



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Construcción sintética de una levadura  
criotolerante**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A:**

**DANIEL OCHOA GUTIÉRREZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky**



**2013**

## **Hojas de Datos del Jurado**

### 1. Datos del alumno

Ochoa  
Gutiérrez  
Daniel  
26 52 10 46  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
305501295

### 2. Datos del Tutor

Dra.  
Claudia Andrea  
Segal  
Kischinevzky

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.  
Víctor Manuel  
Valdés  
López

### 4. Datos del sinodal 2

M. en C.  
Alfonso José  
Vilchis  
Peluyera

### 5. Datos del sinodal 3

Biol.  
Geovani  
López  
Ortiz

### 6. Datos del sinodal 4

Q. F. B.  
María Cristina  
Aranda  
Fraustro

### 7. Datos del trabajo escrito

Construcción sintética de una levadura criotolerante  
68 p.  
2013

## **Agradecimientos académicos:**

Agradezco primero que nada a la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky, mi tutora, por ser una guía desde el principio de mi carrera. Gracias porque desde el segundo semestre, cuando metí Biología Molecular I, me di cuenta qué eso era lo que quería hacer el resto de mi vida. Gracias Clau, por ser el parteaguas de mi vida académica.

A la Dra. Luisa Alba Lois por permitirme realizar este trabajo en el laboratorio de Biología Molecular y Genómica. Porque además de sus enseñanzas siempre me regaló una sonrisa ante cualquier descubrimiento nuevo, fuera grande o pequeño. Gracias por esa motivación Lichi.

Al Biol. Geovani López Ortiz, por ayudarme en mi tesis de una manera que nadie más lo hubiera hecho, gracias por interesarte tanto en mi trabajo y ayudarme a terminarlo a como diera lugar. Probablemente me hubiera dado por vencido de no haber sido por ti.

A la Dra. Alicia González Manjarrez por darme la posibilidad de trabajar en su laboratorio durante un largo periodo de tiempo y brindarme todo el material y el tiempo que fueron necesarios para concluir mis experimentos. Además te agradezco porque a pesar de no ser parte de tu laboratorio como tal, me incluiste y me hiciste sentir como en casa.

Al Dr. Víctor Manuel Valdés López por tus grandes enseñanzas y observaciones. No hay persona con quien se pueda discutir las cosas de manera tan intensa y con tanta brillantez. Gracias por tanto conocimiento que me inculcaste y gracias por dejar mi instinto de curiosidad tan latente desde el primer día de clases.

Al M. en C. José Alfonso Vilchis Peluyera por siempre tener la disposición de ayudar y de brindar conocimiento a todos sus alumnos, incluyéndome. Y porque a pesar de todo siempre se mantuvo firme para enseñarnos cosas nuevas y sorprendernos con el mundo biotecnológico.

A la Q.F.B. María Cristina Aranda Fraustro por permitirse el tiempo de leer, revisar y corregir mi tesis a pesar de la cantidad de trabajo que tiene. Gracias por tu amabilidad y tu disposición en todo momento.

A la Quím. Viviana Escobar Sánchez por su ayuda en el laboratorio y por su apoyo técnico. Además, gracias por facilitarme el material de tu laboratorio cuando estaba a punto de perder la razón.

Al M. en C. Arístides III Sampieri Hernández por enseñarme desde el principio la utilización del material de laboratorio. Además del apoyo técnico, la enseñanza en las discusiones que se llevaron a cabo durante toda mi estancia en el laboratorio permitieron que me preguntara muchas más cosas sobre la vida y su funcionamiento.

A PAPIIT IN 218611-3 “Estrés oxidativo en *Debaryomyces hansenii*” por el financiamiento brindado al laboratorio con el cuál se llevó a cabo este proyecto. Asimismo le agradezco a la UNAM y a PAPIIT la beca que me brindó durante el último año y agradezco a la Facultad de Ciencias, al Instituto de Fisiología Celular y a todo su personal por permitirme realizar mis actividades académicas en éstas instalaciones.

### **Agradecimientos personales:**

Es improbable que pueda nombrar a todas las personas y cosas que me han forjado para que pudiera escribir este trabajo. Existen personas y cosas que aunque su aporte fue minúsculo contribuyeron a que mi mente creciera y lograra tener la capacidad de culminar un trabajo de 23 años. Una disculpa si tú eres una de esas personas que olvidé mencionar a pesar de tu importancia; si eres una cosa no creo que te afecte mucho... ¿verdad? Insensible.

Antes que nada debo agradecer a mi madre y a mi padre. Sin la serotonina, la dopamina, el ATP y el aporte económico y moral que me brindaron durante toda mi vida, no sería tan feliz ni tendría la energía necesaria para poder terminar una tesis de licenciatura en biología. La mayor cantidad de información la recibí en la escuela, pero la posibilidad de ordenar todo eso hubiera sido minúscula sin la ayuda de ustedes dos. No sólo me enseñaron de la vida, me enseñaron a vivir.

A mi hermana y mis hermanos Mariana, Miguel y Pablo, por ser mis personas favoritas en el mundo. Pasar el tiempo con ustedes tres; reír, bailar, jugar, nadar no tiene comparación. No saben lo que hubiera dado por poder haberlo hecho todos los días de mi vida. Gracias por estar ahí desde siempre.

Quiero agradecer a todos los demás integrantes de mi familia, bueno, de mis dos familias. A tito y a tita por sus historias, sus postres interminables y que siempre me acompañan a todos lados, aunque no estén físicamente ahí. A mi abue Chela por sus caldos de pollo con arroz y el cariño tan inmenso que tiene para todos sus nietos. A las tías y tíos: Lina, Vero, Horacio, Ángela, Neftalí, Blanca, Marcela, Chela y Víctor (y a sus respectivas parejas, que también son tíos a pesar de la falta de genes que lo reconozcan) porque además de ser familia también se han convertido en mis mejores amigos. A los 1500 primos que tengo regados por el mundo, pero en especial a los que sí conozco y recuerdo: Sofía, Esteban, Bruno, Miranda, Nicolás, Rodolfo, Ricardo, Rodrigo, Mayara, León, Mequi, Arturo, Yektel, Karla, Ale, Sergio y Natalia.

También debo mencionar a Silvia y a Arturo por fungir como una madre y un padre adjunta (o). Gracias por darme su cuidado, cariño y enseñanza sobre la vida a pesar de no estar emparentados genéticamente en lo absoluto. Agradezco que no me hayan matado como los leones cuando llegan a una nueva manada con crías ajenas.

Agradezco infinitamente a las dos mujeres de mi vida, Gaby y Karen, por estar siempre a mi lado. Porque sé que a pesar de todo lo que pueda suceder en nuestras vidas,

todas las peleas, discusiones, y desacuerdos, al final ustedes van a estar ahí, en mi mente y en mi corazón.

A mis amigos del Madrid: Juan Pablo, Lauris, Edgar, Regina, Chelen, Eli, Fernando, Ana Karen, Juan, Majo, Moni y Dulce. Porque a pesar de nuestras diferencias y de que nuestros caminos evolutivos han ido hacia distintos rumbos siempre me apoyaron en lo que a mi me gusta. Además porque seguimos divirtiéndonos y riendo como pocos grupos de amigos pueden decir que lo hacen.

A todos los biólogos y biólogas que he conocido en estos 5 años y que me han enseñado con discusiones, casi siempre con una chela en la mano, sobre la vida, a pesar de que muchos de nosotros todavía no la entendamos. A Alex, Adair, Naty, Pau, Caro, Yez, Montse, Mariana, Val, Adriana, Alma, Fer, Itai, Anita y a todos los que me faltarán. Seguramente nuestros caminos volverán a divergir en algún momento de nuestras vidas.

A toda la gente con la que trabaje en el laboratorio y que me ayudaron a crecer tanto intelectual como emocionalmente, además de prestarme pipetas, medios, o levaduras cuando las necesité. A Poncho, Moni, Diego, Arístides, Miguel, Maritrini, Charly, James, Citlali, Lalo, Ximena, Dariel, Cristi, Erendira, Juan Carlos, Alan, Isabel, Michelle, Isui, Viri y Rosa.

Además debo hacer un agradecimiento muy especial a Claudia y Geovanni por ser, a parte de compañeros de laboratorio, una guía personal sobre mi vida académica y una parte importante para que no dejara todo al final. Gracias a los dos por ser mis proteínas chaperonas, plegar mi conocimiento y acompañarme hasta salir del núcleo. No lo hubiera logrado sin ustedes.

A las personas que no pertenecen a la facultad o a mi familia y que fueron importantes de alguna manera. A Karla, Mariana, Héctor, Jorge, Fany, gracias por tantos momentos tan divertidos y por seguir siendo mis amigos a pesar del tiempo y la lejanía.

Me parece importante agradecer de igual manera a las mujeres que me acompañaron en algún punto de mi vida y que me apoyaron cuando más lo necesitaba. A Jimena, Gary, Jatziri e Itzel porque también somos lo que hemos dejado atrás.

A los cuadriviosos, a los chicos y profesores de música, a los chicos y chicas del fut y de las canchas, a todos los que fueron mis maestros, a la bandita de la ruta y a los del baile. A todos ellos por tener que soportar mi carácter, mis preguntas, mis discusiones y mi alegría descontrolada.

Quiero agradecer también a todas las cosas inanimadas y personajes históricos o ficticios que me ayudaron a conseguir muchas cosas importantes de mi vida, ustedes fueron las herramientas para mi felicidad y desarrollo personal. A la salsa, la bachata y el son. Al fútbol, al americano y a la gimnasia. A Afrodita (por llevarme y traerme a todos lados), a mi sax, a mis bongoes, a mis balones, a las chelas, a los mojitos, al ron y al whiskey. A Juan Luis, a Sabina, a Calle 13, a Mercedes Sosa, a Compay y a su Buena Vista Social Club. A Willie Colón, Héctor Lavoe, Gilberto Santa Rosa, Oscar de León, Tito Puente, el Grupo Niche y Marc Anthony. A Arturo Sandoval, a Miles, a Ella Fitzgerald y a Desmond. A Cultura Profética, el Panteón, los Cadillacs, el Cafeta, el Gran Silencio, Ely

Guerra, el Jarabe, Soda Estéreo y a Drexler. A Led Zepellin, Pink Floyd, Joe Cocker, Santa Ana, Jamiroquai, los Foo Fighters, Linkin Park, a los Red Hot, Offspring, Tool, System of a Down, Metallica, Marillion, Muse, los Yeah Yeah Yeahs y ZZ-Top. A Big Bang Theory, Friends, Soy tu Fan, Dr. House y los Simpson. A Dragon Ball (Z y GT), a Evangelion, a Digimon y a Pokemon. A Ronaldinho, Messi, Ronaldo, Cristiano, Pirlo, Davids, Henry, Hugol, Maradona y Pelé. A Neo, Morpheo, Trinity y Smith. A Aragorn, Legolas, Gandalf y Gimli. A Darth Vader, Yoda, Luke, Obi wan, Lea, Padme, R2D2 y Han Solo. A Beaker, la rana René y Animal. A Batman, Dr. Manhattan, el Guasón, Bane, V, Flash, Linterna Verde, Dos Caras, Iron Man, War Machine, Spider Man, el Duende Verde, los Gemelos Fantásticos, los X-men y todos los mutantes, Venom, Gatúbela, Dr Doom, Thor, Galactus, los 4 Fantásticos y Hulk. A Scott Pilgrim, 500 días con ella, Moulin Rouge, Eterno resplandor de una mente sin recuerdos, Muy parecido al amor, Elizabethtown, Amelie, Casablanca, Volver al futuro (1, 2 y 3), El origen, Avatar, Terminator, El planeta de los simios, La Guía del Viajero Intergaláctico, Jurassic Park. A Mafalda, Felipe, Manolito, Susanita, Miguelito, Guille, Libertad y Burocracia. A García Marquez, a Tolkien, a Benedetti, a Douglas Adams, a Saramago, a Sabines, a Sor Juana, a Assimov, a Bradbury, a Shelley, a Shakespeare y a Verne. Al Fifa (desde 1998) al Smash, al Guitar Hero y al Marvel vs Capcom. A Dawkins, Darwin, Wallace, Lamarck, Mendel, Haldane, Huxley, Franklin, Watson, Crick, Oparin, Margulis, Lovelock, Gould, Lehniger, Curtis, Benter, Nietzsche, Fromm, Shopenhauer, Kant, Sócrates, Platón, Descartes, Haeckel, Freud, Marcuse, Marx, Hawking, Einstein, Sagan, Newton, Galileo, Heisenberg y Planck. A las gorditas de chicharrón de la prepa 5, a los tacos de pastor, de suadero y campechanos de los primos, a las quekas y tacos de Delia, a los tacos de carnitas de la fac, a las tortas de fajitas de pollo con papas a la francesa, a las comidas corridas, a los jueves de pozole de cerro del agua, al sushi 2x1 y al buffet de comida china. A los tés y el pastel de té verde de la ruta de la seda, a los cuernitos y el chocolate del Jarocho. A las canchas, al Darwin, al pastizal, al helipuerto, a la cafe, al prome, a la biblio, a los B's y a los pastitos del O y el P. A las pipetas, a sus puntas, a los geles de agarosa, a los de poliacrilamida, al bromuro (por no caer en mi piel), a los medios, a las cajas Petri, a los microscopios, a los matraces, a los tubos eppendorf, a la centrífuga y a la microcentrífuga, a la incubadora, a las cámaras para geles, al termociclador, a las endonucleasas y a las ligasas, a los buffers, a los marcadores de peso molecular y a todas las *E. coli* y *S. cerevisiae* que fallecieron.

A París de noche y enamorado, a Londres lluvioso y con el corazón roto, a Boston otoñal con orgullo, a Brujas mágico y borracho, a Hamburgo frío con anhelo, a Berlín conmovedor y confuso, a Roma caluroso e indignado, a Barcelona alegre y libre, y a México como sea y con todo el sentimiento.

A la felicidad, a la tristeza, a la ansiedad, a la ira, a la admiración, a la frustración, a la pasión, a la excitación y a los besos y orgasmos que las producen, a la indiferencia, a la tranquilidad, a la angustia, a la satisfacción, a la nostalgia, a la dignidad, a la libertad, a la desesperación, a la melancolía, a la incertidumbre, a la seguridad, al rencor, al amor, a la soledad, y al miedo que tenemos de todos estos sentimientos. Pero sobre todas las cosas, gracias a la sabiduría, a la filosofía y a la ciencia.

*Dedicada a mi madre y a mi padre  
por todo el DNA y ATP que gastaron en mi*

*Insanity: doing the same thing over and over  
again and expecting different results.*

*Albert Einstein*

*A delusion is something that people believe  
in despite a total lack of evidence.*

*Richard Dawkins*



# Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>11</b>
1. Introducción.....	12
1.1. Biología Sintética e Ingeniería Genética.....	12
1.2. Características de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	15
1.3. Características del agua.....	17
1.4. Estrés y respuesta al frío en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	19
1.5. La AFP y <i>Macrozoarses</i> .....	23
1.6. Vector pYES2.....	27
2. Objetivos.....	29
2.1. Objetivo general.....	29
2.2. Objetivos particulares.....	29
3. Hipótesis.....	30
4. Materiales y Métodos.....	31
4.1. Secuencia de la AFP.....	31
4.2. Medios de cultivo.....	32
4.3. Minipreparación de plásmido bacteriano con AFP.....	32
4.4. Minipreparación de plásmido bacteriano pYES2.....	33
4.5. Verificación del plásmido por electroforesis en gel de agarosa .....	34
4.6. Purificación del producto de PCR.....	34
4.7. Digestión de plásmidos.....	35
4.8. Ligación del inserto y del plásmido.....	35
4.9. Preparación de células ultracompetentes.....	36
4.10. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	36
4.11. Comprobación de la inserción de AFP en el plásmido.....	36
4.12. Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
4.13. Experimento de viabilidad de <i>S.cerevisiae</i> a diferentes temperaturas con un solo evento de congelación.....	38

4.14.	Experimento de viabilidad de <i>S.cerevisiae</i> a diferentes temperaturas con mas de un evento de congelación.....	39
4.15.	Observación en el microscopio de la reacción de <i>S. cerevisiae</i> al frío.....	39
4.16.	Preparación de extractos.....	39
4.17.	Cuantificación de proteínas.....	40
4.18.	Gel de poliacrilamida (PAGE) desnaturalizante.....	41
5.	Resultados.....	43
6.	Discusión.....	55
7.	Conclusiones.....	62
8.	Bibliografía.....	65
8.1.	Fuentes bibliográficas.....	65
8.2.	Fuentes consultadas en la red.....	68

## Resumen

Se colocó el gen de una de las 14 isoformas de la proteína anticongelante de tipo III de *Macrozoarces americanus*, sintetizada artificialmente, en un vector lazadera de expresión en levaduras pYES2 con un promotor inducible por galactosa. Se transformó con este plásmido la cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* S288C con auxotrofia para histidina, leucina, lisina y uracilo. Después se realizaron pruebas de viabilidad a diferentes temperaturas (4° C, -20° C y -70° C) en medios inductivos y no inductivos para observar la resistencia de las levaduras a procesos de congelación y descongelación abruptos. Además se realizaron geles de poliacrilamida (PAGE) para observar la expresión de la proteína. Se encontró que la proteína anticongelante de tipo III no le confiere una mayor viabilidad a *S. cerevisiae* pero que produce, de cierta manera aun no entendida, un cambio fenotípico en la forma de la levadura que es muy evidente.

# 1. Introducción

## 1.1 Biología Sintética e Ingeniería Genética

La biología sintética consiste en el diseño y construcción de nuevos componentes biológicos tales como enzimas, circuitos genéticos y células, o el rediseño de los mismos. El elemento que distingue a la biología sintética de la biología molecular y celular tradicional, es el enfoque hacia el diseño y construcción de componentes vitales y circuitos que puedan ser modelados, entendidos y dirigidos hacia problemas específicos (Keasling 2008). La biología sintética está basada en la ingeniería genética, en la que un gen o un conjunto de genes que proveen una característica específica a un organismo, se obtienen y se colocan en otro organismo ajeno para que éste consiga la característica original. La diferencia con la ingeniería genética reside en el desarrollo de módulos genéticos a partir de la utilización de enzimas de restricción muy específicas, creando la posibilidad de unir varios fragmentos de DNA en un sistema más complejo y con la capacidad de ser modelado previamente.

Los ingenieros genéticos se basan en la expresión de genes por medio de sistemas de control celular naturales (promotores con sus represores y activadores afines). La capacidad de colocar un gen heterólogo bajo el control de uno de estos promotores nativos es la base de la industria biotecnológica moderna (Keasling 2008; Carbone y Arnold 2007). La ingeniería genética utiliza la función de enzimas de restricción (endonucleasas) y de enzimas de ligación (ligasas) para poder “cortar y pegar” respectivamente fragmentos de DNA, incluso de distintos organismos, para crear módulos que se ensamblen y se separen de acuerdo a las necesidades del diseñador (Berg y Mertz 2010).

Desde el siglo pasado la biología ha utilizado la manipulación de genes y proteínas para entender su funcionamiento. En la biología sintética y en la ingeniería genética, además de esto, se pretenden diseñar sistemas vivos completos, consiguiendo la inserción de genes extraños a otros sistemas vivos produciendo quimeras a partir de varios genes homólogos o hasta poder lograr la construcción de toda una célula a partir de moléculas diseñadas sintéticamente (Andrianantoandro 2006; Carbone y Arnold 2007).

Como en cualquier ingeniería, la estandarización de partes es fundamental para el fácil ensamblaje de varios componentes fabricados industrialmente. Para lograr esto, es necesaria la utilización de enzimas de restricción específicas con sitios de corte en los genes en cuestión, produciendo así “biopartes” que puedan ser ensambladas y manipuladas de manera sencilla.

Las enzimas de restricción son herramientas imprescindibles para el desarrollo de la biología sintética y la ingeniería genética. Permiten cortar las secuencias de DNA de manera predecible y reproducible. Las enzimas de restricción pertenecen a un gran grupo de enzimas conocidas como nucleasas. Las nucleasas rompen los enlaces fosfodiéster que unen los nucleótidos adyacentes en el DNA. Las endonucleasas, grupo más reducido de nucleasas, se unen al DNA en posiciones internas, por eso pueden fragmentarlo a pesar de que la secuencia que se cortará no esté en un extremo terminal. Es importante recalcar que este proceso no requiere de ATP así que no presenta un gasto energético para la célula (Micklos y Freyer 2003).

Las secuencias de corte son palindrómicas y normalmente pequeñas (de unas 5 a 10 pares de bases). Por ejemplo, la secuencia que reconoce a *BamHI* es la siguiente:

5' G---GATCC 3'  
3' CCTAG---G 5'

Por lo tanto se liberarán los extremos cohesivos y se podrán pegar con otra secuencia de DNA que contenga el mismo sitio cohesivo para la unión de estos nucleótidos, es decir, cualquier fragmento de DNA que tenga libre una secuencia CTAG en el extremo 5'. Estos extremos cohesivos se unirán ya que los nucleótidos libres serán complementarios, así se formará un enlace no covalente de dos fragmentos de DNA.

Cuando se utilizan enzimas específicas en los genes de estudio, se pueden formar dispositivos que se conectarán en toda ocasión. En la biología sintética se utilizan principalmente cuatro endonucleasas para cortar el DNA: *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* y *PstI*. Los sitios de corte para estas enzimas son:

<i>EcoRI</i> :	5' G-AATTC 3'	<i>SpeI</i> :	5' A-CTAGT 3'
	3' CTAA-G 5'		3' TGATC-A 5'

*Xba*I:        5' T-CTAGA 3'  
                  3' AGATC-T 5'

*Pst*I:         5' C-TGCAG 3'  
                  3' GACGT-C 5'

Se le considera una “bioparte” a un fragmento de DNA que contenga estos cuatro sitios de restricción en los extremos del fragmento, *Eco*RI y *Xba*I al principio, y *Spe*I y *Pst*I al final. *Xba*I y *Spe*I son dos enzimas que tienen sitios de restricción los cuales se diferencian en un solo nucleótido. Cuando se corta con cualquiera de estas dos enzimas, el fragmento cohesivo que se forma es 5' CTAG 3'. Esto permite que los extremos cohesivos formados se puedan unir aunque exista una diferencia con el primer nucleótido del extremo 5' de la secuencia (T en el caso de *Xba*I y A en el caso de *Spe*I). La ventaja de unir los extremos cohesivos formados por estas dos endonucleasas es que se forma una especie de soldadura en el DNA conocida como cicatriz. La cicatriz, al tener un sitio con dos nucleótidos 5' diferentes, no puede ser cortada nuevamente por ninguna de las dos enzimas y, de esta manera, se forma una construcción estable sin capacidad de ser digerida, formando así una “bioparte” mucho más grande y compleja (Registry IGEM).

Al unir fragmentos de DNA (dispositivos), se pueden formar construcciones complejas de genes, promotores y reguladores (módulos) que, unidos dentro de un plásmido con la misma estandarización (sistema), se puede llegar a obtener un organismo genéticamente modificado, plenamente funcional y con una o muchas características y adaptaciones específicas que fueron seleccionadas por un ser humano.

A pesar de la practicidad que se ha logrado hasta el momento para construir sistemas complejos de ensamblaje de genes, la construcción de sistemas biológicos artificiales está precedida por una serie de problemas que se deben de tomar en cuenta. Los módulos y dispositivos biológicos que se puedan llegar a diseñar no son objetos independientes, ni tampoco se construyen en la ausencia de un sistema vivo complejo. La mayor preocupación que se debe tener es la presente incapacidad de poder predecir con certeza las funciones secundarias que un dispositivo (gen, proteína, promotor, regulador, etc.) puede llegar a tener en la célula modificada. La falta de certeza se basa en procesos celulares que no son predecible aún por parte de los

biólogos; procesos como las redes complejas de expresión génica, la tasa de mutación de los genes, la regulación de la muerte y de la división celular, y la interacción entre diferentes organelos y estructuras celulares y el medio extracelular, pueden llevar a que la respuesta de la célula sea fatal (Andrianantoandro 2006).

### **1.2 Características de *Saccharomyces cerevisiae***

*Saccharomyces cerevisiae* es un organismo muy bien conocido debido, principalmente, a su utilización comercial como la levadura básica en la producción del pan y bebidas alcohólicas. Desde tiempos ancestrales se han utilizado las bebidas alcohólicas a pesar de la falta de conocimiento de la bioquímica del proceso. Hasta hace apenas unos 100 años fue demostrada la participación esencial de las levaduras vivas en los procesos de fermentación (Fernandes 2005, Alba-Lois y Segal 2010). El químico francés Antoine Lavoisier (1734-1794) mostró que el azúcar es transformado en etanol mediante la fermentación. Theodor Schwann (1810-1882) y Charles Cagniard-Latour (1797-1859) examinaron microscópicamente mezclas fermentadas y observaron que la “fuerza” que dirigía la fermentación era “una masa de glóbulos que se reproducían por gemación” siendo una consecuencia del crecimiento de las levaduras. Louis Pasteur (1822-1895) concluyó que las levaduras no eran formadas dentro de las mezclas fermentadas sino que las levaduras provenían de otras levaduras y que éstas eran las causantes de que la fermentación se llevara a cabo. Él identificó que las levaduras como *S. cerevisiae* eran las responsables de la fermentación alcohólica (Maheshwari 2005, Alba-Lois y Segal 2010). Para finales del siglo XIX Eduard Buchner logró demostrar que la fermentación podía producirse sin la necesidad de una levadura en un sistema *in vitro*. Logrando así acrecentar la facilidad del estudio bioquímico de este proceso y permitiendo a los científicos posteriores el descubrimiento de elementos importantes para la obtención de energía como el ATP (Alba-Lois y Segal 2010).

*S. cerevisiae* ha sido popular entre los biólogos debido a las grandes ventajas que provee para la biología molecular (Fernandes 2005). Desde que el genoma de *S. cerevisiae* fue secuenciado completamente en 1996, se han descubierto y entendido varios procesos celulares que han llevado a que este organismo se utilice como modelo principal en estudios de células eucariontes. Es un organismo seguro ya que no es patógeno en condiciones naturales, posee modificación post-traduccional y rutas

metabólicas similares a otros eucariontes más complejos, tiene un rápido crecimiento y una condición de cultivo simple y de bajo costo. Además, se tienen herramientas genéticas de fácil acceso, muy bien desarrolladas y posee la facilidad de manipulación y modificación del DNA *in vivo* (Fernandes 2005; Mokdad 2012). Todas estas características han permitido que *Saccharomyces cerevisiae* sea utilizada en biotecnología y biología sintética como un productor rápido y eficiente de proteínas foráneas a su organismo, incluso de mamíferos.

*S. cerevisiae* es un organismo unicelular eucarionte perteneciente al Phylum: Ascomycota, Clase: Saccharomycetes, Orden: Saccharomycetales, Familia: Saccharomycetaceae. Posee unos 6,200 genes en un genoma de 12.5 Mb + 1-2 Mb de DNA ribosomal, empaquetados en 16 cromosomas (Broach *et al.* 1991). Su ciclo de vida consiste en una secuencia temporal de haploidías y diploidías debidas a procesos de meiosis y de apareamiento y de fusión de células, dependiendo de los cambios en las condiciones básicas del medio. Tanto las células haploides como las diploides se dividen por gemación. El ciclo mitótico comienza cuando se duplica el DNA de la célula (fase S), seguido por una precisa separación de las cromátidas hermanas (fase M), llevando finalmente a la separación de las dos células hijas. La fase G1 es el intervalo de tiempo entre la mitosis y el inicio de la síntesis de DNA; la fase G2 es el intervalo entre la síntesis completa de DNA hasta el inicio de la mitosis (Maheshwari 2005).

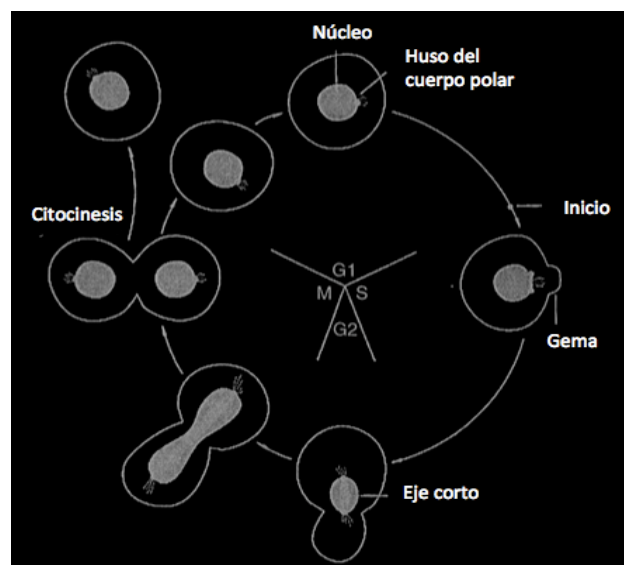


Fig. 1. Se muestran los momentos del ciclo en que se produce la duplicación del material genético y la formación de la gema. Figura tomada de (Maheshwari 2005)



Uno de los problemas básicos del desarrollo y los ciclos celulares es entender los principios por los que un organismo determina el tiempo y la posición para la generación de nuevas células. A este principio se le conoce como polaridad. Durante las últimas cuatro décadas, se ha encontrado que los mecanismos empleados para la manifestación de la polaridad, tanto en seres unicelulares como multicelulares, recae en la generación de una simetría celular conservada por los sistemas de reorganización del citoesqueleto (Maheshwari 2005).

La gemación de *S. cerevisiae* siempre es polar, refiriéndose así a un crecimiento a partir de las zonas más alejadas del centro de la célula. Este crecimiento es característico de *S. cerevisiae* y es posible diferenciarla por esta razón de otras especies de levaduras, como *Schizosaccharomyces pombe*, que se divide por fisión binaria.

### **1.3 Características del agua**

El agua es la sustancia más abundante tanto en nuestro planeta como en la mayoría de los organismos vivos, siendo más del 70 % de su peso. Desde los primeros organismos vivos y durante todo el curso de la evolución, el agua a sido una sustancia fundamental para el desarrollo de la vida en nuestro planeta. Los productos iónicos del agua ( $H^+$  y  $OH^-$ ), el equilibrio constante de pH y la capacidad de formar puentes de hidrógeno o enlaces polares, influyen profundamente la estructura, la capacidad de autoensamblaje y las propiedades de todas las biomoléculas y de todos los componentes celulares (Nelson y Cox 2007).

Los puentes de hidrógeno que se forman entre las moléculas de agua proveen la fuerza cohesiva necesaria para mantener al agua en estado líquido con un orden que sobrepasa el de cualquier otro líquido sobre la Tierra. Las moléculas polares pueden disolverse fácilmente porque remplazan las interacciones entre moléculas de agua con interacciones energéticamente más favorables. En contraste, las moléculas no polares interfieren con la interacción de moléculas agua-agua, pero sin formar una interacción propicia. Por lo tanto, en soluciones acuosas, las moléculas no polares suelen formar agrupaciones que son la base molecular de las membranas celulares (Nelson y Cox 2007).

El agua se estructura a partir de los puentes de hidrógeno, enlaces formados entre un átomo de hidrógeno y un átomo de oxígeno de dos moléculas de agua diferentes. Ya que las moléculas de agua tienen una apertura de enlace entre los átomos de hidrógeno de  $104.5^\circ$ , la estructura que se consigue con la formación de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua es hexaédrica (Nelson y Cox 2007).

Cuando el agua se encuentra en estado líquido, esta estructura hexaédrica es cambiante. Los puentes de hidrógeno formados entre las moléculas de agua se mueven entre éstas cambiando su interacción con varias moléculas, formando nuevos puentes de hidrógeno en cada momento. Sin embargo cuando el agua se solidifica, es decir, que su temperatura desciende por debajo de los  $0^\circ\text{C}$  a 1 atm de presión, estos enlaces se mantienen quietos, dejan de compartirse unos con otros y de moverse entre moléculas. A partir de esto se forma una estructura ordenada que produce los típicos copos de nieve y cristales que se observan en la naturaleza. Esta estructura parecida a una reja estabiliza la distancia entre moléculas, permitiendo al hielo ser menos denso que el agua y haciendo que flote en ella (Nelson y Cox 2007).

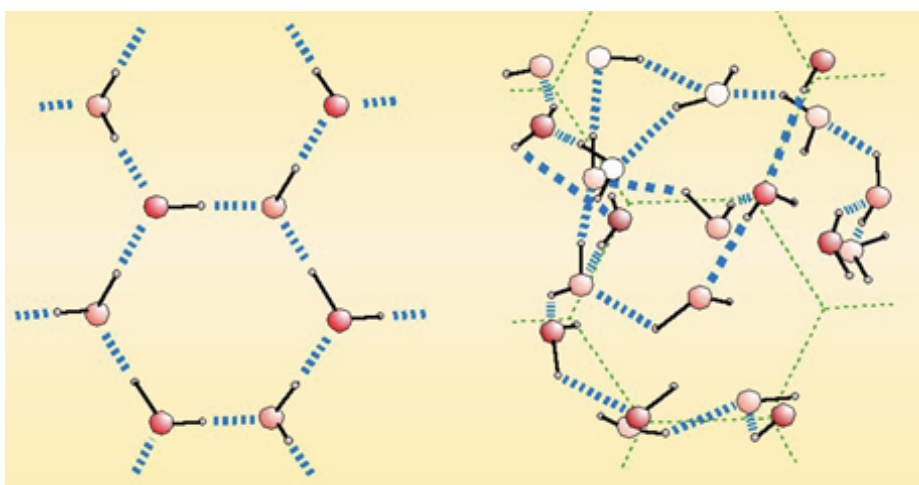


Fig. 2. Estructura molecular del hielo (izquierda) y del agua líquida (derecha). Se observa la estructura hexagonal que se forma por la conjunción de 6 moléculas de agua. La estructura del agua líquida es cambiante y dinámica por lo que no se establece una estructura física estable.

Figura obtenida de <http://old.iupac.org/didac>

La estructura geométrica ordenada del hielo coloca átomos de oxígeno en cada uno de los vértices del hexaedro. Cuando la temperatura desciende y el agua se congela, los

organismos vivos reciben un daño celular causado en gran medida por la formación de estos vértices. Cuando se forma la estructura cristalina, los componentes celulares que están anclados a moléculas de agua son desgarrados por estos vértices como si fueran cuchillas, dañando por completo el sistema celular y no permitiendo la sobrevivencia del organismo congelado. Son pocos los organismos que han encontrado mecanismos celulares para evitar el daño por formación de cristales de agua.

#### **1.4 Estrés y respuesta al frío de *Saccharomyces cerevisiae***

Las principales condiciones de estrés, a las que *S. cerevisiae* responde naturalmente, son el choque térmico de aumento de temperatura, el estrés osmótico, el estrés oxidativo, la falta de nitrógeno y la falta de proteína cinasa A (Moskvina 1998). Recientemente se ha encontrado que también existe un mecanismo de protección ante un choque de baja temperatura (Aguilera *et al.* 2007). La respuesta al choque térmico de frío por parte de *S. cerevisiae* corresponde principalmente a una serie de genes conocidos como los genes TIR (Temperature-shock Inducible Response). Es importante señalar que, además de éstos, la respuesta al frío por parte de *S. cerevisiae* concierne mayoritariamente a genes implicados en rutas de adaptación al estrés, es decir, no existe una ruta específica y determinada únicamente hacia la respuesta a un choque de baja temperatura (Kowalski *et al.* 1995).

Cuando sucede una disminución abrupta de la temperatura en el exterior de la célula, se desencadenan las cascadas de señalización establecidas principalmente para el estrés osmótico u oxidativo. Esto indica que la adaptación hacia el choque de frío de la levadura no evolucionó de manera adyacente, sino que en realidad es una adaptación provista por mecanismos ya establecidos previamente para la protección al estrés ambiental.

A pesar de que algunas proteínas de respuesta a frío pueden ser esenciales para que las células se adapten y puedan crecer bajo condiciones desfavorables, existe evidencia que sugiere que el principal objetivo de la respuesta a choque frío es proteger a las células contra los daños que pueda provocar la congelación (Aguilera *et al.* 2007). El mayor problema que las levaduras enfrentan al momento de bajar la temperatura, es la incapacidad de la membrana y la pared celular de mantener su fluidez (Fernandes 2005). Observaciones de Wolfe y Bryant (Wolfe y Bryant 1999)

sugieren además que la organización de la membrana y las propiedades dinámicas de la misma son los principales blancos del daño por congelación.

Un descenso abrupto en la temperatura también activa el metabolismo de carbohidratos de reserva. La producción de glucógeno, entre otras cosas, ocurre en respuesta a diferentes tipos de estrés como el choque térmico y el daño oxidativo, y también es utilizado como una fuente de carbono durante el proceso de desecación de la célula provocado por un choque de baja temperatura (Parrou 1997).

Después de muchos análisis de la expresión génica en *S. cerevisiae* tras un descenso en la temperatura del medio, se han encontrado ciertos genes que se activan como mecanismo de respuesta. Dentro de estos genes, los implicados en la transcripción de manoproteínas de la pared celular, conocidos dentro de la familia de proteínas inducibles por choque térmico DAN/TIR, son los más importantes. Estas proteínas presentan una inducción a 10° C, 4° C y hasta 0° C (Aguilera *et al.* 2007). Las manoproteínas actúan como un defensor de la fluidez de la pared celular ya que son las responsables de la protección de los beta-glucanos. Los beta-glucanos son los encargados de la completa integridad estructural de la pared celular en *S. cerevisiae* (Zlotnik 1984; Abramova 2001b).

También se encuentran secuencias de DNA relacionadas a TIR conocidas como seripauperinas (familia de proteínas PAU), que presentan una actividad de interacción fosfolipídica y que son transcritas en el momento del descenso de la temperatura (Aguilera *et al.* 2007).

Los genes antes mencionados son activados por promotores inducidos bajo cierto estrés, no sólo de frío, sino también de respuesta a un choque de alta temperatura, como la respuesta de Ole1 y de la ruta PKC; de respuesta a una alta osmolaridad como la ruta HOG; de respuesta a especies reactivas de oxígeno como los factores MOX; o incluso a respuestas generales de estrés como la ruta de AMPc-PKA y factores STRE (Aguilera *et al.* 2007).

Todos estos mecanismos de señalización tienen una propiedad en común, el cambio en las características dinámicas de la membrana y de la pared celular. Por ejemplo, la

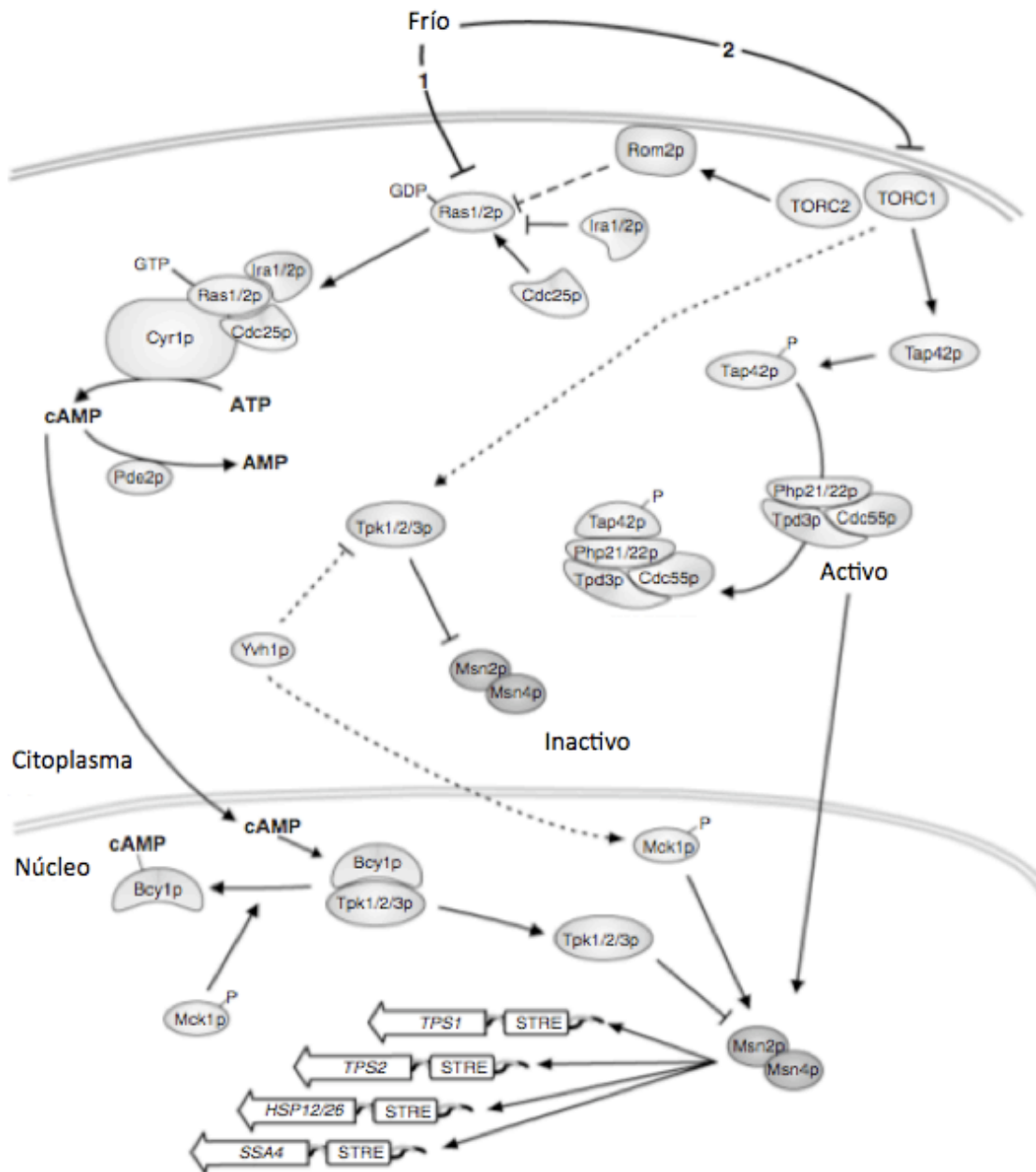


Fig. 3. Activación de los factores de respuesta a estrés en la célula STRE con activación de los genes que codifican para proteínas de protección de la membrana como TPS1/2 (trehalosa fosfato sintasa). Todo a partir de una cascada de señalización producida por una modificación en la cinética de la membrana y de la pared celular. Figura obtenida de (Aguilera *et al.* 2007)

proteína Sln1p, la única histidina cinasa sensora de las levaduras, ha sido reportada recientemente como parte del mecanismo de respuesta al frío (Panadero *et al.* 2006). Sln1p junto a Ypd1p y Ssk1p, forman un sistema de fosforilación, que transmite la señal de osmoestrés a través de diversos elementos de la ruta de alta osmolaridad del

glicerol (ruta HOG por sus siglas en inglés), la cascada de respuesta a estrés osmótico más importante de *S. cerevisiae*. La activación de esta ruta también es inducida por la rigidez provocada por el dimetil-sulfóxido (DMSO) en la membrana celular (Panadero *et al.* 2006).

En otro caso, la ruta de señalización del AMPc-PKA funciona a partir de proteínas fosfatasas de membrana. En particular la proteína YVH1 está inducida exclusivamente por el descenso abrupto de la temperatura del medio extracelular. Después de una conjunción de reacciones de fosforilación de diversos complejos enzimáticos entre los que se encuentra el AMPc y proteínas Tap/Php/Tpd/Cdc, se activa el complejo transcripcional Msn2p/Msn4p. Éste entra al núcleo y activa los promotores STRE encargados de producir proteínas de síntesis de glicerol y trehalosa, confinados a proteger a la célula de la desecación, y proteínas chaperonas o de protección de agentes reactivos (Aguilera *et al.* 2007).

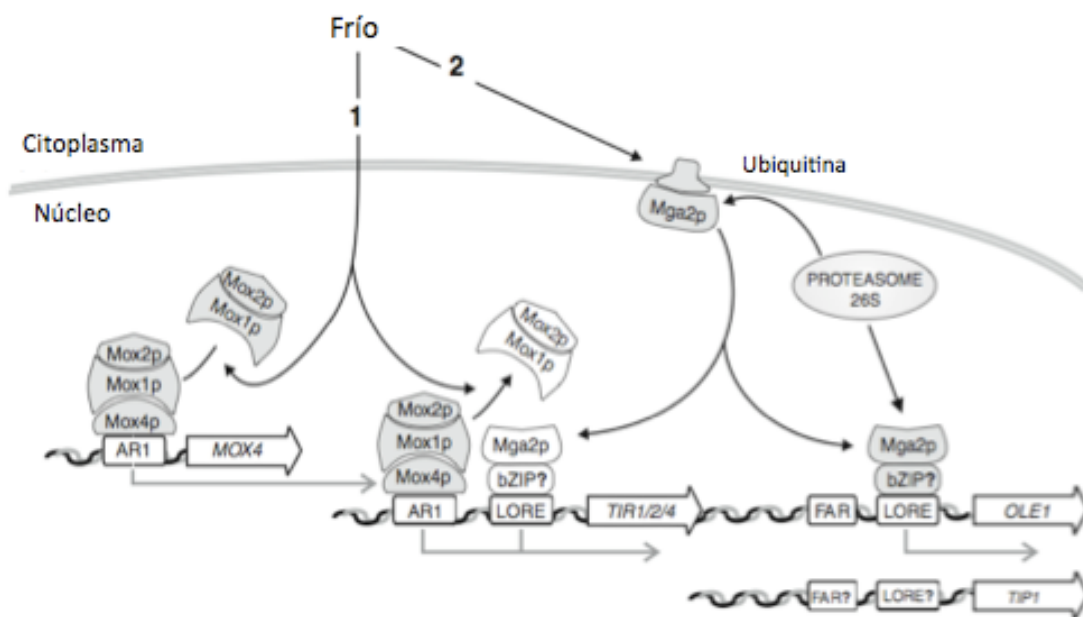


Fig. 4. Activación de los factores de transcripción MOX tras la inducción por frío en el citoplasma. Los factores MOX, a su vez, activan la transcripción de los genes que codifican para las manoproteínas de la pared celular DAN/TIR uniéndose a la secuencia AR1. Figura obtenida de (Aguilera *et al.* 2007)

A nivel transcripcional, existen otros mecanismos que defienden a la célula de un choque térmico de frío. La expresión coordinada de los genes DAN/TIR, con sus respectivos promotores, dependen además de los factores transcripcionales MOX. Se

ha observado que el complejo Mox1p/Mox2p, que es activado a partir de un descenso en la temperatura del citoplasma y de una situación anoxigénica en el medio, se libera dentro del núcleo para unirse a la proteína Mox4p que regula la expresión de los genes DAN/TIR que, como se había mencionado previamente, se encargan de producir manoproteínas de la pared celular (Abramova *et al.* 2001a; Aguilera *et al.* 2007; Cohen *et al.* 2001). Además de esta regulación por parte de los factores MOX, existen elementos regulatorios dentro de los mismos promotores de los genes DAN/TIR. El promotor DAN1, por ejemplo, se regula a partir de una secuencia AR1 a la que está unida el factor Mox4p. Si este sitio es suprimido, la célula es incapaz de producir las manoproteínas de la familia DAN/TIR bajo condiciones anoxigénicas (Cohen *et al.* 2001) y bajo condiciones de choque de frío (Abramova *et al.* 2001b). Todo esto indica que la regulación a partir del frío de los genes DAN/TIR está relacionada tanto con la falta de oxígeno como con el descenso de la temperatura.

Así, la respuesta al frío por parte de *S. cerevisiae*, está integrada en realidad por una conjunción de mecanismos que evolucionaron para actuar ante un estrés general en el medio, principalmente en el caso del descenso de temperatura, ante una desecación o descompensación de la célula, provocada por procesos que afectan a la membrana lipídica o a la pared celular de la levadura.

### **1.5 La AFP y Macrozoarses**

Los seres vivos han desarrollado diversos mecanismos de adaptación para sobrevivir en ambientes extremos. En los ambientes fríos, con temperaturas por debajo de 0° C, existen dos estrategias básicas utilizadas por estos organismos: aquellos que evitan la congelación del agua utilizando polisacáridos o proteínas en el medio intracelular para mantenerla en un estado supercongelado o vítreo, y aquellos que son tolerantes al frío por la capacidad de sintetizar protectores de la congelación y del daño causado por la formación de los cristales de hielo en el medio extracelular. Los peces que viven en aguas cercanas al Ártico utilizan ésta última estrategia para sobrevivir a las bajas temperaturas en las que se encuentran (Venketesh y Dayananda 2008).

*Macrozoarses americanus*, también clasificado como *Zoarces americanus*, es un pez de bajas temperaturas conocido de manera común como anguila faneca. Pertenece al

Phylum Chordata, Clase: Actinopterygii, Orden: Perciformes, Familia Zoarcidae. Habita principalmente en las zonas costeras del Atlántico Norte desde la región de Labrador hasta el estado de Virginia. Suele vivir en el fondo del agua a temperaturas menores de 10° C. No es un pez que lleve a cabo grandes migraciones, por lo que debió encontrar mecanismos de adaptación para sobrevivir a los cambios de temperatura que se producen en su hábitat.

Uno de los principales elementos con los que cuentan los peces que habitan las regiones más frías del planeta son las proteínas anticongelantes (AFP's) y glucoproteínas anticongelantes (AFGP's), halladas en concentraciones de hasta 35 g/L en su sangre (Makarevich *et al.* 2009).

Las AFP's se agrupan muchas veces en las proteínas conocidas como proteínas de unión al hielo (IBP's). Estas proteínas tienen una gran afinidad por las moléculas de H<sub>2</sub>O. Las AFP's, además de unirse al agua, también inhiben la formación y el crecimiento de los cristales de hielo cuando la temperatura cae por debajo de los 0° C (Bar-Dolev *et al.* 2012).

Las AFP's poseen la capacidad única de unirse a la parte exterior de los cristales de hielo, lo que permite el crecimiento de hielo sólo hasta cierto límite, produciendo así la formación de numerosas superficies de hielo convexas entre las uniones de las proteínas anticongelantes. El crecimiento curvo de la superficie del hielo vuelve

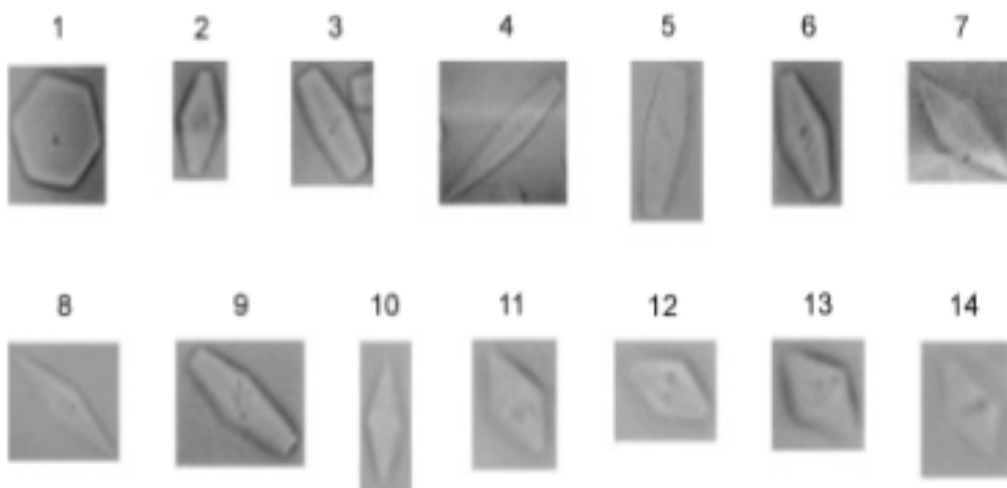


Fig. 5. Diferentes tipos de cristales formados por la dilución de las 14 isoformas de AFP's de tipo III. Se observa cómo la estructura hexagonal de la imagen 1 es diferente a las formas alargadas de las demás imágenes. Las proteínas anticongelantes cambian la estructura hexagonal que se observa en la imagen 1 a diferentes tipos de cristales alargados, evitando la formación de vértices dañinos para la célula. Figura obtenida de (Nishimiya *et al.* 2005)



energéticamente desfavorable el proceso de absorción de nuevas moléculas de agua al cristal, llevando a la finalización del crecimiento del hielo (Nishimiya *et al.* 2005).

Existen cuatro tipos de AFP's y una de AFGP's. A continuación se muestran las diferencias moleculares de estos cuatro tipos de proteínas.

TABLA 1  
Propiedades de las proteínas anticongelantes

Características	AFGP	AFP de tipo I	AFP de tipo II	AFP de tipo III	AFP de tipo IV
Masa (kDa)	2.6-3.3	3.3-4.5	11-24	6.5	12
Estructura primaria	(AAT) repetida	Rica en A	Estabilizado por disulfuros	General	Rica en alanina o rica en glutamina
Tendencia de aminoácidos	>60% A; >30% T	A~60%	Rico en cisteína 9%	General	Rica en glutamina (26%)
Estructura secundaria	Hélices extendidas	$\alpha$ -Hélice	Espiral mezclada	Lámina $\beta$	$\alpha$ -Hélice
Estructura terciaria	Extendida	$\alpha$ -Hélice simple	Globular con doblez de lectina tipo C	Globular	Conjunto de hélices
Heterogeneidad	Polimeros 1-8	Repetitivo/no repetitivo	Dependiente de Ca	Isoformas	NA
Unión al hielo	Cerca de 10-10	20-21	11-21/?	Cerca de 10-10	NA
Homólogos o antecedentes	Gen tripsinogen	NA	Lectinas dependientes de Ca	NA	Dominio de lipoproteínas

Tabla 1. Se muestran algunas de las características básicas de las distintas proteínas anticongelantes. Fuente (Venketesh y Dayananda 2008)

Las AFP's de tipo III son las proteínas anticongelantes sin glucosilar con menor masa, tan sólo unos 6.5 kDa como máximo. También poseen una gran cantidad de estructuras en lámina- $\beta$  y cadenas muy pequeñas de aminoácidos, esto en conjunto les confiere una estructura terciaria globular y, a su vez, una gran afinidad por las moléculas de H<sub>2</sub>O (Venketesh y Dayananda 2008).

Se ha observado que las AFP's de tipo III son muy diferentes en su composición de aminoácidos con respecto a las AFP's de tipo I (ricas en alanina y estructuras de  $\alpha$ -hélice), y con respecto a las tipo de II (ricas en cisteína). Ante esto se han hecho estudios que reflejan cuáles son los aminoácidos que predominan en las AFP de tipo III y se encontró que en todas las AFP's de tipo III estudiadas se presentan regiones de alaninas y valinas muy conservadas (Choy *et al* 1988).

Las AFP's de tipo III se caracterizan por su estructura simétrica de doble plegado interno asemejando la forma de un "pretzel". Esto provee una marcada superficie anfipática delgada para su unión al hielo proporcionada por los residuos 9–10, 13–16, 18–21, 41, 42, 44 y 65 (Nishimiya *et al.* 2005).

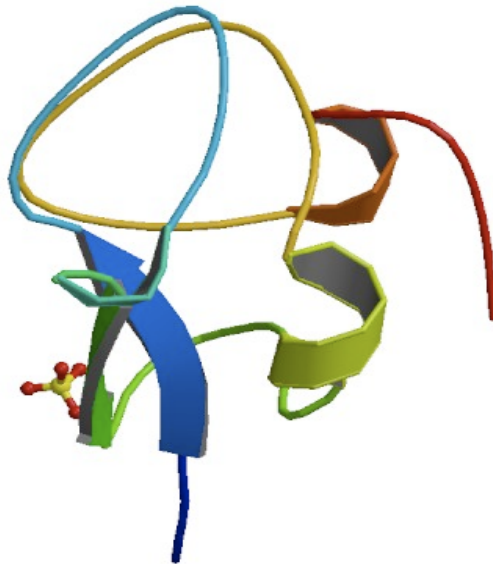


Fig. 6. Estructura terciaria de una de las isoformas HPLC-12 de la proteína anticongelante de tipo III de *Macrozoarces americanus*. Figura obtenida de la Protein Data Base en ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org) No. P19614)

En muchos casos el término "anticongelante" no implica la función natural de las proteínas ya que éstas no previenen la congelación, más bien controlan el tamaño, la forma y la manera en cómo se agregan los cristales de hielo; por lo tanto, proteína estructurante de hielo (ISP) es un término más general y mucho más adecuado que ha sido propuesto por Clarke *et al.* (Clarke *et al.* 2002).

Las secuencias de por lo menos 12 isoformas de AFP's de tipo III de *Macrozoarces americanus* han sido determinadas y secuenciadas por completo. Son conocidas como HPLC1-12 aunque previamente se agrupaban en QAE y SP. Las proteínas QAE y las SP comparten tan sólo un 55 % de identidad entre ellas, mientras que todas las isoformas incluidas en el grupo de las SP comparten más del 90 % de identidad. Sólo se ha reportado modificación post-traducciona l en las proteínas anticongelantes tipo SP (Nishimiya *et al.* 2005).

## 1.6 Vector pYES2

pYES2 es un vector de 5.9 Kb diseñado por la empresa Invitrogen® para la expresión inducible de proteínas recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*. Los rasgos del vector permiten una fácil clonación de los genes de interés y una selección de transformantes a partir de la prototrofia de uracilo.

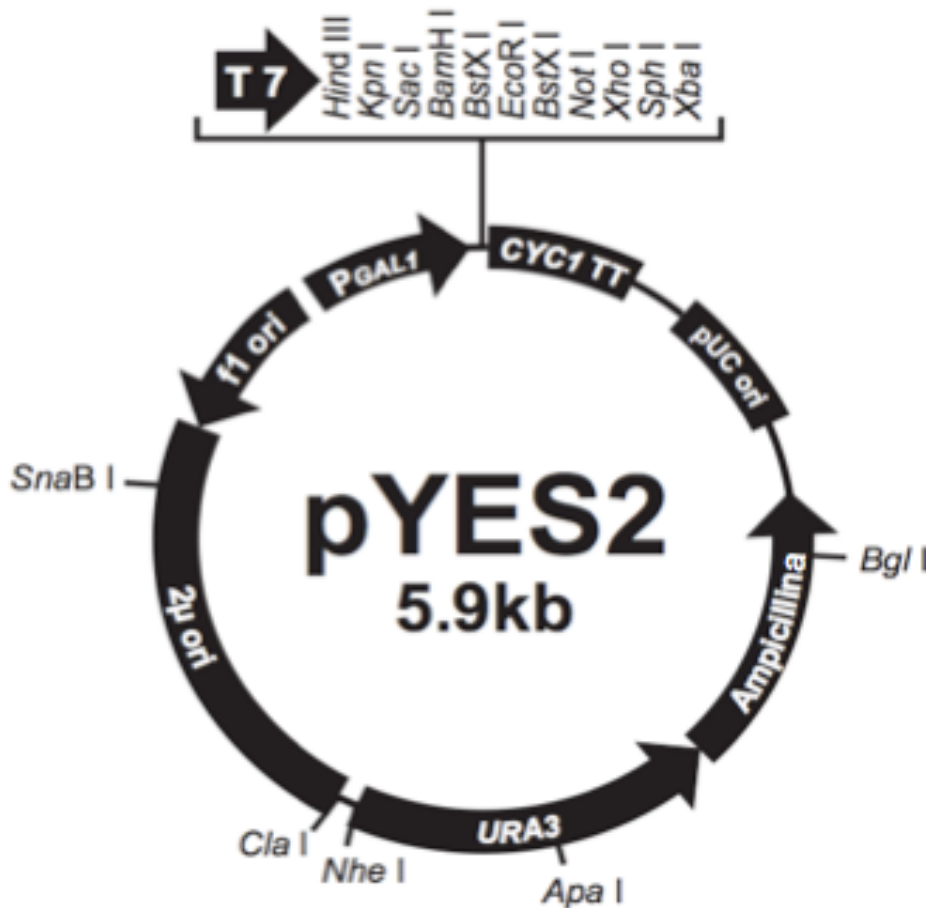


Fig. 7. Diagrama del vector pYES2 marca Invitrogen®

Figura obtenida de (Manual pYES2 Invitrogen® 2008)

El vector contiene los siguientes elementos:

- Un promotor de levadura *GAL1* de alta expresión de proteínas, inducible por galactosa y reprimido por glucosa.
- Un sitio para multiclonación.
- Un terminador transcripcional *CYC1* para la terminación eficiente del mRNA.
- Un gen *URA3* para selección de transformantes en cepas de levadura hospedera con genotipo *ura3*.

- Un gen de resistencia a ampicilina para selección en *E. coli*.
- Un origen de replicación 2  $\mu$  que le permite estar en multicopia



Fig. 8. Secuencia del promotor, terminador y sitio de poliunión del plásmido PYES2 marca Invitrogen®. El sitio de corte de la enzima *PvuII* se encuentra en el lugar 721 (no se muestra en esta imagen). Figura obtenida de (Manual PYES2 Invitrogen® 2008)

El promotor *GAL1* de *S. cerevisiae*, en situaciones normales de crecimiento en el laboratorio, es reprimido en presencia de glucosa. La transcripción de este gen es inducida al quitar la glucosa del medio y añadir galactosa como fuente de carbono. Por otro lado, la presencia de rafinosa en el medio, no reprime ni induce la transcripción del promotor *GAL1*. La adición de galactosa al medio sí induce la transcripción del promotor a pesar de que éste se encuentre en rafinosa. La inducción del promotor *GAL1* por galactosa es más rápida si las células se mantuvieron previamente en rafinosa y no en glucosa (Manual pYES2 Invitrogen® 2008).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Diseñar, a partir de la secuencia sintetizada de una proteína anticongelante (AFP) de tipo III de *Macrozoarsis americanus*, una cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que sea resistente a los cambios abruptos de temperaturas por debajo de los 0° C y que, a su vez, aumente la viabilidad ante un proceso de congelación a -70° C, -20° C y 4° C.

### 2.2 Objetivos particulares

- Mostrar la capacidad de regeneración de las levaduras genéticamente modificadas ante procesos de congelación abruptos y de largos periodos de tiempo observando la sobrevivencia de las células.
- Comprobar que la proteína está siendo expresada en la levadura genéticamente modificada y observar si existen modificaciones fenotípicas que se estén produciendo en el organismo.
- Observar si la proteína anticongelante está siendo expulsada de la célula o se mantiene en el interior del organismo, interactuando con las moléculas de agua del citoplasma o del medio extracelular.

### 3. Hipótesis

La cepa de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que será transformada con el gen de expresión de la proteína anticongelante (AFP) de tipo III de *Macrozoarces americanus*, tendrá la capacidad de sobrevivir a uno o varios procesos de congelación prolongados.

## 4. Materiales y Métodos

Los experimentos 4.4 – 4.11 fueron realizados en el Laboratorio 301 oriente del Instituto de Fisiología Celular a cargo de la Dra. Alicia González.

### 4.1 Secuencia de la AFP

El gen que codifica para la proteína anticongelante (AFP) fue proporcionada por el laboratorio de Biología Sintética a cargo de la M. en C. Fabiola Ramírez Corona. Ellos la obtuvieron a partir de una síntesis artificial de una de las secuencias de las isoformas de la AFP tomadas de la Nucleotide Database del Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI) en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). La secuencia se presenta a continuación:

```
GAATTC GCGGCCGCT TCTAG ATG AAA AGC GTG ATT CTG ACC GGC CTG CTG TTT GTG
CTG CTG TGC GTG GAT CAT ATG ACC GCG AGC CAG AGC GTG GTG GCG ACC CAG CTG
ATT CCG ATT AAC ACC GCG CTG ACC CCG GTG ATG ATG GAA GGC AAA GTG ACC AAC
CCG ATT GGC ATT CCG TCC CTG ATG CCG AAC ATG GTG AAA ACC TAT GCG GCG GGC
AAA TAA TAA TACTAGT AGCGGCCG CTGCAG
```

En verde se muestra el sitio de corte de la enzima *EcoRI*, en amarillo el de la enzima *XbaI*, en lila el de la enzima *SpeI*, en azul cielo el de la enzima *PstI*, en blanco y negro el de la enzima *PvuII*, en rojo el sitio de inicio y de término de la traducción, y en azul rey la secuencia de 198 pb dividida en tripletes del gen que codifica para la proteína estudiada.

A continuación se presenta la secuencia de 67 aminoácidos que conforman la estructura de la proteína:

```
M KSVILTGLLFVLLCVDHMTASQSVVATQLIPINTALTPVMMEGKV
TNP I G I P S L M P N M V K T Y A A G K Stop Stop
```

En rojo se muestran la metionina inicial y los dos sitios de término de la proteína. En azul rey la secuencia de aminoácidos de la proteína.

El gen que codifica para la proteína anticongelante se encontraba en un plásmido circular de DNA con resistencia a kanamicina de 2,570 pb que fue entregada por el proveedor en una cepa TOP10 de la bacteria *E. coli*.

#### **4.2 Medios de cultivo**

Se utilizaron diferentes medios de cultivo dependiendo de la cepa que se requería crecer, las condiciones que eran necesarias expresar o la facilidad del medio para proveer el crecimiento de los microorganismos. Se utilizó YPD (**Y**east **E**xtract **P**eptone **D**extrose) con concentraciones de extracto de levadura al 1%, peptona de caseína al 2% y dextrosa anhidra al 2% para crecer en condiciones nutritivas a *S. cerevisiae*. También se utilizó medio LB (**L**uria **B**ertani) para crecer en condiciones nutritivas a *E. coli*.

Como medios de selección para las transformaciones, se utilizaron medios de cultivo LB kanamicina a una concentración de 30 µg/ml y medios de cultivo LB ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. Se preparó, además, un medio de cultivo mínimo basado en una receta de vitaminas al 0.1%, elementos traza al 0.1%, sales al 2%, sulfato de amonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.5% y glucosa al 2%. A este medio se le agregaron los aminoácidos necesarios para seleccionar a la levadura. Para esto se le agregó leucina a una concentración de 43 mg/l, lisina a una concentración de 43 mg/l e histidina a una concentración de 44 mg/l.

Para la activación del promotor de *GAL1* se necesitaron medios con rafinosa y galactosa como fuentes de carbono. Estos compuestos simplemente se sustituyeron por la glucosa al 2%. También se hicieron medios de cultivo sólidos para los que se necesito agar de tipo III a una concentración del 2%.

#### **4.3 Minipreparación de plásmido bacteriano con AFP**

Se creció un precultivo de la cepa TOP10 de *Escherichia coli* durante toda la noche en 3 ml de LB kanamicina o LB ampicilina a 37° C. Se pasó a un microtubo de polipropileno y se centrifugó durante 1 min. Se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de TE/NaCl 100 mM y se resuspendió en vórtex. Se centrifugó por 1 min y se descartó el sobrenadante. En los aproximadamente 50 µl que sobraron en el tubo, se resuspendió la muestra y se le agregaron 450 µl de TENS. Se agitó suavemente para romper la



membrana y así obtener el material genético. Se colocó inmediatamente en hielo durante 5 min para que éste no se desnaturalizara. Se agregaron 225 µl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2, y se agitó por inversión muy suavemente veinticinco veces para disolver el DNA. Se volvió a reposar en hielo durante 5 min. Se centrifugó durante 7 min a temperatura ambiente, se recuperó el sobrenadante y se agregó un volumen de etanol absoluto previamente enfriado a -20° C para precipitar el DNA. Se incubó en frío durante, por lo menos, 2 horas. Después se centrifugó durante 5 min a 4° C. Se lavó 2 veces con etanol al 70% y se centrifugó para obtener la pastilla nuevamente. Se descartó el sobrenadante con pipeta y se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 min aproximadamente. Se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

#### **4.4 Minipreparación del plásmido bacteriano pYES2**

Para la minipreparación de este plásmido se utilizó el kit de purificación y minipreparación de QIAGEN: QIAprep®

Se creció un precultivo durante toda la noche de *Escherichia coli* Top10 con el plásmido pYES2 en 15 ml de LB. Se centrifugó durante 5 min a 3,000 rpm para obtener las células, se lavó con 40 ml de agua y se volvió a centrifugar. Se resuspendieron estas células con 250 µl del Buffer P1 con RNasa A previamente añadida y se transfirieron a un microtubo. Se añadieron 350 µl del Buffer N3 y se mezcló inmediatamente por inversión unas 10 veces. Se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm. Se transfirió con una pipeta el sobrenadante a una columna QIAprep®. Se centrifugó por 1 min y se descartó el fluido que pasó. Se lavó la columna agregando 500 µl de Buffer PB y centrifugando por 1 min más. Se descartó nuevamente el fluido que pasó. Después se lavó la columna nuevamente pero ahora agregando 750 µl de Buffer PE y centrifugando por 1 min. Se descartó el fluido que pasó y se centrifugó una vez más para quitar residuos de la columna. La columna se colocó en un microtubo limpio, se le agregaron 35 µl de agua desionizada estéril y se dejó reposar por 5 min para hidratar perfectamente la columna y recuperar todo el DNA posible. Se centrifugó y se recolectó lo que pasó a través de la columna.

#### **4.5 Verificación del plásmido por electroforesis en gel de agarosa**

Para verificar la extracción de los plásmidos se utilizó la electroforesis con gel de agarosa. El gel se preparó al 1% y al 0.8% de agarosa con buffer TBE (Tris, Borato, EDTA) 1x de acuerdo al peso que se requería observar. Se debe de tomar en cuenta que entre más pesado es el fragmento, menor debe ser la concentración del gel para que la separación de las bandas sea mejor. Para preparar el gel de agarosa se tomaron 50 ml de TBE y ,para el gel al 1%, 0.5 g de agarosa; para el gel al 0.8%, se tomaron 0.4 g de agarosa. Esta mezcla se calentó hasta disolverlo totalmente y después de unos minutos de enfriamiento se le agregó 2.5  $\mu$ l de bromuro de etidio, 0.5  $\mu$ l por cada 10 ml. Se corrió el gel a un voltaje de 100 V y un amperaje de 70 mA durante un tiempo de 30 min a una hora y media, según el tamaño del fragmento que se deseaba observar. El resultado se vio con una lámpara de rayos UV en un cuarto oscuro.

#### **4.6 Purificación del producto de PCR**

Se utilizó el kit Wizard SV Gel y PCR Clean-up system® para purificación de banda de DNA. Se cortó el fragmento de DNA del gel de agarosa utilizando un escalpelo y se transfirió a un tubo de 1.5 ml o, simplemente, si el fragmento no se encontraba en un gel de agarosa, se tomó la muestra líquida que se iba a purificar. Se agregó un volumen de la solución de unión a membrana por cada volumen de gel de agarosa (1  $\mu$ l = 1 mg) y se incubó a 50° C durante 10 min para disolver el gel completamente. En el caso de la muestra líquida simplemente se combinó hasta formar una mezcla homogénea. Se transfirió la mezcla a un tubo con minicolumna y este, a su vez, a un tubo de colecta. Se centrifugó a 16,000 x g por 1 min y después se descartó el fluido que pasó a través de la columna. Se agregaron 700  $\mu$ l del buffer de lavado (con etanol previamente añadido) a la columna y se dejó reposando 5 min para purificar mejor la muestra, se centrifugó por 30 seg, se descartó el fluido que pasó y se repitió el paso de lavado pero ahora con 500  $\mu$ l. Después se centrifugó una vez más para quitar cualquier remanente de líquido que hubiera quedado en la columna. Por último se agregaron 35  $\mu$ l de agua destilada estéril directo a la columna, se dejó reposar durante 10 min para obtener la mayor cantidad de DNA posible. Se colocó el tubo con minicolumna en un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó durante 1 min para recolectar la muestra. Se cuantificó con el NanoDrop la cantidad de DNA que se obtuvo por mililitro.

#### **4.7 Digestión de plásmidos**

Para la digestión de los plásmidos se utilizaron tres enzimas diferentes: *EcoRI*, *SpeI* y *XbaI*. El vector que contenía la AFP fue digerido con *EcoRI* y *SpeI*. El vector pYES2 con sitio de poliunión fue digerido con *EcoRI* y *XbaI*. Las digestiones se realizaron por separado. En la primera digestión se utilizaron 6 µg de plásmido con AFP, 5 µl de buffer de reacción 10X número 1 marca Invitrogen®, 4 µl de enzima *EcoRI* marca Invitrogen®, y 14 µl de agua para alcanzar los 50 µl. Para la digestión del plásmido pYES2 se utilizaron 6 µg de plásmido, 5 µl de buffer de reacción 10X número 1 marca Invitrogen®, 4 µl de enzima *EcoRI* marca Invitrogen®, y 25 µl de agua para alcanzar los 50µl. Se dejó durante 4 horas a 37° C, después se purificó con el Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-up system® y se midió la cantidad de productos obtenidos en el NanoDrop. Se corrió un gel de agarosa para observar la presencia de los plásmidos y se realizó la segunda digestión.

En la segunda digestión se utilizaron 5 µg de plásmido con AFP, 10 µl de buffer de reacción 10X número 4 marca Invitrogen®, 7 µl de enzima *SpeI* marca Invitrogen®, y 14 µl de agua para alcanzar los 100 µl. Para la digestión del plásmido pYES2 se utilizaron 6 µg de plásmido, 5 µl de buffer de reacción 10X número 4 marca Invitrogen®, 4 µl de enzima *XbaI* marca Invitrogen®, y 18 µl de agua para alcanzar los 50 µl. Se incubó durante 4 horas a 37° C, después se purificó con el Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-up system® y se comprobaron los pesos en un gel de agarosa.

#### **4.8 Ligación del inserto y del plásmido**

Para la ligación de la secuencia que codifica para la AFP con el plásmido pYES2, se colocaron 33 µl de inserto a una concentración de 11 ng/µl y 1.5 µl de plásmido a una concentración de 80 ng/µl en un microtubo, para conseguir una relación final de 1:3 plásmido/inserto. Además, se agregaron 2.5 µl de enzima ligasa T4 de la marca Roche® y 4 µl de buffer de reacción 10X de la misma marca. Se dejó a 16° C durante 18 horas. Después se insertó en las células de *E. coli* ultracompetentes siguiendo el protocolo de transformación que se encuentra más abajo.

#### **4.9 Preparación de células ultracompetentes**

Se dejó creciendo un inóculo de células de *E. coli* de la cepa TB1 en 250 ml de medio SOB a una  $DO_{600nm}$  de 0.5 durante dos días a 18° C y 250 rpm. Después se colocó el matraz en hielo durante 10 min. Se obtuvo una pastilla de células tras centrifugar a 3000 x g durante 10 min a 4° C, que se resuspendió en 80 ml de medio GYT (Glicerol, Extracto de Levadura, Triptona) frío. El frasco se colocó en hielo por 10 min más y se centrifugó nuevamente a 3000 x g durante 10 min a 4° C. Se tiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 20 ml de GYT, después se le agregaron 1.4 ml de DMSO y se mezcló suavemente, se colocaron las células en hielo por otros 10 min. Por último se depositaron 200  $\mu$ l de las células por cada microtubo y se almacenaron a -80° C para su almacenamiento.

#### **4.10 Transformación de *Escherichia coli***

Se descongelaron las células en hielo. Se colocaron 100  $\mu$ l de células en un microtubo y otros 100  $\mu$ l en otro microtubo como control. Se agregaron 10  $\mu$ l de la ligación al primer tubo y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se les dio un choque térmico de 42° C por 45 seg, se agregó 1 ml de LB y se incubó a 37° C con agitación constante durante 1 hora. Después se colocaron 100  $\mu$ l del control y 100  $\mu$ l de las células transformadas en un medio selectivo sólido de LB ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Se dejó durante toda la noche a 37° C y se observaron y contaron las colonias que crecieron en comparación con el control negativo.

#### **4.11 Comprobación de la inserción de AFP en el plásmido**

Para comprobar la inserción del plásmido se tomaron células directamente de 8 colonias transformadas y se diluyeron en 50  $\mu$ l de agua destilada estéril. Se centrifugaron durante 10 seg en una microcentrifuga, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las células en el remanente del tubo. Se agregaron 300  $\mu$ l de buffer TENS y se mezcló con vortex durante 5 seg hasta que la mezcla se volvió viscosa. Se agregaron 150  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se mezcló con vortex durante 5 seg más. Se centrifugó durante 2 min a 14,000 rpm para coleccionar el debris celular y el DNA cromosómico. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se mezcló con 900  $\mu$ l de

etanol absoluto previamente enfriado a  $-20^{\circ}$  C. Se centrifugó durante 2 min de nuevo para colectar el DNA del plásmido y el RNA, se desechó el sobrenadante. Se hicieron dos lavados con 1 ml de etanol al 70% previamente enfriado a  $-20^{\circ}$  C. Se dejó secar el pellet durante 10 min y después se resuspendió en 40  $\mu$ l de agua.

El plásmido obtenido fue digerido con *PvuII* para poder extraer el fragmento de DNA formado por la AFP y el sitio de recombinación del plásmido pYES2. El plásmido fue digerido con 1.2  $\mu$ l de enzima *PvuII*, 2  $\mu$ l de RNasa, 15  $\mu$ l de plásmido y 2  $\mu$ l de Buffer 10X número 4 marca Invitrogen®. Se observó la banda en un gel de agarosa al 1 % para comprobar la inserción del gen.

#### **4.12 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae***

Las soluciones utilizadas para este protocolo se muestran a continuación.

Buffer TE 10X pH 7.5:

Tris-HCl 100 mM, pH 7.5      10 ml

EDTA 10 mM, pH 8            2 ml

\*Esterilizar en autoclave

Solución TELitio:

Buffer TE 10X pH 7.5        1 ml

Acetato de litio 1 M           1 ml

Agua bidestilada              8 ml

\* Preparar al momento de hacer la transformación

Solución PEGlitio:

Buffer TE 10X pH 7.5        1 ml

Acetato de litio 1 M           1 ml

PEG 4000 al 50%              8 ml

\* Preparar al momento de hacer la transformación

Se inocularon 10 ml de YPD con la mutante acatalasémica y auxótrofa de leucina, lisina, histidina y uracilo de *S. cerevisiae* cepa S288C y se incubó durante toda la noche

a 30° C en agitación constante. Al día siguiente se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante, después se lavó tras resuspender las células y se volvió a centrifugar a la misma velocidad durante el mismo tiempo. Se resuspendió nuevamente pero ahora en 2 ml de agua bidestilada estéril, se midió la densidad óptica a 600 nm y se inoculó en 50 ml de YPD lo necesario para obtener una  $DO_{600nm}$  de 0.1. Se incubó durante 4 hrs a 200 rpm a 30° C, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de agua. Se transfirió a un microtubo, se centrifugó durante 1 min y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1 ml de solución TEL, se centrifugó durante 10 seg y se desechó el sobrenadante. Se volvieron a resuspender las células en la solución TEL. Se tomaron 3 microtubos en donde se depositaron 50  $\mu$ l de solución TEL con células en cada uno. Al primer tubo se le agregó 1  $\mu$ g de DNA recombinante, al segundo 2  $\mu$ g de DNA y al tercero ninguna cantidad de DNA, para que sirviera como control negativo. Se les agregaron a cada uno 10  $\mu$ l de DNA esperma de salmón previamente hervido y colocado en hielo por 5 min, además de 300  $\mu$ l de solución TELP. Se mezclaron en vórtex y se incubaron a 30° C en agitación constante de 250 rpm durante 30 min. Al terminar se les agregaron inmediatamente 40  $\mu$ l de DMSO, se agitó en vórtex y se colocó a 42° C durante 15 min con agitación cada 3 min. Cuando este proceso finalizó se sembraron 200  $\mu$ l de las células en medios de cultivo sólido YNB con leucina, lisina e histidina.

#### **4.13 Experimento de viabilidad de *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas con un solo evento de congelación**

Se creció un preinóculo de la cepa transformada de *S. cerevisiae* y un preinóculo de la cepa silvestre sin transformar en medio YP-Rafinosa durante 24 horas. Se inoculó a una  $DO_{600nm}$  de 0.1 en tres medios inducibles de YP-Galactosa, se dejó crecer durante 24 horas y se inició el experimento. Se colocaron 8 stocks de 1 ml de cada inóculo en microtubos a 4 temperaturas diferentes: -70° C, -20° C, 4° C y 28° C, este último como control. A uno de los que contenían la cepa silvestre se le agregaron 100  $\mu$ l de glicerol preparado al 20 % como control. Se tomó un tubo por cada temperatura a las 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas y se descongelaron aquellos que lo requerían. Se hicieron

diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 de cada una de los stocks para cada una de las temperaturas, después se tomaron 20  $\mu$ l, se colocaron en cajas YPD y se dejaron crecer durante 24 horas. Se analizó el crecimiento de cada caja para observar la capacidad de las células para recuperarse de una congelación o de un descenso abrupto de la temperatura.

#### **4.14 Experimento de viabilidad de *S. cerevisiae* a diferentes temperaturas con más de un evento de descongelación**

Se crecieron dos preinóculos durante 24 horas de la cepa transformada de *S. cerevisiae* en medio YP-Rafinosa y un preinóculo de la cepa silvestre sin transformar. Se inoculó a una  $DO_{600nm}$  de 0.1 en dos medios inducibles de YP-Galactosa y un medio no inducible de YP-Rafinosa en donde se colocó una cepa transformada como control. Se dejó crecer durante 24 horas y se inició el experimento. Se colocaron un stock de 1 ml de cada inóculo en microtubos a 3 temperaturas diferentes:  $-70^{\circ} C$ ,  $-20^{\circ} C$  y  $28^{\circ} C$ , este último como control. Se tomó el tubo de cada temperatura a las 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas y se descongeló aquel que lo requería para después regresarlo a la temperatura correspondiente. Se hicieron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 de cada una de los stocks de cada una de las temperaturas, después se tomaron 20  $\mu$ l, se colocaron en cajas YPD y se dejaron crecer durante un día entero.

#### **4.15 Observación en el microscopio de la reacción de *S. cerevisiae* al frío**

Se crecieron dos preinóculos durante 24 horas de la cepa transformada de *S. cerevisiae* en medio YP-Rafinosa y un preinóculo de la cepa silvestre sin transformar. Se inoculó a una  $DO_{600nm}$  de 0.1 en dos medios inducibles de YP-Galactosa y un medio no inducible de YP-Rafinosa en donde se colocó una cepa transformada como control. Se dejó crecer durante 24 horas en estos medios. Se tomaron 2  $\mu$ l de cada uno de los medios y se observaron al microscopio con un aumento de 10x del ocular por 40x del objetivo.

#### **4.16 Preparación de extractos**

Se crecieron dos preinóculos durante 24 horas de la cepa transformada de *S. cerevisiae* en medio YP-Rafinosa. Se inoculó a una  $DO_{600nm}$  de 0.1 en un medio inducible de YP-

Galactosa y un medio no inducible de YP-Rafinosa. Se dejó crecer durante 24 horas en estos medios. Se centrifugaron los inóculos durante 5 min a 3,000 rpm en tubos Falcon previamente esterilizados. Se obtuvo el sobrenadante y se separó en otros tubos Falcon. Los sobrenadantes fueron filtrados por vacío con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ , luego se colocaron en varios microtubos y se centrifugaron con la tapa abierta en una centrifuga de vacío a temperatura ambiente durante 4 horas; esto permitió que las muestras se evaporaran para concentrar las muestras. Al final, se tomaron todas estas muestras y se colocaron en dos microtubos nuevos, uno para el sobrenadante obtenido del inóculo con rafinosa, y otro para el sobrenadante obtenido del inóculo de galactosa. Se lavó el precipitado de células con agua una vez y se resuspendió el extracto en 1ml de buffer de lisis con inhibidor de proteínas.

Buffer de lisis con inhibidor de proteínas:

Para hacer el fosfato de potasio monobásico 1 M se tomaron 19.8 ml y se colocaron en un frasco. Para el fosfato de potasio dibásico 1 M se tomaron 80.2 ml y se mezclaron con el fosfato de potasio monobásico. Se ajustó el pH a 7.4 y después se agregaron 29.22 mg de EDTA, 0.1 ml de DTT, 100  $\mu\text{l}$  de PMSF y 500  $\mu\text{l}$  de TLCK.

Cada una de las muestras se pasó a un tubo de ensayo de vidrio. Se añadió medio volumen de perlas de vidrio, se rompieron las células con vórtex durante 1 min cinco veces, colocando las muestras en hielo en el intervalo de 1 min. Se transfirieron a microtubos nuevos, se centrifugaron durante 15 min a 14,000 rpm y se volvió a pasar este sobrenadante a microtubos nuevos.

Se obtuvieron 4 microtubos a partir de todo este procedimiento. Uno del sobrenadante de rafinosa concentrado, uno del sobrenadante de galactosa concentrado, uno del extracto de rafinosa y otro del extracto de galactosa. A estos cuatro se les cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método de Bradford.

#### **4.17 Cuantificación de proteínas**

Se tomaron 21 ml de reactivo de Bradford 1x y se colocaron en 21 tubos de ensayo de vidrio. Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de BSA disuelto a diferentes concentraciones (de 0.1 hasta 0.9 mg/ml) y se colocaron en 9 de los tubos de ensayo. Después se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de cada



una de las muestras y se colocaron por triplicado en los tubos restantes, de los extractos se tuvo que hacer una dilución 1:10 por la gran concentración de proteínas que se tenía.

Se tomó la absorbancia de las muestras con el espectrofotómetro a una DO de 590 nm. Se utilizó reactivo de Bradford 1x sólo como blanco, se obtuvo una línea patrón a partir de los datos adquiridos por las diferentes concentraciones de reactivos BSA. A partir de esto se hizo una gráfica linear en Excel®. Se obtuvo la línea de tendencia y por regresión linear se obtuvo la ecuación de la gráfica.

Se tomó la absorbancia de las distintas muestras a examinar y se hizo un promedio de los triplicados de cada muestra. Se colocaron los puntos en la recta previamente hecha en Excel® y a partir de la ecuación se obtuvieron los valores de proteínas que se tenían en cada muestra examinada. Con estos datos se calcularon las cantidades de muestra necesarias para correr un gel de poliacrilamida con 70 µg de proteína. En el caso de los sobrenadantes, la cantidad de proteína obtenida fue tan pequeña que se colocó la mayor cantidad posible, alrededor de 15 µg por cada muestra.

#### **4.18 Gel de poliacrilamida (PAGE) desnaturalizante**

Para hacer el gel de poliacrilamida desnaturalizante se tomaron las siguientes concentraciones de reactivos:

##### Gel separador:

H <sub>2</sub> O	3.1 ml
Tris 1.5 M pH 8.2	3.1 ml
SDS 20%	50 µl
Acrilamida 40%	3.75 ml
Persulfato de amonio	120 µl
TEMED	20 µl

##### Gel concentrador:

H <sub>2</sub> O	6.1 ml
Tris 1.5 M pH 6.3	2.5 ml
SDS 20%	50 µl
Acrilamida 40%	1 ml

Persulfato de amonio	100 $\mu$ l
TEMED	20 $\mu$ l

Buffer de corrida 5X:

Tris base	7.5 g/500ml
Glicina	36 g/500ml
SDS 20%	2.5 g/500ml

Solución desteñidora:

Ácido acético glacial	10%
Metanol	40%
Agua destilada	50%

Una vez hechos todos los reactivos necesarios y el gel, se mezclaron cada una de las muestras con 10  $\mu$ l de buffer de carga. Además, se mezcló el marcador de peso molecular Kaleydoscope marca BioRad® con otros 10  $\mu$ l de buffer de carga. Se hirvieron las muestras por 7 min y se dejaron correr durante 1 hora a 200 V y 45 mA. Después se tiñó el gel con azul de Coomassie por 45 min con agitación constante. Se retiró el azul de Coomassie, se limpió con un poco de agua y se colocó solución desteñidora y una esponja. Se dejó el gel toda la noche destiñendo con agitación constante. Al final se colocó en una cámara de luz y se tomó la foto correspondiente.

## 5. Resultados

Se obtuvo el plásmido 15795\_AFP-OP5\_pANY-Kana de 2,570 pb de la cepa de *E. coli* TOP10 por minipreparación de plásmido bacteriano que se presenta en Material y métodos. Fue digerido primero con la enzima *EcoRI* para linealizarlo y dejar un extremo pegajoso: 5' AATTC 3'.

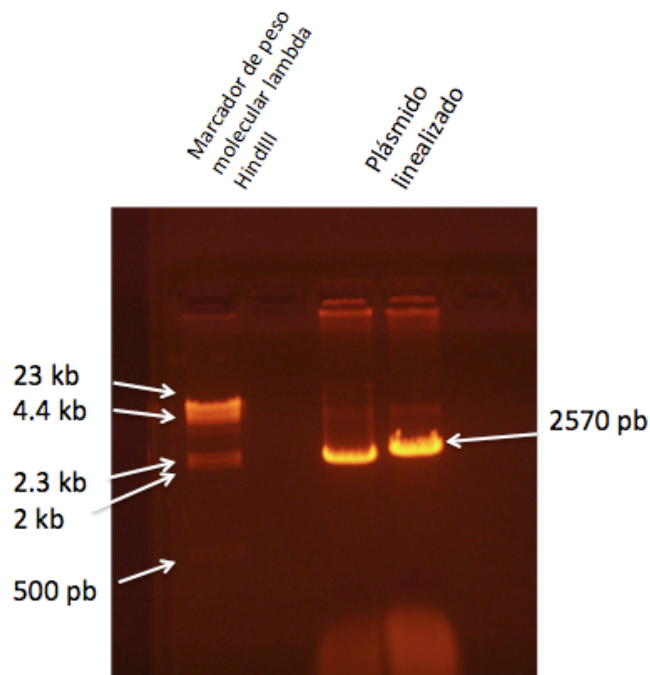


Fig. 9. Gel de agarosa al 1 % mostrando el plásmido bacteriano 15795\_AFP-OP5\_pANY-Kana de 2,570 pb linealizado.

El fragmento de DNA sintetizado fue separado por completo con la segunda digestión utilizando la endonucleasa *SpeI*, liberando así una secuencia de 234 pb, correspondientes a la secuencia del gen de la AFP y dejando un extremo pegajoso: 5' CTAGT 3'.

Al mismo tiempo, se obtuvo el plásmido pYES2 para clonación en levadura marca Invitrogen® de 5,839 pb. Este fue digerido con *EcoRI* y con *XbaI* y de esta manera se liberó un fragmento de unos cuantos pares de bases y se liberaron extremos pegajosos en el plásmido linealizado. El plásmido linealizado tuvo un peso de 5.8 Kb. El extremo pegajoso de *XbaI* corresponde a la secuencia: 5' CTAGA 3'

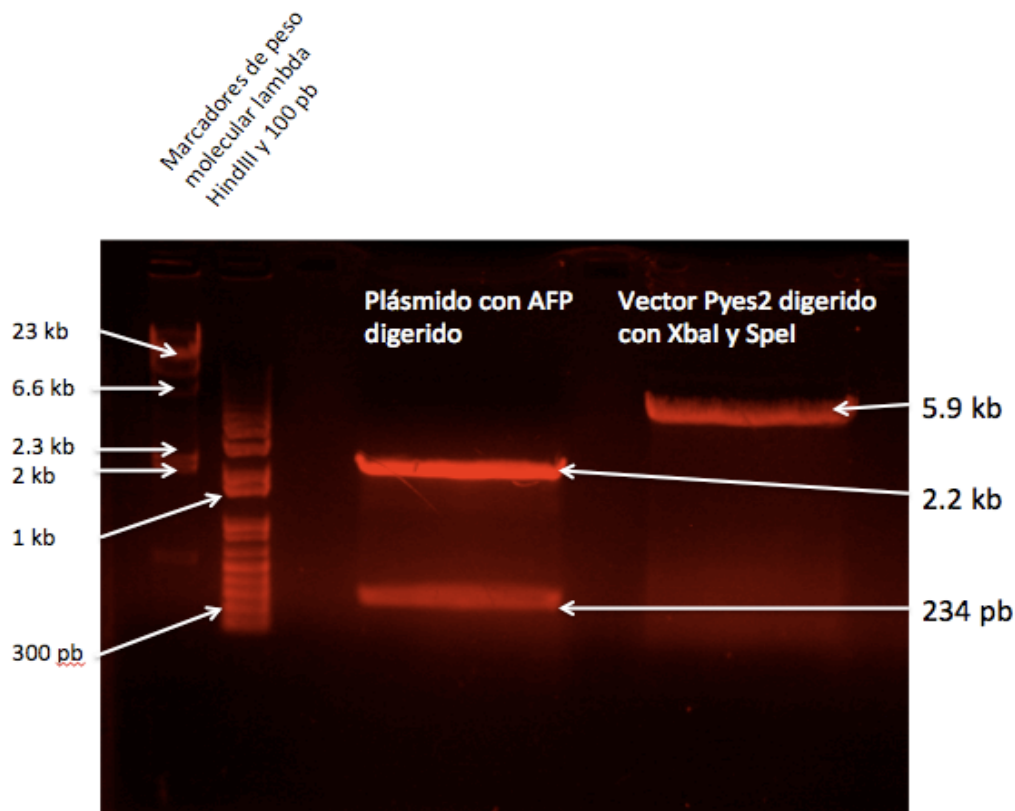


Fig. 10. Fragmento de la AFP liberado del plásmido bacteriano y plásmido pYES2 marca Invitrogen® con extremos pegajosos de *EcoRI* y *XbaI* (*SpeI*).

Estos dos plásmidos digeridos fueron observados tras correr un gel de agarosa al 0.8%. Una vez verificados los tamaños se procedió a purificarlos a partir de banda de gel con el Kit Wizard SV Gel y PCR Clean-up system®.

Después de obtener el plásmidos pYES2 purificado y el gen que codifica para la AFP, se ligaron por los extremos pegajosos, uniendo el extremo *EcoRI* de pYES2 con el extremo *EcoRI* de la AFP; y el extremo *XbaI* de pYES2 con el extremo *SpeI* de la AFP, ya que estos últimos tienen extremos compatibles cohesivos. Esta ligación dio como resultado un plásmido de 6.2 Kb.

De todos los eventos de transformación, se tomaron 8 colonias para comprobar la inserción del fragmento. Se hizo minipreparación de plásmido y digestión del vector con *EcoRI* a partir del protocolo provisto por el laboratorio de la Dra. Alicia González. De esta manera se linealizó el plásmido resultado de la ligación nuevamente con la enzima *EcoRI* y se observaron los tamaños.

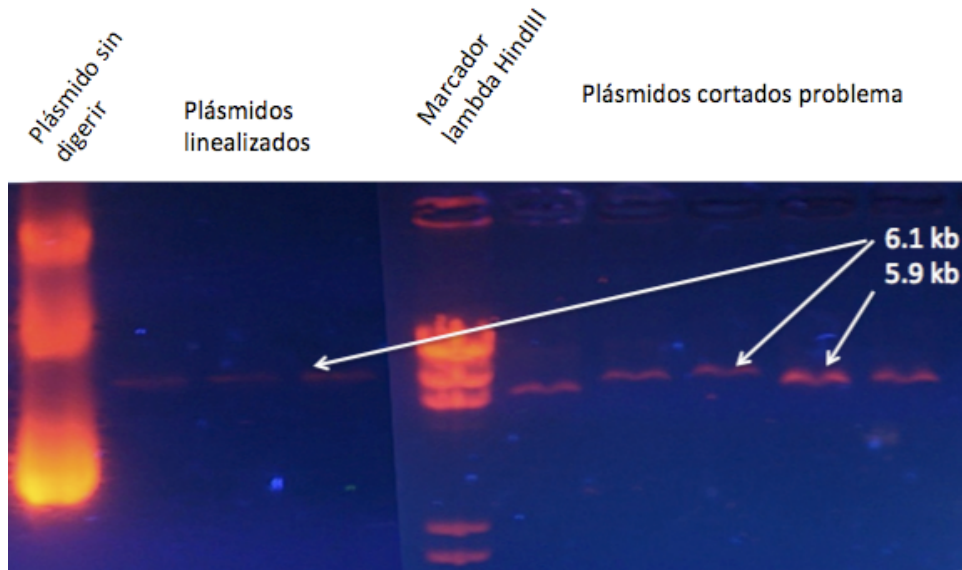


Fig. 11. Se observa el plásmido pYES2 sin AFP linealizado (izquierda) y plásmido con AFP linealizado (derecha). Se observa que algunas bandas son 200 pb más pesadas que otras, éstas son las que ligaron correctamente la AFP.

Se observó que los plásmidos de las colonias encontradas en los carriles 1, 2, 3, 5 y 6 contenían el fragmento de la AFP ya que presentaban un mayor peso molecular que los otros tres carriles.

Para asegurar que este resultado era correcto, se obtuvo nuevamente el plásmido y se digirió con la enzima *PvuII*. Esta enzima encuentra un sitio de restricción en la secuencia del gen de la AFP y otro en el sitio de clonación múltiple del vector pYES2.

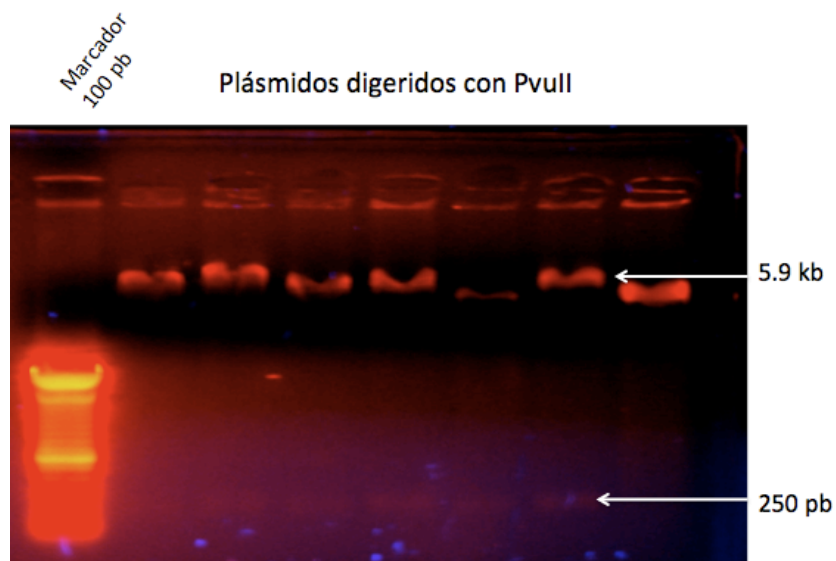


Fig. 12. Plásmido pYES2 con el fragmento de AFP liberado tras la doble digestión con la enzima *PvuII*.

Como se liberó un fragmento de 250 pb en las 5 colonias que presentaban un mayor peso molecular, se pudo concluir que éstas eran las colonias transformadas con el plásmido pYES2 que contenían el inserto deseado del gen de la AFP.

Después se purificó el plásmido y se insertó en *S. cerevisiae* con el protocolo de transformación descrito previamente en materiales y métodos. Las levaduras se crecieron en medio mínimo selectivo con los aminoácidos histidina, leucina y lisina, pero sin uracilo. Se sembraron dos veces para mejorar la selección, e incluso se sembraron y se dejaron crecer durante tres días antes de cada experimento aquí descrito.

A partir de estas colonias se realizaron crecimientos a diferentes temperaturas y ante fuentes de carbono distintas. Se obtuvieron las siguientes imágenes de los crecimientos:

### Viabilidad de la cepa silvestre en medio YP-Galactosa con un solo evento de descongelación.

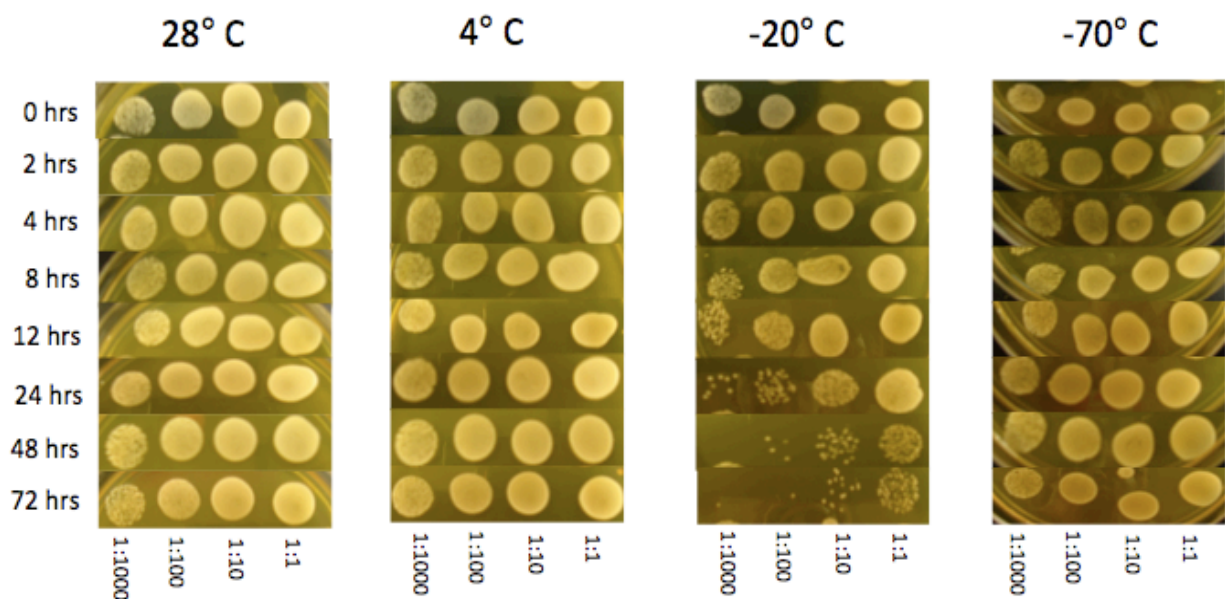


Fig. 13. Se observa la viabilidad de la cepa silvestre S288C en medio YP-Galactosa con un solo evento de descongelación a 28° C, 4° C, -20° C y -70° C a diferentes concentraciones y tiempos. La viabilidad descende conforme es mayor el tiempo que las levaduras se mantienen en congelación.

## Viabilidad de la cepa silvestre en medio YP-Galactosa con glicerol al 20 % con un solo evento de descongelación.

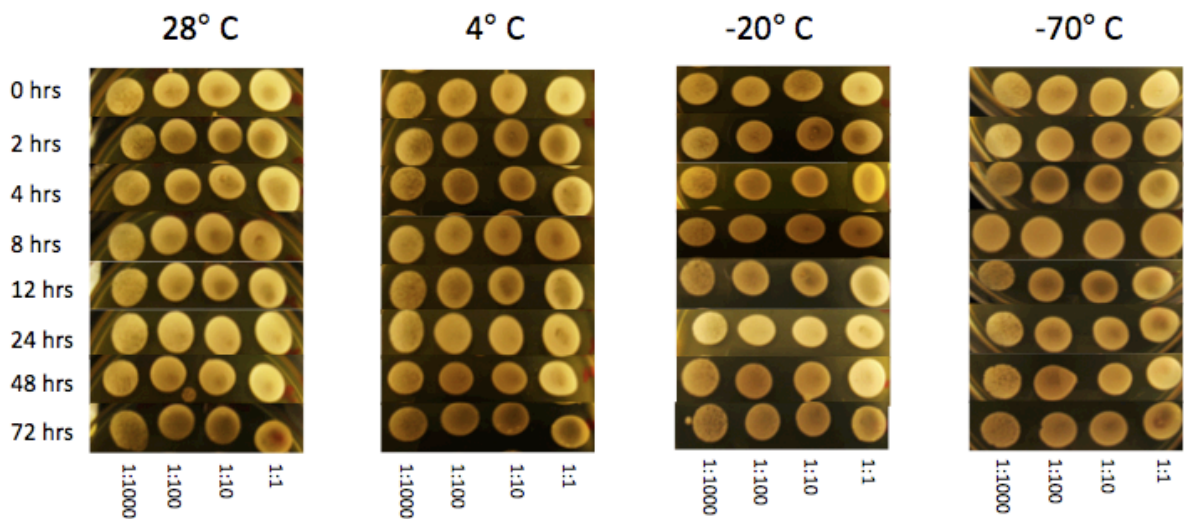


Fig. 14. Se observa la viabilidad de la cepa silvestre S288C en medio YP-Galactosa con un solo evento de descongelación a 28° C, 4° C, -20° C y -70° C a diferentes concentraciones y tiempos. La viabilidad se mantiene constante a pesar de que el tiempo de congelación sea de 72 hrs.

## Viabilidad de la cepa transformada con el gen que codifica para la AFP en medio de inducción YP-Galactosa con un solo evento de descongelación.

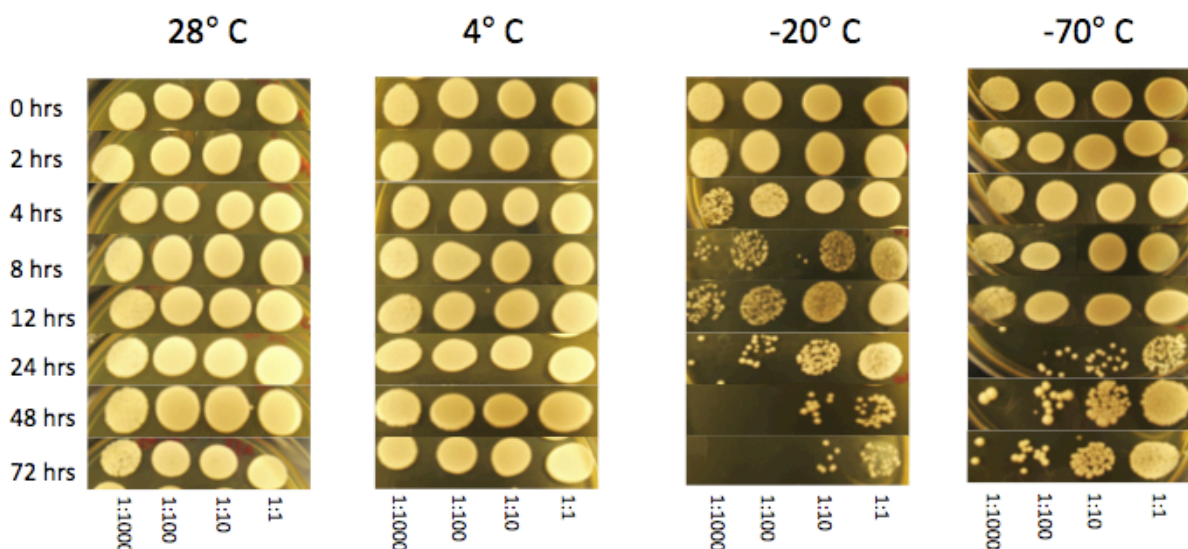


Fig. 15. Se observa la viabilidad de la cepa transformada con el gen que codifica para la AFP en medio YP-Galactosa con un solo evento de descongelación a 28° C, 4° C, -20° C y -70° C a diferentes concentraciones y tiempos. La viabilidad descende conforme es mayor el tiempo que las levaduras se mantienen en congelación.

## Viabilidad de la cepa silvestre en medio YP-Galactosa con más de un evento de descongelación.

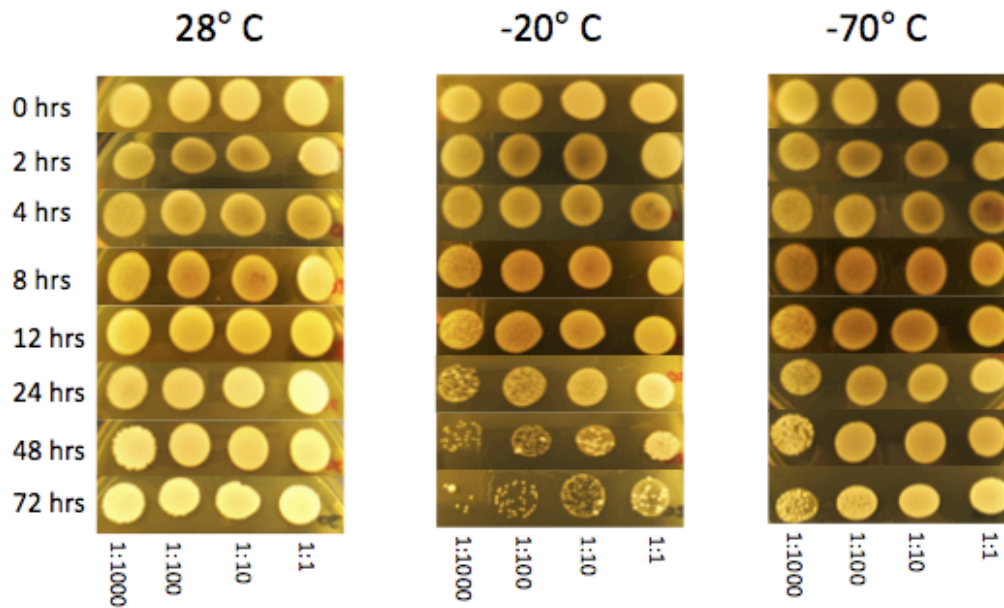


Fig. 16. Se observa la viabilidad de la cepa silvestre S288C en medio YP-Galactosa con más de un evento de descongelación a 28° C, -20° C y -70° C a diferentes concentraciones y tiempos. La viabilidad desciende conforme es mayor el tiempo que las levaduras se mantienen en congelación pero es mayor que cuando se realizó un solo evento de descongelación.

## Viabilidad de la cepa transformada con el gen que codifica para la AFP en medio no inductivo YP-Rafinosa con más de un evento de descongelación.

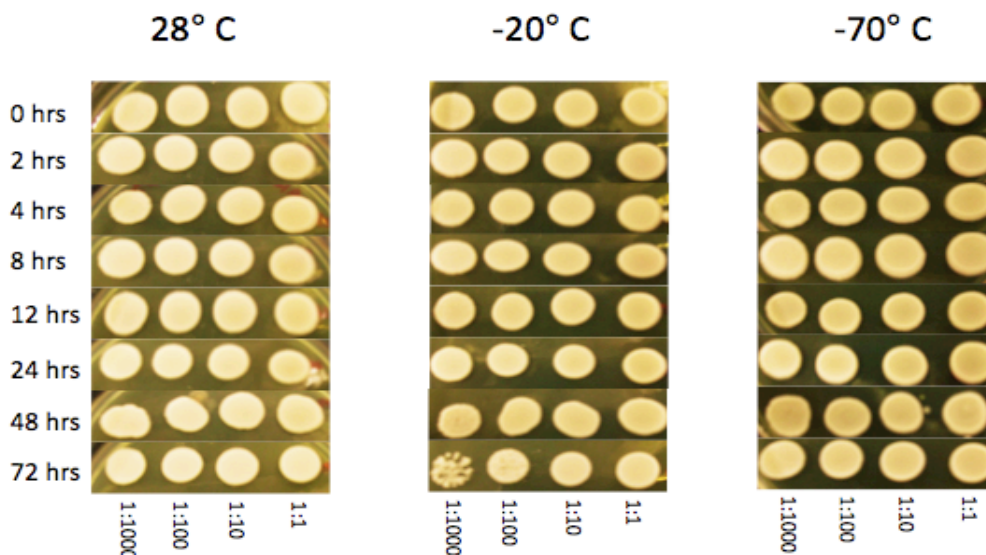


Fig. 17. Se observa la viabilidad de la cepa transformada con el gen que codifica para la AFP en medio no inductivo YP-Rafinosa con más de un evento de descongelación a 28° C, -20° C y -70° C a diferentes concentraciones y tiempos. La viabilidad no desciende en gran medida conforme es mayor el tiempo que las levaduras se mantienen en congelación, aunque esta viabilidad no es tan grande como la que se presenta en el medio YP-Galactosa con glicerol al 20%.



## Viabilidad de la cepa transformada con el gen que codifica para la AFP en medio de inducción YP-Galactosa con más de un evento de descongelación.

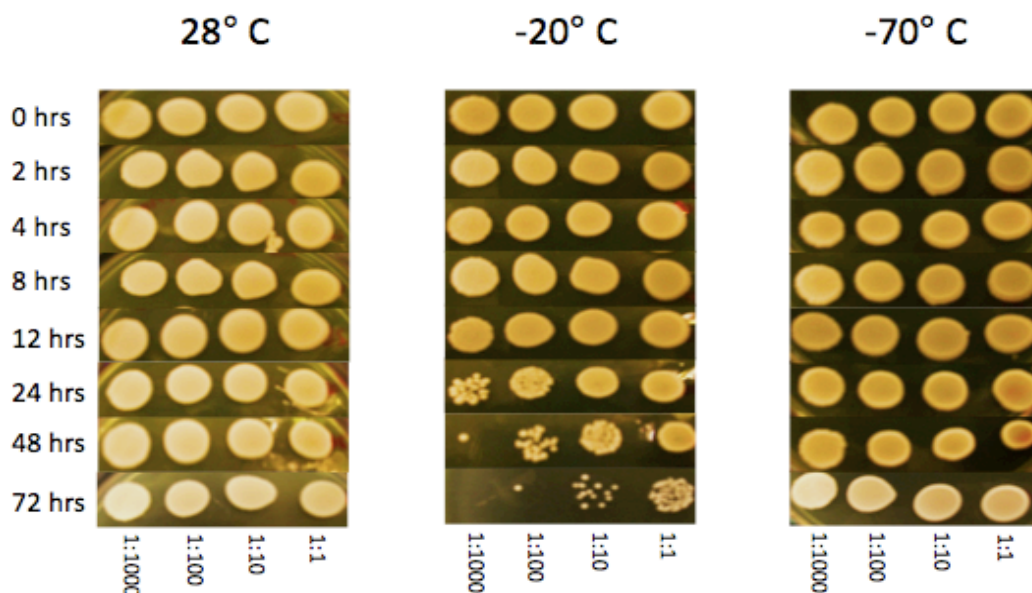


Fig. 18. Se observa la viabilidad de la cepa transformada con el gen que codifica para la AFP en medio de inducción YP-Galactosa con un solo evento de descongelación a 28° C, -20° C y -70° C a diferentes concentraciones y tiempos. La viabilidad desciende conforme es mayor el tiempo que las levaduras se mantienen en congelación pero es mayor que cuando existía un solo evento de descongelación.

Después del proceso de inducción de las diferentes cepas transformadas o no transformadas se obtuvieron imágenes en microscopio para observar el fenotipo de las mismas. Se muestran a continuación las imágenes de la cepa no transformada en medio con galactosa, la cepa transformada en medio con rafinosa, y por último la cepa transformada en medio con galactosa.

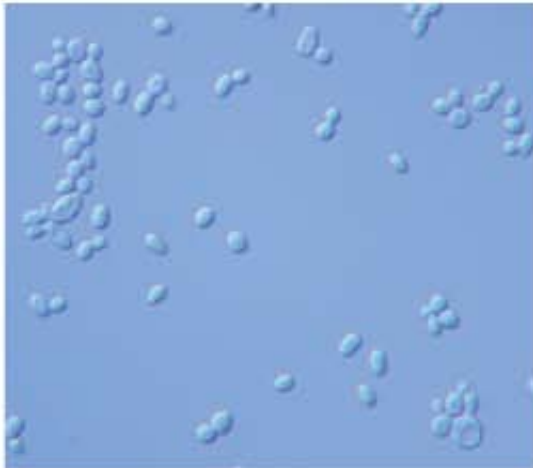


Fig. 19. *Saccharomyces cerevisiae* transformada con el plásmido Pyes2 en medio no inductivo YP-Rafinosa.

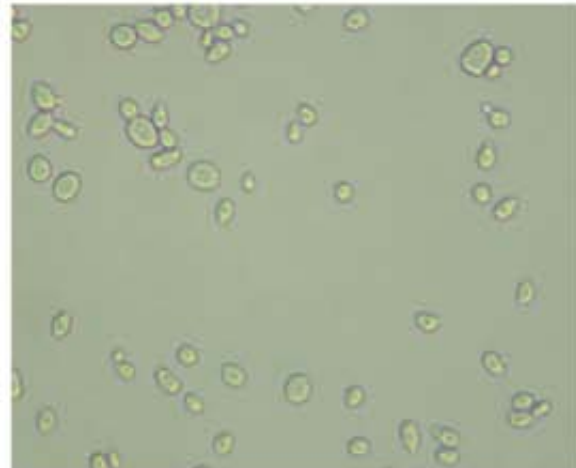


Fig. 20. *Saccharomyces cerevisiae* no transformada (wild type) en medio inductivo YP-Galactosa.

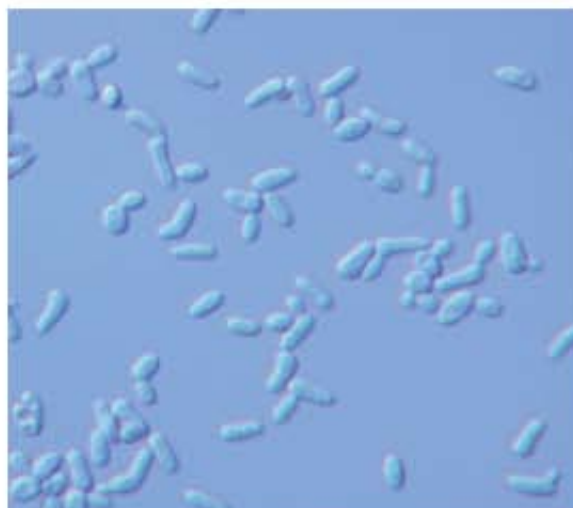
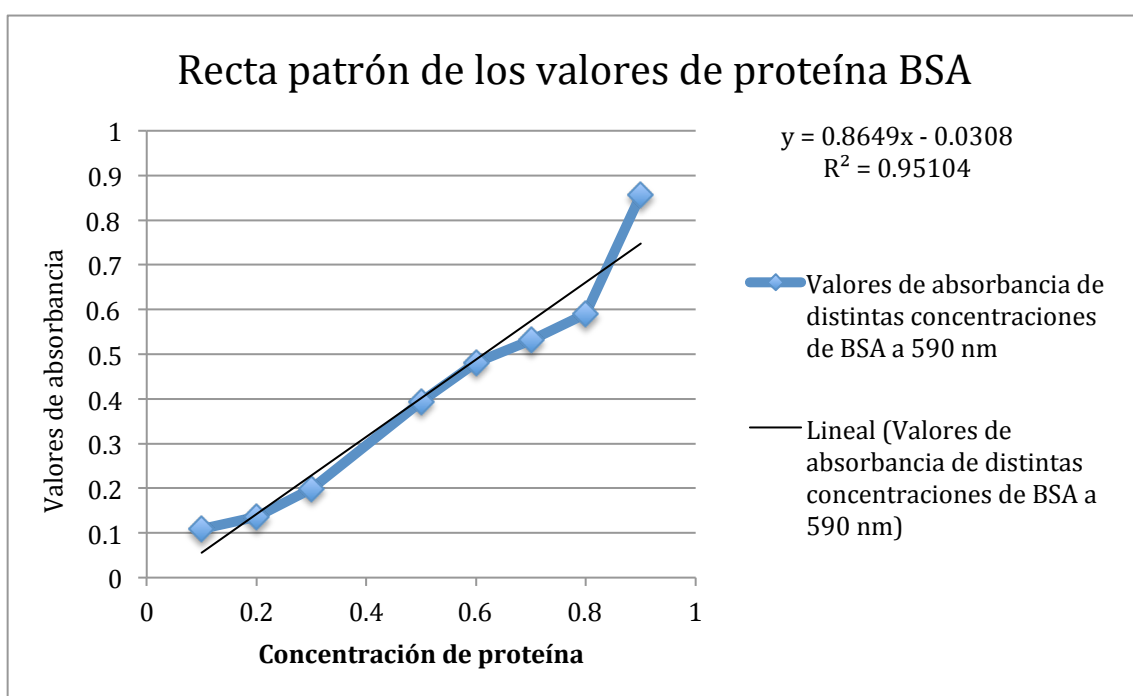


Fig. 21. *Saccharomyces cerevisiae* transformada con el plásmido Pyes2 en medio inductivo YP-Galactosa.

Se observa que existe un cambio fenotípico en las levaduras transformadas con el plásmido pYES2 con la expresión de AFP inducida en cuanto a la forma de la célula. En el caso de la levadura transformada con crecimiento en galactosa existe una forma alargada que simula la de un bacilo mas que la de una levadura, que generalmente tiene una forma globular. En la cepa no transformada en medio inductivo YP-Galactosa y en la cepa transformada en medio no inductivo YP-Rafinosa, no se presenta ningún cambio fenotípico evidente en cuanto a la forma de la levadura, las dos se mantienen con una forma globular.

A partir de estos resultados se intentó detectar la expresión de la proteína por medio de la obtención de extractos crudos y electroforesis en un gel de acrilamida. Debido a que la proteína en *M. americanus* es exportada al medio extracelular para interactuar con los cristales de hielo de la sangre, se hizo una cuantificación de proteínas de la cepa transformada en medio no inductivo YP-Rafinosa y en medio inductivo YP-Galactosa tanto del medio extracelular como del extracto celular.

Después de concentrar las muestras del medio extracelular obteniendo el sobrenadante y posteriormente centrifugando al vacío durante 3 horas y media, se realizó un ensayo Bradford para calcular la cantidad de proteína que se tenía en la zona extracelular y la cantidad de proteína que se tenía en el medio intracelular resultado del proceso de extracción.



La cantidad de proteínas encontradas en el medio extracelular fue mucho menor que la del extracto. Se realizó una regresión lineal tras conseguir una curva patrón con distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA).

A partir de los valores de la recta patrón mostrada anteriormente se obtuvo una ecuación por regresión lineal. Se realizaron los despejes necesarios y se sustituyeron las incógnitas para obtener los valores correspondientes de proteína en las muestras del sobrenadante y del extracto con respecto a los valores de absorbancia que presentaban.

Al final, la cantidad de proteína en los sobrenadantes era de  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  y  $0.13 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  para el medio YP-Rafinosa y YP-Galactosa respectivamente. Ya que los pozos tienen una capacidad máxima de  $30 \mu\text{l}$  y son necesarios  $10 \mu\text{l}$  de buffer de carga mezclada con la muestra, se colocaron en los pozos del gel de acrilamida la mayor cantidad de muestra posible para  $20 \mu\text{l}$ . Las cantidades cargadas en el gel fueron de  $2.1 \mu\text{g}$  para el medio YP-Rafinosa y  $2.6 \mu\text{g}$  para el medio YP-Galactosa.

Las cantidades de proteínas de los extractos fueron mayores que en las muestras de sobrenadante. Para el extracto del medio YP-Rafinosa se obtuvieron valores de  $2.77 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , para el extracto del medio YP-Galactosa se obtuvieron valores de  $3.75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . En este caso se colocó una cantidad de  $55 \mu\text{g}$  por muestra.

Los geles de acrilamida correspondientes se muestran a continuación:

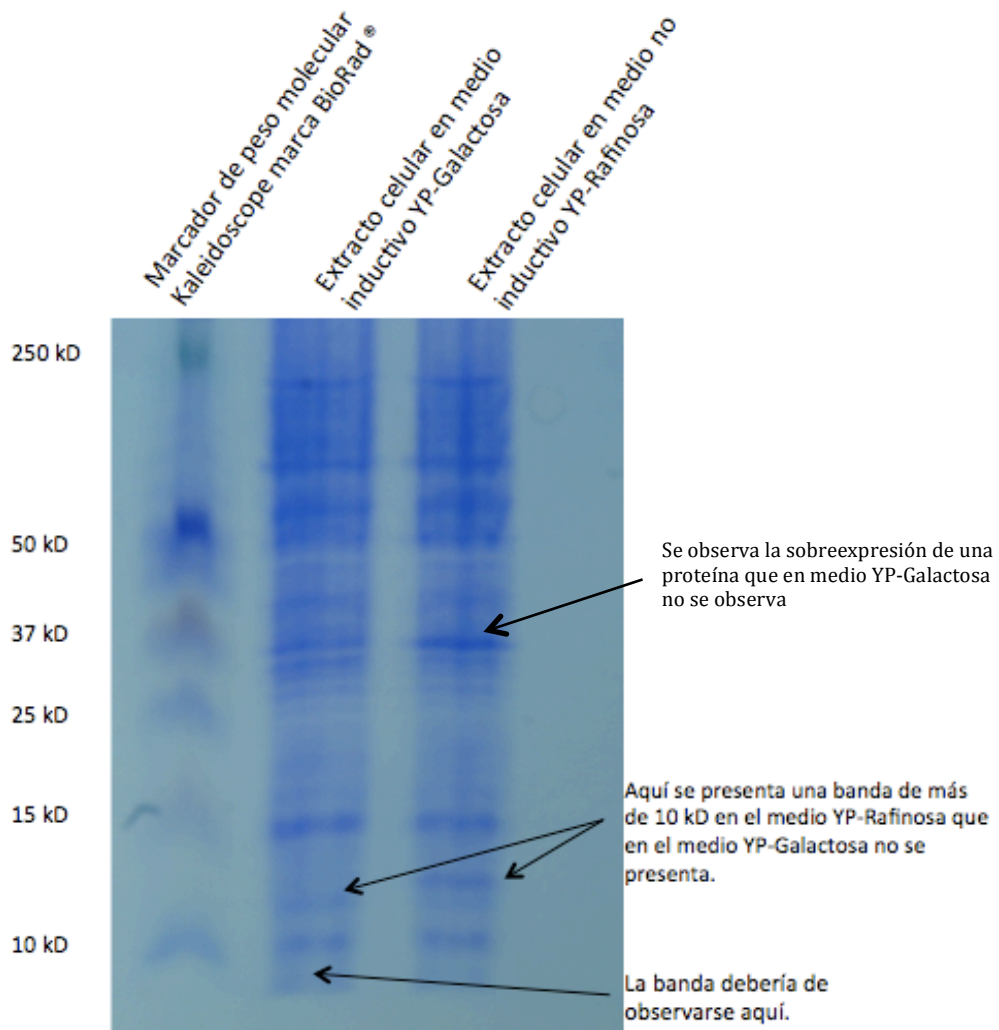


Fig. 23. Gel de poliacrilamida con muestras del extracto celular de crecimientos en YP-Galactosa y YP-Rafinosa

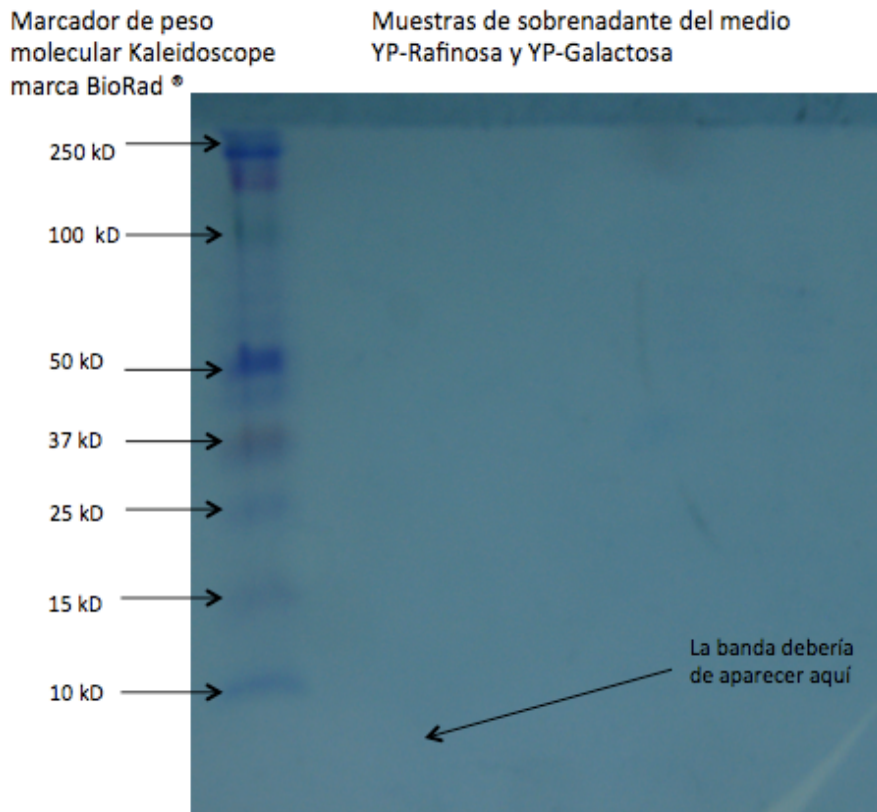


Fig. 22. Gel de acrilamida con muestras del medio extracelular de los crecimientos en YP-Rafinosa y YP-Galactosa.

En los geles, la expresión de la proteína anticongelante, no es la que se esperaría. En el caso del medio extracelular no se observa la expresión de ninguna proteína. En el caso del extracto celular se observan algunas bandas con sobreexpresión en las levaduras que fueron crecidas en medio YP-Rafinosa que en las otras no se presentan. La sobreexpresión de la AFP no se presenta en ninguno de los dos casos.

## 6. Discusión

Los vectores lanzadera (*shuttle vector*) han sido una herramienta muy importante para la ingeniería genética y la biología sintética porque permiten el traspaso de genes de un organismo a otro de manera rápida y eficiente.

La transformación en los dos organismos (*E. coli* y *S. cerevisiae*) fue un éxito. El vector lanzadera pYES2 fue una de las herramientas más importantes para el desarrollo de esta tesis por su capacidad de funcionar tanto en una bacteria como en una levadura con su marcador de selección correspondiente.

La facilidad de hacer una construcción genética entre dos elementos génicos de diferentes organismos, como un promotor *GAL1* de levadura y un gen *AFP* de pez, es posible gracias a la utilización de enzimas de restricción equivalentes o que construyan extremos pegajosos similares. En el caso de la biología sintética, es claro que nos facilita mucho el trabajo de unión el utilizar módulos bien establecidos a partir de cuatro enzimas particulares: *EcoRI*, *XbaI*, *SpeI* y *PstI*, y no fragmentos de DNA que sean complicados de unir debido a las diversas enzimas de restricción con las que se están creando los extremos pegajosos.

Como mencionan Berg y Mertz en su artículo de 2010, la importancia de que en la ingeniería genética se desarrollen “biopartes” a manera de dispositivos modulares facilita el trabajo del ingeniero genético. Permite que se produzcan ensamblajes gigantescos que, con un mundo de endonucleasas, serían acciones muy complejas porque las partes no encajarían nunca unas con otras (Berg y Mertz 2010). Los dispositivos biológicos con extremos pegajosos compatibles, proporcionados por las cuatro endonucleasas antes descritas, fueron una ventaja a la que se pudo acudir en este trabajo. Al existir extremos cohesivos entre *SpeI* y *XbaI*, se pudo ligar con éxito el fragmento *AFP* con el plásmido pYES2 en su sitio de poliunión, a pesar de que las enzimas no eran las mismas.

En los estudios de viabilidad se encontraron resultados distintos a los esperados en la hipótesis. Se ve que, procesos de congelación por un tiempo prolongado y constante, son más dañinos para la recuperación de las células que procesos de congelación y

descongelación frecuentes. Esto puede deberse a que en el momento de descongelar una colonia, se da una recuperación de las células, a diferencia de una colonia congelada por mucho tiempo que está siendo dañada constantemente sin capacidad de adaptarse. La recuperación permitiría que las células vuelvan a tener cierta capacidad de sobrevivencia al nuevo evento de congelación y esto les puede ayudar a retomar ciertas actividades metabólicas que las protejan del proceso de congelación repetitivo, incluso, adaptándolas a largo plazo, a este proceso.

Algo que es muy claro en los crecimientos que, de hecho, llevó a eliminar la temperatura de 4° C de las pruebas, es que la viabilidad de las células para esta temperatura, en el lapso de tiempo elegido, no fue suficiente para determinar una diferencia notable de viabilidad. Para que este experimento tuviera resultados más claros es posible que se tuviera que aumentar el tiempo de almacenaje de las colonias incluso durante varias semanas.

Un resultado interesante es que en todos los casos, ya sea de las cepas silvestres, AFP inducidas y AFP no inducidas, la viabilidad de las células disminuía mucho más a una temperatura de -20° C que a una temperatura de -70° C. Esto corrobora de cierta manera por qué se guardan las cepas de laboratorio a una temperatura de -70°C y no de -20° C. La manera en cómo se forman los cristales de hielo tiene mucho qué ver. Los puentes de hidrógeno y las estructuras hexagonales que se forman al momento de la congelación, como se explicó en la introducción, son los causantes de la formación de cristales. Estos cristales cerca o, incluso dentro de una célula u organismo, pueden provocar un gran daño celular o tisular. En el agua líquida las estructuras hexagonales poseen una mayor cantidad de energía cinética y están en constante movimiento, por lo tanto, si el proceso de congelación es muy rápido, es imposible que las estructuras hexagonales se acoplen por completo; se evita la formación de ápices muy bien elaborados, y a su vez, la peligrosidad de éstos hacia las estructuras celulares (Nelson y Cox 2007).

Las colonias de la cepa silvestre y las colonias de la cepa transformada con el plásmido pYES2 con el inserto de *AFP* sobrevivieron de una manera muy similar a pesar de que las dos cepas lo hicieron en medio inductivo del promotor *GAL1*. Esto indica que, a



pesar de la supuesta expresión de la AFP en las cepas transformadas, no se presentaba una mejoría en la resistencia a una congelación abrupta con ayuda de la proteína anticongelante. La sobrevivencia observada por la cepa silvestre y por la cepa transformada es debida, seguramente, a los mecanismos constitutivos con los que *S. cerevisiae* cuenta para su protección ante un descenso rápido de la temperatura. Las rutas de señalización para los genes *STRE*, *DAN/TIR*, *OLE* y los encargados de la síntesis de trehalosa y glucógeno, fueron los mecanismos encargados de la protección de *S. cerevisiae* y no la expresión o la no expresión de la proteína anticongelante.

Se puede observar que la mayor sobrevivencia fue presentada por las colonias crecidas en medio YP-Galactosa con glicerol al 20 %. Es claro que la recuperación de las células con glicerol como protector celular es en gran medida superior a cualquier otra condición mostrada en este trabajo. Es por esto que se utiliza como método regular para el almacenamiento de células vivas a bajas temperaturas por largos periodos de tiempo.

Las colonias que contenían el plásmido pero fueron crecidas en un medio no inductivo YP-Rafinosa, tuvieron una sobrevivencia mayor a la presentada por la cepa silvestre y por las colonias transformadas crecidas en medio YP-Galactosa después de varios eventos de descongelación y congelación. En este caso el medio puede ser el causante de este resultado inesperado.

Muchos polisacáridos son utilizados como protectores naturales contra el daño por congelación y desecación en algunos organismos. Incluso en *S. cerevisiae* existen rutas de señalización para la activación de carbohidratos de protección como la trehalosa. Es posible que la rafinosa esté actuando como una fuente de carbono protectora para la célula ante los procesos de desecación y congelación repentina; acción que la galactosa no está ejerciendo. Sztein *et al.* realizaron experimentos en el 2001 con criopreservación de espermatozoides de ratón. Colocaron diferentes alcoholes criopreservantes como glicerol y DMSO, y los compararon con carbohidratos criopreservantes como trehalosa, lactosa y rafinosa. Se observó que, después de descongelar las muestras, la integridad de la membrana y la movilidad de los espermatozoides era mayor en los que habían sido expuestos a carbohidratos (siendo

la trehalosa y la rafinosa los mejores protectores) que aquellos que habían sido expuestos a alcoholes (Stein *et al.* 2001). Esto puede resultar en que la viabilidad que se observa en las cepas transformadas con el gen de la AFP, aunque en medio no inductivo YP-Rafinosa, sea proporcionado por la capacidad de la rafinosa de actuar como un crioprotector más que por otro mecanismo interno de la levadura. La capacidad de sobrevivir mejor a los procesos de congelación y descongelación por largos periodos de tiempo, en este caso, no se debe a la acción de la proteína anticongelante, sino a que la rafinosa es una fuente de carbono que permite una mayor protección a los procesos de congelación que la galactosa. No se encontraron referencias de esto en *S. cerevisiae*.

Es importante observar que a pesar de que no existe ningún cambio claro de la capacidad de sobrevivencia de la cepa transformada con el plásmido pYES2 con el inserto de la AFP inducida y de la cepa silvestre, sí se presenta un cambio fenotípico de la estructura celular muy evidente. Las cepas que, se supone, están expresando la proteína anticongelante, desarrollaron una forma celular alargada más parecida a la de un bacilo que a la de una levadura *S. cerevisiae* globular común. La inserción del plásmido por sí sólo no es el causante de este cambio fenotípico ya que la cepa transformada con el plásmido pYES2 pero sin la inducción con galactosa, presenta una estructura globular típica.

La posibilidad de que sea una contaminación por un organismo más alargado como *Schizosaccharomices pombe* también es descartada. La manera en que sucede la división celular en *S. pombe* es por fisión binaria. En cambio, la división celular observada en las colonias transformadas e inducidas es por gemación polar, tal y como es llevada a cabo por *S. cerevisiae* normalmente (Maheshwari 2005). Este proceso, además, se repitió en varias ocasiones y el resultado fue el mismo, es decir que el cambio en la forma celular de *S. cerevisiae* es debida por completo a un evento que ocurre al momento de la inducción con galactosa, y sólo en la levadura transformada. Este resultado aún no es posible de explicar por la acción de la proteína anticongelante ya que no existe bibliografía correspondiente a un cambio morfológico parecido en las células de *M. americanus* con la expresión de la AFP, ni tampoco se ha insertado previamente en *S. cerevisiae* un gen para una proteína anticongelante.

Este proceso podría ser provocado por una disminución en la expresión de la enzima galactocinasa, proteína encargada de la fosforilación de la galactosa en el primer paso de la ruta hacia la transformación de galactosa en glucosa. Podría ser provocado, también, por la interacción de la proteína anticongelante con el citoesqueleto o con las proteínas de la membrana. No se debe olvidar que la AFP interactúa con las moléculas de agua cambiando la forma de los cristales de hielo a estructuras alargadas, lo que sugeriría que las moléculas de agua se estén acomodando de manera transversal hacia los polos de la estructura celular. Lo cierto es que, con los resultados que se obtuvieron en este trabajo, no es posible asegurar que la proteína anticongelante esté produciendo este cambio en lo absoluto. Habría que llevar a cabo una serie de experimentos con diferentes organismos unicelulares que expresen de manera artificial esta proteína, y también expresar esta proteína en *S. cerevisiae* con otros plásmidos con acción constitutiva y no con inducción por galactosa. De esta manera se tendrían controles positivos y negativos de la acción fenotípica de este evento de transformación y poder, así, llegar a una conclusión contundente.

Los gels de poliacrilamida que se realizaron para saber si este cambio fenotípico era otorgado por la sobreexpresión de la proteína anticongelante no arrojaron resultados evidentes de la expresión de la proteína.

La falta de expresión de la proteína en el medio extracelular puede ser debida a dos razones. Por un lado puede ser que la proteína sí está siendo expresada pero no está siendo exportada al medio, por lo tanto, no se observa en la muestra del medio extracelular. Al no existir transportadores de membrana para esta proteína en la levadura, la capacidad de exportarla sería nula, así la proteína no se observaría en una muestra del medio. Esto también permitiría entender un poco por qué la viabilidad de las células no aumentó bajo esta condición. La AFP es una proteína que evita la formación del hielo y el daño en la membrana por los cristales de hielo en el medio extracelular. Si la proteína no está siendo exportada, su acción es exclusiva al medio intracelular y se sigue permitiendo la formación de cristales dañinos para la célula.

La otra razón es que la proteína sí está siendo exportada pero, por la poca cantidad obtenida, sea imposible observarla en un gel de este tipo. En el gel con muestras del

extracto celular, la proteína tampoco se ve y, si no es posible observarla en donde debería de haber una alta concentración por la sobreexpresión de la proteína, mucho menos se observará en un medio donde la expresión debiera ser mínima.

Puede ser, también, que la proteína simplemente no se pliegue correctamente por la falta de la maquinaria celular de *M. Americanus* o la deficiencia de proteínas chaperonas que le den la capacidad de plegamiento a la AFP que, están en el pez, y de las cuales no se tenía conciencia de su requerimiento.

La proteína, de igual manera, puede que simplemente sea tan pequeña que se degrade muy rápido o sea imposible de observar en un gel de acrilamida por falta de tinción.

Las posibilidades son muchas y, no se puede estar seguro de cuál es la correcta, hasta que las pruebas correspondientes sean llevadas a cabo. Lo que es claro es que el fenotipo de las levaduras transformadas cambió en el momento de la inducción con galactosa y esto es debido a un proceso celular que en la cepa silvestre no está ocurriendo.

La sobreexpresión de las dos proteínas que se acotan en la muestra del medio YP-Rafinosa no pueden ser resueltas por completo. Estas proteínas de 39 kDa y 12 kDa no pueden ser explicadas por completo pero podría ser que sean proteínas que estén implicadas en la ruta metabólica de la rafinosa o en algún sistema de degradación de la misma, pero todo esto no podrá ser explicado hasta hacer las pruebas correspondientes.

La inserción del gen que codifica para la AFP en un plásmido pYES2 con inducción por galactosa no derivó en ningún cambio importante para la sobrevivencia en condiciones de muy bajas temperaturas. Se debe recalcar que, como menciona Andrianantoandro en su artículo de 2006, no por el simple hecho de conseguir una construcción diseñada correctamente el organismo lo aceptará como tal (Andrianantoandro 2006). Los seres vivos son maquinarias mucho más complejas que no están diseñadas, son imperfectas y simplemente seleccionadas de acuerdo a la velocidad y eficacia de su adaptación al medio. Es por eso que no debemos fiarnos de que un salto gigantesco en su camino

evolutivo, pueda permitir una mejora si no ha llevado a cabo un proceso de selección natural con el tiempo y condiciones necesarias.

La ingeniería genética y la biología sintética son por el momento una herramienta muy importante para la biología molecular, pudiendo demostrar las rutas o los procesos de la célula por medio de hibridaciones, recombinación heteróloga de genes, o construcción de quimeras. Pero para que la biología sintética tenga algún impacto mayor en nuestra vida cotidiana, todavía es necesario trabajar más en solventar las cuestiones evolutivas y ecológicas que conlleva. Pensar no sólo en la ingeniería y en las facultades de los genes y las proteínas, sino también extrapolar esto a las interacciones de todo el organismo en conjunto con otros seres vivos y con su medio, y así poder conseguir resultados más sofisticados. Los seres vivos no están diseñados, por eso no podemos esperar que de un momento a otro acepten un diseño que nosotros hemos hecho para ellos.

## 7. Conclusiones

El gen que codifica para la AFP tipo III de *Macrozoarces americanus* fue insertado con éxito en una levadura *Saccharomyces cerevisiae* por medio de un vector lanzadera pYES2 marca Invitrogen® regulado bajo la expresión de un promotor *GAL1* que es activado por el crecimiento de la levadura en un medio YP-Galactosa. La construcción fue exitosa y fue comprobada con los geles de agarosa correspondientes.

La viabilidad de las colonias, ya sea transformadas con inducción, transformadas sin inducción y la cepa silvestre, fue menor ante un evento de congelación a una temperatura de -20° C que a una temperatura de -70° C.

La viabilidad de las células que deberían estar expresando la proteína anticongelante no fue muy diferente a aquellas colonias de cepa silvestre que no expresaban ninguna proteína anticongelante. Es posible que esta sobrevivencia de la cepa silvestre se deba a los mecanismos constitutivos con los que *S. cerevisiae* cuenta para defenderse de una congelación abrupta.

La viabilidad de las células crecidas en medio YP-Rafinosa fue mayor que las crecidas en medio YP-Galactosa porque la rafinosa es un polisacárido que podría funcionar como protector celular ante un descenso de la temperatura a pesar de que no hubiera una inducción de la proteína anticongelante.

El fenotipo de la cepa transformada, y que se espera esté sintetizando la proteína anticongelante, cambió de manera considerable con respecto a las otras cepas, a pesar de que estuvieran en el mismo medio YP-Galactosa o tuvieran el mismo inserto pero sin expresión del promotor. La forma celular de las levaduras transformadas con expresión de la AFP fue alargada, en lugar de una forma globular como se presenta normalmente en la especie *S. cerevisiae*.

La expresión de la proteína anticongelante no pudo ser observada en este trabajo ni en el medio extracelular, ni en el medio intracelular. La explicación a esto es todavía muy

poco clara pero muy probable que se deba a la cantidad tan reducida de proteína que se estaba expresando o a la degradación tan rápida debida al tamaño de la proteína.

### **Perspectivas**

Como continuación de este trabajo sería interesante replantear en principio los experimentos de viabilidad. Realizar experimentos de congelación más prolongados, utilizar menos puntos y con mayor separación de tiempo entre ellos, o realizar la congelación de los organismos en varios puntos de crecimiento, es decir, congelar a algunas levaduras en fase de adaptación, otras en fase exponencial y otras en fase estacionaria para observar si la expresión de la proteína está relacionada con algún punto específico del crecimiento.

Otro experimento interesante sería utilizar un vector constitutivo para la expresión del gen que codifica para la proteína anticongelante. Sería importante explorar la posibilidad de que los cambios en la viabilidad de las levaduras no esté relacionada con el medio en el que se está llevando a cabo el crecimiento. Es por eso que la utilización de un promotor constitutivo en el que ni la rafinosa ni la galactosa estén implicados sería una manera clara de demostrar que la proteína anticongelante y su actividad son los únicos factores determinantes para esta adaptación.

Es necesario que se realicen experimentos para la purificación de la proteína y que se observe si está siendo expresada en el medio intracelular o extracelular. Sería interesante explorar la posibilidad de utilizar otros marcadores de expresión como la inserción de un gen, al final de la secuencia, que codifique para una proteína verde fluorescente (GFP). También podría insertarse algún gen que produzca una proteína con actividad específica de anticuerpos conocida y de esta manera llevar a cabo un *Western blot* que nos indicara si la proteína anticongelante está siendo expresada.

Por último es necesario que se explore el cambio fenotípico que surgió a partir de la expresión de la proteína. Sería interesante hacer ensayos con diferentes organismos unicelulares que expresaran la proteína anticongelante de manera artificial,

observarlos en el microscopio y determinar si existe un cambio fenotípico claro en la forma para estos organismos.



## 8. Bibliografía

### 8.1 Fuentes bibliográficas

Abramova, E. Natalia; Cohen, Brian D.; Sertil, Odeniel; Kapoor, Rachna; Davies, Kelvin J. A. y Lowry, Charles V. (2001a) *Regulatory Mechanisms Controlling Expression of the DAN/TIR Mannoprotein Genes During Anaerobic Remodeling of the Cell Wall in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. Vol. 157; 1169-1177.

Abramova, E. Natalia; Sertil, Odeniel; Metha, Sapna y Lowry, Charles V. (2001b) *Reciprocal Regulation of Anaerobic and Aerobic Cell Wall Mannoprotein Gene Expression in Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. Vol. 183:9; 2881-2887.

Aguilera, Jaime; Randez-Gil, Francisca y Prieto, José Antonio (2007) *Cold response in Saccharomyces cerevisiae: new functions for old mechanisms*. FEMS Microbiology Review 31; 327-341.

Alba-Lois, L. y Segal-Kischinevzky, C. (2010) *Beer and Wine Makers*. Nature Education. Vol. 3(9):17

Andrianantoandro, Ernesto; Basu, Subhayu; Karig, David K. y Weisssof, Ron (2006) *Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline*. Molecular Systems Biology 2006.0028; 1-14.

Bar-Dolev, Maya; Celik, Yeliz; Wettlaufer, J. S.; Davies, Peter L. y Braslavsky, Ido (2012) *New insights into ice growth and melting modifications by antifreeze proteins*. Journal of the Royal Society Interface; 1-11.

Berg, P. y Mertz, J. (2010) *Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology*. Genetics .Vol. 184:1; 9–17.

Broach, James R.; Pringle, John R. y Jones, Elizabeth W. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991. 826 pp.

Carbone, Martina N. y Arnold, Frances H. (2007) *Engineering by homologous recombination: exploring sequence and function within a conserved fold*. USA, Current opinión in structural biology, Vol. 17:454–459

Choy, Hew L.; Wang, Nam-C; Joshi, Shashikant; Fletcher, Garth L.; Scott, Gary K.; Hayes, Plini H.; Buettner, Bert y Davies, Peter L. (1988) *Multiple Genes Provide the Basis for Antifreeze Protein Diversity and Dosage in the Ocean Pout, Macrozoarces americanus*. The journal of biological chemistry. Vol. 263:24; 12049-12055

Clarke, C. J., Buckley, S. L., y Lindner, N. (2002). *Ice structuring proteins—a new name for antifreeze proteins*. Cryo Letters. Vol. 23:2; 89–92.

Cohen, D. Brian; Sertil, Odeniel; Abramova, Natalia E., Davies, Kelvin J. A. y Lowry, Charles V. (2001) *Induction and repression of DAN1 and the family of anaerobic mannoprotein genes in Saccharomyces cerevisiae occurs through a complex array of regulatory sites*. Nucleic Acid Research. Vol. 29:3; 799-808.

Fernandes, P. M. B. (2005) *How does yeast respond to pressure?* Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Vol 38:8; 1239-1245.

Keasling, Jay D. (2008) *Synthetic biology for synthetic chemistry, Review*. ACS Chemical Biology. Vol. 3:1; 64-76.

Maheshwari, Ramesh. *Fungi: Experimental Methods in Biology*. Florida, Taylor & Francis Group, 2005. 240 pp.

Makarevich, A. V.; Kubovičová, E.; Popelková, M.; Fabian, D.; Čikoš, Š.; Pivko, J. y Chrenek, P. (2009) *Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant*. *Zygote*. Vol. 18; 145-153.

Micklos, David A. y Freyer, Greg A. *DNA Science: A first Course*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Segunda edición), 2003. 574 pp.

Mokdad-Gargouri, Raja; Abdelmoula-Soussi, Salma; Hadji-Abbès, Nadia; Yacoubi- Hadj Amor, Ines; Borchani-Chabchoub, Istabrak y Gargouri, Ali (2012) *Yeasts as a tool for heterologous gene expression*; en *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols* (Tercera edición). *Methods in Molecular Biology*. Vol. 824; 359-370.

Moskvina, E.; Schüller C.; Maurer, C. T. C.; Mager, W. H. y Ruis, H. (1998) *A search in the genome of Saccharomyces cerevisiae for genes regulated via stress response elements*; en *Yeast* 14. John Wiley & Sons; 1041-1050.

Nelson, David L. y Cox, Michael M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. New York, W. H. Freeman and Company, 2007 (Cuarta edición). p. 47-60

Nishimiya, Yoshiyuki; Sato, Ryoko; Takamichi, Manabu; Miura, Ai y Tsuda, Sakae (2005) *Co-operative effect of the isoforms of type III antifreeze protein expressed in Notched-fin eelpout, Zoarces elongatus Kner*. *The FEBS Journal*. Vol. 272; 482-492.

Ogden, Jill E.; Stanway, C.; Kim, S.; Mellor, J.; Kingsman, A. J. y Kingsman, S. M. (1986) *Efficient expression of the Saccharomyces cerevisiae PGK gene depends on an upstream activation sequence but does not require TATA sequences*. *American Society for Microbiology*. Vol. 6:12; 4335-4343.

Panadero, Joaquín; Palloti, Claudia; Rodriguez-Vargas, Sonia; Randez-Gil, Francisca y Prieto, José A. (2006) *A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 281; 4638-4645.

Parrou, J. L.; Teste, M. A. y Francois J. (1997) *Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in Saccharomyces cerevisiae: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose*. Microbiology. Vol. 143; 1891–1900.

Sztejn, J. M.; Noble, K.; Farley, J. S. y Mobraaten, L. E. (2001) *Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation*. Academic Press, Cryobiology Vol. 41; 28-39

Venketesh, S. y Dayananda, C. (2008) *Properties, Potentials, and Prospects of Antifreeze Proteins*. Critical Reviews in Biotechnology. Vol. 28; 57–82.

Zlotnik, Hinda; Fernandez, M. P.; Bowers, B. y Cabib E. (1984) *Saccharomyces cerevisiae mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity*. Journal of Bacteriology. Vol. 159:3; 1018- 1026.

## **8.2 Fuentes consultadas en la red**

- <http://old.iupac.org/didac>
- Protein Data Base en [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)
- Nucleotide Database del Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI) en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Registry IGEM en <http://partsregistry.org/>