

130
2 ej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

OBTENCION Y CARACTERIZACION
DE MUTANTES Y DEL GEN QUE CODI-
FICA PARA UNA PROTEINA REQUE-
RIDA PARA EL TRANSPORTE DE
POTASIO DE ALTA AFINIDAD EN LA
LEVADURA *kluveromyces lactis*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
MANUEL MIRANDA ARANGO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

ABREVIATURAS

RESUMEN

I. INTRODUCCION	1
I.1 Generalidades sobre las levaduras	1
I.2 Genética extracromosómica	3
I.3 El transporte del potasio en levaduras	7
II. OBJETIVOS	11
III. MATERIALES Y METODOS	12
III.1 Cepas	12
III.2 Medios de cultivo y reactivos	13
III.3 Plásmidos	16
III.3.1 Transformación bacteriana	17
III.4 Construcción de un banco de genes de <u>Kluyveromyces lactis</u>	17
III.4.1 Maxipreparación	20
III.5 Transformación de levaduras	21
III.5.1 Transformación de la cepa TRK de <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	22
III.6 Medida del transporte de potasio	22
III.7 Caracterización del plásmido en las transformantes	23
III.8 Obtención de mutantes resistentes a bromuro de etidio y deficientes en el transporte de potasio (K_{dm}^{-}).	24
III.8.1 Análisis genético de las mutantes K_{dm}^{-}	24

IV RESULTADOS	26
IV.1 Transformantes de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> que mostraron un fenotipo silvestre	26
IV.2 Análisis fisiológico de las transformantes	29
IV.3 Caracterización de los plásmidos	32
IV.4 Mutantes de <u>Kluyveromyces lactis</u> dependientes de potasio	33
V DISCUSION Y CONCLUSIONES	38
V.1 Sistema de transformación usado para <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	38
V.2 Transformantes de <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	39
V.3 Mutantes deficientes en el transporte de potasio	42
V.4 Conclusiones y perspectivas	43
VI REFERENCIAS	45

ABREVIATURAS

DNA	- ácido desoxiribonucleico
RNA	- ácido ribonucleico
ADP	- difosfato de adenosina
ATP	- trifosfato de adenosina
Kb	- Kilo pares de bases
EDTA	- ácido etilen diamino tetracético
SDS	- dodecil sulfato de sodio
Tris	- Tris Hidroximetil aminometano
EB	- Bromuro de etidio
MES	- ácido 2(N-Morfolino) etanosulfónico
TEA	- trietanol amina
Kdm	- mutante deficiente en el transporte de potasio
AcLi	- acetato de litio
PEG	- polietilenglicol

RESUMEN

Las levaduras cuentan con una H⁺-ATPasa, por lo menos un canal de potasio y al parecer dos sistemas de transporte de potasio, uno de alta y otro de baja afinidad.

En este trabajo se reporta la clonación del gen del acarreador de potasio de alta afinidad de *Kluyveromyces fragilis* (TRK-1), que se identificó por expresión heteróloga en una mutante de *Saccharomyces cerevisiae* Δ TRK (*trk* Δ , *Kdm*⁻). Con un banco de genes de *K. fragilis* se transformó la mutante Δ TRK de *S. cerevisiae*, seleccionando en un medio sin uracilo y replicando las colonias que mostraban crecimiento en un medio bajo en sales, sin uracilo y suplementado con 1 mM de K⁺ (LSKIURA). Las colonias que mostraron crecimiento en LSKIURA se seleccionaron, y se observó complementación génica de la mutación *trk* Δ . Se midió el transporte de potasio de las transformantes (*Kdm*⁻)⁺, comprobando que habían adquirido un fenotipo silvestre para el transporte de potasio. Un análisis del plásmido de una transformante mostró un inserto de 7.4 Kb que lleva a el gen del acarreador de *K. fragilis*.

Por otra parte, se obtuvieron mutantes de *K. fragilis* deficientes en el transporte de potasio (*Kdm*⁻), seleccionando clones resistentes a 20 μ M de bromuro de etidio. Se aisló y caracterizó genéticamente una mutante *Kdm*⁻ que exhibió un patrón de segregación 2:2 para los fenotipos (*Kdm*⁺/*Kdm*⁻) (*ER*^B/*ER*^b), lo que indica que la mutación es nuclear.

INTRODUCCION

I.1 GENERALIDADES SOBRE LAS LEVADURAS

Las levaduras pueden ser definidas como hongos unicelulares que se reproducen por gemación o por fisión (Kreger Van Rij 1984) o como organismos eucariontes unicelulares, que de acuerdo a su morfología se consideran como un estado en el ciclo de vida de los hongos hifales (Rose et al, 1969).

Las levaduras son taxonómicamente diversas e incluyen 3 grupos: a) las levaduras ascospórogenas b) basidiospórogenas y c) levaduras imperfectas. Estas últimas presentan afinidad tanto con los ascomyces como con los basidiomycetes (Kreger Van Rij 1984). El subphylum Ascomycotina comprende la clase Hemiascomycetes y el orden Endomycetales con 2 familias: la Esperomphoraceae y la Saccharomycetaceae. Esta última agrupa organismos que han sido ampliamente estudiados tanto genética como bioquímicamente tales como: Saccharomyces, Kluyveromyces, Pichia, Torulasporea, Zygosaccharomyces, Schizosaccharomyces, etc. El subphylum Deuteromycotina comprende la clase Blastomycetes donde se halla la familia Cryptococcaceae de importancia médica por tener especies patógenas como Candida y Cryptococcus.

Las levaduras Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis y Schizosaccharomyces pombe pueden crecer como células haploides o diploides. Las dos primeras normalmente se reproducen asexualmente por gemación y la tercera por fisión. También pueden reproducirse sexualmente, y en este caso 2 células haploides con factor de compatibilidad o sexual opuesto, α vs α o h^- vs h^+ , se

conjugan para formar un cigoto, que dará lugar a una clona diploide, la cual se puede dividir mitóticamente y posteriormente sufrir un proceso de meiosis y originar una tétrada de ascosporas haploides (Fig 1a y 1b).

Las levaduras han sido usadas en diversos estudios como un modelo de organismos eucariontes, con los cuales se pueden investigar los fenómenos celulares, pues poseen características ventajosas que incluyen a: la alternancia en la reproducción sexual y asexual, por mostrar un crecimiento rápido, y su anaerobiosis facultativa, lo que les permite crecer sin oxígeno. Tanto la levadura Saccharomyces cerevisiae como Kluyveromyces lactis son aeróbeas facultativas, y pueden crecer en ausencia de oxígeno cuando se les proporciona sustratos fermentables, derivando su energía a partir de la glucólisis. La utilización de sustratos como glicerol, lactato, etanol y acetato requiere de la presencia de oxígeno y mitocondrias funcionales. La fermentación es vigorosa y varias especies de K. lactis producen un pigmento rojo estrechamente relacionado o idéntico con la pulquerimina.

Las levaduras han sido usadas extensamente en estudios genéticos, debido a su fácil manipulación en el laboratorio y a la disponibilidad de un amplio rango de mutaciones que afectan diversos procesos celulares (Sherman y Fink 1979).

1.2 GENETICA EXTRACROMOSOMICA

Un plásmido se puede definir como un elemento genético extracromosómico de replicación autónoma (Rieger et al, 1976). Los plásmidos se caracterizan por poseer una secuencia de iniciación, el origen de replicación (*ori* en bacterias, *ars* en levaduras) cuya función consiste en la formación de la horquilla de replicación, y además poseen una secuencia de terminación. La mayoría de los plásmidos conocidos son moléculas de DNA de doble cadena, circulares y covalentemente cerrados (cccds DNA). Sin embargo, también existen plásmidos lineales (ds DNA) de DNA o de RNA; estos pueden ser episomales o integrativos, por su número unicopia o multicopia; y por su localización, mitocondriales o citoplásmicos (Esser et al, 1986).

En los procariontes los plásmidos pueden conferir características fenotípicas como resistencia a ciertos antibióticos (Ampicilina, tetraciclina, oligomicina etc.). Aunque en las levaduras no se ha encontrado relación entre la presencia del plásmido de 2um de *Saccharomyces cerevisiae* y alguna característica fenotípica, se han reportado otros plásmidos como el "Killer" de *S. cerevisiae* que codifica para una toxina, y el plásmido de envejecimiento de *Podospora anserina*, que altera la velocidad de crecimiento de las células en que se encuentra.

Los plásmidos están ampliamente distribuidos y se encuentran en plantas, protocistas, animales, hongos y procariontes. En contraste con los plásmidos procariontes, muchos plásmidos eucariontes son lineales y están en las mitocondrias

La mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* poseen

un elemento extracromosómico de replicación autónoma, análogo a un plásmido bacteriano, llamado DNA de 2 um. Este elemento está presente en 50 a 100 copias por célula aproximadamente y se mantiene en una manera estable, lo que lo hace potencialmente útil como vector de clonación. Este DNA muestra una estricta especificidad de hospedero y no puede ser usado en otras especies (Hollenberg, 1982), aunque se ha reportado que funciona y es estable en *Torulaspota delbruckii* (Compagno et al.1989) y *Schizosaccharomyces pombe* (Picard et al, 1990).

Se han aislado plásmidos similares al 2 um de *Kluyveromyces drosophilaram* (Chen et al, 1986). Este plásmido circular pKD1 de 1.6um, se mantiene en forma estable en la célula en 50 a 70 copias. Se han construido vectores con marcadores de selección que se pueden replicar en un número alto de copias en *K. lactis* (Chen et al, 1986; Bianchi et al, 1987).

Muchos de estos plásmidos con la propiedad de replicación autónoma (ARS) de *K. drosophilaram* son funcionales en *S. cerevisiae*, *K. fragilis* y en *K. lactis*. Estos plásmidos con secuencias ARS que se replican en más de una especie de levadura pueden ser la base para la construcción de vectores lanzadera (Shuttle en inglés), que pueden ser usados para transferir información genética entre 2 especies distintas de levadura y analizar así mecanismos de expresión de un gen en dos contextos genómicos diferentes (Fabiani et al 1990).

La presencia de los plásmidos lineales pGKL1 (13.4kpb) y pGKL2 (8.9kpb) en *K. lactis* está correlacionada con la producción de una toxina killer que mata, además de ciertas cepas sensibles

de *K. lactis*, a otras especies de levadura . Este plásmido puede ser transferido a *S. cerevisiae* por transformación (Gunge, 1982) o por fusión celular (Gunge y Sakaguchi, 1981). Su mantenimiento en *S. cerevisiae* se demuestra por la producción de la toxina Killer de *K. lactis*.

Debido a que los plásmidos de *K. lactis* se pueden replicar y funcionar en sistemas heterólogos, estos pueden ser utilizados en la construcción de vectores eucarióticos. Los plásmidos eucarióticos como vectores potenciales para clonación son importantes en Biotecnología y Biología Molecular.

De manera similar a los plásmidos bacterianos, los plásmidos eucarióticos son vectores ideales para la transferencia y propagación de material genético en hospederos eucarióticos, lo que abre la posibilidad de usar las técnicas de clonación para incrementar la productividad o alterar las características de producción de microorganismos industriales (Esser et al, 1986).

Los vectores más usados para la clonación de genes son híbridos que constan de una parte procariótica y otra eucariótica (vectores lanzadera) Fig. 2a. La parte procariótica le permite al vector propagarse eficientemente y seleccionarse en una bacteria debido a que lleva el origen de replicación autónoma para bacterias y un marcador de selección procariótico, como un gen de resistencia a antibióticos; la parte eucariótica está compuesta de 3 dominios funcionales: a) un marcador de selección que pueden ser genes de complementación en alguna ruta biosintética, o de resistencia a antibióticos; b) un origen de replicación autónoma eucariótico; y c) una región con sitio múltiple de clonación para los genes a ser transferidos (Volkert et al, 1989) (Fig 2a y

2b).

Estos vectores híbridos de clonación se han usado para identificar genes expresándolos tanto en sistemas homólogos como en sistemas heterólogos. Por ejemplo, Au-Young y Robbins en 1990 aislaron el gen de la quitina sintasa de *Candida albicans* expresándolo en *S. cerevisiae* a partir de un banco de genes hecho en un plásmido de *S. cerevisiae*, el YEp 13 (Au-Young et al, 1990). Se han clonado genes de enzimas biosintéticas de purinas de humano por complementación de mutaciones en levadura, usando vectores de expresión que llevan el Σ um en *S. cerevisiae* (Schild et al, 1990). Se ha reportado también que vectores con el Σ um se pueden replicar en *Trichosporon delbrueckii* pero son muy inestables (Compagno et al 1989).

Para poder realizar estudios genéticos, es necesario muchas veces disponer de mutantes que presenten alteraciones en el genoma nuclear, lo que permite tener un patrón de referencia claramente mendeliano, y para ello se utilizan mutantes auxotróficas. Las mutantes auxotróficas son aquellas que presentan deficiencia en la síntesis de una o más sustancias (aminoácidos, vitaminas o bases nitrogenadas), que suelen ser producto de sus patrones biosintéticos, por lo que el o los nutrientes que se requieren se deben adicionar al medio de cultivo para que las mutantes puedan crecer.

I.3 EL TRANSPORTE DE POTASIO EN LEVADURAS

Las levaduras como todos los organismos acumulan potasio del medio externo para satisfacer sus requerimientos celulares. La forma en que lo logran es por medio de una ATPasa de membrana plasmática. Esta ATPasa de membrana se ha identificado como una bomba electrogénica de protones y el gradiente electroquímico (μH^+) generado a través de la membrana provee la fuerza motriz para las funciones fisiológicas importantes tales como el transporte de aminoácidos, la secreción de ácidos y el mantenimiento del potasio intracelular (Goffeau et al 1983; Serrano et al 1990,1986).

Debido a que todos los organismos requieren potasio para vivir, el transporte de este catión ha sido objeto de estudios intensos. Los primeros estudios encaminados a dilucidar el mecanismo de transporte de potasio en levaduras fueron iniciados por el grupo de Conway, quien demostró la existencia de un acarreador catiónico en la membrana plasmática de levaduras (Conway y O Malley, 1946). Después propuso la existencia de un mecanismo para el transporte de potasio, que implicaba un acarreador que intercambiaba K^+ por H^+ , y le llevó a suponer que éste estaba conectado con los sistemas metabólicos de la célula para obtener energía y realizar el proceso, pues tanto la salida de H^+ como la entrada de K^+ deberían ocurrir en contra de un gradiente de concentración (Conway y Duggan 1957). Posteriormente Mitchell propuso la teoría quimiosmótica, en la que explicó que los sistemas de transporte en los seres vivos se realizan siguiendo el sentido de los potenciales electroquímicos existentes en las membranas (Mitchell, 1974) y que el

diferentes: uno de alta afinidad cuando las células se crecieron a concentraciones de potasio del orden de $5\mu\text{M}$. Este sistema muestra una K_m de $150\mu\text{M}$ y una V_{max} de $21\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$; y otro sistema de baja afinidad se observó cuando las células se crecieron a concentraciones altas de potasio (2mM) y muestra una K_m de 6 mM y una V_{max} de $6\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$. (Rodríguez Navarro et al. 1984). Este descubrimiento llevó a proponer la existencia de un sistema de transporte de potasio interconvertible que puede operar con 2 afinidades diferentes o 2 sistemas de transporte independientes, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad.

En 1985, el grupo de Rodríguez Navarro obtuvo una mutante de *S. cerevisiae* deficiente en el transporte de potasio de alta afinidad, lo que demostró la existencia de 2 sistemas de transporte de potasio independientes (Rodríguez Navarro et al, 1985). En otros organismos como *Neurospora crassa* y *Escherichia coli* también se han reportado 2 sistemas de transporte de potasio (Tatum y Shyman, 1964; Epstein 1971).

En 1988, se clonó y secuenció el gen que codifica para el acarreador de alta afinidad TRK-1 en *S. cerevisiae* demostrando la independencia física y funcional del sistema de transporte de protones y de potasio (Gaber et al 1988). El gen que codifica para el acarreador de potasio TRK-1 de *S. cerevisiae* mapea en el cromosoma X de la levadura y muestra regiones de homología con la subunidad α del receptor de acetilcolina de *Torpedo californica* y entre el TRK-1 y la ATPasa transportadora de potasio de *E. coli* codificada por el gen KdpC.

En este trabajo de tesis se reporta la clonación y caracterización física (mapa de restricción) del gen que codifica

para el acarreador de potasio de alta afinidad en la levadura *Kluyveromyces lactis* por expresión y complementación heteróloga, usando mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, se reporta también la obtención y caracterización de mutantes deficientes en el transporte de potasio de alta afinidad en *K. lactis*.

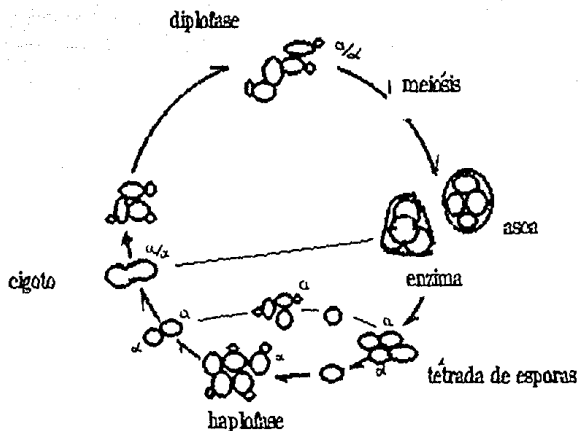


Fig. 1a. Ciclo de vida heterotático de *S. cerevisiae*

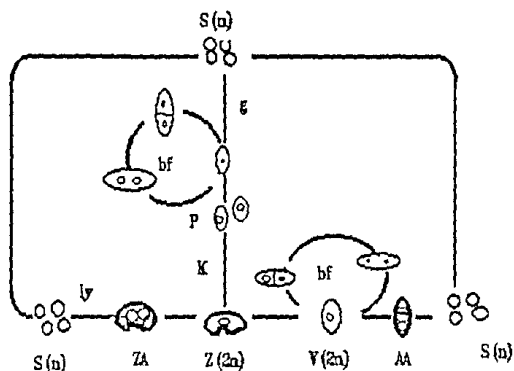


Fig. 1b. Ciclo de vida de *Schiz. pombe* S(n) — esporas haploides, V(n) células vegetativas haploides, V(2n) células vegetativas diploides, Z(2n) cigoto diploide, ZA ascua cigótica, AA — ascua asexual, g — germinación, bf fisión binaria, P — plasmogamia, K — cariogamia, m — meiosis, a esporulación, (y líneas de la pared del ascua) (da Cunha, 1938)

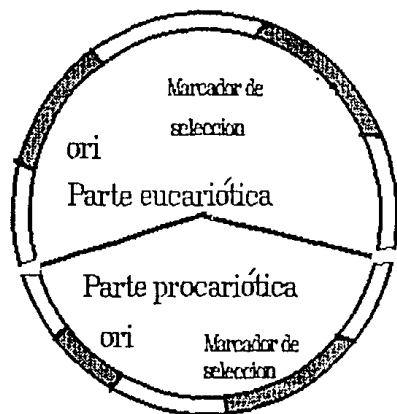


Fig. 2a Esquema de un plásmido lanzadera que se puede replicar en 2 organismos, un procarionte y un eucariote.

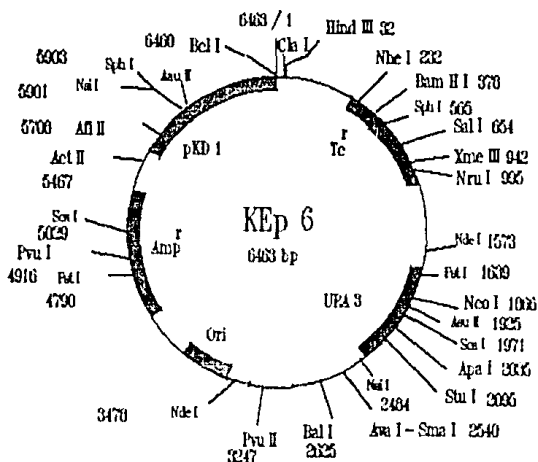


Fig. 2b Mapa de restricción del plásmido KEp6

II. OBJETIVOS

El presente trabajo se llevó a cabo con base en los trabajos reportados por otros investigadores, en donde genes de otros organismos son expresados en S. cerevisiae (Picard et al, 1990, Compagno et al, 1989; Schild et al, 1990; Fabiani et al, 1990, Au-Young et al 1990). Por la estrecha relación filogenética entre S. cerevisiae y K. lactis, se pensó que podíamos utilizar una mutante del transporte de potasio de S. cerevisiae como hospedero para una clona que llevara el gen del acarreador de K^+ de K. lactis, expresándolo en un vector apropiado. Para ello aislamos transformantes de una mutante de S. cerevisiae deficiente en el transporte de potasio (Kdm^-), que adquirieron un fenotipo silvestre (Kdm^-)⁺ al transformar con una genoteca de K. lactis.

Por otro lado, se ha reportado que una deficiencia en el transporte de potasio está asociado con una dificultad de las células para transportar el colorante mutágeno bromuro de etidio (Brunner et al, 1982). Con este antecedente, decidimos obtener mutantes deficientes en el transporte de potasio Kdm^- , seleccionando clonas resistentes a 20 μ M de EB y hacer una caracterización genética de estas

III. MATERIALES Y METODOS

III.1 CEPAS

Especies y cepa	Genotipo
<u>E. coli</u>	
HB101	hsdS20, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rps L20, xyl-15, mt1-14, supE44
<u>S. cerevisiae</u>	
R-757	Mat ⁺ , his4-15, ura3-52, lis9, EB ⁺
R-1155 (ΔTRK)	Mat ⁺ , his4-15, ura3-52, lis9, trkA, Kdm ⁻ , EB ⁺
PC-1	Mat ⁺ , Ade2-1, adex, trk-1, Kdm ⁻ , EB ⁺
<u>K. lactis</u>	
WM37	Mat ⁺ , his A, EB ⁺
KA6-BA	Mat ⁺ , hisA, Kdm ⁻ , EB ⁺
WM27	Mat ⁺ , lisA, EB ⁺
CS48-5	Mat ⁺ , lisA, trk-1, Kdm ⁻ , EB ⁺
M-5	Mat ⁺ , lisA, trk-1, Kdm ⁻ , EB ⁺
KA5-6C	Mat ⁺ , adeB, hisA, leuA, EB ⁺
MD2/1	Mat ⁺ , uraA, lisA, argA [pKD1, K1 K2] K ⁻ R ⁻ EB ⁺
MD2/1 -3A	Mat ⁺ , uraA, argA, hisA, EB ⁺
MS-4	lisA, adeB, hisA, uraA, EB ⁺

R-757 es una cepa silvestre de *S. cerevisiae*; la cepa R-1155 deriva de la R-757 y contiene una deleción dentro del gen TRK-1 generada por el método de integración y escisión. Ambas cepas fueron generosamente donadas por el Dr. R. Gaber (Gaber et al

1988). La cepa PC-1 es una mutante deficiente en el transporte de potasio y fue donada por el Dr. A. Rodríguez Navarro (Rodríguez Navarro et al 1985).

La cepa MD2/1, lleva el plásmido pKD1 y fue donada generosamente por el Dr. H. Fukuhara

III.2 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

a) Medio completo YPD:	Extracto de levadura	1 %
	Peptona de gelatina	1 %
	Dextrosa	2 %
	Agar	2 %
b) Medio completo YPG:	Extracto de levadura	1 %
	Peptona de gelatina	1 %
	Glicerol	2 %
	Agar	2 %
c) Medio de extracto de malta (ME):		
	Extracto de malta	5 %
	Agar	3 %
d) Medio de Luria-Bertani (LB):		
	Extracto de levadura	0.5%
	Triptona	1 %
	NaCl	1 %
	Agar	2 %
LB+ampiclina (LBamp):	Ampicilina	60ug/ml
LB+tetraciclina (LBtet):	tetraciclina	20ug/ml

e) Medio mínimo SD:	Base nitrogenada de levadura	0.67%
	Dextrosa	2 %
	Agar	1 %

f) Medio mínimo con aminoácidos (SD+aa)

Base nitrogenada de levadura	0.67%
Dextrosa	2 %
Agar	1 %
Sulfato de adenina	20mg/lt
L-arginina	20mg/lt
L-histidina	20mg/lt
L-leucina	30mg/lt
L-lisina	30mg/lt
L-metionina	20mg/lt
L-triptofano	20mg/lt
uracilo	20mg/lt

g) Medio sintético bajo en sales (LSK1 URA)

H ₃ PO ₄	8 mM	Sulfato de adenina	20mg/lt
MgSO ₄	2 mM	L-histidina HCl	20mg/lt
CaCl ₂	0.2mM	L-arginina HCl	20mg/lt
NH ₄ DH	12.5mM	L-metionina	20mg/lt
Dextrosa	2 %	L-tirosina	30mg/lt
Agar bajo		L-leucina	30mg/lt
en sales	2 %	L-isoleucina	30mg/lt
Vitaminas	1.2 mg	L-lisina HCl	30mg/lt
Elementos traza		L-fenilalanina	50mg/lt
1000X	0.1 %	L-ácido glutámico	100mg/lt
KCl	1mM	L-ácido aspártico	100mg/lt
		L-valina	150mg/lt

L-treonina	200mg/lit
L-serina	375mg/lit
cisteína	60mg/lit
alanina	20mg/lit
guanina	20mg/lit
prolina	120mg/lit

Agar y glucosa se esterilizaron por separado y el medio se preparó con agua desionizada.

h) Amortiguador de tris-boratos (TBE):

trizma base	0.089 M
Ácido bórico	0.089 M
EDTA	0.002 M
pH	8.0

i) Amortiguador TE : Tris-HCl 10 mM

EDTA	1.0 mM
pH	7.5

j) Mezcla de parar (Ficoll 'stop mix'):

Ficoll	35%
SDS	0.5%
azul de bromofenol	0.1%
xilencianol	0.1%

La cepa HB101 de *E. coli* se usó como hospedero para la propagación y amplificación de plásmidos, y se mantuvo en medio de Luria-Bertani LB. El crecimiento se realizó de 24 a 48 hrs, a 37 °C.

Las cepas de *S. cerevisiae* y *L. lactis* fueron crecidas en YPD y/o YPG. Los medios de selección para las transformantes de

levadura fueron: medio mínimo sin uracilo, SDURA y un medio sintético completo, LSKURA que carece de sodio.

La inducción de cruza y cigotos fué hecha en un medio de extracto de malta, y los diploides se colectaron por complementación de auxotrofías en medio mínimo SD. Todas las endonucleasas de restricción con sus respectivos amortiguadores se obtuvieron de BRL o IBI. Los geles de electroforesis se prepararon con agarosa al 0.6 y 0.8% en amortiguador de TBE. Las digestiones enzimáticas se interrumpieron con una mezcla de parar, Ficoll 'stop mix'

III.3 PLASMIDOS

El plásmido KEp6, un vector híbrido, fue donado por el Dr. H. Fukuhara (Instituto curie, sección de biología. Francia) y lleva el marcador de selección *ura3* de *S. cerevisiae*, el pKD1 de *K. drosophyllum* y los genes que confieren resistencia a ampicilina y tetraciclina, y un origen de replicación bacteriano (Fig 2b).

El plásmido KEp6 TRK que lleva el gen TRK-1 de *S. cerevisiae* fue construido por digestión del plásmido YCp50 con las enzimas de restricción BamH1-Sal1. El plásmido YCp50 lleva al gen completo del acarreador de potasio TRK-1 de *S. cerevisiae* en el fragmento de BamH1-Sal1 de 4.2Kpb. Este fragmento Bam-Sal fue subclonado en el sitio de BamH1-Sal1 del plásmido KEp6. El plásmido KEp6 se preparó para subclonación de la siguiente manera: se linealizó con las enzimas BamH1 y Sal1, el plásmido lineal se incubó para ligación con el fragmento de 4.2 Kb,

amortiguador de DNA ligasa y DNA ligasa T4 a 12 °C toda la noche. Con la reacción de ligación se transformó la cepa HB101 por el método de Mandel y Higa modificado (Mandel y Higa 1970) con el objeto de mantener y amplificar el nuevo plásmido KEp6 TRK.

III.3.1 TRANSFORMACION BACTERIANA

La transformación de la cepa de *E. coli* HB101 se realizó inoculando 100 ml de medio LB, e incubándolo a 37 °C con agitación constante hasta obtener una densidad de 55 unidades Klett. Se centrifugaron 2 tubos con 35 ml de células, y se resuspendieron en 20 ml de CaCl₂ 50mM. Las células se dejaron 20 min. en hielo, se centrifugaron y resuspendieron en 2.5ml de CaCl₂ 50mM. Finalmente se dejaron en hielo toda la noche para obtener células competentes.

En un tubo Eppendorf se mezclaron 200 ul de células y 5 ug de DNA, y se incubaron en frío durante 20 min. Después de la incubación se dio un choque térmico en un baño a 40-42 °C durante 3 min., posteriormente se añadió 1 ml de LB e incubó en un baño a 37 °C por 1 hr. para recuperación. Las células se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en 200ul de LB, y se sembraron en LBamp60.

III.4 CONSTRUCCION DE UN BANCO DE GENES DE *K. lactis*

Para la construcción del banco se purificó DNA total de la levadura *K. lactis* cepa WM27. Con el DNA cromosómico purificado,

se hizo una cinética de digestión parcial con la enzima de restricción Sau 3a I; ésto permitió conocer las condiciones de digestión necesarias para obtener fragmentos de 10 a 15 Kpb.

La cinética de digestión se realizó haciendo la serie de diluciones discutida a continuación: se tomaron 9 tubos Eppendorf y se numeraron del 1 al 9. Al tubo 1 se le añadieron 20 ul de DNA 1.7ug/ul, 10ul de amortiguador de Sau 3a y 70ul de agua destilada, se mezcló y guardo en frío. Se transfirieron 10 ul de la mezcla del tubo 1 a los tubos 2 al 9. Al tubo uno con 20 ul finales se le añadió 1 ul de enzima Sau 3a (4 U/ul dil 1:10), se mezcló y se transfirieron 10 ul del tubo 1 al tubo 2; se mezcló y se transfirieron 10 ul del tubo 2 al tubo 3 y así sucesivamente hasta dejar al tubo 8 con 20 ul de mezcla, de los cuales se tomaron 10 ul y se descartaron. Al tubo 9 no se le añadió enzima. Los tubos se incubaron para digestión por 1 hr. en un baño a 37 °C. Después de la incubación, la reacción se paró con la mezcla de ficoll y se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 0.8%, poniendo DNA del bacteriófago digerido con Hind III como marcador de peso molecular .

Una vez caracterizadas las condiciones de digestión del DNA cromosómico (en este caso 0.6 Uts de enzima para digerir 340 ug /hr). se cortó todo el DNA con la cantidad correspondiente de enzima Sau 3a para obtener fragmentos de 10 a 15 Kb en 1hr. El DNA digerido se corrió en un gel de agarosa al 0.8% y se electroeluyeron los fragmentos mayores de 9Kb. El DNA recuperado se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto por 1hr a -70 °C, se centrifugó a 8700 xg por 10 min., se resuspendió en 30 ul de

TE y se almacenó a -20°C .

Del vector KEp6 se hizo una preparación (Maxiprep) a partir de la cepa bacteriana correspondiente. El vector fue digerido con la enzima de restricción BamHI para linearizar y se defosforiló con fosfatasa alcalina bacteriana. La defosforilación se realizó de la siguiente manera: en un tubo eppendorf se colocaron 40 ul del plásmido digerido con BamHI en tris 50 mM pH 8.0, 1 ul de fosfatasa alcalina (BAP 1.4 uts/ul) y se llevó a un volumen total de 50 ul con tris 50 mM pH 8.0. La mezcla se incubó a 37°C por 1hr, interrumpiendo la reacción con 2ul de EDTA 0.5M pH 8.0, después se incubó a 70°C por 5 min. y se hizo una extracción con fenol-cloroformo 1:1, se recuperó la fase acuosa que lleva el DNA y éste se precipitó adicionando 2 volúmenes de etanol absoluto, recuperando el DNA por centrifugación. El DNA se lavó con etanol al 70% y se secó al vacío, finalmente el precipitado se resuspendió en 30 ul de TE.

Los fragmentos de DNA cromosómico se ligaron al vector KEp6 en una reacción que comprendía 50 ng de DNA cromosómico por cada 100 ng de vector lineal, 2 ul de DNA ligasa de T4, 40 ul de su amortiguador, 10 ul de ATP y agua destilada hasta un volumen de 200 ul. Se incubó toda la noche a 12°C y después de la incubación se utilizó la mezcla para transformar la cepa HB101, seleccionando las transformantes en placas de LBamp60. De todas las transformantes se hizo una preparación de plásmido (Maxiprep) el cual fue concentrado en 50 ul de TE.

III.4.1 MAXIPREPARACION

Se inocularon 600 ml de medio de LB amp50 con una asada de bacterias y se incubó por 15 a 24 hrs. a 37 °C con agitación constante. Las células se colectaron por centrifugación a 7000 xg por 10 min. y se resuspendieron en 40 ml de amortiguador de sacarosa 25% y Tris-HCl 50mM pH8.0. Las células se colocaron en frío y se añadieron 8 ml de lisozima (5mg/ml) en amortiguador de sacarosa/Tris, se incubó por 5 min. y se agregaron 16 ml de EDTA 0.25M pH 8.0 y 20 ml de NaCl 5M, se mezcló y adicionaron 8 ml de SDS 10 %. La mezcla se incubó por 3 hrs en hielo. Posteriormente se centrifugó a 27 000 xg por 1 hr, pasando el sobrenadante a otro tubo, se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol para precipitar el DNA y se incubó a -70 °C por 20 min.. Se centrifugó a 5900 xg por 15 min decantando el sobrenadante, el precipitado fué resuspendido en 10 ml de TE al que se le añadió bromuro de etidio a una concentración de 40 ug/ml y cloruro de cesio a 1g/ml. Se mezcló y centrifugó en una ultracentrifuga Beckman a 200,000 xg por 24 hrs. Pasado el tiempo de centrifugación, se extrajo la banda del plásmido y se limpió 5 veces con isopropanol saturado con agua saturada con CsCl, se diluyó la muestra 3 veces con TE y se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto a -70 °C por 2 hrs. Se centrifugó a 5900 xg por 15 min y se decantó el sobrenadante, el precipitado se lavó con etanol al 70%. se secó al vacío y se resuspendió en 200 ul de TE.

III.5 TRANSFORMACION DE LEVADURAS

Se creció la cepa de levadura de interés en 200 ml de YPD hasta obtener una densidad de 80 unidades klett. Una vez crecidas las células, se colocan en 20 tubos con 10 ml cada uno y se colectan por centrifugación a 1000 xg por 10 min. Se resuspendieron en 5 ml de acetato de litio 0.1M en TE y se volvieron a centrifugar; se decantaron y el precipitado se resuspendió en 100 ul de acetato de litio 0.1M en TE. Todas las células se transfirieron a un tubo dando un volúmen total de 2ml de células. Estas se incubaron con agitación constante 1 hr a 30 °C, para hacer células competentes. Todo se realiza en condiciones estériles.

En tubos Eppendorf se colocaron 50 ug de ctdNA y 5 ug de DNA del banco de K₂ lactis, se añadieron 100 ul de células competentes. Se incluyó un control negativo sin DNA del banco y otro positivo, con DNA del KEp6. Los tubos se incubaron a 30 °C por 30 min. y se añadieron 0.7 ml de PEG 40% en 0.1M de AcLi/TE y se incubó a 30 °C por 1 hr. Al término de la incubación se colocaron los tubos en un baño de agua a 40-42 °C por 3 min. y se centrifugaron las células en una microfuga Beckman descartando el sobrenadante; las células fueron resuspendidas en 200 ul de TE y se sembraron en los medios de selección, creciendo a 30 °C hasta obtener colonias grandes. (Método modificado a partir de Ito et al, 1983).

III.5.1 TRANSFORMACION DE LA CEPA Δ TRK DE *S. cerevisiae*

Se transformó la cepa de *S. cerevisiae* Δ TRK con 5 μ g de DNA del banco de *K. lactis*. Las transformantes se seleccionaron empleando 2 estrategias: 1) Sembrando en medio mínimo SDURA y aislando las colonias que mostraron crecimiento. Estas se replicaron en un medio bajo en sales LSKURA con 1 mM de potasio en el medio. 2) Sembrando directamente en un medio LSKURA con 1 mM de potasio en el medio.

A las transformantes obtenidas que mostraron un fenotipo silvestre (K_{dm}^-) se les probaron marcadores de auxotrofia y el crecimiento en bajo potasio.

III.6 MEDIDA DEL TRANSPORTE DE POTASIO

A las transformantes obtenidas que mostraron un fenotipo silvestre para el transporte de potasio (K_{dm}^-), se les hizo un análisis fisiológico de transporte de potasio. Para ello, se inoculó cada transformante, la cepa Δ TRK y la cepa progenitora R-757 en 200 ml de YPD líquido y se crecieron durante 24 hrs a 30 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm. Después del crecimiento, se colectaron las células por centrifugación a 4340 \times g por 10 min. y se lavaron 2 veces con agua desionizada (ddH₂O). Las células se resuspendieron en 100 ml de agua desionizada y se aerearon con agitación vigorosa por 16 a 18 hrs a 30 °C. Después de este tiempo las células fueron centrifugadas y lavadas 2 veces con agua desionizada. Las células fueron resuspendidas finalmente en una proporción de 0.5 g/ml.

Los registros de transporte de potasio se siguieron con un electrodo catiónico (Beckman 39047) conectado a un electrómetro, un amplificador y un sistema de registro. La cubeta del electrodo contenía 9.8 ml de amortiguador (MES 5mM, TEA 10mM pH6, glucosa 50mM, y cuando se requería KCl 0.5 mM) y 200 ul de la suspensión de células. El transporte de potasio se midió con cero y 0.5 mM de potasio en el medio.

La respiración de las células se midió en un oxímetro con un electrodo de Clark conectado a una fuente de poder y un registrador. La cubeta del electrodo contenía 1.8 ml de amortiguador (MES 5mM, TEA 10 mM pH 6, glucosa 50 mM) y 200 ul de la suspensión de células. La respiración se midió para comprobar que las células estaban vivas

III.7 CARACTERIZACION DEL PLASMIDO EN LAS TRANSFORMANTES

A las transformantes que mostraron un fenotipo silvestre (K_{dm}^{-}) para el transporte de potasio, se les extrajo el plásmido correspondiente y con éste se transformó la cepa de *E. coli* HB101, seleccionando transformantes Amp^r , Tet^r . Se purificó DNA de las transformantes bacterianas por el método Melton-prep y se le sometió a análisis físico, como determinación del tamaño del inserto y el corte con endonucleasas de restricción para construir un mapa físico. El corte con endonucleasas se realizó incubando 0.5 ug de DNA, 1 ul de enzima y 1 ul de amortiguador correspondiente y agua hasta un volumen final de 10 ul. Las reacciones se incubaron toda la noche a 37 °C para digestión y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.6%. El avance de los fragmentos se visualizó con luz ultravioleta. A

todos los geles se agregó, DNA del bacteriófago cortado con Hind III, como marcador de peso molecular

III.8 OBTENCION DE MUTANTES RESISTENTES A BROMURO DE ETIDIO Y DEFICIENTES EN EL TRANSPORTE DE POTASIO (MUTANTES Kdm^-)

Se seleccionaron mutantes resistentes a bromuro de etidio (EB)[®] sembrando aproximadamente 10^8 células de la cepa WM27 en YPD (YPD en amortiguador de fosfatos 50 mM pH7) que contenía 20 μ M de bromuro de etidio. Cuando las colonias fueron suficientemente grandes (6 a 7 días después de la incubación) las mutantes se seleccionaron y sembraron en YPD. A las mutantes seleccionadas se les probaron marcadores de auxotrofia y crecimiento en YPD + EB a concentración de 10, 15 y 20 μ M de EB, también fueron crecidas en medio de bajo potasio y a las que no mostraban crecimiento se les hizo el análisis fisiológico (transporte de potasio y respiración).

III.8.1 ANALISIS GENETICO DE LAS MUTANTES Kdm^-

A las mutantes que mostraron un fenotipo Kdm^- se analizaron genéticamente estudiando la segregación de caracteres. Para ello se hicieron cruzas sembrando una asada de células de cada cepa con diferente factor de compatibilidad "y" e en medio de extracto de malta. A las 24 hrs se observaron cigotos y diploides, de los cuales se hizo una suspensión ligera, poniendo las células en 10 ml de agua destilada estéril y sembrando 200 μ l de la suspensión en medio mínimo, se incubó por 48 hrs a 30 °C, para aislar colonias individuales. Después de la incubación, se

diploides, de los cuales se hizo una suspensión ligera, poniendo las células en 10 ml de agua destilada estéril y sembrando 200 μ l de la suspensión en medio mínimo, se incubó por 48 hrs a 30 °C, para aislar colonias individuales. Después de la incubación, se indujo la esporulación sembrando una clona diploide en un medio de extracto de malta por 48 hrs, observando al microscopio la formación de tétradas. Las tétradas se resuspendieron en 1 ml de agua destilada y se digirió la pared del asca añadiendo 200 μ l de β -glucuronidasa (2 mg/ml), se dejó a temperatura ambiente hasta encontrar ascas abiertas y después se detuvo la reacción en frío.

La disección de las tétradas se realizó con un micromanipulador Leitz, sembrando las ascosporas individuales en YPD y posteriormente se les probó marcadores de auxotrofia, crecimiento en bajo potasio y resistencia a bromuro de etidio. Las cruces realizadas fueron KAS6c x MD2/1 y MD2/1 3a x CSP 4B-5.

IV RESULTADOS

IV.1 TRANSFORMANTES DE *S. cerevisiae* QUE MOSTRARON UN FENOTIPO SILVÉSTRE

Se transformó la cepa R-757 de *S. cerevisiae* con 1 μ g de DNA del plásmido KEp6 para demostrar si el vector es funcional en *S. cerevisiae*. De este experimento se obtuvieron de 400 a 500 transformantes por caja por μ g de DNA, habiendo seleccionado en SD URA. En el control (células no transformadas) no se observó crecimiento de colonias, lo que comprueba que el plásmido, es al menos, es funcional en *S. cerevisiae*.

Por transformación de la cepa Δ TRK con el banco de *K. lactis* se obtuvieron 12 clones (13-1, 13-2, 13-3, 14-1, 14-2, D-3, D-4, D-5, D-7, D-9, D-13, y D-15) que mostraron un fenotipo silvestre (K_{dm}^{-})⁺, por mostrar crecimiento en un medio con 1 mM de potasio (LSK1) al igual que la cepa silvestre R-757. En un medio con 1 mM de potasio, la mutante Δ TRK no muestra crecimiento alguno; requiere al menos 10 mM de potasio en el medio para crecer (Tabla I).

De las 2 estrategias utilizadas para la selección de las transformantes (ura^{-})⁺ (K_{dm}^{-})⁺ se observó que cuando se seleccionaba, sembrando las transformantes directamente en un medio de bajo potasio (LSK1), no había crecimiento de colonias, y por el contrario, cuando se seleccionó sembrando en un medio no selectivo para el transporte de potasio (SD URA), se obtenían transformantes (ura^{-})⁺. Cuando estas últimas se replicaban en un medio de bajo potasio, daban lugar a colonias viables con el

fenotipo buscado (ura^{-})⁺ (Kdm^{-})⁺. Esto indicaba que cuando se transformaba la cepa ΔTRK , se tenían que sembrar las transformantes en un medio no selectivo para el transporte de potasio, pues al seleccionar directamente en un medio de bajo potasio no obteníamos crecimiento de transformantes.

Las transformantes aisladas que adquirieron un fenotipo silvestre, fueron seleccionadas primero por complementación auxotrófica (medio SDURA) seguida de replicación en el medio de bajo potasio (LSK1URA). Las transformantes seleccionadas se purificaron y se probaron nuevamente sus requerimientos auxotróficos y su crecimiento en bajo potasio para comprobar que no eran contaminantes (Tabla I). Como se esperaba, la cepa ΔTRK transformada con KEp6 no creció en bajo potasio. La cepa silvestre R-757 al ser transformada con KEp6 también adquirió la capacidad de crecer sin uracilo y creció en bajo potasio.

Se midió también la eficiencia de transformación tomando como 100 % el número de transformantes obtenidas con la cepa MD2/1 de *K. lactis* con 1 ug de DNA del banco de *K. lactis*, comparándolo con el número de transformantes obtenidas con la misma cantidad de DNA usando la mutante ΔTRK de *S. cerevisiae*. Se obtuvo una eficiencia del 25 % con DNA del banco entre la mutante ΔTRK de *S. cerevisiae* y la cepa MD2/1 de *K. lactis*, comparando de la misma manera la eficiencia de transformación con el plásmido KEp6. Se observó que la eficiencia de transformación de la ΔTRK es solo el 33 % de la encontrada para la cepa MD2/1 (Tabla II).

Tabla I. Prueba de marcadores de auxotrofia y crecimiento en bajo potasio. Las transformantes 13-1 a D-15 muestran un fenotipo similar a la cepa silvestre R-757. Los signos + representan buen crecimiento, +- crecimiento regular, y - ausencia de crecimiento

Tabla 1

Cepa	YPD	YPG	Lis	His	Ura	LSK0.75	LSK1	LSK2	LSK10
R-757	+	+	-	-	-	+	+	+	+
R-757KEp6	+	+	-	-	+	+	+	+	+
ΔTRK	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ΔTRK Bank	+	+	-	-	+	-	-	-	-
13-1	+	+	-	-	+	+	+	+	+
13-2	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
13-3	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
14-1	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
14-2	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
D-3	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
D-4	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
D-5	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
D-7	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
D-9	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
D-13	+	+	-	-	+	+-	+	+	+
D-15	+	+	-	-	+	+-	+	+	+

Tabla II. Eficiencia de transformación obtenida con 1 ug de DNA para la cepa de *K. lactis* MD2/1 y *S. cerevisiae* R-757 y Δ TRK.

	Número de transformantes		
	<i>K. lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	MD2/1	R-757	Δ TRK
KEp6	750 (100 %)	500 (67 %)	250 (33.3 %)
Banco de <i>K. lactis</i>	200 (100 %)	200 (100 %)	50 +19 (25%)

IV.2 ANALISIS FISIOLÓGICO DE LAS TRANSFORMANTES

En las transformantes de *S. cerevisiae* (K_{dm}^-)⁻ se midió el transporte de potasio con células completas, para determinar cuales clonas mostraban un fenotipo silvestre para el transporte de potasio. Se observó que únicamente las transformantes 13-1, 13-2, 14-2, D-4, D-5, D-7, D-9, D-13, y D-15 transportaban potasio (Fig 3 y 4). Los registros de transporte de potasio se realizaron a cero y 0.5 mM de potasio en el medio. A una concentración de 0.5 mM de potasio se está estimulando el sistema de alta afinidad de transporte de potasio por adición de sustrato (K^+), ya que tiene una K_m de 150 μ M para potasio.

En la figura 3 A se muestran los registros de transporte con cero potasio en el medio, teniendo como control positivo la cepa R-757 y WM27. En los trazos correspondientes a los controles

positivos, se observa una salida de potasio del interior celular; esta salida es registrada por el electrodo catiónico como un aumento en el voltaje, que a su vez es traducido a una concentración externa de potasio. Las células posteriormente muestran una reincorporación de potasio, y en este caso se observa un descenso en la concentración de potasio registrada por el electrodo como consecuencia de una disminución en el voltaje. Como control negativo tenemos a la mutante Δ TRK que no muestra incorporación de potasio al interior celular, ya que carece del gen que codifica para el acarreador de potasio TRK-1. En los trazos correspondientes a la cepa Δ TRK, se observa una salida de potasio de el interior celular y por tanto un aumento en la concentración de potasio externa que es registrada por el electrodo. No se observa recuperación del potasio, ya que esta cepa no cuenta con el sistema de entrada de potasio de alta afinidad.

A cero potasio en el medio, las transformantes 13-1, 13-2, 14-1 aparentemente no transportan al catión. Sin embargo, cuando se midió transporte a 0.5 mM de potasio en el medio (Fig. 3 B,) se observó incorporación del catión al interior celular. Por otro lado, tenemos las transformantes D-3, D-5, D-7, D-9, D-13 y D-15 que se midieron únicamente con 0.5 mM de potasio, y que mostraron un curso típico de transporte de potasio para todas las transformantes, en donde se observa una salida de potasio de la célula y posterior incorporación del catión al interior celular (Fig4). Ello indicó que habían adquirido un fenotipo $(K_{dm}^-)^+$ por transformación. El experimento a cero potasio no se realizó

debido a los resultados obtenidos con las primeras transformantes.

De todas las transformantes seleccionadas, se aisló el plásmido de levadura, con el cual procedimos a transformar bacterias y a mantener el plásmido en bacterias para una mejor y fácil manipulación del mismo. Por transformación bacteriana se obtuvieron sólo transformantes de las clonas 13-1, 13-2, 14-1, 14-2, D-4, D-5, D-7 y D-9, las cuales fueron seleccionadas por exhibir crecimiento en un medio con ampicilina y mostrando sensibilidad a tetraciclina. En la selección se obtuvieron de cero a 50 colonias de transformantes bacterianas por caja de LB amp60.

De las transformantes bacterianas se aisló nuevamente al plásmido, que se usó para retransformar a la mutante Δ TRK de S. cerevisiae y comprobar que regeneraba el fenotipo (Kdm⁻)⁺ para el transporte de potasio. Se encontró únicamente complementación de la mutación con el plásmido de las clonas D-4, D-5, D-9, y 13-1 por haber mostrado crecimiento en un medio con 1mM de potasio y por mostrar un curso típico de transporte de este catión. En los trazos de transporte de estas transformantes, se observó nuevamente una salida de potasio al comienzo y un influjo de potasio posterior (Tabla III, Figs. 5 y 6).

Tabla III. Prueba de marcadores de auxotrofia de las retransformantes y crecimiento en medio con 1 y 2 mM de potasio.

	YPD	YPG	Ura	His	Lis	LSK1	LSK2
R-757	+	+	-	-	-	+	+
R-757 KEp6	+	+	+	-	-	+	+
ΔTRK	+	+	-	-	-	-	-
ΔTRK KEp6	+	+	+	-	-	-	-
13-1	+	+	+	-	-	+	+
13-2	+	+	+	-	-	-	-
14-1	+	+	+	-	-	-	-
D-4	+	+	+	-	-	+	+
D-5	+	+	+	-	-	+	+
D-7	+	+	+	-	-	-	-
D-9	+	+	+	-	-	+	+

IV.3 CARACTERIZACION DE LOS PLASMIDOS

Un análisis de restricción mostró que las clonas 13-2, 14-1, 14-2, D-4 y D-7 posiblemente habían recombinado y que por ello no mostraban complementación de la mutación. La evidencia que se tiene de recombinación es que, en el análisis del plásmido con enzimas de restricción se obtiene un plásmido que no lleva inserto e inclusive en el caso de la clona 14-1 es de menor tamaño que el vector usado para el banco (6.2 Kb). Por otra parte, las clonas muestran sensibilidad a tetraciclina, si fuera únicamente el vector deberían conservar la resistencia a este antibiótico

Un análisis de restricción de las clonas D-5 y D-9, que sí complementaron la mutación, mostraron un inserto de 7.4 Kb, con sitios para las endonucleasas BamHI, Hind III, Pst I, Cla I. En

la Figura 9 se muestra un mapa físico para el inserto de la clona D-5; esta clona lleva a el gen TRK-1 de *K. lactis*

IV.4 MUTANTES DE *Kluyveromyces lactis* DEPENDIENTES DE POTASIO

Al crecer a la cepa WM 27 en medio de YPG con bromuro de etidio (EB) se aislaron 200 mutantes resistentes a 20 μ M de este colorante, de las cuales se seleccionaron únicamente 44 para análisis fisiológico. Las mutantes mostraban un crecimiento normal tanto en medio rico YPD como YPG, como en medios de YPG + EB y un requerimiento de más de 10mM de potasio en el medio LSK para crecer. A las mutantes seleccionadas se les hizo un análisis fisiológico para el transporte de potasio, obteniendo 5 mutantes que mostraron deficiencia en el transporte de potasio. Estas fueron las cepas CS48-5, M-5, 70, 139 y 145. Las mutantes 70, 139, y 145 mostraron en un principio un fenotipo Kdm^- y cuando se les hizo un registro posterior de transporte de potasio, se observó que transportaban potasio. Este hecho indicó que la mutación en estas cepas era inestable y que habíamos obtenido un fenotipo que había revertido (Tabla IV). De la mutante 70, se hizo una caracterización genética por segregación de caracteres, obteniendo un patrón de segregación mendeliano (2:2) para los marcadores de auxotrofia, pero una segregación (0:4) (Kdm^- : Kdm^+) para el transporte de potasio, indicando que en realidad habíamos obtenido mutantes que habían revertido.

De las mutantes CS48-5 y M-5 se realizaron varios registros de transporte mostrando que la mutación en estas cepas era estable y que exhibían un fenotipo Kdm^- tanto en pruebas en

medio de bajo potasio LSK1 como en registros de transporte de potasio (Fig 7 y 8). A las mutantes CS 48-5 y M-5 se les revisaron marcadores de auxotrofia, incapacidad de crecer en un medio de bajo potasio y resistencia a bromuro de etidio.

Tabla IV. Mutantes de *K. lactis* obtenidas seleccionando clones resistentes a 20 uM de EB. El signo + indica transporte y el signo - indica incapacidad de transportar potasio.

cepa	Transporte de potasio
WM27	+
ΔTRK	-
PC-1	-
CS48-5	-
M-5	-
70,139,145	+ (Revertantes)

La mutante CS 48-5 se analizó genéticamente para comprobar que la mutación era cromosómica. Para ello se hizo una cruce de las cepas MD2/1 Mat^a * KAS-6C Mat^a obteniendo la segregante MD2/1 3A Mat^a, ura A, arg A, hisA; con ella realizamos la siguiente cruce MD2/1 3A Mat^a, ura A, argA, hisA * CS 48-5 Mat^a, hisA. Los diploides se sometieron a esporulación y análisis de tétradas. Un análisis de prototrofia y auxotrofia de las cepas parentales y segregantes, así como de la resistencia a bromuro de etidio y deficiencia en el transporte de potasio, mostraron una segregación mendeliana (2:2), indicando que las mutaciones son

nucleares (Tabla V y VI)

Tabla V. Prueba de marcadores de auxotrofia de las segregantes de la cruce MD2/1 3A * CS48-5, donde se muestra un patrón de segregación mendeliano para el transporte, resistencia a EB y marcadores de auxotrofia. (+ indica crecimiento y - ausencia de crecimiento).

	YPD	YPG	URA	Ade	Arg	His	Lis	LSK1	LSK2	LSK10	EB15	EB20
WM27	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
MD2/1 3a	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
ΔTRK	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
ΔTRK KEp6	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
M-5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
CS 48-5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
MS-1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
MS-2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
MS-3	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
MS-4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+

Tabla VI. Fenotipo de las segregantes de la cruz MD2/1 * CS48-5, donde se muestra un patrón mendeliano para el transporte, resistencia a EB y marcadores de auxotrofia

MD2/1 3a Mat a * CS48-5 Mat a
 Ade B , ura A, arg A, his A, EB^o lisA, Kdm⁻, EB^R.

Segregantes	Fenotipo
MS-1	arg A, his A, lisA EB ^o
MS-2	arg A, EB ^R
MS-3	ura A, adeB Kdm ⁻ , EB ^o
MS-4	ura A, adeB, hisA, lisA, Kdm ⁻ , EB ^R

Se realizó también un registro de transporte de potasio para las segregantes y cepas parentales, comprobando así que la mutación para el transporte mostraba un patrón de segregación mendeliano (2:2), puesto que las segregantes MS-1 y MS-2 mostraban un curso de transporte de potasio normal y las segregantes MS-3 y MS-4 tenían dificultad para transportar potasio. Se hicieron registros de transporte a cero y 0.5 mM de potasio en el medio, y se observó que las segregantes MS-1 y MS-2 mostraban un fenotipo parecido al silvestre, en donde se observa una salida y posterior incorporación de potasio al interior celular. Mientras que MS-3 y MS-4 a cero potasio parecían mostrar poco transporte de este ión; sin embargo, a 0.5 mM de potasio no muestran transporte (Figs 7 y 8), lo que comprobó que eran mutantes deficientes en el transporte de potasio.

Por otra parte, se midió concentración interna de potasio en células silvestres ayunadas, encontrando una concentración de promedio de 150 ± 50 mM. Las mutantes MS-3 y MS-4 mostraron una concentración de 94 y 118 mM respectivamente, lo que indica que estas mutantes tienen una cantidad de potasio menor que la silvestre (Tabla VII).

Tabla VII Contenido de potasio intracelular de las cepas parentales y segregantes. El valor dado es para células ayunadas

Cepa	Potasio intracelular (mM)
1.- MD2/1 3a	104
2.- Δ TRK	160
3.- M-5	140
4.- CS48-5	104
5.- MS-1	168
6.- MS-2	98
7.- MS-3	94
8.- MS-4	118

V DISCUSION Y CONCLUSIONES

V.1 SISTEMA DE TRANSFORMACION USADO PARA S. cerevisiae.

Se han descrito varios sistemas de transformación usados para K. lactis (Das y Hollenberg. 1982; Das et al. 1984) y S. cerevisiae (Hollenberg et al. 1982; Fincham J. 1989). La mayoría de los vectores de transformación en S. cerevisiae llevan parte del plásmido de 2um, mientras que los sistemas en K. lactis utilizan secuencias 'ars' cromosomales o segmentos de plásmidos Killer lineales pGK1, pGK2. En este trabajo hacemos uso de un vector de transformación (KEp6), basado en el plásmido circular pKD1, que ha mostrado ser un sistema eficiente de transformación para Kluyveromyces lactis y a la vez ha sido de gran utilidad para S. cerevisiae (este estudio).

La eficiencia de transformación reportada para S. cerevisiae empleando vectores con el 2um y con AcLi es de 4×10^9 por 10 ug de DNA (Ito et al. 1983), mientras la eficiencia reportada para K. lactis usando vectores con el pKD1 y con protoplastos es de 10^4 a 10^5 transformantes por ug de DNA (Bianchi et al. 1987). En este trabajo se encontró una eficiencia de 750 transformantes por ug de DNA para este sistema basado en el pKD1 transformando la cepa MD2/1 de K. lactis y una eficiencia de 500 transformantes (66.3 %) por ug de DNA para S. cerevisiae con el mismo sistema. Se observó una menor eficiencia (33.3%) al transformar la mutante TRK con 1 ug de KEp6 o 1 ug del banco hecho en KEp6. Esto permitió concluir que el plásmido KEp6 de K. lactis puede usarse como sistema de transformación para S. cerevisiae, y también

demuestra que puede permanecer en la célula en un medio no selectivo hasta por 20 generaciones (resultados no mostrados). Se observó también, que cuando se transformó la cepa Δ TRK con el banco de genes, disminuyó la eficiencia de transformación en un 75% comparado con la cepa silvestre; esto pudo deberse a que el vector lleva fragmentos de DNA ligados, y por ello la cantidad de plásmido disminuye en un 1 μ g de DNA, dando una menor eficiencia.

Aunque se ha reportado que los vectores de la serie pKD1 tienen especificidad de hospedero (Bianchi et al. 1987); en este estudio se encontró que también puede replicarse y funcionar en *S. cerevisiae*. Estos hallazgos se ven reforzados por reportes recientes que corroboran estos resultados, en donde se ha transformado otras levaduras diferentes de *K. lactis*, con plásmidos basados en el pKD1 (Fabiani et al 1990).

V.2 TRANSFORMANTES DE *S. cerevisiae*

Se aislaron transformantes que adquirieron un fenotipo (Kde-)* solo cuando se seleccionaban en un medio mínimo que carece de uracilo y se replicaban a un medio de bajo potasio (1 mM). Cuando se sembró células transformadas directamente en un medio de bajo potasio, nunca se observó crecimiento de transformantes, por lo que las transformantes que interesaban fueron obtenidas únicamente por réplica.

Se seleccionaron 12 transformantes de la cepa Δ TRK que habían crecido en un medio selectivo con 1 mM de potasio (LSK1), lo que indicaba, que habían adquirido un fenotipo parecido a la cepa silvestre. Este fenotipo fué comprobado porque las células fueron capaces de crecer en el medio selectivo para el

transporte.

Las transformantes no mostraron buen crecimiento en un medio con una concentración de potasio de 0.75 mM, en comparación con la cepa silvestre. Ello puede deberse a que se trata de una proteína de *K. lactis* expresada en *S. cerevisiae*, por lo que no se puede esperar un crecimiento igual que en la cepa silvestre.

El análisis fisiológico de las transformantes permitió comprobar que habían adquirido un fenotipo silvestre para el transporte de potasio, ya que mostraron dicho transporte cuando se hacían registros con 0.5 mM de potasio en el medio. Los registros hechos a cero potasio en el medio, indicaron que las transformantes no mostraban transporte de potasio o que lo presentaban con una eficiencia menor que la cepa silvestre. Ello pudo haberse debido a que a cero potasio no se estaba estimulando el sistema de transporte de potasio a trabajar y que por ello se observaba una baja eficiencia de transporte de potasio.

Al transformar bacterias con una preparación de plásmido obtenida de las transformantes, se encontró que la eficiencia de transformación disminuyó bastante, ya que se obtuvo de cero a 20 transformantes por caja con diferentes cantidades de DNA. Como no se encontró correlación entre la cantidad de DNA y el número de transformantes obtenidas, se puede pensar que la baja eficiencia pudo deberse a que la preparación de DNA con que se transformó fue deficiente (DNA con proteína) y/o que no se hicieron células competentes buenas. Con DNA de estas clonas se retransformó la mutante ΔTRK comprobando que únicamente el plásmido de las clonas

D-4, D-5, D-9 y 13-1 regeneraban el fenotipo silvestre para el crecimiento en un medio de bajo potasio y para el transporte de potasio de alta afinidad, lo que indicaba que estas clonas llevaban el gen TRK-1 de K. lactis u otro gen relacionado estrechamente con el transporte de potasio.

Un análisis físico demostró que la clona 13-1 llevaba el gen TRK-1 de S. cerevisiae, ya que al digerir con las endonucleasas de restricción Xba o Pst I se obtenían los mismos fragmentos de DNA al correr en geles de electroforesis. Las clonas D-5 y D-9 llevan un fragmento de 7.4 Kb aproximadamente y no comparten sitios de restricción con el TRK-1 de S. cerevisiae, por lo que se descartó la posibilidad de que sea el gen TRK-1 de S. cerevisiae.

No se sabe si es homólogo con el TRK-1 de S. cerevisiae debido a que no se ha hecho una hibridación, sin embargo se sabe que es el TRK-1 de K. lactis o un gen relacionado con el sistema de transporte de potasio. No se descarta la posibilidad de que sea un gen que codifique una proteína reguladora del sistema de transporte de potasio de alta afinidad. Esto se sugiere, ya que se han aislado dobles mutantes Rpd (dependencia reducida de potasio) de la mutante Δ TRK que muestran transporte de potasio.

Las clonas 13-2, 14-1 y D-7 no mostraron regeneración del fenotipo (Kdm^-)⁺ al transformar la cepa Δ TRK. Un análisis del plásmido demostró que se habían obtenido plásmidos recombinantes porque al digerir el DNA con enzimas de restricción, se obtenían únicamente los fragmentos del vector. Los resultados que corroboraron esta hipótesis son: sensibilidad a tetraciclina y ausencia de sitios de restricción del vector como Sal I. Hay

reportes que apoyan estos resultados, en donde se demuestra que plásmidos híbridos compuestos de DNA de 2 μ m, un gen de levadura y parte de un vector bacteriano, recombinan con el DNA cromosomal homólogo por recombinación sitio específica (Kielland-Brandt et al. 1981). Se propone que un proceso similar sucedió en las transformantes de este trabajo.

V.3 MUTANTES DEFICIENTES EN EL TRANSPORTE DE POTASIO

Se ha reportado una correlación entre la resistencia a bromuro de etidio y cambios en el transporte de potasio en la levadura (Brunner et al 1982) y además que el bromuro de etidio es un inhibidor competitivo para el transporte de potasio (Peña et al 1975). En este estudio se obtuvieron 2 mutantes M-5 y CS48-5 deficientes en el transporte de potasio, seleccionando clonas resistentes a 20 μ M de EB. La caracterización genética de la mutante CS48-5 demostró que la mutación que confiere resistencia a EB y la mutación que afecta el transporte de potasio son nucleares, y mapean en loci diferentes no ligados. Estos resultados pueden indicar que la deficiencia en el transporte de potasio y la resistencia a EB, no están dadas por un solo gen, aunque no se descarta la posibilidad de que sean 2 genes separados correlacionados entre sí, porque no se midió transporte de EB. Otra posibilidad es que sean genes que no tienen ninguna relación funcional y que la mutación que confiere resistencia a EB sea diferente estructural y funcionalmente de la mutación que confiere resistencia a EB en las mutantes descritas por Brunner y colaboradores. Un punto importante que apoya esta

última hipótesis, es que se han descrito mutantes que muestran resistencia a bromuro de etidio, pero que no muestran alteración en el transporte de potasio (Brunner et al 1982).

El análisis fisiológico de las segregantes de la mutante CS48-5 demostró que las cepas MS-3 y MS-4, muestran cantidades pequeñas de eflujo de potasio (0.005 mM) comparado con la cepa silvestre WM27 y la mutante CS48-5, que exhibieron un eflujo de 0.04 mM; esto indica que pudieran estar alteradas en algún sistema de salida de potasio, además en el acarreador de alta afinidad por mostrar dificultad para transportar potasio.

V.4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Las conclusiones obtenidas en este estudio, son las siguientes:

- 1) El plásmido KEp6 de *K. lactis* es funcional y se puede replicar en *S. cerevisiae*.
- 2) El plásmido KEp6 basado en el pKD1, mostró ser un sistema eficiente de transformación para *S. cerevisiae* comparado con *K. lactis*.
- 3) Se identificó el gen TRK-1 de *K. lactis* por expresión en un sistema heterólogo (gen de *K. lactis* expresado en *S. cerevisiae*).
- 4) Se obtuvieron transformantes de *S. cerevisiae* que mostraron un fenotipo parecido al silvestre, pero no se comportan igual que la silvestre por tratarse de un sistema heterólogo.
- 5) Plásmidos híbridos que llevan un gen de levadura, recombinan con el DNA cromosomal homólogo por recombinación sitio específico.

6) Se clonó el gen TRK-1 de K. lactis en un inserto de 7.4 Kb y se expresó en S. cerevisiae

7) Se obtuvieron mutantes deficientes en el transporte de potasio con bromuro de etidio, y su análisis genético indicó que la resistencia a EB y la deficiencia en el transporte son mutaciones nucleares

8) En las mutantes obtenidas con EB, se encontró que la resistencia a EB y la deficiencia en el transporte de potasio mapean en locus diferentes no ligados.

9) Posiblemente, la resistencia a EB y la deficiencia en el transporte no tienen relación funcional, porque se obtuvieron mutantes resistentes a EB que transportaron potasio.

Entre las perspectivas que derivan de este estudio, esta el elucidar, si el gen TRK-1 de K. lactis complementa la mutación en las cepas resistentes a bromuro de etidio y deficientes en el transporte CS 48-5 y M-5. Si este es el caso, se refuerza los trabajos del Dr. Gaber R. de que el TRK-1 es el gen del acarreador de potasio. En el caso contrario, clonar el gen que complemente la mutación en las cepas CS 48-5 y M-5 y ver cómo está relacionado con el TRK-1.

VI REFERENCIAS

- Armstrong, W and A. Rothstein (1964). Discrimination between alkali metal cations by yeast. I Effects of pH on uptake. *J. Gen. Physiol.* 48:61-71
- Au-Young, J. and P.W. Robbins (1990). Isolation of a chitin synthase gene (CHS1) from *Candida albicans* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 4(2):197-207
- Bianchi, M. M; C. Falcone, C. Xin Jie, M. Weslowski-Louvel, L. Frontali, H. Fukuhara. (1987) Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 μ m circular plasmid pKD1. *Curr. Genet.* 12:185-192.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1981) Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 650:88-123.
- Borst-Pauwels, G.W.F.H. (1986) Third small meeting on yeast and energetics (SMYTE III), The Neatherlands, 21-23 August 1985. *Yeast.* 2:143-144.
- Breunig, K.D. (1989) Multicopy plasmids containing the gene for the transcriptional activator LAC9 are not tolerated by *K. lactis* cells. *Curr Genet.* 15:143-348.
- Brunner, A; N. Carrasco, A. Peña (1982) Correlation between resistance to Ethidium Bromide and Changes in monovalent cation uptake in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* 217(1):30-36.
- Bruschi, C.; A. Comer, G. Howe (1987) Specificity of DNA uptake during whole cell transformation of *S. cerevisiae*. *Yeast.* 3:131-137.
- Chen, X.J; M. Saliola, C. Falcone, M. Bianchi, M. Wesolowki, H. Fukuhara (1986) Sequence organization of the circular plasmid pKD1 from the yeast *Kluyveromyces fragophilacum*. *Nuc. Acids Res.* 14:4471-4481
- Compagno, C.; B.M. Ranzi, E. Martegani (1989) Yeast 2 μ m vectors replicate and undergo recombination in *Trichosporon delbrueckii* *Molecular Microbiology.* 3(8):1003-1010.
- Conway, E.J; and O Malley, E. (1946) The nature of the cation exchange during yeast fermentation, with formation of 0.02 N H ion. *Biochem J.* 40 (59)
- Conway, E.J. M. Donway (1950) Quantitative relations of succinic and carbonic acids to the potassium and hydrogen ion exchange in fermenting yeast. *Biochem. J.* 47(347)
- Conway, E.J (1955) *Int. Rev. Cytol.* 4(377)

Conway, E.J.; F. Duggan (1957) A cation carrier in the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta.* 69:265-274.

Das, S; CP Hollenberg (1982) A high frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* 6:123-128

De la Peña, P.; F. Barros, S. Gascon, S. Ramos, P. Lazo. (1982) The electrochemical proton gradient of *Saccharomyces* the role of potassium. *Eur. J. Biochem.* 123:447-453.

Epstein, W. (1971) Potassium transport loci in *E. coli* K.12. *J. Bacteriol.* 108:639-644

Epstein, W; L. Wieczorek, A. Siebers, and A. Karlheinz. (1984). Potassium transport en *Escherichia coli*: genetics and biochemical characterization of the K⁺-transporting ATPase. *Biochem. Soc. Trans.* 12:235-236

Esser, K; U. Kuck, C. Lang-Hinrich, P. Lemke, H.D. Osiewaz, U. Sthal, P. Tudzynski (1986) Plasmids of Eucariontes. Springer-Verlog. Berlin Heidelberg New York

Fabiani, L.; M. Aragona, L. Frontali. (1990) Isolation and sequence analysis of a *K₁ lactis* chromosomal DNA element able to autonomously replicate in *S. cerevisiae* and *K₁ lactis*. *Yeast* 6:69-76.

Fincham, J. (1989) Transformation in Fungi. *Microbiological Reviews* 53(1):148-170.

Gaber, R.F; C.A. Styles and G. R. Fink. (1988) TRK1 Encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *S. cerevisiae*. *Molecular and cellular biology.* 8(7):2848-2859

Goffeau, A.; S. Ulaszewski, M. Grenson. (1983) Modified plasma membrane ATPase in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 130:235-239.

Goffeau, A; M. Ghislain, S. Ulaszewski. (1986) Isolation and sequencing of the H⁺-ATPase gene from *Squizzosaccharomyces pombe*. 13TH Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology

Gunge, N. (1983) Yeast DNA plasmids. *Annu. Rev. Microbiol.* 37:253-276.

Gunge, N; K. Sakaguchi (1981) Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid killer plasmids, pGK1 and pGK2, from *K₁ lactis* into *S. cerevisiae* by cellular fusion. *J. Bacteriol.* 147: 155-160.

- Gunge, N; K. Sakaguchi (1982) Transformation of *S. cerevisiae* with linear DNA plasmids from *K. lactis*. J. Bacteriol. 151: 462-464.
- Haro, R.; J. Ramos, B. Garciadeblas, A. Rodriguez-Navarro. (1990) TRK1 is a regulatory component of the potassium uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta (in press).
- Herskowitz, I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological Reviews. 52(4):536-553.
- Hinnen, A.; K. B. Hicks, G. R. Fink (1978) Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75(4):1929-1933.
- Hollenberg, CP. (1982) Cloning with 2 um DNA vectors and the expression of foreign genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Ito, H.; Y. Fukuda, K. Murata, A. Kimura (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153(1):163-168.
- Kielland-Brandt, M.C; T Nilsson, L. Peterson, S. Holmberg (1981) Transformation in yeast without the involvement of bacterial plasmids. In molecular genetics in yeast. Alfred Benzon symposium 16. Munkaard, Copenhagen
- Kreger-van Rij, N.J.W. (1984) The Yeast: a taxonomic study. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. 1082 pp.
- Malpartita, F; and R. Serrano. (1981) Reconstitution of the proton-translocating adenosine triphosphatase of yeast plasma membranes. J. Biol. Chem. 256:4175-4177.
- Mandel, M; and A. Higa (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53:159-162.
- Maniatis, T; E.F. Fritsch, and J. Sambrook. (1982) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 545 pp.
- Mitchell, P.S. (1974) A chemiosmotic molecular mechanism for proton translocating adenosine triphosphatases. FEBS LETTERS 43 (2):189-194
- Olof Nehlin, J.; M. Carlberg, H. Ronne (1989) Yeast galactose permease is related to yeast and mammalian glucose transporters. Gene. 85:313-319.
- Peña, A; G. Cinco, A. Gómez, M. Tuena (1972) Effect of the pH on the incubation medium on glycolysis and respiration in *S. cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. 153 (413)

Peña, A. (1975) Studies on the mechanism of K transport in yeast. Arch. Bioch. Biophys. 167:397-409.

Peña, A.; M. A. Mora, N. Carrasco (1979) Uptake and effects of several cationic dyes on yeast. J. Membrane Biol. 47:261-284.

Peña, A.; G. Ramirez (1975) Interaction of ethidium bromide with the transport system for monovalent cations in yeast. J. Membrane Biol. 22:369-384.

Picard, D.; M. Schena, K. R. Yamamoto (1990) An inducible expression vector for both fission and budding yeast. Gene. 86:257-261.

Rodriguez-Navarro, A.; J. Ramos (1984) Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriology. 159(3): 940-945

Rodriguez-Navarro, A; J. Ramos, P. Contreras (1985) A potassium transport mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 143:88-93.

Rieger, R; A. Michaelis (1976) Glossary of genetics and cytogenetics classical and molecular. 14 th ed. Springer, Berlin Heidelberg New York

Rose H.A. and J.S. Harrison (1969). The Yeast. Vol1 Biology of the yeast. Academic Press London. New York. 508 p.p.

Schild, D.; A. J. Brake, M. C. Kiefer, D. Young, P. J. Barr (1990) Cloning of three human multifunctional de novo purine biosynthetic genes by functional complementation of yeast mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:2916-2920.

Serrano, R. (1985). Plasma membrane ATPase of plants and fungi. C.R.C. Press USA. 174 pp.

Serrano, R; M. C. Kielland-Brandt (1986) PMA1, The gene for yeast plasma membrane ATPase. 13th. Int. Conf. on Yeast Genetics and Molecular Biology.

Serrano, R; Kielland-Brandt, and G.R. Fink (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na + K), K⁺-and Ca²⁺-ATPases. Nature. 319:689-693

Serrano, R; and F. Portillo (1990) Catalytic and regulator sites of yeast plasma membrane H⁺-ATPase studied by directed mutagenesis. Biochim. Biophys. Acta 1018(2/3):195-199

Sherman, F; G.R. Fink, and C. Lawrence (1979). Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 73pp.

Tatum, E.L., W. Slayman (1964) Potassium transport in *Neurospora*. Biochim. Biophys. Acta 88:578-592.

Vallejo, C. G.; R. Serrano (1989) Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. Yeast 5:307-319.

Vidal, M.; F. Hilger, C. G. Burd, R. F. Gaber (1988) Mutations in RPD1 and RPD3 alter potassium transport in yeast. 14th. Int. Conf. on yeast Genetics and Molecular Biology.

Volkert, F. C.; D. W. Wilson, J. R. Broach (1989) Deoxyribonucleic acid plasmids in yeast. Microbiological Reviews. 53(3):279-317.

ESTA TESIS
NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA

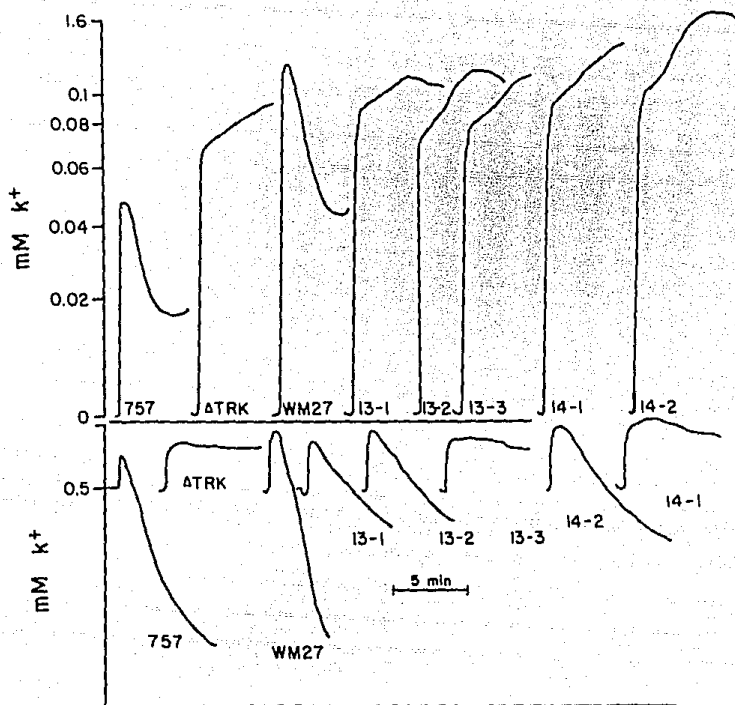


Fig. 3 Registros de transporte de potasio de las cepas R-757, Δ TRK y transformantes de *S. cerevisiae*. Para la cepa R-757 y transformantes, se observa una salida de potasio de las células, dando un incremento en la concentración externa y posteriormente meten potasio al interior celular. La cepa Δ TRK, solamente muestra salida pero no entrada de potasio a la célula. En A se muestran los trazos con el contenido endógeno de potasio y en B se muestran los trazos obtenidos con 0.5 mM de K⁺ en el medio.

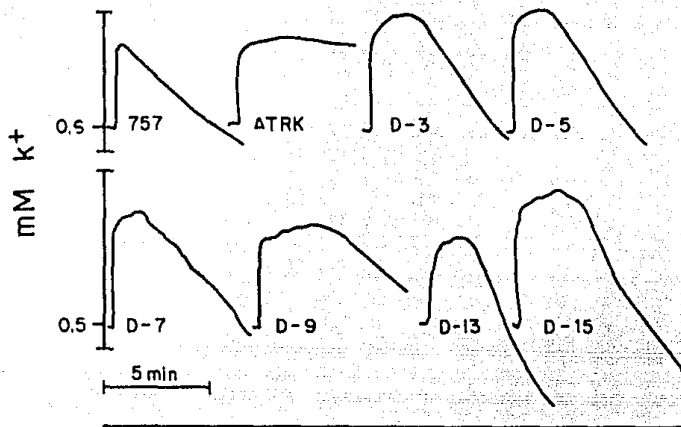


Fig. 4 Registros de transporte de potasio de las cepas R-757, Δ TRK y transformantes de *S. cerevisiae*. La cepa R-757 y transformantes muestran transporte de potasio, y la cepa Δ TRK muestra salida pero no entrada de potasio. Los trazos se realizaron con 0.5 mM de K^+ en el medio.

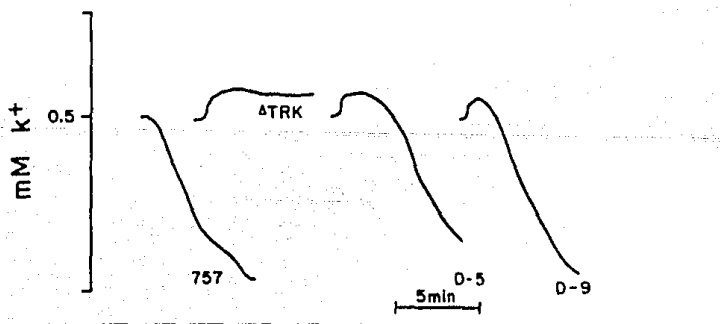


Fig. 5 Registros de transporte de potasio de las cepas R-757, Δ TRK y de las retransformantes D-5, D-9. Se observa transporte de potasio para la cepa control R-757 y retransformantes D-5, D-9; el control negativo Δ TRK no muestra transporte de potasio. Los registros se realizaron con 0.5 mM de K en el medio.

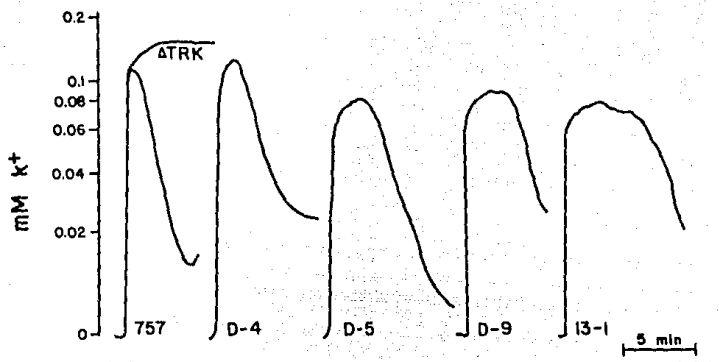


Fig. 6 Registros de transporte de potasio de las cepas R-757, Δ TRK y de las retransformantes de *S. cerevisiae*. Las retransformantes D-4, D-5 D-9 y 13-1 muestran un fenotipo parecido a la cepa silvestre R-757, porque muestran transporte de potasio. Los registros se realizaron con el contenido endógeno de potasio.

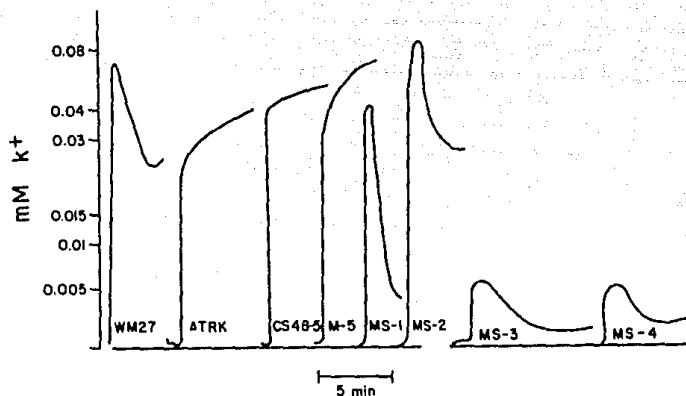


Fig. 7 Registros de transporte con el contenido endógeno de potasio de las cepas WM 27, Δ TRK y de las mutantes de *K. lactis* CS48-5, M-5 resistentes a EB y deficientes en el transporte de potasio (primeros 4 trazos). Medida de transporte de las segregantes MS-1, MS-2 que transportan potasio y MS-3, MS-4 que muestran deficiencia en el transporte de potasio. En estas segregantes se muestra un patrón de segregación 2:2 para el transporte.

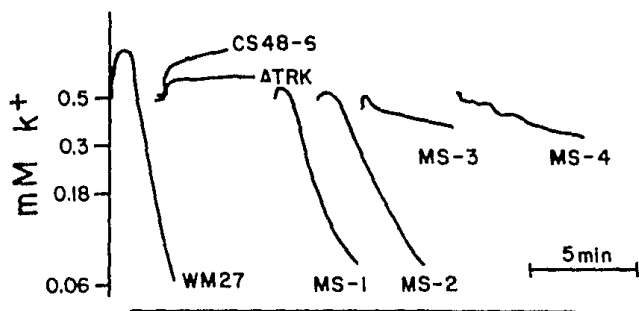


Fig. 8 Registros de transporte de potasio de las cepas WM 27, de la mutante CS 48-5 y de las segregantes MS-1, MS-2, MS-3, y MS-4. Las segregantes MS-1 y MS-2 transportan potasio y las segregantes MS-3 y MS-4 son deficientes en el transporte de potasio. Los trazos se realizaron con 0.5 mM de potasio en el medio.

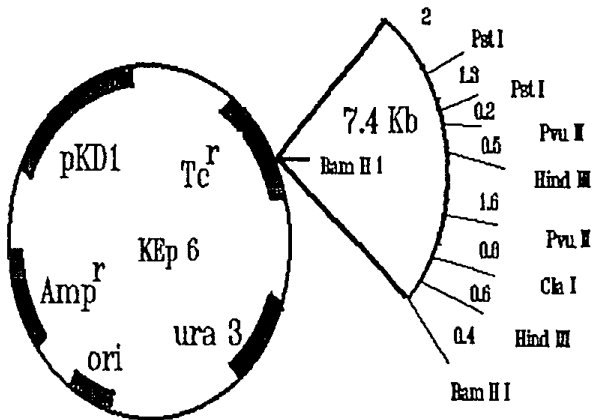


Fig. 9 Caracterización física del inserto que lleva a el gen TRK-1 de K. lactis