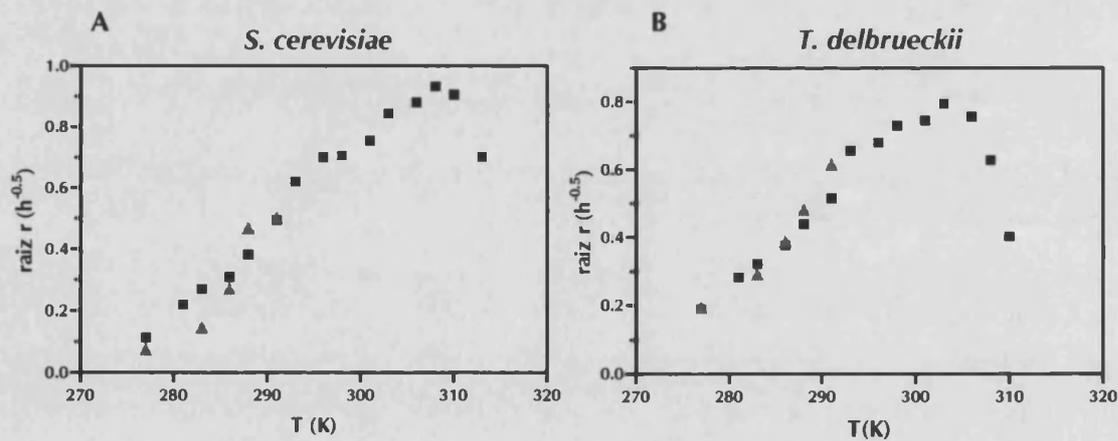


Figura 26: Representación de Ratkowsky para células “aclimatadas” y “no aclimatadas”. Crecimiento en función de la temperatura para las levaduras *S. cerevisiae* (A) y *T. delbrueckii* (B) de células crecidas en condiciones de “no aclimatación” (cuadrados negros) y de “aclimatación” (triángulos grises).

Para determinar si las diferencias encontradas en las tasas de crecimiento entre las células “aclimatadas” y “no aclimatadas” son significativas, se aplicaron varios modelos matemáticos, resultantes de la introducción en la ecuación de Ratkowsky (ecuación [1]) de un término que modifica los diferentes parámetros de la ecuación. Se aplicaron tres modelos diferentes:

Capítulo II

Modelo A: La aclimatación modifica los cuatro parámetros de la ecuación de Ratkowsky, es decir, las pendientes b y c , así como las T_{\min} y T_{\max} . Por lo tanto la ecuación de Ratkowsky se modificaría de la siguiente manera:

$$\sqrt{r} = (b + b'A)(T - T_{\min} - T'_{\min} A) \{1 - e^{[(c + c'A)(T - T_{\max} - T'_{\max} A)]}\} \quad \text{Ecuación [2]}$$

Donde A es el término debido a la aclimatación, que en el caso de ser nulo no modificaría la ecuación original de Ratkowsky (ecuación [1]).

Modelo B: La aclimatación modifica sólo las pendientes b y c , manteniéndose invariables las T_{\min} y T_{\max} , que se serían características propias de cada organismo.

$$\sqrt{r} = (b + b'A)(T - T_{\min}) \{1 - e^{[(c + c'A)(T - T_{\max})]}\} \quad \text{Ecuación [3]}$$

Modelo C: En este supuesto, la aclimatación sólo modifica la tasa de crecimiento para temperaturas menores a la T_{opt} ($T < T_{\text{opt}}$), por lo tanto el único parámetro de la ecuación que se modificaría sería la pendiente b .

$$\sqrt{r} = (b + b'A)(T - T_{\min}) \{1 - e^{[c(T - T_{\max})]}\} \quad \text{Ecuación [4]}$$

Estos modelos se aplicaron a los datos experimentales de crecimiento en ambas condiciones experimentales, para levaduras "aclimatadas" y "no aclimatadas".

Para *S. cerevisiae* no fue posible encontrar convergencia de los parámetros de la ecuación, debido probablemente a falta de puntos experimentales que describieran el comportamiento de la curva en las regiones críticas. No podemos, por lo tanto, deducir si existe o no aclimatación en *S. cerevisiae* según éstos modelos aplicados.

Para *T. delbrueckii*, fue posible ajustar los datos experimentales a las ecuaciones propuestas para los tres modelos de aclimatación, con unos buenos parámetros estadísticos.

Modelo A:

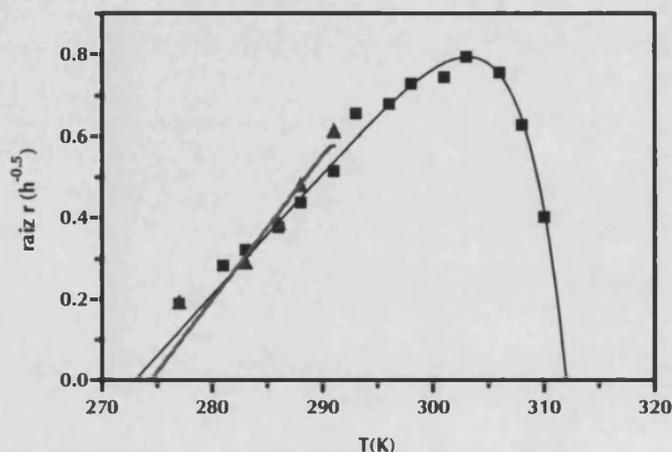


Figura 27: Representación de Ratkowsky del modelo A de aclimatación para *T.delbrueckii*. Ajuste del crecimiento de células de *T. delbrueckii* “aclimatadas” (triángulos grises) y “no aclimatadas” (cuadrados negros). Las líneas representan las curvas teóricas resultantes del ajuste de la ecuación [2] a los datos experimentales.

Tabla 16: Parámetros obtenidos de la aplicación del modelo A de aclimatación a los datos de crecimiento de *T. delbrueckii*.

$\sqrt{r}=(b+b'A)(T-T_{\min}-T'_{\min}A)\{1-e^{[(c+c'A)(T-T_{\max}-T'_{\max}A)]}\}$			
Ajuste de la ecuación	nº de iteraciones	200	
	valor F	580.97	
	Valor P	<0.0001	
Estimación de parámetros	Parámetros	valor	Límites de confianza (95%)
	b	0.030	[0.028 ; 0.037]
	b'A	0.056	[-0.032 ; 0.043]
	c	0.238	[0.118 ; 0.359]
	c'A	2.517	[-19005 ; 19010]
	T_{\min} (°K)	273	[268.9 ; 277.0]
	$T'_{\min} A$ (°K)	1.433	[-9.882 ; 12.748]
	T_{\max} (°K)	312	[311.0; 313.0]
$T'_{\max} A$ (°K)	-19.618	[-9481.7 ; 9442.4]	

Se muestran los datos del ajuste de la ecuación [2] y el valor de los parámetros calculados junto con su límite de confianza al 95%.

Modelo B:

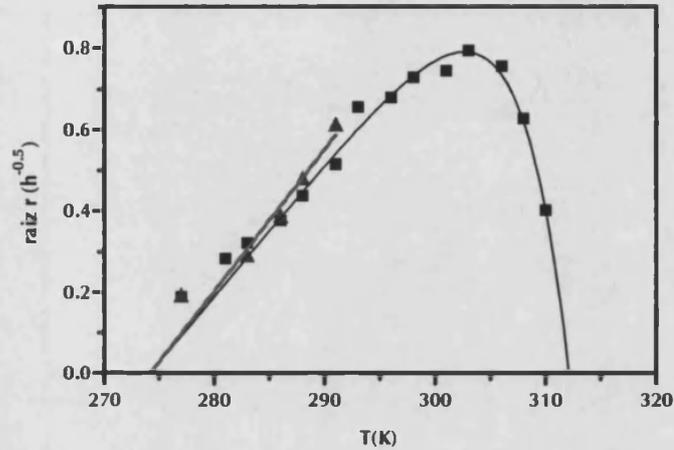


Figura 28: Representación de Ratkowsky del modelo B de aclimatación para *T. delbrueckii*. Ajuste del crecimiento de células de *T. delbrueckii* “aclimatadas” (triángulos grises) y “no aclimatadas” (cuadrados negros). Las líneas representan las curvas teóricas resultantes del ajuste de la ecuación [3] a los datos experimentales.

Tabla 17: Parámetros obtenidos de la aplicación del modelo B de aclimatación a los datos de crecimiento de *T. delbrueckii*.

$\sqrt{r} = (b + b'A)(T - T_{\min}) \{1 - e^{[(c + c'A)(T - T_{\max})]}\}$			
Ajuste de la ecuación	nº de iteraciones	8	
	valor F	1373	
	Valor P	<0.0001	
Estimación de parámetros	Parámetros	valor	Límites de confianza (95%)
	b	0.032	[0.027 ; 0.038]
	b'A	0.002	[-0.008 ; 0.005]
	c	0.202	[0.129 ; 0.276]
	c'A	1454938	[-∞ ; ∞]
	T _{min} A(°K)	274.2	[271.8 ; 276.5]
T _{max} A(°K)	312.1	[311.3 ; 312.9]	

Se muestran los datos del ajuste de la ecuación [3] y el valor de los parámetros calculados junto con su límite de confianza al 95%.

Modelo C:

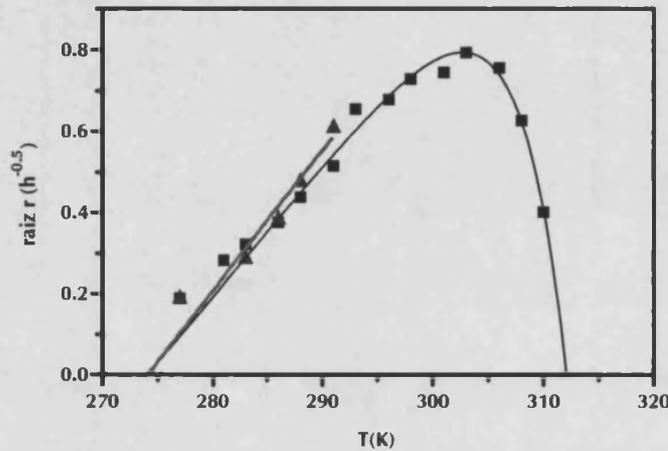


Figura 29: Representación de Ratkowsky del modelo C de aclimatación para *T.delbrueckii*. Ajuste del crecimiento de células de *T. delbrueckii* “aclimatadas” (triángulos grises) y “no aclimatadas” (cuadrados negros). Las líneas representan las curvas teóricas resultantes del ajuste de la ecuación [4] a los datos experimentales.

Tabla 18: Parámetros obtenidos de la aplicación del modelo C de aclimatación a los datos de crecimiento de *T. delbrueckii*.

$\sqrt{r} = (b + b'A)(T - T_{min})\{1 - e^{[c(T - T_{max})]}\}$			
Ajuste de la ecuación	nº de iteraciones	5	
	valor F	1324	
	Valor P	<0.0001	
Estimación de parámetros	Parámetros	valor	Límites de confianza (95%)
	b	0.032	[0.027 ; 0.038]
	b'A	0.003	[-0.0006 ; 0.006]
	c	0.205	[0.128 ; 0.282]
	T_{min} (°K)	274.1	[271.7 ; 276.6]
T_{max} (°K)	312.1	[311.3 ; 312.9]	

Se muestran los datos del ajuste de la ecuación [4] y el valor de los parámetros calculados junto con su límite de confianza al 95%.

El resultado de los ajustes muestra que para los tres modelos, los datos obtenidos para los parámetros modificados por la presencia-ausencia de aclimatación incluyen dentro de su intervalo de confianza el cero. Esto implica que, los términos de la ecuación que afectan al modelo de Ratkowsky cuando las células han sido aclimatadas ($b'A$; $c'A$; $T'_{max}A$, $T'_{min}A$) son nulos. Debemos

Capítulo II

inferir, por lo tanto, que las modificaciones en el crecimiento a bajas temperaturas que produce la aclimatación de las células de *T. delbrueckii* no suponen ningún cambio significativo respecto al crecimiento de las células no aclimatadas, en ninguno de los tres modelos matemáticos aplicados.

3.3.- Estudio de la tolerancia a la congelación de células previamente crecidas a temperaturas sub-óptimas.

La congelación de microorganismos es utilizada tanto en procesos científicos, por ejemplo el mantenimiento de cepas, como tecnológicos, relacionados con el procesamiento de alimentos, como por ejemplo la producción de cultivos iniciadores o la fabricación de masas congeladas.

En este trabajo hemos encontrado evidencias de la existencia de adaptación a la congelación en levaduras (apartado 2.4). Por ello decidimos profundizar en el estudio de la adquisición de tolerancia a la congelación-descongelación de dos levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* sometidas previamente a un estrés por frío.

Con este fin se crecieron células de *S. cerevisiae* (cepa CEN.PK) y *T. delbrueckii* (cepa IGC5321) en YPD hasta fase exponencial ($DO_{600} \approx 1$) a 30°C y a 4°C. Las células se recogieron por centrifugación y se congelaron en alícuotas en medio LSD (*Liquid Dough System*); se mantuvieron congeladas a -20°C durante 24 días tomando muestras a diferentes tiempos de congelación. La supervivencia se midió mediante ensayos de viabilidad por recuento de viables en placa (figura 30).

En general, la congelación-descongelación genera un estrés cuya consecuencia final es la disminución de la viabilidad celular. No obstante, la intensidad del daño producido varía en función del microorganismo y del pretratamiento ensayado.

Capítulo II

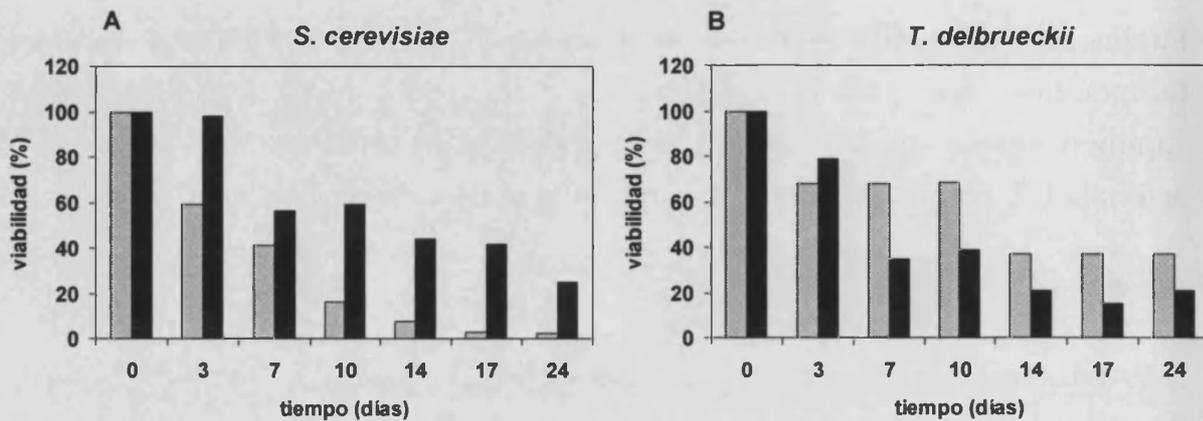


Figura 30: Viabilidad tras congelación de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* crecidas a 30°C y a 4°C. Células de *S.cerevisiae* (A) y *T. delbrueckii* (B) almacenadas en congelación tras haber sido crecidas a 30°C (barras grises) y 4°C (barras negras). El tiempo 0 corresponde a las células recogidas, antes de ser congeladas. La misma tendencia se observó para tres réplicas independientes del experimento.

Los resultados muestran que la viabilidad de *T. delbrueckii* (IGC5321) cuando las células se han crecido a 30°C es mayor durante todo el periodo de congelación estudiado que la viabilidad de *S. cerevisiae*. Por ejemplo, tras 10 días, la viabilidad de *S. cerevisiae* se ha reducido hasta un 20% aproximadamente, mientras que *T. delbrueckii* mantiene un 60% de células viables y tras 24 días de congelación solo un 2% de las células de *S. cerevisiae* son capaces de crecer tras ser descongeladas, mientras la viabilidad de *T. delbrueckii* sigue manteniéndose en un 40%. Este resultado es consecuente con la criorresistencia descrita para la cepa IGC5321 de *T. delbrueckii* (Almeida y Pais 1996b; Hernández-López 2003a).

Respecto a la viabilidad de las células crecidas a 4°C, observamos que para *S. cerevisiae* ésta se mantiene significativamente más elevada que cuando ha sido crecida a 30°C, así, tras 10 días de congelación mantiene una viabilidad del 60% y tras completar los 24 días de almacenamiento a -20°C, el 25% de las células son viables, diez veces más que en las células crecidas a 30°C. En el caso de la levadura *T. delbrueckii*, la viabilidad de las células crecidas a 4°C disminuye notablemente, incluso a niveles inferiores a la observada para las células crecidas a 30°C.

Curiosamente, la especial tolerancia a la congelación que se ha puesto de manifiesto para esta cepa de *T. delbrueckii* en comparación con *S. cerevisiae*,

Capítulo II

cuando ambas levaduras crecen a 30°C, se pierde cuando *T. delbrueckii* se crece a 4°C ya que entonces su viabilidad tras congelación es incluso menor que la de células de *S. cerevisiae* crecidas en las mismas condiciones. Es decir, *S. cerevisiae* se adapta a la congelación por exposición previa a temperaturas sub-óptimas, hecho que no se observa en *T. delbrueckii*.

A pesar de que los datos de aclimatación obtenidos en este trabajo no nos permiten asegurar que *S. cerevisiae* es capaz de adaptarse a bajas temperaturas, los datos presentados en este apartado demuestran que la exposición a temperaturas sub-óptimas de crecimiento sí mejora su respuesta a estrés por congelación. Para *T. delbrueckii* no se han descrito fenómenos de protección cruzada al estrés, nuestros resultados indican que un pre-tratamiento en frío no mejora su viabilidad tras congelación, por lo que nos cuestionamos la existencia de estos mecanismos en *T. delbrueckii*.

Capítulo II

DISCUSIÓN

Las propiedades físicas de los lípidos en las membranas biológicas son muy sensibles a cambios en la temperatura ambiental (Hazel y Williams 1990). Perturbaciones en la organización de la membrana plasmática suponen un reto en el mantenimiento de las funciones biológicas para organismos poiquiloterms. Las membranas biológicas son fluidas, es decir, deben mantenerse en estado líquido-cristalino para conservar su función. La temperatura óptima para un organismo será aquella a la cual las membranas se mantengan en este estado, mientras que, una disminución en la temperatura ambiental inducirá su transición a estado gel. Las variaciones en el estado físico de las membranas poseen un gran impacto sobre su estructura y función. La transición de las membranas biológicas de su estado fluido (líquido-cristalino) a su estado gel induce la agregación de proteínas integrales de membrana, reduce la actividad de enzimas asociados a membrana, disminuye la tasa de difusión lateral y aumenta la permeabilidad a cationes y agua (Hazel 1995).

La composición en ácidos grasos de la membrana, también afecta al estado físico de los fosfolípidos y por lo tanto, a la permeabilidad y fluidez de las mismas. Así, fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos insaturados y cadenas de ácidos grasos cortas poseen puntos de fusión más bajos y un mayor grado de flexibilidad que los que poseen ácidos grasos saturados o de mayor longitud. La inserción de un primer doble enlace en la cadena, posee un efecto mayor en la temperatura de transición de fase que los siguientes dobles enlaces que se puedan introducir, o por ejemplo, que una reducción en la longitud de la cadena en dos átomos carbono. El aumento en el contenido de esteroides en la membrana disminuye las interacciones entre las cadenas de ácidos grasos (Mouritsen 2001), condensando bicapas lipídicas en estado líquido-cristalino pero expandiéndolas cuando se encuentran en estado gel.

En *S. cerevisiae*, la resistencia a frío y congelación se ha relacionado con la composición en ácidos grasos y esteroides de la membrana plasmática (Calcott y Rose 1982). Una mayor condensación de las membranas plasmáticas disminuiría la permeabilidad de éstas al agua durante la congelación, reduciéndose así el daño celular.

Capítulo II

Los estudios de expresión génica llevados a cabo en este trabajo (Capítulo I) han identificado genes implicados en la respuesta a frío y congelación en *S. cerevisiae* relacionados con el metabolismo de lípidos. Así, el gen *ERG10*, identificado mediante *differential display*, y los genes *ERG1*, *ERG6*, *OYE2* y *NCP1*, identificados mediante análisis global de la expresión, codifican enzimas que actúan en la ruta de biosíntesis de ergosterol. Acp1p y Fas2p, actúan en la biosíntesis de ácidos grasos y el gen *OLE1* codifica la única desaturasa que posee *S. cerevisiae*. Estos resultados dirigieron nuestra atención al estudio del papel de la membrana plasmática y su composición en la adquisición de tolerancia a frío y congelación en *S. cerevisiae*. Para ello, decidimos modificar la composición de la membrana plasmática mediante manipulación genética de la ruta de biosíntesis de ergosterol o de la síntesis de ácidos grasos insaturados.

El efecto de la proporción de esteroides frente a ácidos grasos en la criorresistencia de levaduras ha sido previamente discutido, encontrándose en la bibliografía datos opuestos. Así Gélinas et al. (1991) relacionan una proporción superior de esteroides libres frente a fosfolípidos con una mejor criorresistencia en células de *S. cerevisiae*. Sin embargo, Murakami et al. (1995) describen una relación molar esteroles/fosfolípidos menor en una cepa de *T. delbrueckii* tolerante a la congelación, respecto a su correspondiente mutante sensible. Resultados similares se obtuvieron en cepas comerciales de levaduras de panadería (Murakami et al., 1996).

Curiosamente, la manipulación de la ruta de biosíntesis de ergosterol mediante sobre-expresión de los genes *ERG10*, *ERG1* o *ERG1+ERG10*, no consigue aumentar la cantidad de ergosterol en las membranas de *S. cerevisiae*. Este resultado apunta a una fuerte regulación de la biosíntesis de ergosterol en levaduras, indicando que el ergosterol u otro metabolito intermediario ejercen una regulación "feed-back" negativa sobre enzimas que catalizan pasos limitantes. En este sentido, se ha descrito previamente que tanto *ERG10* (Dimster-Denk y Rine 1996) como *ERG1* (M'Baya et al., 1989; Leber et al., 2001) están regulados positivamente a nivel de transcripción y de actividad enzimática por la disminución intracelular de ergosterol. Además, la regulación de los niveles de ergosterol libre en la célula sucede también mediante esterificación de este compuesto con ácidos grasos (Lewis et al., 1987).

Capítulo II

Parece, por lo tanto, existir una concentración óptima de ergosterol libre en las células, y que un exceso de este compuesto puede tener efectos perjudiciales sobre la función biológica de las membranas.

La sobre-expresión de Erg10p, primer enzima de la ruta, tiene como resultado la acumulación de un metabolito intermediario de ésta, el escualeno, pero no de ergosterol. Este hecho sugiere la existencia de una regulación “feed-back” negativa generada por ergosterol u otro intermediario del segundo tramo de la ruta. Por la misma razón, la sobre-expresión de *ERG1* no produciría ningún aumento en los niveles de ergosterol. Al sobre-expresar *ERG1* y *ERG10* de manera conjunta no observamos acumulación de ergosterol ni escualeno, probablemente porque la biosíntesis se desvía hacia otros compuestos (quinonas, dolicoles o grupo hemo).

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la sobre-expresión del gen *ERG10*, mejora el crecimiento de *S. cerevisiae* a 10°C, así como su viabilidad tras congelación. Sin embargo, estas mejoras no se observan cuando se sobre-expresa el gen *ERG1* o *ERG1* junto con *ERG10*. La única relación entre este fenotipo y el metabolismo del ergosterol, encontrada a partir de los análisis realizados en este trabajo, es un aumento en la cantidad de escualeno. Sin embargo, no podemos asegurar que esta sea la causa final de la mejora en la tolerancia a frío y congelación que genera la sobre-expresión del gen *ERG10*, ya que pueden existir otras alteraciones en el metabolismo que no hemos sido capaces de detectar mediante los análisis realizados. Además, la biosíntesis de ergosterol es una ruta que supone un elevado coste energético para la célula (Parks y Casey 1995). Así, desde el punto de vista evolutivo, la regulación de los niveles de ergosterol libre debe tener un significado fisiológico, no sólo por la función de los esteroides en el mantenimiento de la permeabilidad de las membranas bajo diferentes condiciones ambientales, sino también por la implicación de los esteroides en otros procesos celulares, como por ejemplo la conjugación (Torneo et al 1992) y el transporte de triptófano (Umebayashi y Nakano 2003). Es posible que el efecto indirecto de la manipulación de esta ruta sobre otros procesos celulares sea en último término los causantes de la mejora en la tolerancia a frío y la crioresistencia de las cepas de *S. cerevisiae* que sobre-expresan el gen *ERG10*.

Capítulo II

Respecto a la relación entre la composición en ácidos grasos de la membrana y la resistencia a frío, existen estudios que sugieren que la membrana plasmática es una estructura fundamental en la detección de cambios en la temperatura ambiental y en la adaptación de las células a frío (Inaba et al 2003). Recientemente se ha descrito en plantas (Sangwan et al., 2002) que el aumento en la rigidez, mediante el tratamiento con un agente químico como DMSO, genera una señal capaz de inducir la activación de una MAP quinasa implicada en la cascada de transducción de la señal de diferentes estímulos externos como frío, desecación o sal (Ichimura et al., 2000; Jonak et al., 1996). Estos autores también demuestran que la fluidificación de la membrana, por adición de benzil alcohol, genera la señal que induce la activación de una MAP quinasa implicada en choque térmico. Trabajos previos realizados en *Synechocystis*, ponen de manifiesto que el aumento en la rigidez de la membrana por hidrogenación de sus lípidos estimula la transcripción del gen *desA* ($\Delta 12$ desaturasa) (Vigh et al., 1993) de manera similar a la observada tras la exposición de células a bajas temperaturas. Otra prueba que apunta a los cambios en la fluidez de membrana como sensor de las variaciones en la temperatura ambiente fue descrita por Carratù et al. (1996) usando mutantes *ole1* de *S. cerevisiae* que expresan en un plásmido este gen bajo el control de diferentes promotores. Estos datos consiguen establecer una correlación entre composición en ácidos grasos y la expresión de genes de respuesta a choque térmico. Así, la presencia de un nivel más elevado de ácidos grasos insaturados induce la expresión de *HSP82* a temperatura ambiente.

En este trabajo se ha demostrado que un aumento en la rigidez de la membrana de *Saccharomyces cerevisiae*, provocado por un agente químico (DMSO), desencadena una respuesta similar a la obtenida por una disminución en la temperatura, es decir, incrementa la expresión de genes inducidos por frío. Este resultado sugiere que en *S. cerevisiae* la membrana plasmática no sólo funciona como un sensor de aumentos bruscos de la temperatura (Carratù et al., 1996), sino que además actúa como sensor de la disminución en la temperatura ambiental.

Entre los genes de los que hemos estudiado su inducción tanto por frío como por disminución de la fluidez de la membrana se encuentra *OLE1*. La relación

Capítulo II

entre la desaturación de ácidos grasos y la adaptación a bajas temperaturas, ha sido ampliamente demostrada en varios organismos (Thieringer *et al.*, 1998), desde plantas (Miguel *et al.*, 1993, Ishizaki-Nishizawa *et al.*, 1996, Kodama *et al.*, 1994) y animales (Cossins *et al.*, 2002) a bacterias (Weber *et al.*, 2001) y cianobacterias (Murata y Los 1997). A la vista de estos datos, decidimos aumentar la presencia de ácidos grasos insaturados en la membrana de levadura mediante la sobre-expresión de una $\Delta 12$ -desaturasa de girasol.

Las levaduras con membranas enriquecidas en ácidos grasos poli-insaturados, por la expresión heteróloga de estas desaturasas, no presentan un mejor crecimiento a bajas temperaturas. Este resultado contrasta con el obtenido por Peyou-Ndi *et al.* (2000), en el que la expresión de una $\Delta 12$ -desaturasa de *Caenorhabditis elegans* en *S. cerevisiae* aumenta la tasa de crecimiento a 12°C, pero no a otras temperaturas sub-óptimas.

El efecto del incremento de las insaturaciones en la membrana plasmática en la viabilidad tras congelación no ha sido estudiado con detalle. Nuestro trabajo pone de manifiesto que la expresión de desaturasas mejora significativamente la viabilidad de *S. cerevisiae* tras congelación. Esto sugiere un importante efecto protector de la integridad celular, frente a los daños que causa la congelación, por parte de una membrana plasmática enriquecida en ácidos grasos dienoicos. Cabe destacar que la presencia de estos ácidos grasos no tiene efectos en el crecimiento de *S. cerevisiae* a 30°C, lo que supone una ventaja a la hora de explotar esta estrategia en cepas industriales.

En este trabajo hemos comprobado que la expresión de una desaturasa de girasol, que aumenta el número de insaturaciones presentes en la membrana plasmática, modifica la expresión génica de aproximadamente un 1% de los genes de *S. cerevisiae*. El análisis funcional de estos resultados sugiere una cierta coincidencia con la respuesta observada en la levadura tras choque térmico. Por ejemplo, encontramos inducidos genes que promueven la síntesis de ATP, de reparación de DNA o proteínas de choque térmico (Hsp30p) y un factor transcripcional de respuesta a estrés térmico, Mga1p. Así, estos resultados añaden una prueba más a la hipótesis de la función de la membrana plasmática como una estructura esencial en la percepción de cambios ambientales.

Capítulo II

En nuestras medidas de supervivencia, se observó que la viabilidad tras congelación de células de *S. cerevisiae* es mayor cuando estas han sido previamente cultivadas a 15°C que a 30°C. Este resultado sugiere que una exposición de las células a temperaturas sub-óptimas les confiere determinadas propiedades ventajosas para tolerar un estrés por congelación. Estas observaciones nos llevaron a estudiar si las levaduras pueden aclimatarse a bajas temperaturas de manera similar a lo descrito en plantas (Guy, 1990; Hughes y Dunn, 1996).

Como se ha demostrado en este trabajo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* poseen un comportamiento diferente en relación a su crecimiento a lo largo de la curva bio-cinética. Así, *S. cerevisiae* posee una temperatura óptima de crecimiento superior a la de *T. delbrueckii* y es capaz de crecer hasta una temperatura máxima más elevada. Sin embargo, *T. delbrueckii* crece hasta temperaturas más bajas que *S. cerevisiae*, indicando una especial predisposición de esta levadura no convencional para adaptar su crecimiento a condiciones sub-óptimas de temperatura.

En este apartado estudiamos la capacidad de ambas levaduras de mejorar su crecimiento a bajas temperaturas, mediante su exposición previa a una temperatura sub-óptima menos restrictiva que la temperatura más baja de crecimiento. A esta característica la denominamos aclimatación. Aunque esta hipótesis no se pudo comprobar en *S. cerevisiae*, los estudios en *T. delbrueckii* demuestran que el crecimiento a bajas temperaturas no mejora por exposición previa a temperaturas sub-óptimas. Otra posibilidad sería considerar que no existen diferencias en la tasa de crecimiento de estos microorganismos a una temperatura dada, pero sí en el tiempo que estas necesitan para adaptarse a un crecimiento activo. A pesar de las distintas aproximaciones experimentales llevadas a cabo para demostrar esta hipótesis, no se obtuvieron resultados significativos que la confirmen.

La adquisición de tolerancia a congelación por exposición previa a bajas temperaturas se estudió también para ambas levaduras. Este fenómeno ha sido descrito con anterioridad en otros organismos, como en el hongo *Geotrichum candidum* (Thammavongs et al., 2000). La congelación es una condición de

Capítulo II

estrés que resulta letal para las células de levadura y, su viabilidad tras ser sometidas a este estrés, depende de la situación fisiológica en la que se encuentren en el momento de ser congeladas. En este trabajo demostramos que células de *S. cerevisiae* son más resistentes a la congelación cuando han sido mantenidas a 4°C, condición restrictiva del crecimiento, pero no letal. Este resultado indica que, la exposición a frío antes de la congelación dota a las células de esta levadura de una mejor resistencia a este estrés. El fenómeno de protección cruzada a estrés ha sido previamente descrito en *S. cerevisiae* para algunas condiciones. Así, células pre-tratadas con H₂O₂, cicloheximida, choque térmico leve o NaCl poseen mayor tolerancia a congelación (Park et al., 1997), esto indica la existencia de protección cruzada entre diferentes tipos de estrés y capacidad de adaptación por parte de las células de *S. cerevisiae*. Sin embargo, estos autores señalan que *S. cerevisiae* no se adapta a estrés por congelación tras varios ciclos de congelación-descongelación o tras una exposición a bajas temperaturas.

Sobre este tema encontramos resultados contradictorios en la bibliografía. Se ha descrito que un tratamiento de células de *S. cerevisiae* a 10°C durante dos horas induce cambios biofísicos que van acompañados de una mejor resistencia de las células a los daños producidos por la congelación (Kaul et al., 1992b). Más recientemente, se han aislado cepas tolerantes a congelación combinando mutagénesis con luz UV y 200 ciclos de congelación-descongelación (Teunissen et al., 2002).

Sin embargo, el comportamiento de *T. delbrueckii* respecto a la adaptación a congelación por exposición a bajas temperaturas es totalmente diferente, siendo la viabilidad de las células crecidas a 4°C inferior a la que poseen las células crecidas a 30°C. Estos resultados parecen indicar que *T. delbrueckii* es una levadura con una capacidad de crecimiento a bajas temperaturas y de supervivencia tras congelación mejor que *S. cerevisiae*, pero que no puede mejorar esta característica mediante la exposición previa a una condición de estrés más suave, como temperaturas de crecimiento sub-óptimas. Sin embargo, sí fuimos capaces de mejorar la supervivencia de *S. cerevisiae* tras congelación exponiendo las células previamente a temperaturas sub-óptimas de crecimiento. Resultados similares se observaron en el estudio de la

Capítulo II

viabilidad de dos levaduras, *Candida utilis* (mesófila) y *Leucosporidium stokesii* (psicrófila) tras varios ciclos de congelación-descongelación en el que la levadura psicrófila era menos tolerante a este estrés que la mesófila (Meyer et al., 1975).

Este comportamiento diferente de ambas levaduras, *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, respecto a la aclimatación, puede tener una explicación desde el punto de vista evolutivo. Así, *S. cerevisiae* es una levadura que en la naturaleza se ve expuesta a situaciones ambientales diversas y cambiantes. Esto ha propiciado la evolución en esta levadura de mecanismos que la protejan frente al estrés, así como del fenómeno conocido como protección cruzada, mediante el cual la exposición a una situación ambiental adversa genera una respuesta en la levadura que la protege de otras situaciones de estrés (Park et al., 1997). Es posible que en *T. delbrueckii*, debido a los entornos en los que ha evolucionado, no se hayan desarrollado estos mecanismos de protección cruzada, si bien, como demuestran los resultados de este trabajo, este organismo se encuentra bien adaptado a situaciones ambientales adversas, como pueden ser el estrés por frío y/o congelación.

CAPÍTULO III

Caracterización del perfil de proteínas de levaduras crecidas a bajas temperaturas.

RESULTADOS

El perfil de proteínas obtenido mediante electroforesis bidimensional proporciona un patrón de identificación propio de cada organismo, gracias a la capacidad de esta técnica de resolver proteínas a partir de una mezcla compleja en función de dos propiedades físicas de éstas, su punto isoeléctrico y su peso molecular. Así, la electroforesis bidimensional es una técnica muy efectiva para la caracterización y comparación de organismos, incluso entre diferentes cepas de la misma especie (Andlid *et al.*, 1999; Joubert *et al.*, 2001), así como para la comparación entre diferentes condiciones fisiológicas.

1.- Perfil de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* crecida a bajas temperaturas.

El crecimiento de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas requiere la activación de una serie de mecanismos que capaciten a las células con las propiedades necesarias para adaptarse a esta situación ambiental. Como se ha puesto de manifiesto previamente, la capacidad de crecer a bajas temperaturas implica cambios celulares para mantener la fluidez de la membrana, para proteger la integridad estructural de proteínas y complejos proteicos, así como modificaciones en la composición de la pared celular y en el metabolismo de hidratos de carbono. Sin embargo, uno de los efectos de las bajas temperaturas es la reducción en la eficiencia de la traducción, debida a la formación de estructuras secundarias en el RNA y a la inactivación de ribosomas (Jones y Inouye 1996). Se ha descrito que células de levadura expuestas a bajas temperaturas activan la síntesis de rRNAs así como de proteínas ribosomales (Sahara *et al.*, 2002).

La importancia de la síntesis de proteínas durante la adaptación al crecimiento a bajas temperaturas ha sido muy estudiada en bacterias. La síntesis de CSPs (*cold shock proteins*) es una respuesta específica frente a frío que se produce en una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las CSPs son pequeñas proteínas, (7kDa), implicadas en el plegamiento de RNA, síntesis de proteínas y protección frente a congelación (Wouters *et al.*, 2000).

Capítulo III

Existen por lo tanto, múltiples evidencias de que la biosíntesis de proteínas es esencial en la adaptación a frío, esto, junto al hecho de que el nivel de expresión de los genes no siempre se correlaciona con los niveles de proteína en la célula (Gygi *et al.*, 1999) nos ha llevado a plantear el estudio de la respuesta a frío en *S. cerevisiae* a nivel de proteínas. El análisis cuantitativo del patrón de expresión de proteínas de una célula en determinada situación ambiental proporciona una aproximación al estado fisiológico de las células en esta condición. La técnica utilizada en este estudio ha sido la electroforesis bidimensional de proteínas, desarrollada por O'Farrel en 1975 (O'Farrel 1975); con esta técnica es posible resolver entre 1000 y 1500 proteínas de una mezcla compleja aplicando de forma secuencial dos procedimientos de separación diferentes. En primer lugar las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico (pI) mediante isoelectroenfoque (IEF) y en la segunda dimensión las proteínas se separan en función de su masa molecular mediante una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

1.1.- Análisis cuantitativo de proteínas inducidas y reprimidas durante el crecimiento en frío de *S. cerevisiae*.

La levadura *S. cerevisiae* creciendo a 30°C, en medio YPD, tiene un tiempo de generación de aproximadamente 1,35 horas; sin embargo ésta levadura es capaz de crecer a temperaturas inferiores, por ejemplo, a 10°C en medio YPD, pero con un tiempo de generación de 22,8 horas (figura 31).

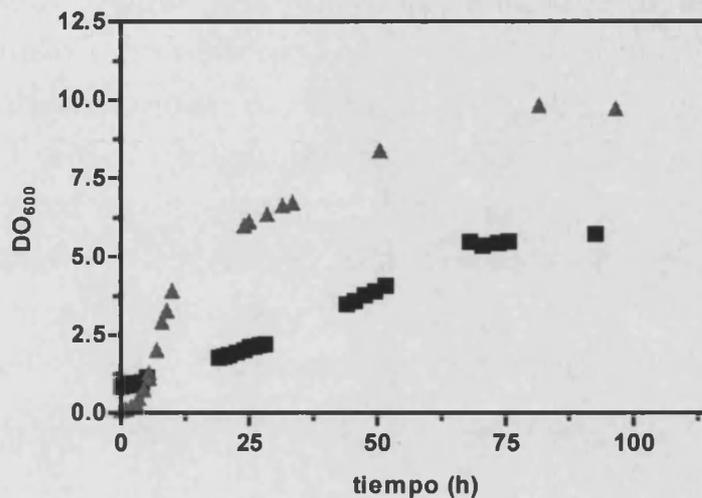


Figura 31: Curvas de crecimiento de *S. cerevisiae* a 30°C y 10°C. La cepa W303-1A se creció en YPD a 30°C (triángulos grises) y a 10°C (cuadrados negros). Un preinóculo crecido durante 12 horas en YPD a 30°C, se refrescó a 30°C en el mismo medio, tras dos tiempos de generación se recogieron las células por centrifugación y se transfirieron a medio YPD atemperado a 10°C donde se mantuvieron en agitación y se siguió su crecimiento durante seis días.

Con el fin de detectar diferencias en la situación fisiológica de las células creciendo a 30°C o a 10°C se realizó un análisis cuantitativo del perfil de proteínas de células de *S. cerevisiae* creciendo activamente a ambas temperaturas y se compararon entre si. La preparación del extracto proteico y la electroforesis bidimensional se realizó según el protocolo descrito por Blomberg (2002). Los geles se tiñeron con el colorante fluorescente no covalente Sypro[®] Ruby. La tinción de geles bidimensionales con Sypro[®] Ruby posee varias ventajas respecto a la tinción clásica con plata (Lopez *et al.*, 2000). En primer lugar, la sensibilidad de detección de proteínas, entre 0,5 y 5 ng dependiendo de la proteína, es comparable a la obtenida con tinción de plata. Además la respuesta lineal que se obtiene con este colorante llega hasta tres órdenes de magnitud, siendo la obtenida con plata sólo de 50 veces, lo cual posibilita un análisis cuantitativo más preciso. Finalmente, debido a que este colorante interacciona con las proteínas de forma no covalente y no es necesario glutaraldehído ni formaldehído en el proceso de tinción, las proteínas teñidas pueden utilizarse para análisis por espectrometría de masas (Nishihara y Champion 2002).

Capítulo III

Los extractos proteicos se separaron en la primera dimensión en un rango no lineal de pH de 3 a 10 y en la segunda dimensión en acrilamida 12,5% en condiciones desnaturalizantes. Se consiguieron resolver alrededor de 1000 puntos por gel. El análisis cuantitativo de tres réplicas independientes de cada muestra permitió detectar 60 proteínas significativamente inducidas, mientras que 30 aparecen reprimidos en las células crecidas a 10°C frente a las células control crecidas a 30°C. En la [figura 32](#) se muestran una imagen representativa del perfil de proteínas de las células crecidas a 10°C.

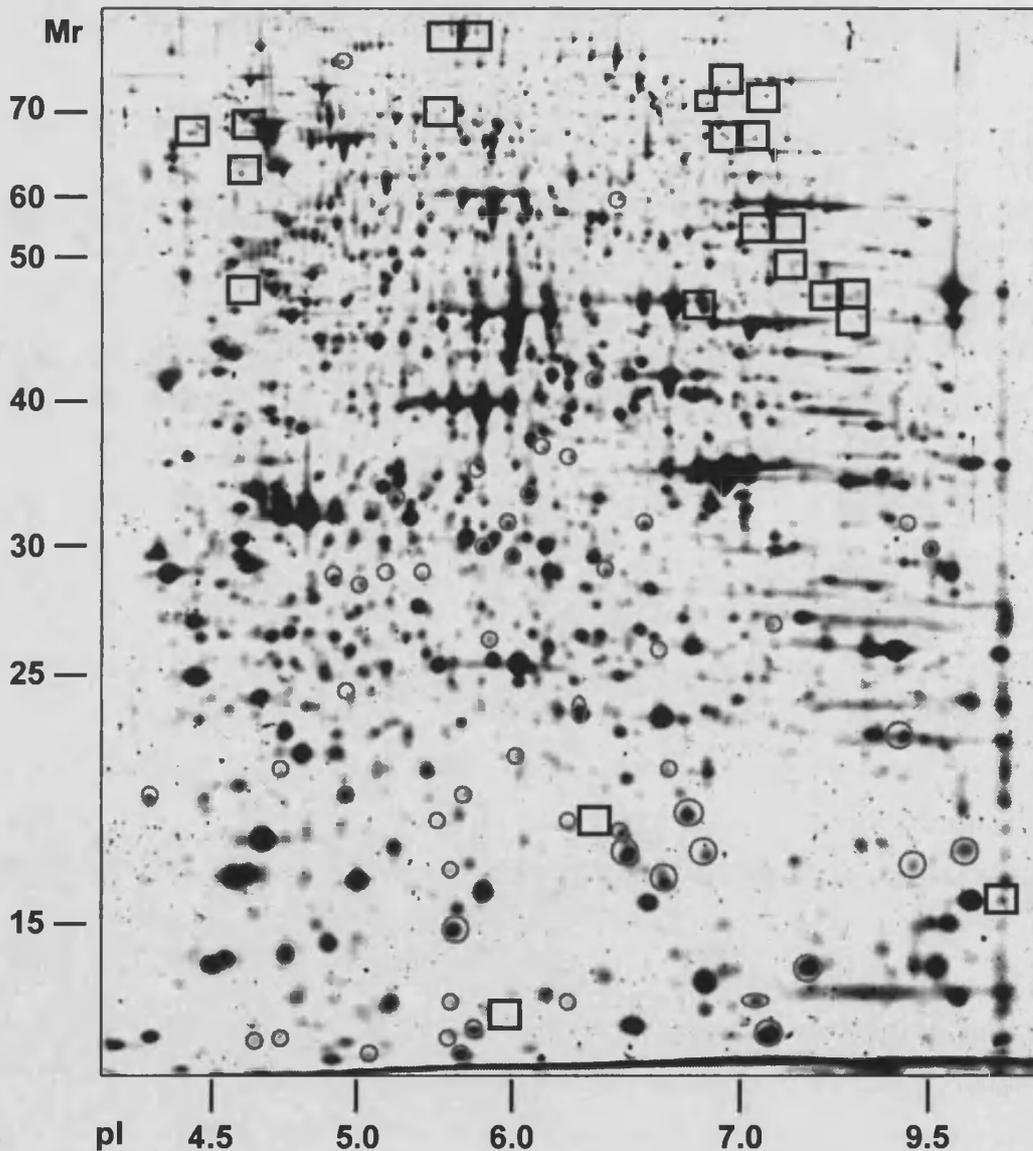


Figura 32: Perfil de proteínas de *S. cerevisiae* crecida a 10°C. Se resaltan en círculos los puntos inducidos y en cuadrados los reprimidos significativamente más de dos veces respecto a la muestra control. La imagen pertenece a un gel revelado con tinción de plata.

La distribución de las proteínas inducidas o reprimidas en estas condiciones de estrés no es aleatoria, observamos una acumulación de proteínas inducidas en la parte inferior del gel, en la zona correspondiente a pesos moleculares inferiores a 40kDa, mientras que las proteínas que disminuyen su abundancia están localizadas en la zona superior del gel, correspondiente a proteínas con pesos moleculares superiores a 45kDa. Este tipo de patrón ha sido previamente descrito en la respuesta a frío en bacterias, así por ejemplo estudios de proteómica realizados recientemente con la bacteria *Bacillus stearothermophilus* revelaron que las mayores variaciones en el perfil de proteínas, después de una disminución en la temperatura, se producían en la zona correspondiente a proteínas ácidas de bajo peso molecular (Sinchaikul et al., 2002).

La comparación del perfil de proteínas de *S. cerevisiae* a 10°C y 30°C ha permitido detectar diferencias significativas en la abundancia de 90 proteínas o péptidos. Éstos se han clasificado en función de su nivel de inducción o represión en tres categorías (figura 33).

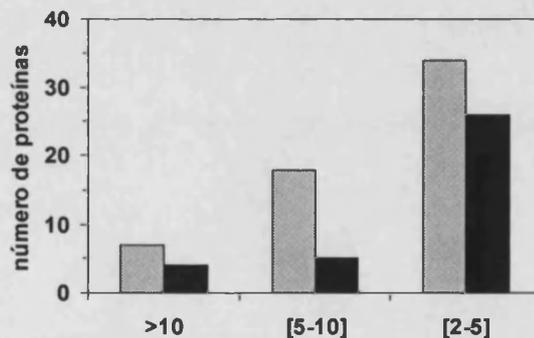


Figura 33: Diferencias en el perfil proteico de células creciendo a 10°C clasificadas en función de su nivel de inducción. Comparación entre los perfiles proteicos obtenidos a ambas temperaturas y análisis estadístico de los resultados de tres réplicas independientes utilizando el programa PDQuest. Clasificación de los puntos inducidos (barras grises) y reprimidos (barras negras) en función de los niveles de inducción-represión.

El 64% de puntos modificados posee una inducción o represión comprendida entre 2 y 5 veces, para el 25% la variación se encuentra entre 5 y 10 veces y sólo en el 11% de los casos es superior a 10 veces. Esos resultados indican que la respuesta a frío a nivel de proteínas implica un gran número de pequeños cambios más que cambios drásticos en un número reducido de proteínas.

Capítulo III

2.- Perfil de proteínas de la levadura no convencional *Toluraspora delbrueckii*.

Toluraspora delbrueckii es una levadura no convencional que ha despertado interés industrial debido a la capacidad que poseen algunas cepas de fermentar una masa panaria, además, a diferencia de *Saccharomyces cerevisiae* posee una excepcional resistencia a estrés osmótico y a estrés por congelación-descongelación, propiedades que, como se ha expuesto en la introducción, resultan de gran interés actualmente en la industria panadera. En concreto, las cepas de *T. delbrueckii* IGC5321 e IGC5323 presentan estas características.

La resistencia a estrés de estas cepas de *T. delbrueckii*, no sólo les otorga un interés industrial, sino que hacen de esta levadura un potencial modelo de estudio de los mecanismos que confieren la tolerancia a estos tipos de estrés, ahora bien, para ello, es necesario el desarrollo de herramientas moleculares para esta levadura que permitan su estudio y manipulación.

En este trabajo se ha utilizado la técnica de la electroforesis bidimensional de proteínas con dos fines, por una parte, proporcionar un perfil proteico de la levadura *T. delbrueckii* y establecer un mapa mediante la identificación de las proteínas mayoritarias y por otra parte, estudiar la respuesta a estrés por frío de *T. delbrueckii* comparando los perfiles de proteínas de células crecidas a bajas temperaturas.

2.1.- Mapa de proteínas de *Torulaspora delbrueckii*.

Como se ha comentado anteriormente, *T. delbrueckii* es una levadura no convencional cuya caracterización fisiológica y genética, así como el desarrollo de herramientas moleculares que permitan su manipulación se encuentra en progreso actualmente (Hernández-López et al., 2002; Hernández-López et al., 2003b). La disponibilidad de un mapa de proteínas de determinado organismo proporciona una herramienta muy útil para el avance de muchas investigaciones que utilizan los geles bidimensionales como técnica habitual en

estudios de comparación y caracterización de organismos así como en el estudio de respuestas ante diferentes condiciones ambientales.

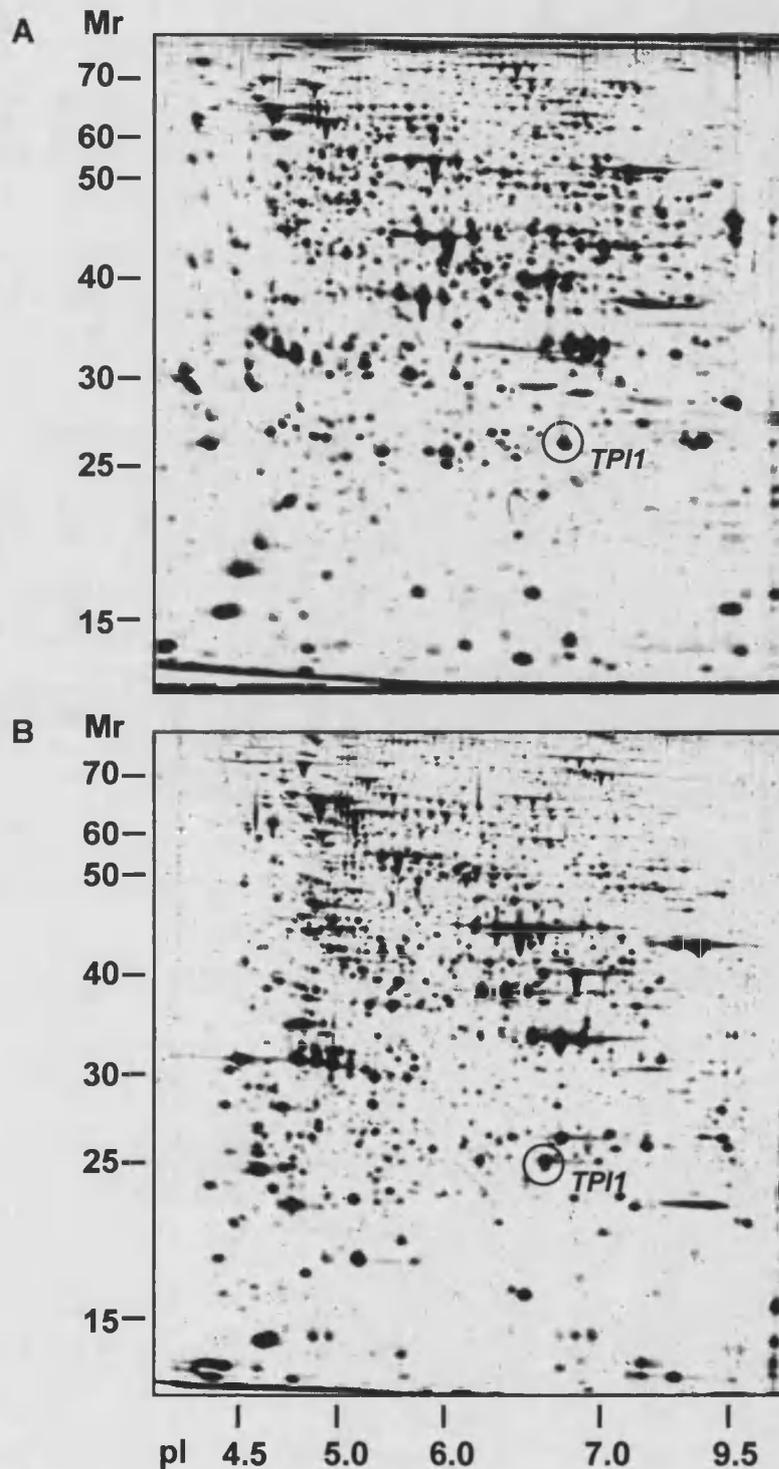


Figura 34: Perfil de proteínas de las levaduras *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Se realizaron geles bidimensionales con 100 μ g de proteínas totales de las levaduras *S. cerevisiae* (A) y *T. delbrueckii* (B) las cuales se visualizaron mediante tinción de plata.

Capítulo III

En este trabajo se han realizado por primera vez geles bidimensionales de proteínas de *T. delbrueckii*. Aplicando los mismos protocolos de extracción y separación de proteínas utilizados con *S. cerevisiae* se resuelven entre 1000 y 1500 puntos por gel. La comparación cualitativa del perfil de proteínas de ambas levaduras (figura 34) pone de manifiesto diferencias importantes entre ambas especies, especialmente en la posición horizontal de las proteínas mayoritarias, lo cual puede deberse a diferencias en el punto isoelectrico.

2.1.1.- Identificación de proteínas de *T. delbrueckii* mediante espectrometría de masas.

La identificación de proteínas separadas en geles bidimensionales de levaduras se ha realizado tradicionalmente mediante la utilización de levaduras mutantes o sobre-expresantes de determinados genes (Boucherie *et al.*, 1995). Tras la obtención del genoma completo de *S. cerevisiae* muchas proteínas han podido ser identificadas por su composición en aminoácidos (Maillet *et al.*, 1996). Sin embargo, la espectrometría de masas se ha impuesto como método de identificación de proteínas gracias a sus características de especificidad, sensibilidad y rapidez (Yates 2000; Mann *et al.*, 2001).

Existen dos estrategias utilizadas mayoritariamente en la identificación de proteínas por espectrometría de masas. La primera consiste en la realización de un perfil de los péptidos obtenidos a partir de la digestión enzimática (habitualmente con tripsina) de una proteína y la clasificación en función de su masa/carga (m/z), éste método se conoce como PMF (Peptide Mass Fingerprinting) y habitualmente se utiliza la técnica MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) que genera iones gaseosos de los péptidos embebidos en una matriz sólida irradiándolos con láser y separa los iones en función de su velocidad tras ser acelerados y por lo tanto del tiempo que tardan en llegar al detector (TOF), siendo la velocidad de los iones pequeños mayor. La segunda estrategia es un método de secuenciación basado en la utilización de espectrómetros de masas en serie (MS/MS), tras la selección de un péptido de la mezcla de digestión trípica en un primer espectrómetro, éste se disocia mediante la colisión con un gas inerte y los fragmentos se separan en el segundo espectrómetro de masas. La interpretación del espectro

de fragmentación proporciona una secuencia de aminoácidos. En la realización de un MS/MS se utiliza habitualmente el *electrospray* como método de ionización (ESI) y un triple cuádruplo en la detección de los iones.

Con el fin de obtener un mapa de las proteínas mayoritarias de *T. delbrueckii* separadas en un gel bidimensional, se realizaron geles preparativos en los que se aplicaron 1,2 mg de proteína total y se tiñeron con colorante azul Coomassie. Se cortaron los puntos a identificar y se tripsinizaron las proteínas embebidas en el gel. Los péptidos se analizaron en primer lugar por PMF utilizando la técnica de MALDI-TOF. Para identificar una proteína por su PMF es necesario que la secuencia de la proteína se encuentre en las bases de datos; dado que el genoma de *T. delbrueckii* no está secuenciado, no se disponen de secuencias de sus proteínas, es por lo tanto, necesario buscar homologías de nuestros resultados con los disponibles en las bases de datos para otras levaduras, especialmente *S. cerevisiae*.

En la figura 35 se muestran el espectro de masas de MALDI-TOF obtenido durante la identificación de la proteína Ssb1p. Del total de péptidos que se resuelven, la masa molecular de siete de ellos coincide con la masa esperada tras digestión trípica, de la secuencia correspondiente a esta proteína en *S. cerevisiae*

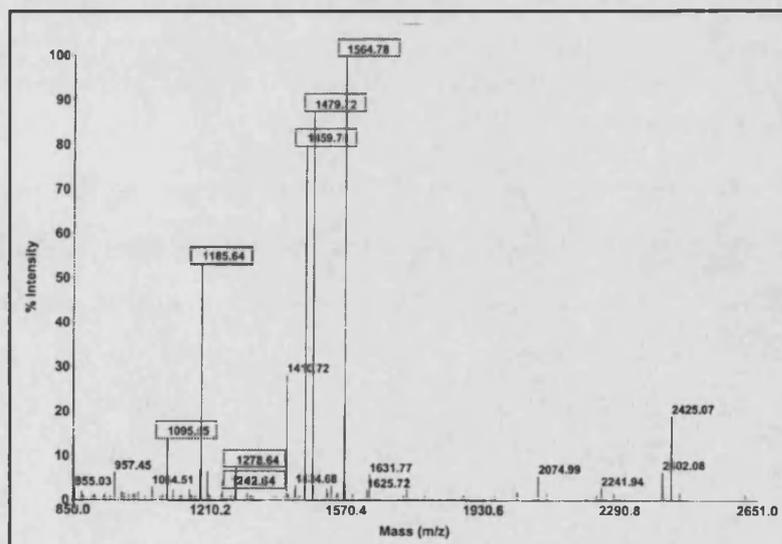


Figura 35: Espectro de masas de la digestión trípica de una proteína de *T.delbrueckii* aislada de una electroforesis bidimensional. PMF obtenido mediante MALDI-TOF. Se enmarcan en rectángulos las masas moleculares de los péptidos que coinciden con el perfil de Ssb1p de *S. cerevisiae*.

Capítulo III

Para confirmar la identificación de esta proteína se seleccionó el ión monoprotonado de m/z 1185,6 correspondiente a un péptido cuya m/z coincide con un péptido de *S. cerevisiae* y se realizó un MS/MS, cuyo espectro se muestra en la figura 36. De la secuenciación parcial de este péptido hemos obtenido una secuencia de doce aminoácidos que coincide, excepto en dos, con una secuencia de la proteína Ssb1p de *S. cerevisiae*. A partir de estos resultados podemos deducir que la proteína identificada de *T. delbrueckii* es Ssb1p, aunque posee diferencias con *S. cerevisiae* en su secuencia de aminoácidos.

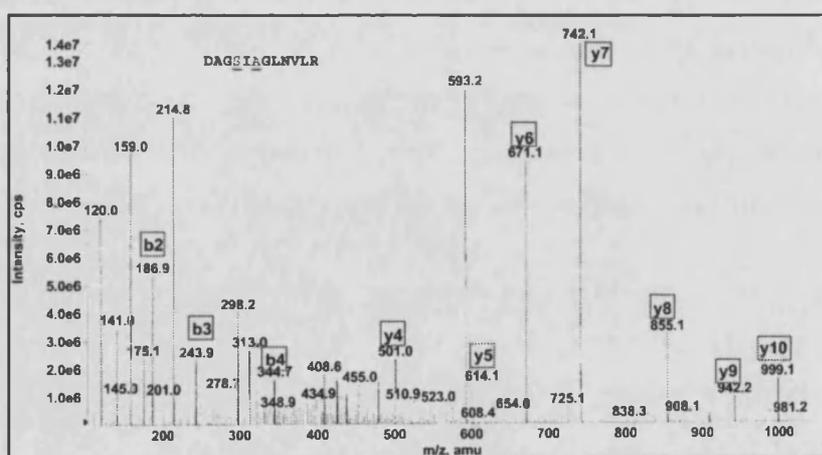


Figura 36: Espectro de MS/MS de un péptido de la proteína Ssb1p de *T. delbrueckii*. Secuenciación parcial de un péptido obtenida por MS/MS mediante ESI-QTRAP. Se muestra la secuencia de doce aminoácidos obtenida, subrayándose los aminoácidos que difieren respecto a la secuencia de *S. cerevisiae*.

Aplicando las técnicas MALDI-TOF y ESI ha sido posible identificar siete proteínas de *T. delbrueckii*. En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas indicando, el nombre de la proteína, el número de péptidos similares al correspondiente PMF de esta proteína en *S. cerevisiae*, así como la secuencia obtenida mediante MS/MS. En algunos casos, el fragmento de *T. delbrueckii* secuenciado no es igual al correspondiente fragmento en *S. cerevisiae* habiéndose observado cambios conservados de aminoácidos y deleciones en alguna posición. En la tabla se indica el porcentaje (%) de identidad entre las secuencias obtenidas de *T. delbrueckii* por MS/MS y las de dichos péptidos en *S. cerevisiae*.

Tabla 19: Proteínas identificadas de *T. delbrueckii*.

Proteína	PMF	Id (%)	Levadura	Secuencia (MS/MS)
Eno1p Eno2p	3	64	Td Sc	AADWGVCVF-R AAGWGMVSHR
		53	Td Sc	AEAF G -----YHNI/LK AEAL RIGSE VYHN LK
		60	Td Sc	I/LGANAI/LI/LG-----R L GANA I L GVSLA SR
Ssb1p	7	75	Td Sc	DAG S IAGI/LNVI/LR DAG AISG L NV L R
Ssa1p	10	100	Td Sc	VTVPAY VTVPAY
Pdc6p	2	100	Td Sc	HTI/LGNGDFTVFHR HT L GNGDFTVFHR
		100	Td Sc	VEFHSDY VEFHSDY
		100	Td Sc	EI/LNAAYAADG E L NAAYAADG
Tpi1p	N.I.	100	Td Sc	V I/L I/L C V I L C

En la tabla se indican el número de péptidos que ha podido ser identificado mediante MALDI-TOF (PMF) y la secuencia de los puntos de *T. delbrueckii* (Td) analizados mediante MS/MS comparada con la de los péptidos homólogos para *S. cerevisiae* (Sc) así como el % de identidad entre ambas secuencias (Id.%). En negrilla se marcan los aminoácidos en los que se ha producido algún cambio respecto a la secuencia en *S. cerevisiae*.

La proteína Eno1p o Eno2p ha sido identificada gracias a la coincidencia en la masa de tres péptidos con *S. cerevisiae*. La secuenciación de tres fragmentos dio como resultado secuencias que poseen un 64%, 53% y 60% de identidad con las correspondientes de *S. cerevisiae* para las proteínas Eno1p o Eno2p.

El perfil peptídico de la proteína identificada como Ssb1p de *T. delbrueckii* coincide en siete péptidos con la correspondiente en *S. cerevisiae*; curiosamente la secuenciación de un fragmento de esta proteína de *T. delbrueckii* dio como resultado una secuencia con una inversión de tres aminoácidos respecto a *S. cerevisiae*.

La tripsinización de la proteína Ssa1p de *T. delbrueckii* rinde un perfil peptídico del cual la masa de diez péptidos coincide con la proteína Ssa1p de *S. cerevisiae*. En la confirmación de este resultado mediante MS/MS obtuvimos una secuencia de 6 aminoácidos idéntica a la de *S. cerevisiae*.

Capítulo III

La proteína Pdc6p ha sido identificada gracias a la coincidencia de la masa de dos péptidos y de la secuencia de tres fragmentos de 13, 7 y 10 aminoácidos idénticos a la correspondiente proteína de *S. cerevisiae*.

Para la proteína Tpi1p no se ha obtenido ninguna coincidencia de su PMF con el de otras proteínas de levaduras presentes en las bases de datos. Sin embargo, de la secuenciación mediante MS/MS de un péptido se pudo obtener una secuencia que coincidía con la proteína Tpi1p de *S. cerevisiae*. Esto, junto con una posición similar en el gel de la proteína Tpi1p de *S. cerevisiae* (figura 35) nos permitió identificar la proteína como Tpi1p de *T. delbrueckii*.

La identificación de las proteínas Tdh2/Tdh3p y Fba1p no fue posible mediante homologías en su PMF. El análisis de la muestra por MS/MS dio como resultado el espectro de fragmentación de un péptido, el cual se interpretó utilizando la versión *on line* del programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) permitiendo identificar los puntos como Tdh2p/Tdh3p y Fba1p.

La posición en el gel bidimensional de las proteínas identificadas de *T. delbrueckii* se muestran en la figura 37.

Algunas de las proteínas de *T. delbrueckii* que se han podido identificar poseen una masa molecular y un pI similar al de las proteínas de *S. cerevisiae* (tabla 20). Así, el punto isoeléctrico de las proteínas Eno1p/Eno2p, Ssb1p y Ssa1p de *T. delbrueckii* difieren, como máximo, en 0,3 unidades de pH, respecto a las correspondientes proteínas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, para las proteínas Tpi1p, Tdh2/Tdh3p y Fba1 la diferencia encontrada entre los puntos isoeléctricos oscila entre 0,5 y 1 unidad de pH. Curiosamente, estas tres últimas proteínas son las que más dificultad han presentado a la hora de ser identificadas, este resultado concuerda con la observación realizada previamente a la vista de los geles bidimensionales de ambas levaduras, en los que se aprecia que las mayores diferencias entre ambas se encuentran en la migración en la primera dimensión de las proteínas.

Capítulo III

Tabla 20: Masas moleculares y pI de las proteínas identificadas de *T. delbrueckii*.

	Eno1p/Eno2p		Ssb1p		Ssa1p		Pdc6p		Tpi1p		Tdh2p/Tdh3p		Fba1p	
	<i>Td</i>	<i>Sc</i>	<i>Td</i>	<i>Sc</i>	<i>Td</i>	<i>Sc</i>	<i>Td</i>	<i>Sc</i>	<i>Td</i>	<i>Sc</i>	<i>Td</i>	<i>Sc</i>	<i>Td</i>	<i>Sc</i>
Mr	45	46,8	68	66,5	70	69,5	60	61,5	25	26,7	35	35,5/35,6	40	39,5
pI	6,5	6,2/5,7	5	5,3	4,9	5,0	5,5	5,8	6,8	5,75	7	6,5	6,5	5,5

Las masas moleculares (Mr) y los puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas identificadas de *T. delbrueckii* se estimaron a partir de su posición en el gel bidimensional; los mismos datos para las correspondientes proteínas en *S. cerevisiae* se han obtenido en la base de datos de proteínas SwissProt (<http://us.expasy.org/spot/>)

Algunos de los análisis llevados a cabo con el MALDI-TOF han identificado proteínas de *T. delbrueckii* en posiciones que difieren considerablemente de la conocida para la misma proteína en *S. cerevisiae* (figura 37). Así, por ejemplo, el punto denominado A1 (figura 37) cuya posición corresponde a una proteína de Mr 55kDa y pI 4,8 se ha identificado, gracias a la coincidencia en cinco péptidos, como Eno1p/Eno2p. En el punto A2 (figura 37), que corresponde a una proteína con Mr 65kDa y pI 4,9, se identificaron Adh1p y Afg3p por coincidencia en 6 y 5 péptidos respectivamente con las correspondientes proteínas de *S. cerevisiae*, las cuales poseen un peso molecular de 37 kDa y pI 6,6 para Adh1p y 84,5 kDa y pI 9,2 para Afg3p. El punto A3 (figura 37) fue identificado como Pdc6p mediante MALDI-TOF y MS/MS pero además, en este punto hemos encontrado nueve péptidos cuyo patrón corresponde con el de la proteína Fba1p de *S. cerevisiae*; la posición del punto A3 no coincide con la conocida para Fba1p de *S. cerevisiae*, además en el gel de *T. delbrueckii* otro punto se ha identificado también como Fba1p. Por último, en la posición A4 (figura 37) se ha identificado mediante el perfil de MALDI-TOF obtenido para siete péptidos a la proteína Tdh3p, la cual también se ha identificado en otra posición mediante MS/MS (figura 37).

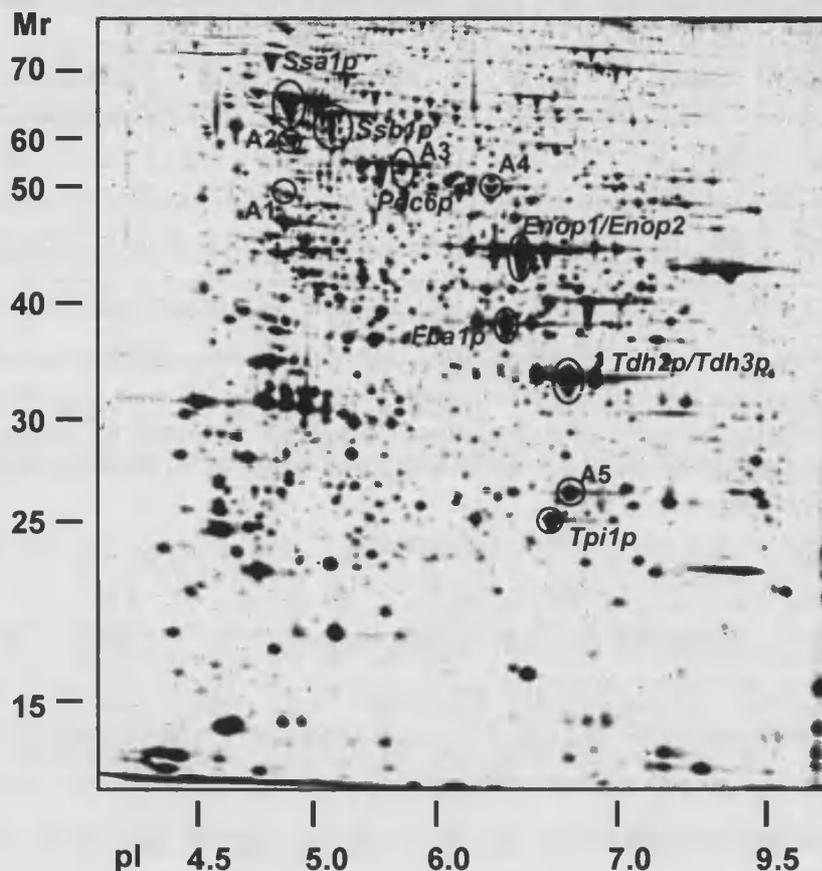


Figura 37: Mapa de las proteínas identificadas de *T. delbrueckii*. Posición en el gel bidimensional de las proteínas identificadas de *T. delbrueckii* mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF y/o MS/MS.

Diferentes isoformas de una misma proteína pueden detectarse mediante electroforesis bidimensional, así por ejemplo modificaciones post-traduccionales como glucosilaciones y fosforilaciones dan lugar a una migración diferente en la proteína modificada. Se ha demostrado que el tratamiento con Ser/Thr fosfatasa desplaza la distribución de isoformas de la proteína AlgU de *Pseudomonas aeruginosa* hacia el extremo básico de los geles (Schurr et al., 1995). Sin embargo, no siempre es fácil predecir cómo las modificaciones post-traduccionales alteran las propiedades estructurales de las proteínas y por lo tanto cómo alteran su patrón de migración (Packer et al., 1997). El hecho de que en nuestros resultados identifiquemos la misma proteína en diferentes puntos del gel puede ser debido a modificaciones post-traduccionales de estas proteínas o a la presencia de distintos fragmentos de la misma proteína.

Los resultados presentados en este apartado ponen de manifiesto, a partir de las proteínas que han podido ser identificadas, que *T. delbrueckii* es una levadura que difiere considerablemente de *S. cerevisiae* a nivel molecular, habiéndose detectado diferencias tanto en la masa molecular como en el punto isoeléctrico de sus proteínas y en la posible presencia de modificaciones post-traduccionales.

3.- Perfil de proteínas de *Torulaspora delbrueckii* crecida a bajas temperaturas.

3.1.- Crecimiento a bajas temperaturas de diferentes cepas de *T. delbrueckii*.

Como se ha comentado anteriormente, algunas cepas de *T. delbrueckii* poseen una especial tolerancia a estrés. Se ha descrito, que la cepa IGC5321 es más resistente a congelación, estrés osmótico y estrés salino que *S. cerevisiae*.

En este apartado estudiaremos el crecimiento de diferentes cepas de *T. delbrueckii* a bajas temperaturas. Para ello, se crecieron las cepas IGC5321 y CECT1680 en medio YPD a 10°C y se realizaron curvas de crecimiento, comparándose sus características.

El crecimiento de las dos cepas a 30°C, es igual, siendo su tiempo de generación de aproximadamente 1,8 horas (figura 38-A). Por el contrario, cuando se crecen a 10°C (figura 38-B) ambas cepas crecen de forma diferente. Curiosamente, la tasa de crecimiento durante las primeras horas es igual para ambas, siendo el tiempo de generación de 12 horas aproximadamente. La cepa CECT1680 mantiene su crecimiento a esta tasa durante 50 horas, tras las cuales entra en fase estacionaria, sin embargo la cepa IGC5321 es capaz de seguir creciendo activamente durante 100 horas, por lo tanto, la densidad óptica máxima que es capaz de alcanzar IGC5321 es de 21 mientras que CECT1680 alcanza 7,8 unidades.

Capítulo III

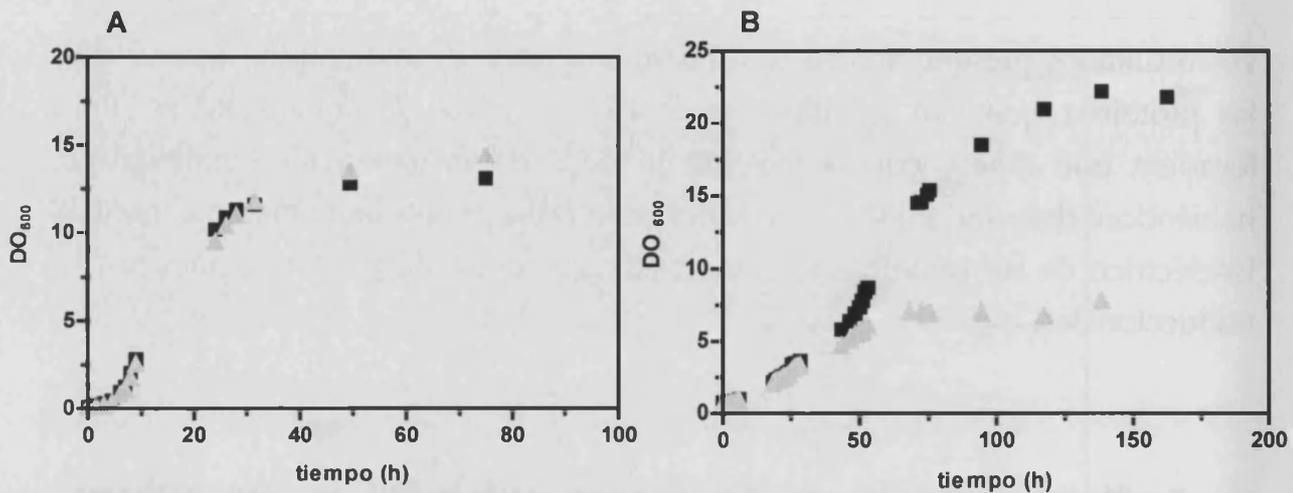


Figura 38: Curvas de crecimiento de distintas cepas de *T. delbrueckii*. Crecimiento de las cepas IGC5321 (cuadrados negros) y CECT1680 (triángulos grises) en medio rico a 30°C (A) y 10°C (B).

Estos resultados muestran que la capacidad de crecer a 10°C difiere considerablemente entre cepas de *T. delbrueckii*, en concreto, la cepa IGC5321 posee una especial tolerancia a estrés por frío, que se manifiesta en la capacidad de crecer activamente durante más tiempo.

3.2.- Análisis cuantitativo del perfil de proteínas de cepas con distinta tolerancia a frío de *T. delbrueckii*.

En este apartado nos planteamos estudiar las diferencias, a nivel cuantitativo, existentes en el perfil de proteínas de estas dos cepas de *T. delbrueckii* que difieren considerablemente en su tolerancia frío, IGC5321 y CECT1680.

Se realizaron geles bidimensionales de extractos de proteínas totales de ambas cepas crecidas a 30°C hasta fase logarítmica y a 10°C durante 24 horas. Los geles se tiñeron con Sypro[®] Rubi, colorante más conveniente cuando se realiza un análisis cuantitativo.

Tras el análisis, de aproximadamente 1000 puntos en los geles bidimensionales, se encontraron sólo 3 puntos para los cuales existían diferencias significativas entre ambas cepas cuando éstas eran crecidas a 30°C (figura 39, panel 30°C y figura 40 puntos C, D y E)

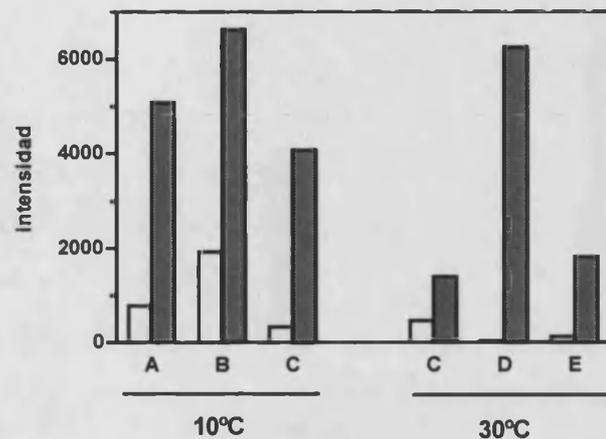


Figura 39: Puntos con diferente intensidad entre dos cepas de *T. delbrueckii*. Intensidad de la señal detectada para la cepa CECT1680 (barras blancas) e IGC5321 (barras grises) para los puntos que presentan una abundancia significativamente diferente entre ambas cepas.

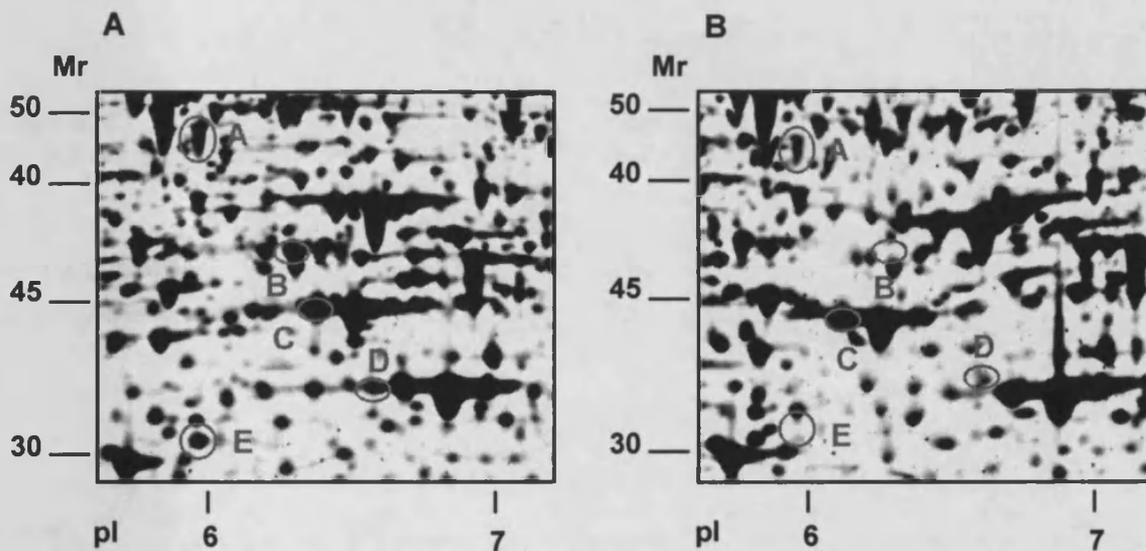


Figura 40: Diferencias en el perfil de proteínas entre dos cepas de *T. delbrueckii*. Sección de los gels bidimensionales de las cepas IGC5321 (A) y CECT1680 (B) en los que se indican los puntos cuya intensidad difiere significativamente entre ambas.

A pesar de la diferencia en el crecimiento a 10°C entre las cepas IGC5321 y CECT1680 de *T. delbrueckii*, cuando realizamos un perfil de proteínas, en el que es posible resolver 1000 puntos aproximadamente para cada cepa, de nuevo sólo encontramos 3 proteínas más abundantes en la cepa tolerante respecto a la sensible (figura 39, panel 10°C y figura 40 puntos A, B y C). Cabe destacar que, las diferencias encontradas entre ambas cepas (figura 40) se centraron en la zona de proteínas de Mr entre [50-30] kDa y pI [6-7].

3.3.- Perfil de proteínas de la cepa IGC5321 de *T. delbrueckii* a 10°C.

Dada la especial tolerancia a frío que posee la cepa IGC5321 nos planteamos estudiar las diferencias en el perfil de proteínas de ésta creciendo activamente a 30°C y a 10°C. Con este fin se realizaron geles bidimensionales de proteínas, se tiñeron con Sypro® Rubi y se cuantificaron cerca de 1000 puntos en cada gel. Los resultados de la cuantificación revelaron diferencias significativas en 5 puntos, cuyos valores de inducción se muestran en la figura 41.

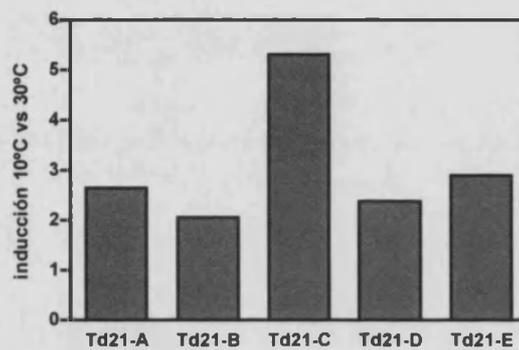


Figura 41: Puntos inducidos en *T. delbrueckii* IGC5321 tras crecer a 10°C. En la figura se muestran los valores de inducción para cinco puntos del perfil de proteínas de las células crecidas a 10°C respecto a las crecidas a 30°C.

Los puntos cuya intensidad es mayor a 10°C que a 30°C se muestran en la figura 42. Todos ellos se centran en la zona de proteínas de Mr entre [30-40] kDa y poseen un pI alrededor de 7.

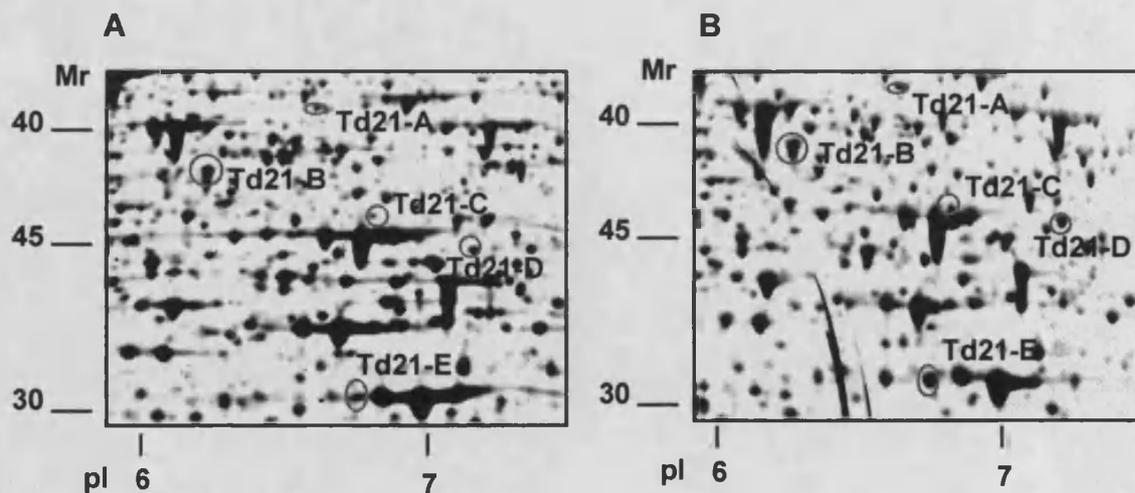


Figura 42: Sección de geles bidimensionales de proteínas de *T. delbrueckii* IGC5321 crecida a 30°C y 10°C. Se muestra la sección de los geles bidimensionales, teñidos con Sypro® Rubi, en la que se indican los puntos cuya intensidad difiere entre las células crecidas a 30°C hasta fase logarítmica (A) y a 10°C durante 24 horas (B).

Capítulo III

A pesar de la capacidad de crecimiento que se ha demostrado que *T. delbrueckii* IGC5321 posee a 10°C, su perfil de proteínas a esta temperatura no difiere del perfil de proteínas de las células creciendo a 30°C. Este resultado contrasta con el obtenido para *S. cerevisiae*, para la cual detectamos diferencias en 94 puntos, aproximadamente un 10% del total de puntos analizados.

Estos resultados parecen indicar que el crecimiento de *T. delbrueckii* a bajas temperaturas no varía de forma drástica su perfil proteico respecto a cuando crece a 30°C, y que las propiedades que le confieren la especial capacidad de crecimiento a 10°C no las adquiere al ser expuesta a esta temperatura.

Capítulo III

DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo, se ha demostrado que el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* a temperaturas sub-óptimas requiere la adaptación de la fisiología de la célula a esta nueva situación. Los estudios de expresión génica realizados en este trabajo ponen de manifiesto la inducción de genes implicados en el procesamiento de RNA, además de genes que codifican factores de inicio y de elongación de la traducción, así como implicados en la biogénesis de ribosomas. Estos resultados apuntan a una inducción de la biosíntesis de ribosomas instigada por un descenso en la temperatura con el fin de compensar la ralentización de la traducción a 4°C

C. La recuperación de la actividad traduccional en las levaduras sometidas a bajas temperaturas parece esencial en el proceso de adaptación, ya que es imprescindible para poder llevar a cabo la síntesis *de novo* de proteínas necesarias en restablecer otros procesos celulares.

Dado que la biosíntesis de proteínas parece tener un papel esencial en la fisiología de la célula a bajas temperaturas, abordamos el estudio de esta condición de estrés analizando el perfil proteico de las levaduras cuando se someten a estrés por frío. La electroforesis bidimensional de proteínas es una técnica que permite resolver multitud de proteínas celulares proporcionando un patrón característico para las levaduras en diferentes situaciones fisiológicas. La aplicación de esta herramienta a células de *S. cerevisiae* sometidas a estrés por frío nos permite llevar a cabo una comparación cualitativa y cuantitativa de las diferencias existentes a nivel de proteínas entre ambas situaciones fisiológicas.

El análisis cuantitativo de geles bidimensionales de proteínas de células de *S. cerevisiae* crecidas a 10°C y a 30°C ha puesto de manifiesto diferencias significativas en el nivel de expresión de proteínas entre ambas condiciones, encontrándose tanto proteínas inducidas como reprimidas. Curiosamente, las proteínas cuyo nivel se reduce a 10°C poseen masas moleculares elevadas, mientras que las proteínas inducidas tienen masas moleculares pequeñas, por debajo de 45 kDa. Este resultado sugiere, que uno de los efectos del estrés por

Capítulo III

frío es un incremento de la proteólisis en la célula y que parte de los puntos que detectamos en la parte inferior de los geles pertenecen a péptidos derivados de la degradación de proteínas. La existencia de procesos de autodigestión de proteínas ha sido descrita también para otros tipos de estrés (Trabalzini *et al.*, 2003). Así cuando estos autores previenen la proteólisis *in vivo* por adición de PMSF al cultivo, el número de puntos de bajo peso molecular disminuye drásticamente. Se ha planteado que la función de esta proteólisis puede ser aumentar el nivel de aminoácidos en el citoplasma con el fin de favorecer el recambio de proteínas (Kim y Klionsky 2000). Ahora bien, podemos especular que esta acumulación de aminoácidos tiene en la célula una función de protección contra la congelación, similar a la descrita por la adición exógena de aminoácidos (Takagi *et al.*, 1997), siguiendo esta hipótesis se puede postular que los péptidos generados en estas condiciones tienen una clara función anticongelante.

En otros microorganismos, por ejemplo *Bacillus subtilis*, la síntesis de la mayoría de proteínas disminuye un 30 % tras un descenso en la temperatura. Sin embargo un grupo específico de proteínas se induce en esta condición (Graumann *et al.*, 1996). No podemos, por lo tanto, descartar la inducción en *S. cerevisiae* de determinadas proteínas por estrés por frío. La identificación de estas proteínas mediante espectrometría de masas no ha sido posible, por el momento, debido a su pequeño tamaño molecular y a la escasez de proteína aplicada en los geles, lo cual ha impedido obtener una mezcla de digestión trípica adecuada para obtener un espectro de masas que permita la identificación de estas proteínas. En estas circunstancias, resulta tentador sugerir que estos puntos corresponden a proteínas inducidas por temperatura, como son la familia *srp/tip* (*serinpauperin/temperature induced protein*), en esta familia encontramos proteínas de tamaño molecular entre 5,6 kDa (Pau7p) a 24,9 kDa (Tir1p) que coinciden con los tamaños moleculares observados para proteínas inducidas en los geles bidimensionales.

En este trabajo se han realizado por primera vez geles bidimensionales de proteínas de *T. delbrueckii*, obteniéndose perfiles proteicos de una calidad y resolución equivalente a los que se obtiene con muestras de *S. cerevisiae*. Gracias a este hecho hemos podido aplicar la electroforesis bidimensional de

Capítulo III

proteínas a la caracterización a nivel molecular de esta levadura, estudios poco desarrollados hasta la fecha.

La identificación de las proteínas de *T. delbrueckii* tiene la dificultad adicional de la falta de información sobre las secuencias de éstas en las bases de datos, ya que es un microorganismo cuyo genoma no está secuenciado. La identificación de las proteínas por espectrometría de masas debe realizarse por tanto buscando homologías de los espectros obtenidos con los de otras levaduras, lo más próximas posibles filogenéticamente a *T. delbrueckii*, cuyas secuencias se encuentran disponibles. Así, ha sido posible localizar en el mapa de *T. delbrueckii* siete proteínas, Ssa1p, Ssb1p, Pdc6p, Eno1p/Eno2p, Tdh2/Tdh3p, Fba1p y Tpi1p, todas ellas proteínas de elevado peso molecular, muy abundantes y de secuencia bastante conservada entre diferentes especies.

Sin embargo, muchas de las proteínas analizadas no se han podido identificar ya que, en muchos casos, no fue posible obtener una similitud significativa entre los PMF o los espectros de MS/MS resultantes y los datos depositados en las bases. Esto puede deberse a varios factores. Es posible que la tripsinización de proteínas de *T. delbrueckii* no genere un número de péptidos adecuado para su posterior identificación por PMF. También pueden existir cambios en la secuencia de aminoácidos respecto a *S. cerevisiae* (como se ha demostrado para las proteínas Eno1p/Eno2p, Ssb1 y Ssa1p) que modifiquen la relación m/z de estos péptidos. Además, las proteínas de *T. delbrueckii* pueden ser objeto de modificaciones post-traduccionales (fosforilaciones, glucosilaciones) diferentes a las proteínas de *S. cerevisiae*. Ésto, no sólo modificaría su movilidad en los geles bidimensionales, sino que puede influir en la eficiencia de la digestión con tripsina y afectar a la relación m/z , dificultando la identificación de las proteínas mediante homologías con otras levaduras.

Hay que tener en cuenta que las levaduras que actualmente se consideran más próximas filogenéticamente a *T. delbrueckii*, *Zygosaccharomyces rouxii* y *Kluyveromyces lactis*, no están secuenciadas en su totalidad, por lo tanto la disponibilidad de secuencias de proteínas de estas levaduras es muy limitada. Probablemente, las proteínas no han podido ser identificadas, difieren

Capítulo III

considerablemente de sus homólogas en *S. cerevisiae* u otras levaduras cuyas secuencias están disponibles en las bases de datos.

En algunos casos, el análisis mediante espectrometría de masas de los péptidos resultantes de la tripsinización de un único punto en el gel ha resultado en la identificación de más de una proteína; esto es posible ya que el rango de pH utilizado para la separación de las proteínas en la primera dimensión es muy amplio (pH 3-10), dándose en algunas zonas del gel una pobre resolución de las proteínas y, por lo tanto, es posible encontrar varias proteínas en un mismo punto del gel.

También presentan una especial dificultad a la hora de ser identificadas aquellas proteínas de tamaño molecular pequeño (menores de 30 kDa), probablemente debido al bajo número de péptidos que se obtiene tras la tripsinización, lo cual reduce las posibilidades de encontrar coincidencias.

Algunas de las proteínas identificadas (Tpi1p, Fba1p y Tdh2/Tdh3) poseen un pI, calculado a partir de su posición en el gel bidimensional, que difiere bastante del que poseen las correspondientes proteínas de *S. cerevisiae*. Estas diferencias en los puntos isoeléctricos de algunas proteínas, junto con la dificultad a la hora de identificar muchas de las proteínas analizadas, nos indica que *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* son significativamente distintas a nivel molecular.

Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo, algunas cepas de la levadura no convencional *T. delbrueckii* poseen una capacidad de crecimiento y una resistencia a estrés por congelación superiores a *S. cerevisiae*. Con el fin de obtener más información de *T. delbrueckii* a nivel molecular, consideramos interesante la aplicación de la técnica de electroforesis bidimensional de proteínas a la comparación de dos cepas de *T. delbrueckii* con diferente capacidad de crecimiento a 10°C, así como a la definición del perfil de proteínas de una cepa tolerante a frío y congelación (IGC5321).

En contraposición a lo que cabría esperar, las diferencias en el perfil proteico de las dos cepas de *T. delbrueckii* son muy reducidas, siendo sólo cinco las proteínas que modifican significativamente su nivel de expresión. Dado que los

Capítulo III

estudios realizados a lo largo de este trabajo han puesto de manifiesto que multitud de funciones celulares están implicadas en el crecimiento de las células a bajas temperaturas, no parece que la distinta capacidad de crecimiento a 10°C de ambas cepas se refleje en un perfil de proteínas muy diferente en las condiciones ensayadas en este trabajo, por lo tanto, las funciones celulares responsables de la distinta capacidad de crecimiento a bajas temperaturas no deben estar relacionadas con la expresión génica o con una actividad traduccional diferente, ya que éstas se reflejarían en un mayor número de cambios en el perfil de proteínas. Es posible que las diferencias radiquen en factores bioquímicos como actividad de las enzimas, regulación alostérica y afinidad sustrato-producto.

La comparación del perfil proteico obtenido de células de *T. delbrueckii* IGC5321 crecidas a 30°C y 10°C puso de manifiesto que sólo cinco proteínas poseen una expresión significativamente diferencial entre ambas condiciones. Este resultado contrasta con el obtenido con *S. cerevisiae*, que en las mismas condiciones, muestra 90 proteínas que modifican su expresión. Esto indica que el crecimiento a bajas temperaturas no induce cambios drásticos a nivel molecular en esta levadura. Este hecho está en consonancia con los resultados presentados en el capítulo II, en los que se demuestra que *T. delbrueckii* no se aclimata a bajas temperaturas ni mejora su resistencia a congelación por exposición previa a temperaturas sub-óptimas de crecimiento. Nuestros resultados permiten especular que *T. delbrueckii* es una levadura cuya fisiología posee un nivel de adaptación elevado para el crecimiento a bajas temperaturas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La levadura de panadería, *Saccharomyces cerevisiae* posee un patrón de expresión diferencial en situaciones estrés por congelación-descongelación o por frío.
- 2.- El frío y la congelación son situaciones de estrés que afectan a múltiples funciones celulares, destacando la biosíntesis de proteínas y el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono.
- 3.- Entre los genes inducidos por frío y congelación se encuentran genes que se activan por la respuesta general al estrés.
- 4.- Niveles elevados de expresión del gen *ERC10* se correlacionan con una mejor tolerancia a congelación en cepas de levadura de panadería comerciales. La sobre-expresión de este gen mejora el crecimiento en frío y la supervivencia tras congelación.
- 5.- La expresión heteróloga de desaturasas de girasol en *S. cerevisiae* introduce ácidos grasos poli-insaturados en sus membranas cuya presencia se correlaciona con una mejor supervivencia de estas cepas a la congelación.
- 6.- La exposición a temperaturas sub-óptimas de crecimiento de *S. cerevisiae* mejora su supervivencia tras congelación.
- 7.- La levadura *Torulaspota delbrueckii* posee una tasa de crecimiento en frío y una viabilidad tras congelación superiores a *S. cerevisiae*, sin embargo, su supervivencia tras congelación no mejora por exposición previa a bajas temperaturas.
- 8.- El perfil de proteínas de *S. cerevisiae* a una temperatura sub-óptima muestra la inducción de proteínas o péptidos de bajo peso molecular y la disminución de la abundancia de proteínas de elevado peso molecular.
- 9.- Se ha empezado a establecer el mapa de proteínas de *T. delbrueckii*, constatándose que varias de sus proteínas difieren considerablemente en su punto isoeléctrico y masa molecular respecto a *S. cerevisiae*.
- 10.- El perfil de proteínas de *T. delbrueckii* a distintas temperaturas no muestra grandes diferencias, hecho que podría estar relacionado con su incapacidad para aclimatarse.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS



En los últimos años la tecnología del DNA recombinante ha permitido la construcción de nuevas cepas de levadura de panadería con nuevas propiedades y se espera que esta herramienta produzca en un futuro, un amplio espectro de levaduras especializadas de alto valor añadido. No obstante, estamos todavía lejos de disponer de cepas capaces de satisfacer todas las demandas del mercado, en particular de productores y usuarios.

Los retos biotecnológicos más relevantes en este campo son sin duda, la mejora de las características fermentativas, de la osmotolerancia y de la crioresistencia. Existen evidencias de que estos rasgos dependen de un gran número de genes y funciones celulares. Así, el análisis del patrón de expresión, en el contexto de condiciones industriales, es una herramienta obvia para entender como múltiples genes están implicados en los distintos procesos metabólicos que determinan el comportamiento de las levaduras de panadería. En este trabajo, se ha puesto de manifiesto la utilidad de distintos métodos de análisis de la expresión génica, para obtener información sobre posibles genes diana cuya manipulación ha permitido, en última instancia, mejorar la crioresistencia de levaduras.

En este escenario, la mejora de las características comerciales de las levaduras de panadería aparece, siendo realistas, como un trabajo difícil. El elevado e irregular grado de ploidía de estas levaduras domesticadas, parece haberlas dotado de una mayor capacidad de fermentación, robustez y velocidad de crecimiento en situaciones de limitación de nutrientes. Sin embargo, el nivel de ploidía parece haber generado también una fuerte limitación en la capacidad de estas estirpes para soportar y adaptarse a situaciones de estrés. Estudios en nuestro laboratorio con cepas de *T. delbrueckii* que difieren en su grado de ploidía confirman este extremo.

Sólo el conocimiento, a nivel molecular, de las rutas metabólicas que determinan el comportamiento de cepas industriales frente al estrés puede ayudarnos a elegir genes diana para modificar un rasgo concreto. En esta línea,

Perspectivas

la identificación de reguladores y factores transcripcionales implicados en la respuesta a congelación, y su modificación, parece la apuesta más razonable. Con este fin, la aplicación de técnicas de proteómica se presenta como una alternativa atractiva para mostrarnos el escenario de cambios metabólicos en respuesta a condiciones de estrés severo. No obstante, no podemos olvidar, que las distintas rutas metabólicas están íntimamente ligadas unas con otras y que modificaciones en una de ellas, podrían afectar a otras (Lee et al., 2002). Esto podría ser especialmente problemático en cepas industriales, pues cualquier mejora debe asegurar la no alteración de aquellas características que han sido determinantes en la selección tradicional de cepas industriales (Randez-Gil et al., 2003). Algunos de los fenotipos deseados podrían ir también en contra del “diseño biológico” (Attfield 1997).

Una alternativa a la manipulación genética, podría ser la inducción durante las etapas de producción industrial de levaduras comerciales de una mayor tolerancia a condiciones de estrés. Esta estrategia es habitualmente empleada para dotar de estabilidad a la levadura durante su almacenamiento, en particular en la producción de levadura deshidratada. En este trabajo se ha puesto de manifiesto la existencia de un mecanismo de tolerancia inducida en *S. cerevisiae*, no demostrado con anterioridad. Células expuestas a bajas temperaturas soportan mejor las condiciones adversas de un estrés por congelación. En este sentido, resulta interesante que los productores de levadura de panadería almacenen a 4°C la levadura prensada hasta su utilización, sugiriendo un posible fenómeno de tolerancia inducida en esta práctica. No obstante, falta determinar si la adquisición de esta característica se da también en células expuestas a un agotamiento de nutrientes, típico en levadura prensada, o si por el contrario se requiere un medio completo, como el caso analizado en este trabajo.

Por último la introducción en el mercado de nuevas de cepas industriales de panadería no-convencionales se presenta como una estrategia adecuada para dar una solución inmediata al problema de la criotolerancia en masas congeladas. En este sentido, aunque parezca la alternativa más plausible hoy en día, no hay que olvidar la reticencia de los productores de levadura industrial a cambiar sus procesos de producción y adaptarlos a nuevos microorganismos.

Perspectivas

La congelación es un estrés complejo y multifacético, dónde diferentes estreses y respuestas a estrés parecen jugar un papel importante. No es sorprendente pues que la tolerancia a congelación en levaduras industriales requiera de diferentes mecanismos y porque no, de diferentes estrategias.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Agatep R, Kierkpatrick RD, Parchaliuk DL, Woods RA, Gietz RD (1998)** Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. *Technical tips online* (<http://tto.trends.com>).
- Alber T, Kawasaki G. (1982)** Nucleotide sequence of the triose phosphate isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:419-434.
- Almeida MJ, Pais CS. (1996a)** Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Lett. Appl. Microbiol.* **23**: 154-158.
- Almeida MJ, Pais CS. (1996b)** Leavening ability and freeze tolerance of yeasts isolated from traditional corn and rye bread doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4401-4404.
- Amorós M, Estruch F. (2001)** Hsf and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol.* **36**:1523-1532.
- Andlid T, Blomberg L, Gustafsson L, Blomberg A. (1999)** Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CBS 7764 isolated from rainbow trout intestine. *System. Appl. Microbiol.* **22**:145-155.
- Ansell R, Granath K, Hohmann S, Thevelein JM, Adler L. (1997)** Two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *CPD1* and *CPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* **16**:2179-2179.
- Attfield PV. (1997)** Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology* **15**: 1351-1357.
- Beauvoit B, Bonoust O, Guerin B, Rigoulet M. (1999)** ATP-regulation of cytochrome oxidase in yeast mitochondria: role of subunit VIa. *Eur. J. Biochem.* **263**:118-127.
- Belloch C, Querol A, Garcia MD, Barrio E. (2000)** Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from the mitochondrial cytochrome-c-oxidase II gene. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 405-416.
- Benítez T, Castrejón F, Gasent-Ramírez JM, Codón AC. (1996)** Development of new strains for the food industry. *Biotecnol. Prog.* **12**:149-163.
- Birnboim HC, Doly J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**:1513-1523.

Bibliografia

Blomberg A. (2002) Use of two dimensional gels in yeast proteomics. *Methods in Enzymology* **350**:559-584.

Bohni P, Deshaies CRJ, Schekman RW (1988) *SEC11* is required for signal peptide processing and yeast cell growth. *J. Cell Biol.* **106**:1035-1042.

Boucherie H, Dujardin G, Kermorgant M, Monribot C, Slonimski P, Perrot M. (1995) Two dimensional map of *Saccharomyces cerevisiae*: Construction of a gene protein index. *Yeast* **11**:601-613.

Braley R, Piper PW. (1997) The C-terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase is essential for the regulation of this enzyme by heat shock protein Hsp30, but not for stress activation. *FEBS Lett.* **418**:123-126.

Breierova E. (1997) Yeast exoglycoproteins produced under NaCl-stress conditions as efficient cryoprotective agents. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**: 254-256.

Broomfield S, Chow BL, Xiao W. (1998). *MMS2*, encoding a ubiquitin-conjugating-enzyme-like protein, is a member of the yeast error-free postreplication repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:5678-5683.

Calcott PH, Rose AH. (1982) Freeze-thaw and cold shock resistance of *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition. *J. Gen. Microbiol.* **128**:549-555.

Carratù L, Franceschelli S, Pardini CL, Kobayashi GS, Horvath I, Vigh L, Maresca B. (1996) Membrane lipid perturbation modifies the set point of the temperature of heat shock response in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**:3870-3875.

Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **12**: 323-337.

Chen SI, Chiger M. (1985) Production of baker's yeast. En: Moo-Young M (ed). *Comprehensive Biotechnology Vol. 3.* Pergamon Press, Oxford, UK, pp 429-455.

Cheng C, Mu J, Farkas I, Huang D, Goebel MG, Roach PJ. (1995) Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**:6632-6640.

Codón AC, Benítez T, Korhola M. (1997) Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Curr. Genet.* **32**:247-259.

Codón AC, Benítez T, Korhola M. (1998) Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 154-163.

Bibliografía

Codón AC, Rincón AM, Moreno-Mateos MA, Delgado-Jarana J, Rey M, Limón C, Rosado IV, Cubero B, Peñate X, Castrejón F, Benítez T. (2003) New *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast displaying enhanced resistance to freezing. *J Agric Food Chem.* **51**: 483-491.

Compagno C, Boschi F, Ranchi BM. (1996) Glycerol production in a triose phosphate isomerase deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Prog.* **12**:591-595.

Corominas J, Clotet J, Fernández-Banares I, Boles E, Zimmermann FK, Guinovart JJ, Ariño J. (1992) Gycogen metabolism in a *Saccharomyces cerevisiae* phosphoglucose isomerase (*pgi1*) disruption mutant. *FEBS Lett.* **310**:182-186.

Corran HS. (1975) A History of Brewing. Davis & Charles, Newton Abbott,UK.

Cossins AR, Murray PA, Gracey AY, Logue J, Polley S, Caddick M, Brooks S, Postle T, Maclean N. (2002) The role of desaturases in cold-induced lipid restructuring. *Biochem. Soc. Trans.* **30**:1082-1086.

Daum G, Lees ND, Bard M, Dickson R. (1998) Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:1471-1510.

Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH, Schielst RH. (1996) Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**:5116-5121.

de Winde JH, Thevelein JM, Winderickx J. (1997) From feast to famine: Adaptation to nutrient depletion in yeast. En "Yeast stress responses" Hohmann S y Mager WH. (eds) Springer. New York, N.Y. pp 7-52.

Demain AL, Solomon NA. (1981) Industrial Microbiology. *Scientific American* **245**: 42-51.

Dequin S (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**:577-588.

Dimster-Denk D, Rine J. (1996) Transcriptional regulation of sterol biosynthetic enzyme by sterol levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**:3981-3989.

Dolinski KJ, Cardenas ME, Heitman J. (1998) *CNS1* encodes an essential p60/Sti1 homolog in *Saccharomyces cerevisiae* that suppresses cyclophilin 40 mutations and interacts with Hsp90. *Mol. Cell Biol.* **18**:7344-7352.

Bibliografía

Dolinski KJ, Muir S, Cardenas ME, Heitman J. (1997) All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:13093-13098.

Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D. (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. **13**:17-27.

Entian KD, Kotter P. (1998) Yeast mutant and plasmid collections. Yeast gene Analysis. *Methods in Microbiology*. Vol. **26** pp 431-449. Brown A, Tuite M (eds) Academic Press.

Estruch F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**:469-486.

Evans IH. (1990) Yeasts strains for baking: recent developments. En: Spencer JFT, Spencer DM (eds) *Yeast Technology*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 13-54.

Francois J, Parrou JL. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* **25**:125-145.

Gangloff SP, Marguet D, Lauquin GJ. (1990) Molecular cloning of the mitochondrial aconitase gene (*ACO1*) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate. *Mol. Cell. Biol.* **10**:3551-3561.

Garcés R, Mancha M. (1993) One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* **211**:139-143.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4241-4257.

Gasent-Ramírez JM, Castrejón F, Querol A, Ramón D, Benítez T. (1999) Genomic stability of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *System. Appl. Microbiol.* **22**:329-340.

Gélinas P, Fiset G, Willemot C, Goulet J. (1991) Lipid content and cryotolerance of baker's yeasts in frozen doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 463-468.

Gélinas P, Lagimonière M, Dubord C. (1993) Baker's yeast sampling and frozen dough stability. *Cereal Chem.* **70**: 219-225.

Gietz RD, Sugino A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vivo* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction enzymes. *Gene* **74**:527-534.

Goffeau A et al. (1997) The yeast genome directory. *Nature* **387** (suppl): 1-105.

Bibliografía

- Gong Z, Lee H, Xiong L, Jagendorf A, Stevenson B, Zhu JK.** (2002) RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:11507-11512.
- Goversriemlag JWP, Janssen MP, Zwaal FA, Rosing J.** (1992) Effect of membrane fluidity and fatty acid composition on the prothrombin-converting activity of phospholipid vesicles. *Biochemistry* **31**(41):10000-10008.
- Graumann P, Schöeder K, Schmid R, Marahiel MA.** (1996) Cold shock stress induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**: 4611-4619.
- Groß M.** (1999) La parade cellulaire aux variations thermiques. *La Recherche* **317**: 82-86.
- Guy CL.** (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**:187-223.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R.** (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **19**:1720-1730.
- Hahn YS, Kawai H.** (1990) Isolation and characterization of freeze tolerant yeasts from nature available from frozen-dough method. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 829-831.
- Hampsey M, Reinberg D.** (1999) RNA polimerase II as a control panel for multiple coactivator complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**:132-139.
- Hazel JR, Williams EE.** (1990) The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organism to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* **29**:167-227.
- Hazel JR.** (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is a homeoviscous adaptation the explanation?. *Annu. Rev. Physiol.* **57**:19-42.
- Hermes-Lima M, Storey KB** (1993) Antioxidant defences in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol.* **265**: R646-R652.
- Hernandez-López MJ, Prieto JA, Rande-Gil F.** (2002) Isolation and characterization of the gene *URA3* encoding the Orotidine- 5'-phosphate decarboxylase from *Torulasporea delbruekii*. *Yeast* **19**: 1431-1435.
- Hernandez-López MJ, Prieto JA, Rande-Gil F.** (2003a) Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulasporea delbruekii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**:124-134.

Bibliografía

Hernandez-López MJ, Prieto JA, Rande-Gil F. (2003b) Ura⁺ host strains for genetic manipulation and heterologous expression of *Torulaspota delbruekii*. *Int. J. Food. Microbiol.* **86**:79-86.

Higgins VJ, Bell PJJ, Dawes IW, Attfield PV. (2001) Generation of a novel *Saccharomyces cerevisiae* strain that exhibits strong maltose utilization and hyperosmotic resistance using nonrecombinant techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4346-4348.

Hiser L, Basson ME, Rine J (1994) *ERG10* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes acetoacetyl-CoA thiolase. *J. Biol. Chem.* **269**: 31383-31389.

Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, Bader GD, Moore L, Adams SL, Millar A, Taylor P, Bennett K, Boutilier K, Yang L, Wolting C, Donaldson I, Schandorff S, Shewnarane J, et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180-183.

Hoffman CS, Winston F. (1987) A ten minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**:267-272.

Hohmann S. (2002) Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeast. *Microbiol. Mol. Biol.Rev.* **66**:300-372.

Hovland PG, Tecklenberg M, Sclafani RA. (1997). Overexpression of the protein kinase Pak1 suppresses yeast DNA polymerase mutations. *Mol. Gen. Genet.* **256**:45-53.

Hughes MA, Dunn MA. (1996) The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* **47**:291-305.

Ichikawa N, Yoshida Y, Hashimoto T, Ogasawara N, Yoshikawa H, Imamoto F, Tagawa K. (1990) Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase in yeast. *J. Biol. Chem.* **265**:6274-6278.

Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K. (2000) Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J.* **24**:655-665.

Inaba M, Suzuki I, Szalontai B, Kanesaki Y, Los DA, Hayashi H, Murata N. (2003) Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* **278**:12191-12198.

Inouye M, (1999) Cold-shock response and adaptation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 191.

Bibliografía

Ishizaki-Nishizawa O, Fujii T, Azuma M, Sequiguchi K, Murata N, Ohtani T, Toguri T. (1996) Low temperature resistance of higher plants is significantly enhanced by a nonspecific cyanobacterial desaturase. *Nature Biotech.* **14**:1003-1006.

Jahnke L, Klein HP. (1983) Oxygen requirements for formation and activity of the squalene epoxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **155**:488-492.

James R, Branton D. (1973) Lipid and temperature dependent structural changes in *Acholeplasma laidlawii* cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **323**:378-390.

James SA, Collins MD, Roberts IN. (1996) Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulasporea*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 189-194.

Jonak C, Kiegerl S, Ligerink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H. (1996) Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:11274-11279.

Jones PG, Inouye M. (1996) RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. *Mol. Microbiol.* **21**: 1207-1218.

Joubert R, Strub JM, Zugmeyer S, Kobi D, Carte N, Dorselaer AV, Boucherie H, Jaquet-Gutfreund L. (2001) Identification by mass spectrometry of two-dimensional gel electrophoresis-separated proteins extracted from lager brewing yeast. *Electrophoresis* **22**:2969-2982.

Kaan T, Homuth G, Mäder U, Bandow J, Schweder T. (2002) Genome wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology* **148**:3441-3455.

Kalebina TS, Laurinavichute DK, Packeiser AN, Morenkov OS, Ter-Avanesyan MD, Kulaev IS. (2002) Correct GPI-anchor synthesis is required for the incorporation of endoglucanase/glucanase Bgl2p into the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *FEMS Microbiol. Lett.* **210**:81-85.

Kashara T, Kashara M. (2003) Transmembrane segments 1, 3, 5 and 8 are required for high-affinity glucose transport by *Saccharomyces cerevisiae* Hxt2 transporter. *Biochem. J.* **372**:247-252.

Kaul SC, Obuchi K, Iwahashi H, Komatsu Y. (1992a) Cryoprotection provided by heat shock treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Biol.* **35**: 135-143.

Bibliografía

- Kaul SC, Obuchi K, Komatsu Y.** (1992b). Cold shock response of yeast cells: induction of a 33KDa protein and protection against freezing injury. *Cell. Mol. Biol.* **38**:553-559.
- Kim J, Alizadeh P, Harding T, Hefner-Gravink A, Klinski DJ.** (1996) Disruption of the gene *ATH1* confers better survival after dehydration, freezing and ethanol shock: potential commercial applications. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1563-1569.
- Kim J, Klionsky DJ.** (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cell. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:303-342.
- Klein W, Weber MHW, Marahiel MA.** (1999) Cold shock response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperature. *J. Bacteriol.* **181**:5341-5349.
- Kodama H, Hamada T, Horiguchi G, Nishimura M, Iba K.** (1994) Genetic enrichment of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast ω -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **105**:601-605.
- Kondo K, Inouye M.** (1991) *TIP1*, a cold-shock inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266**: 17537-17544.
- Kowalski LRZ, Kondo K, Inouye M.** (1995) Cold-shock induction of a family of *TIP1*-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **15**: 341-353.
- Krieger K, Ernst JF.** (1994) Iron regulation of triose phosphate isomerase transcript stability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**:1079-1084.
- Kruckeberg AL, Ye L, Berden JA, van Dam K.** (1999) Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem. J.* **339**:299-307.
- Kuipers OP** (1999) Genomics for food biotechnology: prospects of the use of high throughput technologies for the improvement of food microorganism. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 511-516.
- Kurtzman CP.** (1998) *Torulaspota* Lidner. En Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The Yeasts. A taxonomic study*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 404-408.
- Kwon M, Chong S, Han S, Kim K.** (2003) Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1623**:1-5.

Bibliografía

- Leber R, Zenz R, Schröttner K, Fuschbichler S, Pühringer B, Turnowsky F. (2001). A novel sequence element is involved in the transcriptional regulation of expression of *ERG1* (squalene epoxidase) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 914-924.
- Lee KS, Patton JL, Fido M, Hines LK, Kolhwein SD, Paltauf F, Henry SA, Levin DE. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* *PLB1* gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity. *J. Biol. Chem.* **269**:19725-19730.
- Lee TI, Rinaldi NJ, Robert F, Odom DT, Bar-Joseph Z, Gerber GK, Hannet NM, Harbison CT, Thomson CM, Simon I, Zeitlinger J, Jennings EG, Murray HL, Gordon DB, Ren B, Wyrich JJ, Tagne J-B, Volkert TL, Fraenkel E, Gifford DK, Young RA. (2002) Transcriptional regulatory networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **298**:799-804.
- Lewis JG, Learmonth RP, Atfield PV, Watson K. (1997) Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 30-36.
- Lewis JG, Learmonth RP, Watson K. (1993) Role of growth phase and ethanol in freeze thaw resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1065-1071.
- Lewis JG, Learmonth RP, Watson K. (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141**:687-694.
- Lewis TA, Rodríguez RJ, Parks LW. (1987) Relationship between intracellular sterol content and sterol sterification and hydrolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **921**:205-212.
- Liang P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 961-971.
- Lockhart DJ, Winzeler EA. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**:827-836.
- Lopez M, Berggren K, Chernokalskaya E, Lazarev A, Robinson M, Patton W. (2000) A comparison of silver stain and SYPRO Ruby protein gel stain with respect to protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* **21**: 3673-3683.
- M'Baya B, Fegueur M, Servouse M, Karst F. (1989) Regulation of squalene synthetase and squalene epoxidase activities in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* **24**:1020-1023.

Bibliografía

- Mager** WH, Kruijff AJJ. (1995) Stress-induced transcription activation. *Microbiol Rev.* **59**:506-531.
- Maillet** I, Lagniel G, Perrot M, Boucherie H, Labarre J. (1996) Rapid identification of yeast proteins on two-dimensional gels. *J. Biol. Chem.* **271**:10263-10270.
- Mann** M, Hendrickson RC, Pandey A. (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:437-473.
- Marchler** G, Schuller C, Adams G, Ruis H. (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J.* **12**:1997-2003.
- Martínez-Rivas** JM, García-Díaz MT, Mancha M. (2000) Temperature and oxygen regulation of microsomal oleate desaturase (FAD2) from sunflower. *Biochemical Society Transactions* **28**:890-892.
- Martínez-Rivas** JM, Sperling P, Lühs W, Heinz E. (2001) Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding* **8**: 159-168.
- McKersie** BD, Chen Y, Beus MD, Bowley SR, Bowler C, Inze D, D'Halluin K, Botterman J. (1993) Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **103**:1155-1163.
- Mewes** HW, Frishman D, Guldener U, Mannhaupt G, Mayer K, Mokrejs M, Morgenstern B, Munsterkoter M, Rudd S, Weil B. (2002) MIPS: A database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res.* **30**:31-34.
- Meyer** ED, Sinclair NA, Nagy B. (1975) Comparison of the survival and metabolic activity of psychophilic and mesophilic yeasts subjected to freeze-thaw stress. *App. Microbiol.* **29**:739-744.
- Miguel** M, James D, Dooner H, Browse J. (1993) *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:6208-6212.
- Miosga** M, Zimmermann FK (1996) Cloning and characterization of the first two genes of the non-oxidative part of the *Saccharomyces cerevisiae* pentose-phosphate pathway. *Curr. Genet.* **30**:404-409.
- Morita** Y, Nakamori S, Takagi H. (2003) L-Proline accumulation and freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* are caused by a mutation in the *PRO1* gene encoding γ -glutamyl kinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 212-219.

Bibliografía

Morris GJ, Coulson GE, Clarke KJ. (1988) Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*. The effects of growth conditions. *Cryobiology* **25**:471-472.

Mouritsen OG. (2001) Theoretical models of phospholipid phase transitions. *Chem. Phys. Lipids.* **57**:179.

Mrsa V, Ecker M, Strahl-Bolsinger S, Nimtz M, Lehle L, Tanner W. (1999) Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**:3076-3086.

Murakami Y, Yokoigawa K, Kawai F, Kawai H. (1996) Lipid composition of commercial baker's yeasts having different freeze tolerance in frozen dough. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**:1874-1876.

Murakami Y, Yokoigawa K, Kawai H. (1995) Lipid composition of a freeze-tolerant yeast, *Torulasporea delbrueckii*, and its freeze sensitive mutant. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**:167-171.

Murata N, Los DA. (1997) Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.* **115**:875-879.

Myers DK, Atfield PV. (1999) Intracellular concentration of exogenous glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* provides for improved leavening of frozen and sweet doughs. *Food Microbiol.* **16**: 45-51.

Nakagawa S, Ouchi K. (1994) Construction from a single parent of baker's yeast strains with high freeze tolerance and fermentative activity in both lean and sweet doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3499-3502.

Nakagawa Y, Sakumoto N, Kaneko Y, Harashima S. (2002) *Mga2p* is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **291**:707-713.

Nath N, McCartney RR, Schmidt MC. (2003) Yeast Pak1 kinase associates with and activates Snf1. *Mol. Cell Biol.* **23**: 3909-3917.

Niedenthal R, Riles L, Guldener U, Klein S, Johnston M, Hegemann JH. (1999) Systematic analysis of *S. cerevisiae* chromosome VIII genes. *Yeast* **15**:1775-1796.

Nishihara JC, Champion KM. (2002) Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain. *Electrophoresis* **23**:2203-2215.

O'Farrell PH. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.

Bibliografía

Oda Y, Tonomura K (1995) Electrophoretic karyotyping of the yeast genus *Torulaspota*. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**: 190-193.

Oda Y, Tonomura K. (1993) Selection of a novel baking strain from the *Torulaspota* yeasts. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 1320-1322.

Oda Y, Yabuki M, tonomura K, Fukunaga M (1997) A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S-28S rRNA spacer regions. *Yeast* **13**: 1243-1250.

Oh CS, Toke DA, Mandala S, Martin CE. (1997) *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are requires for sphingolipid formation. *J. Biol. Chem.* **272**:17376-17384.

Packer NH, Pawlak A, Kett WC, Gooley AA, Redmond JW, Williams KL. (1997) Proteome analysis of glycoforms: a review of strategies for the microcharacterisation of glycoproteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **18**:452-460.

Panoff JM, Thammavongs B, Laplace JM, Hartke A, Boutibonnes P, Auffray Y. (1995) Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. *Cryobiology* **32**:616:520.

Park JI, Grant CM, Attfield PV, Dawes IW. (1997) The freeze thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS-cyclic AMP signal transduction pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3818-3824.

Park JI, Grant CM, Davies MJ, Dawes IW. (1998) The cytoplasmic Cu, Zn superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to freeze-thaw stress. Generation of free radicals during freezing and thawing. *J. Biol. Chem.* **273**:22921-22928.

Parks LW, Casey WM (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:95-116.

Paul MF, Ackermann S, Yue J, Arselin G, Velours J, Tzagolof A. (1994) Cloning of the yeast *ATP3* gene coding for the gamma-subunit of F1 and characterization of *atp3* mutants. *J. Biol. Chem.* **269**:26158-26164.

Peyou-Ndi MM, Watts JL, Browse J. (2000) Identification and characterization of an animal Δ^{12} fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**:399-408.

Pretorius IS. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**:675-729.

Bibliografía

Przybyla-Zawislak B, Dennis RA, Zakharkin SO, McCammon MT. (1998) Genes of succinyl-CoA ligase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **258**:736-743.

Quail MA, Kelly SL. (1996) The extraction and analysis of sterols from yeast. *Methods Mol. Biol.* **53**:123-131.

Que QQ, Winzeler EA. (2002) Large scale mutagenesis and functional genomics in yeast. *Functional and Integrative Genomics.* **2**: 193-198.

Randez-Gil F, Aguilera J, Codón A, Rincón AM, Estruch F, Prieto JA. (2003) Baker's yeast: challenges and future prospects. pp. 57-85. En: *Functional Genetics of Industrial Yeasts*. de Winde JH (ed). Topics in Current Genetics. Elsevier.

Randez-Gil F, Bojunga N, Proft M, Entian KD. (1997) Glucose derepression of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* correlates with phosphorylation of the gene activator Cat8p. *Mol. Cell Biol.* **17**:2502-2510.

Randez-Gil F, Prieto JA, Hernández-López MJ. (2002) Utilization of *Torulaspora delbruekii* strains in the production of sweet dough. PCT/ES02/00431.

Randez-Gil F, Sanz P, Prieto JA. (1999) Engineering baker's yeast: rooms for improvement. *Trend Biotechnol.* **17**:237-144.

Randez-Gil F, Sanz P. (1994) Construction of industrial baker's yeast strains able to assimilate maltose under catabolite repression conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 581-586.

Ratkowsky DA, Lowry RK, McMeekin TA, Stokes AN, Chandler RE. (1983) Model of bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J. Bacteriol.* **154**:1222-1226.

Ratkowsky DA, Olley J, McMeekin TA, Ball A. (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* **149**: 1-5.

Robinson J. (1994) *The Oxford Companion to wine*. Oxford University Press, Oxford,UK.

Rodríguez-Manzanaque MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E. (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **19**:8180-8190.

Rodríguez-Vargas S, Estruch F, Randez-Gil F. (2002) Gene expression analysis of cold and freeze stress in baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3024-3030.

Bibliografía

Rosenfeld J, Capdevielle J, Gillemot JC, Ferrara P. (1992) In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **203**:173-179.

Russell NJ. (1984) Mechanism of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trends Biochem. Sci.* **9**:108-112.

Sahara T, Goda T, Ohgiya S. (2002) Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J. Biol. Chem.* **277**: 50015-50021.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Samuel D, Kumar TKS, Ganesh G, Jayaraman G, Yang PW, Chang MM, Trivedi VD, Wang SL, Hwang KC, Chang DK, Yu C. (2000) Proline inhibits aggregation during protein refolding. *Protein Sci.* **9**: 344-352.

Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S. (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO Journal* **11**:2357-2364.

Sandercock SP, Russell NJ. (1980) The elongation of exogenous fatty acids and the control of phospholipid acyl chain length in *Micrococcus cryophilus*. *Biochem J.* **188**:585-592.

Sangwan V, Örväl BL, Beyerly J, Hirt H, Dhindsa RS. (2002) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant J.* **31**: 629-638.

Sano F, Asakawa N, Inouye Y, Sakurai M. (1999) A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. *Cryobiology* **39**: 80-87.

Schurr MJ, Yu H, Martínez-Salazar JM, Hibler NS, Deretic V. (1995) Biochemical characterization and posttranslational modification of AlgU, a regulator of stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**:874-880.

Sherman F, Fink GR, Hicks JB. (1995) Methods in yeast genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor (New York).

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**: 850-858.

Shima J, Hino A, Yamada-Iyo C, Suzuki Y, Nakajima R, Watanabe H, Mori K, Takano H. (1999) Stress tolerance in dough of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase

Bibliografía

mutants derived from commercial baker's yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2841-2846.

Shima J, Sakata-Tsuda Y, Suzuki Y, Nakajima R, Watanabe H, Kawamoto S, Takano H. (2003) Disruption of the *CAR1* gene encoding arginase enhances freeze tolerance of the commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 715-718.

Sinchaikul S, Sookkheo B, Phutrakul S, Pan FM, Chen ST. (2002) Proteomic study of cold shock protein in *Bacillus stearothermophilus* P1: Comparison of temperature downshifts. *Proteomics* **2**: 1316-1324.

Singer M. (1981) Permeability of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *Chem. Phys. Lipids.* **28**:253-267.

Skrzypek M, Lester RL, Dickson RC. (1997) Suppressor gene analysis reveals an essential role for sphingolipids in transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**:1513-1520.

Somer L, Schmulman T, Dror S, Hashmueli Y, Kashai Y. (2002) The eukaryote chaperonin *CCT* is a cold shock protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones* **7**:47-54.

Stear Ch A. (1990) Handbook of bread making technology. pp.467-491. Elsevier Science Publishers Ltd.

Stolz LE, Huynh CV, Thorner J, York JD (1998a) Identification and characterization of a family of inositol polyphosphate 5-phosphatases (*INP51*, *INP52*, *INP53* gene products) in the yeast. *Genetics* **148**:1715-1729.

Stolz LE, Kuo WJ, Longchamps J, Sekhon MK, York JD (1998b) *INP51*, a yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase required for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis and whose absence confers cold-resistant phenotype. *J. Biol. Chem.* **273**:11852-11861.

Stukey JE, McDonough VM, Martin CE. (1989) Isolation and characterization of *OLE1* a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **264**: 16537-16544.

Stukey JE, McDonough VM, Martin CE. (1990) The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes $\Delta 9$ fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* **265**:20144-20149.

Suzuki I, Los DA, Murata N. (2000) Perception and transduction of low-temperature signals to induce desaturation of fatty acids. *Biochem. Soc. Trans.* **28**:628-630.



Bibliografía

Swam TM, Watson K. (1998) Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**:191-197.

Takagi H, Iwamoto F, Nakamori S. (1997) Isolation of freeze-tolerant laboratory strain of *Saccharomyces cerevisiae* from proline-analogue-resistant mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 405-411.

Takagi H, Sakai K, Morida K, Nakamori S. (2000) Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**:103-108.

Tanghe A, Van Dijck P, Dumortier F, Teunissen A, Hohmann S, Thevelein JM (2002) Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5981-5989.

Terashima H, Hamada K, Kitada K (2003) The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI-associated protein, from the plasma membrane to the cell wall affecting the cellular function. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**:175-180.

Terashima H, Yabuki N, Arisawa M, Hamada K, Kitada K. (2000) Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of *FKS1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **264**:64-74.

Teunissen A, Dumortier F, Gorwa MF, Bauer J, Tanghe A, Loiez A, Smet P, Van Dijck P, Thevelein JM. (2002) Isolation and characterization of a freeze tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen dough. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4780-4787.

Thammavongs B, Corroler D, Panoff JM, Auffray Y, Boutibonnes P. (1996) Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing thawing challenge. *Let. Appl. Microbiol.* **23**: 398-402.

Thammavongs B, Panoff JM, Guéguen M. (2000) Phenotypic adaptation to freeze-thaw of the yeast-like fungus *Geotrichum candidum*. *Int. J. Food Microbiol.* **60**:99-105.

Thieringer HA, Jones PG, Inouye M. (1998) Cold shock and adaptation. *BioEssays* **20**: 49-57.

Thomas BJ, Rothstein R. (1989) Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell.* **56**:619-630.

Bibliografía

Toh-e A, Yasunaga S, Nisogi H, Tnaka K, Oguchi T, Matsui Y. (1993) Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are requires for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**:481-494.

Torneo ME, Fenner G, Tove SR, Parks LW. (1992) Effect of sterol alterations on conjugation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **8**:1015-1024.

Trabalzini L, PAffetti A, Scalonì A, Talamo F, Ferro E, Coratza G, Bovalini L, Lusini P, Martelli P, Santucci A. (2003) Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild type wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* **370**:35-46.

Trivedi NB, Jacobson GK, Tresh W. (1986) Baker's yeast. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **4**: 75-109.

Tsuchiya E, Matsuzaki G, Kurano K, Fukuchi T, Tsukao A, Miyakawa A. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* *SSD1* gene is involved in the tolerance to high concentration of Ca^{2+} with the participation of *HST1/NRC1/BFR1*. *Gene* **176**:35-38.

Tsukada M, Will E, Gallwitz D. (1999) Structural and functional analysis of a novel coiled-coil protein involved in Ypt6 GTPase-regulated protein transport in yeast. *Mol. Biol. Cell* **10**:63-75.

Umebayashi K, Nakano A. (2003) Ergosterol is required for targeting tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell. Biol.* **161**:1117-1131.

Ushio H, Watabe S. (1993) Effects of temperature acclimation on Ca^{2+} -ATPase of the carp sarcoplasmic reticulum. *J. Exp. Zool.* **265**:9-17.

Vaillier J, Arselin G, Graves PV, Camougrand N, Velours J. (1999) Isolation of supernumerary yeast ATP synthase subunits e and i. Characterization of subunit i and disruption of its structural gene *ATP18*. *J. Biol. Chem.* **274**:543-548.

van der Vaart JM, Caro LH, Chapman JW, Klis FM, Verrips CT. (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**:3104-3110.

van Dijck P, Colavizza D, Smet P, Thevelein JM. (1995) Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 109-115.

van Dijck P, Ma P, Versele M, Gorwa MF, Colombo S, Lemaire K, Bossi D, Loiez A, Thevelein JM. (2000) A baker's yeast mutant (*fil1*) with a specific partially inactivating mutation in adenylate cyclase maintains a high stress resistance

Bibliografía

during active fermentation and growth. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**: 521-530.

van Hoek P, van Dijken JP, Pronk JT. (2000) Regulation of fermentative capacity and levels of glycolytic enzymes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **26**: 724-736.

Vaughan-Martin A, Martini A. (1998) *Saccharomyces* Meyen ex Reess. En Kurtzman CP, Fell JW (eds) *The Yeasts. A taxonomic study*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp 358-371.

Versele M, de Winde JH, Thevelein JM. (1999). A novel regulator of G protein signalling in yeast, *Rgs2*, down regulates glucose-activation of the cAMP pathway through direct inhibition of *Gpa2*. *EMBO J.* **18**:5577-5591.

Vigh I, Los DA, Horvath I, Murata N. (1993) The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:9090-9094.

Vigh L, Maresca B, Harwood JL. (1998) Does the membrane physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem. Sci.* **23**:369-374.

Wang JS, Sharp SJ, Poirier GM, Wagaman PC, Chambers J, Pyati J, Hom YL, Galindo JE, Huvar A, Peterson PA, Jackson MR, Erlander M. (1996) Cloning differentially expressed mRNAs. *Nature Biotechnol.* **14**:1685-1691.

Weber MH, Klein W, Müller L, Niess UM, Marahiel MA. (2001) Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol. Microbiol.* **39**:1321-1329.

Winderickx J, Holsbeeks I, Lagatie O, Giots F, Thevelein J, de Winde JH. (2003) From feast to famine; adaptation to nutrient availability in yeast. En: *Topics in Current Genetics*, Vol. 1 (Hohmann S, Mager WH, eds), "Yeast stress responses". Springer Verlag, Berlin, pp 305-386.

Wolfe J, Bryant G. (1999) Freezing, crying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology* **39**: 103-129.

Wouters JA, Rombouts FM, Kuipers OP, de Vos WM, Abee T. (2000) The role of cold shock proteins in low temperature adaptation of food related bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **23**:165-173.

Bibliografía

YaDeau J, Klein TC, Blobel G. (1991) Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the Sec11 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:517-521.

Yates JR. (2000) Mass spectrometry. From genomics to proteomics. *TIC* **16**:5-8.

Yoshida Y, Sato T, Hashimoto T, Ichikawa N, Nakai S, Yoshikawa H, Imamoto F, Tagawa K. (1990) Isolation of a gene for a regulatory 15-kDa subunit of mitochondrial F1F0-ATPase and construction of mutant yeast lacking the protein. *J. Biol. Chem.* **192**:49-53.

Yun DJ, zhao Y, Pardo JM, Narsimhan ML, Damsz B, Lee H, Abad LR, D'Urzo MP, Hasegawa PM, Bressan RA. (1997) Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotine, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 7082-7087.

Zhang L, Ohta A, Horiuchi H, Takagi M, Imai R. (2001) Multiple mechanisms regulate expression of low temperature responsive (*LOT*) genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**: 531-535.

Zhang L, Onda K, Imai R, Fukuda R, Horiuchi H, Ohta A. (2003) Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**:308-314.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha acordó otorgar a esta Tesis Doctoral de

D./D^a. **SONIA RODRÍGUEZ VARGAS**.....

la calificación de *SOBRESALIENTE CUM LAUDE*.....

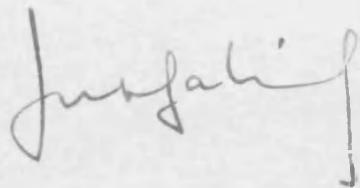
Valencia, a *22* de *diciembre* de *2003*.....

EL SECRETARIO,



EL PRESIDENTE

Dr. D. Marcel.lí del Olmo Muñoz



Dr. D. Julio Salinas Muñoz