

Tópicos en Biofísica Molecular

2^{do} Cuatrimestre de 2015

Docentes: Lía Pietrasanta y Alan Bush

Práctica de laboratorio nº 5: Transformación de levaduras

OBJETIVOS

Familiarizarse con la manipulación genética de células de levaduras. Transformar levaduras haploides del género *Saccharomyces cerevisiae* con un plásmido integrativo que contiene un gen reportero para la vía de respuesta a alta osmolaridad.

INTRODUCCIÓN

La **transformación** se define como la introducción dentro de una célula eucariota “inferior” o bacteriana de una molécula de DNA que no pertenece a dicha célula. Este mismo proceso se denomina **transfección** en células eucariota “superior”¹. Los organismos que han sido permanentemente modificados por la inserción, supresión o reemplazo de un gen se denominan organismos *transgénicos*.

Las técnicas de transformación celular han permitido en gran medida ampliar los conocimientos acerca de la regulación génica y de la función de las proteínas en los sistemas celulares. La introducción de una construcción de DNA recombinante en la que se ha situado una secuencia codificante de un gen reportero (luciferasa, proteínas fluorescentes, beta-galactosidasa, etc.) bajo una secuencia de regulación que se desea estudiar permite medir con facilidad tasas de expresión génica en diferentes situaciones experimentales.

Muchas veces puede ser de interés seleccionar las células que han adquirido el plásmido. Para facilitararlo se incluyen en estos plásmidos genes de resistencia a drogas que permiten a las células que los han adquirido sobrevivir en medios selectivos. Así, se pueden diferenciar las **transformaciones temporales o transientes**, en las que el DNA introducido no se incorpora en el genoma, y las **transformaciones estables** en las que el DNA se **integra** en el genoma del organismo.

Las técnicas de transformación que se utilizan en la actualidad se pueden clasificar en dos tipos: **métodos químicos** o **métodos físicos** [2]. Los **métodos químicos** están basados en la formación de complejos que las células son capaces de adquirir e incorporar, bien sea directamente mediante la ruta endocítica o a través de las membranas. Entre estos métodos podemos mencionar:

1. **Método del fosfato cálcico.** Basado en la obtención de un precipitado entre el cloruro de calcio y el DNA en una solución salina de fosfatos. En esta situación coprecipitan formando unos agregados que son endocitados por las células. Aparentemente el agregado con calcio protege al DNA de la degradación por las nucleasas celulares.

¹ En células animales el término **transformación** se reserva para indicar la transición a un estado canceroso.

2. **Método del DEAE dextrano.** Basado en la obtención de complejos entre la resina DEAE y el DNA. Los polímeros de DEAE dextrano o polybreno tienen una carga que les permite unirse a las muy negativamente cargadas moléculas de DNA. El DNA acomplejado se introduce en las células mediante choque osmótico mediante DMSO o glicerol. El uso de DEAE dextrano se limita a las transfecciones transientes.
3. **Método de lipofección.** Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA. El complejo tiene afinidad por la membrana y permite la entrada del DNA en el citosol. Existen un gran número de lípidos que se emplean en lipofección, aunque existe un consenso de un lípido catiónico sintético, a partir de la cual se han diseñado muchas variantes. Es esencial optimizar las condiciones específicas de transfección para obtener buenas eficiencias, que suelen ser en buenas condiciones de entre el 70 y el 90% de las células de la placa. Las desventajas del método es, aparte del elevado precio de los lípidos, el hecho de que no todos los lípidos funcionan en todos los tipos celulares, y que hay que optimizar el ensayo para cada tipo celular. Los parámetros a optimizar son la relación entre lípido y DNA (relación de cargas), la cantidad de DNA empleado, el tiempo que se exponen las células al complejo y la presencia o ausencia de suero.
4. **Método del esferoplasto.** Utilizado para células con pared celular, como los hongos y las células vegetales. Se basa en remover la pared celular (mediante enzimas que la degradan), teniendo recaudos para que la célula no se mueran. Dichas células sin pared celular se llaman esferoplastos, y cuando se las incuban en un medio con poli-etileno-glicol (PEG), son capaces de incorporar DNA foráneo.
5. **Método del litio.** Usado principalmente para transformar hongos con pared celular. Se basa en incubar las células con acetato de litio, PEG y someterlas a un shock térmico. Estas condiciones desestabilizan la pared celular y permiten la entrada de DNA, sin la necesidad de preparar esferoplastos.

Los **métodos físicos** están basados en la introducción mecánica de las moléculas en el interior de la célula. Entre ellos están:

1. **Microinyección directa.** El DNA se microinyecta directamente al citosol, célula por célula.
2. **Electroporación.** Introducción del DNA adherido a micropartículas que se disparan sobre las células.
3. **Biolística (o Biobalística).** Se basa en cubrir micropartículas de oro u otros metales con DNA, y luego disparar dichas partículas como micro-proyectiles contra las células. De esta manera se puede atravesar la pared celular de hongos y vegetales, permitiendo a las mismas incorporar el DNA.

En esta práctica vamos a transformar células de levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* con un gen reportero. Las levaduras son hongos unicelulares, y como tales tiene una pared celular. Por lo tanto vamos a usar el método del litio, que es técnicamente sencillo y permite transformar este tipo de células.

El gen reportero que vamos a introducir es *tdTomato*, que consta de dos copias en tándem de la proteína fluorescente *Tomato*, una versión optimizada en el laboratorio de DsRed. DsRed es una proteína fluorescente originalmente aislada del coral *Discosoma*.

Los genes reporteros nos permiten medir el nivel de inducción de algún promotor que nos interese estudiar. En este caso vamos a usar el promotor de STL1. STL1 es un gen que codifica para un transportador de glicerol y es inducido durante la respuesta de las levaduras a shock hiper-osmótico. De esta manera el constructo P_{STL1}-tdTomato nos permite medir el grado de activación de la vía de respuesta a shock osmótico de las levaduras.

Este constructo forma parte de un plásmido, cuya secuencia se encuentra en el archivo "Promotor STL1-TdTomato LEU2.ape" (ver más abajo). Este plásmido no contiene un origen de replicación para levaduras, por lo que la única manera de que sea mantenido en la célula es que se integre en el genoma. Este evento de integración es raro, muy pocas de las células que incorporen el DNA lo integraran en su genoma (aproximadamente 1 en 10⁷). Las que si lo hacen, en general lo hacen por un mecanismo llamado **recombinación homóloga**. Este es un mecanismo de reparación del DNA, que reconoce cortes doble cadena de la molécula. Para reparar estos cortes, las levaduras diploides utilizan la información del cromosoma homólogo, generando un entrecruzamiento entre la cadena cortada y la cadena homóloga. Cuando se introduce en una levadura haploide DNA lineal es reconocido por la maquinaria de reparación del DNA como un corte doble cadena. Si los extremos del DNA lineal son homólogos (tiene identidad de secuencia) con alguna parte del genoma, este mecanismo de reparación del DNA puede integrarlo en el genoma. Aunque la probabilidad que esto sucede es baja, es mucho más probable en levaduras que en la mayoría de los organismos. Por lo tanto es posible "dirigir" el sitio del genoma donde nuestro plásmidos se va a integrar, según qué secuencias queden en los extremos del plásmido "linearizado".

Para poder aislar las células que efectivamente incorporan el plásmido en su genoma, de las millones de células que no lo hacen, necesitamos un mecanismo de selección. En general existen dos formas de hacer esto. Una es incluir en el plásmido un gen resistencia a antibiótico. De esta manera si se plaquean las células en un medio sólido que contiene dicho antibiótico, únicamente las células con el gen de resistencia serán capaces de crecer.

La otra estrategia es usar **auxotrofias**. Un organismo auxótrofo para un determinado nutriente es aquel que necesita que dicho nutriente se encuentre en el medio de cultivo para crecer. Por el contrario, un organismo **protótrofo** es aquel que puede crecer sin dicho nutriente. En el laboratorio es usual usar cepas de levaduras auxótrofas para diferentes aminoácidos y bases nitrogenadas. Estas cepas contiene alguna mutación en los genes que codifican para las enzimas de las rutas biosintéticas de estas moléculas. Por ejemplo, las cepas con el alelo *leu2-3* no producen la enzima beta-isopropilmalato-deshidrogenasa, indispensable para sintetizar el aminoácido leucina. Por lo tanto estas células solo crecen en medio con leucina. Si en el plásmido se incluye un alelo funcional del gen *LEU2*, las cepas que lo incorporen podrán crecer en un medio sin leucina. Es decir que si después de transformar plaquemos las células en un medio sin leucina, solo formaran colonias aquellas células que hayan incorporado el plásmido en su genoma.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. ANÁLISIS DEL PLÁSMIDO

El programa ApE es un editor de secuencias de ADN. Es un software libre (“open source”). Es sencillo y bastante versátil. Se puede bajar desde <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>. El formato “universal” de plásmidos es genebank (.gb o gbk). Todos los editores de plásmidos lo leen. Además de la secuencia, tienen identificados los “features” presentes.

Descarguen la secuencia del plásmido “Promotor STL1-TdTomato LEU2.ape” (los archivos .ape están en el formato genebank, con comentarios adicionales específicos del software ApE).

El esquema del plásmido se encuentra en la Figura 1. El ejercicio consiste en encontrar las distintas partes en la secuencia de ADN. El objetivo final es **identificar con qué enzima de restricción conviene cortar para integrar el plásmido en un locus determinado**.

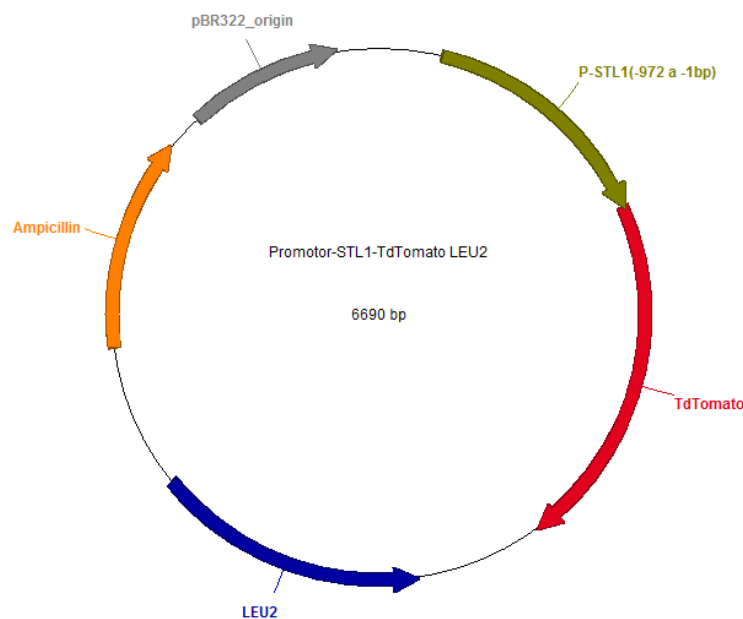
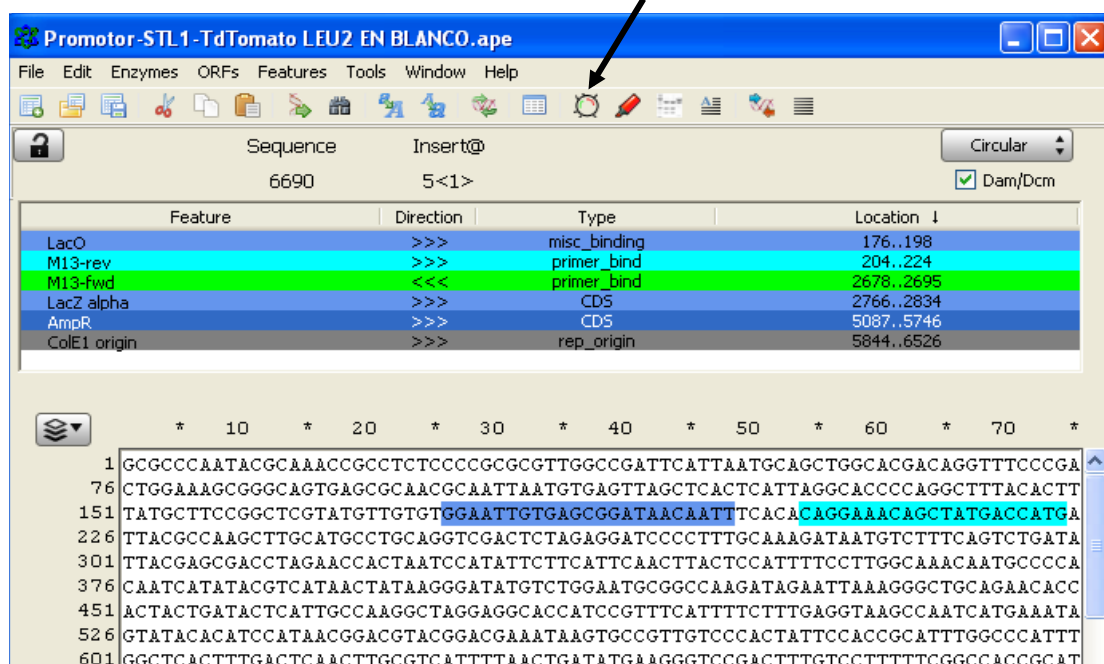


Figura1. Plásmido Promotor-STL1-TdTomato LEU2.

El programa viene con una pequeña biblioteca de secuencias reconocidas (“features”). Uno puede incorporar a esta biblioteca nuevas “features” para empezar a personalizar el programa.

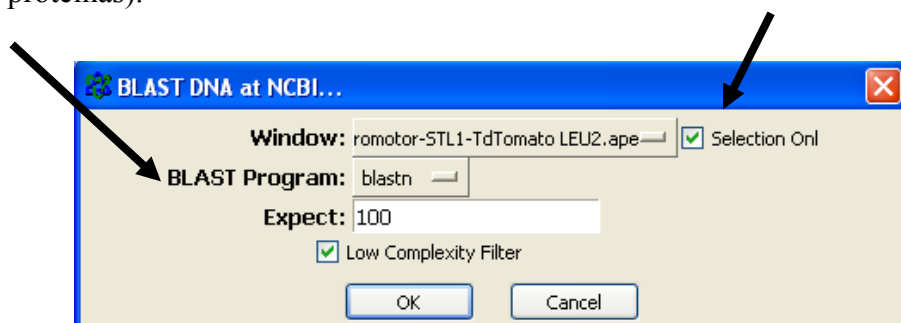
- 1) Vayan a **Features>Annotate features using library** o presionen Control+K. Se anotan elementos comunes como orígenes de replicación y sitios de unión a primers universales con su Nombre, Dirección (>>>>, en la hebra cuya secuencia figura, <<<<<, en la que no figura), Tipo de “feature” y su posición en bp.
- 2) Generen un mapa del plásmido a medida que lo van anotando en **Enzyme>Graphic Map** o Control+Y o con el botón correspondiente.



3) Ahora encuentren el marcador, LEU2, y la proteína fluorescente, tdTomato. Para ello tienen que encontrar ORFs lo suficientemente grandes. Vayan a **ORFs>Search Strands>Both**, luego pongan el cursor al inicio de la secuencia y vayan **ORFs>Find Next...** o Control+>.

Cuando encuentren un ORF lo suficientemente largo y en la orientación correcta según el esquema de la Figura 1, copien la secuencia o su reverso-complementario (Edit>copy o copy reverse-complement, o right-click, etc).

a) **En el BLAST directamente:** Busquen la secuencia en el BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Usando el programa Nucleotide Blast (blastn, en base de datos nucleotídica) o el blastx (que traduce la secuencia y busca en la base de datos de proteínas).



b) **Con el BLAST desde Ape:** Apretar Control+0 (cero) para abrir la consola. Ir a Tools>Blast sequences at NCBI..., clicar la opción **Selection Onl**(y) y elegir el programa a usar (blastn o blastx)

4) Una vez identificado, anótenlo como una nueva “feature”, **Feature>New Feature** o **Control+.** (punto). Elijan el color, nombre y tipo. Para que quede registrado en la biblioteca tiene que elegir la opción **New feature in library**.

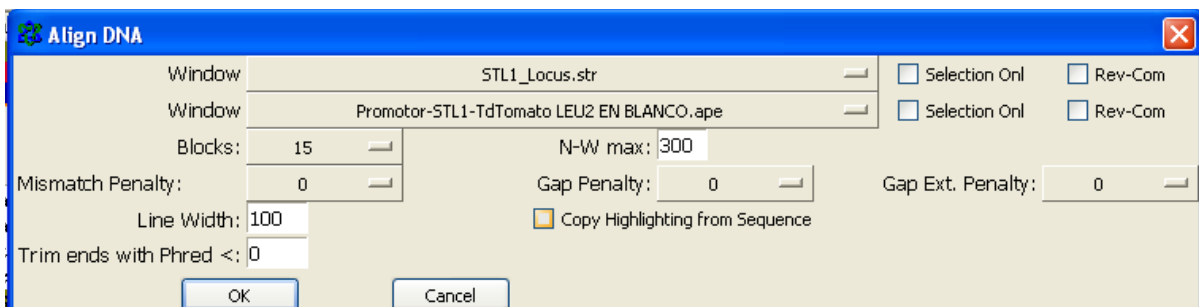
5) Falta identificar el promotor. En este caso, ya sabemos que está 972bp río arriba del ATG de tdTomato. Pero en una situación desconocida, para encontrar tenemos que bajar la secuencia del locus STL1 (Hacerlo...)

Ir a www.yeastgenome.org, buscar STL1 y obtener la secuencia de DNA +1kb up/downstream. Guárdenla en un nuevo archivo de ApE (STL1 Locus.apE) y anótenle el ORF de STL1, como ya saben hacerlo.

	Relative Coordinates	Chromosomal Coordinates	Most Recent Updates Coordinates	Sequence
CDS	1..1710	1508005..1509714	2011-02-03	1996-07-31

Retrieve sequences: S.c. Reference Strain S288C, DNA +1 kb up/downstream, Get Sequence

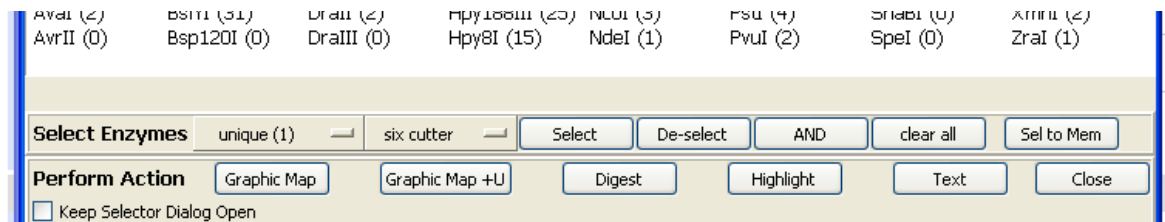
6) Usen la herramienta **Tools>Align two sequences...** para encontrar la secuencia compartida entre el plásmido y el locus. Seleccionen los archivos a comparar y denle OK.



Una vez realizado el alineamiento, seleccionen la parte inicial con 100% de identidad, cópienla y búsquenla en la secuencia del plásmido (al derecho o en rev-com según como esté orientado) con **Edit>Find** o **Control+F**. Pueden elegir la opción **Highlight All** para que se seleccione. Anoten el promotor.

7) Por último, necesitamos el mapa de restricción para elegir la enzima a utilizar para integrar tanto en el locus de STL1 como en el de LEU2. **Enzymes>Enzyme Selector** o

Control+E. Seleccionen Unique (1) y six cutter (enzimas más comunes) y luego “Select”. Finalmente, **Graphic Map**.



2. TRANSFORMACIÓN

Vamos a transformar la cepa ACL379, de *background* genético W303a. El genoma relevante de esta cepa es: *ho ura3 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11,15 GAL+ psi+ can1::HO-CAN1 ho::ADE2 bar1*.

Protocolo de preparación de levaduras competentes

Se debe trabajar en esterilidad bajo mechero durante **todo** el protocolo.

- 1) A partir de un cultivo *overnight* (ON) en YPD, diluir en 50mL YPD a $OD_{600}=0,2$ en Erlenmeyer de 250mL preferentemente.
- 2) Crecer a 30°C por 3-4hs hasta $OD=0,6-0,8$.
- 3) Transferir a tubo falcon de 50mL y centrifugar 5' a 3500rpm.
- 4) Descartar el sobrenadante por volcado y resuspender con 25mL de H₂O_d estéril. Vortex.
- 5) Centrifugar 5' a 3500rpm, descartar el sobrenadante y resuspender en 1mL de LiTE. Transferir a un tubo eppendorf.
- 6) Centrifugar 20'' a máxima, volcar el sobrenadante y resuspender con 300μL de LiTE ($V_f=500\mu L$).

Transformación de levaduras

Se debe trabajar en esterilidad bajo mechero durante **todo** el protocolo.

- 7) Alicuotar levaduras competentes de a 50ul por transformación en eppendorf de 1.5 ml.
- 8) hervir ssDNA (DNA simple cadena de esperma de salmón) por 5 minutos y pasar a hielo rápidamente.
- 9) agregar 2.5ul de ssDNA desnaturalizado por transformación

- 10) vortexear 20 segundos
- 11) agregar plásmido digerido (50 ng) y mezclar con vortex
- 12) agregar 375ul de PEG 40% LiTE 1x
- 13) incubar 45 minutos a 30°C (o temperatura ambiente)
- 14) agregar 50ul de DMSO y mezclar por inversión
- 15) incubar a 42°C por 10 minutos. ¡Ser exacto!
- 16) centrifugar 20 segundos y descartar sobrenadante
- 17) resuspender en 100ul de agua o TE 1x estéril
- 18) plaquear en medio sólido selectivo -L
- 19) incubar a 30°C por dos o tres días

Día de Reestria

Sacarle una foto a cada placa de transformación. Contar las colonias obtenidas a mano o usando el programa OpenCFU. Calcule la eficiencia de la transformación, definida como el número de colonias transformantes por μg (microgramo) de DNA utilizado en la transformación.

Re-estriar en placa de selección 10 colonias de la transformación.

BIBLIOGRAFÍA

- *Guía de Trabajos Prácticos* de la materia IBMC - cátedra Dr. A. Kornblitt, DFBMC, FCEN, UBA.
- *Guía de Trabajos Prácticos* de la materia Ingeniería Genética 2015, DFBMC, FCEN, UBA - equipo docente: Fiszbein, Sapochnik, Vasen, Nieto Moreno y Patop.
- Kawai, Shigeyuki, Wataru Hashimoto, and Kousaku Murata. "Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism." *Bioengineered bugs* 1.6 (2010): 395-403.
- *Guía de Laboratorio* de la materia Tópicos de Biofísica 2011- DF, FCEN, UBA. Lía Pietrasanta y Catalina von Bilderling.