



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LA INACTIVACIÓN DE LA SUBUNIDAD G γ DE LA PROTEÍNA G
HETEROTRIMÉRICA DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*,
PRODUCE UNA DEFICIENCIA DE CRECIMIENTO EN GLICEROL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Diana María García Chávez

TUTOR PRINCIPAL
DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
[Instituto de Fisiología Celular](#)
DRA. NURIA SÁNCHEZ PUIG
[Instituto de Química](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. a 20 de Noviembre del 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme distinguido como becaria durante la realización del presente trabajo (No. de becaria 585717). Agradezco al PAEP por haberme permitido participar en el Congreso Internacional de Biología Experimental en Chicago, Illinois. Agradezco también el apoyo del CONACyT (proyecto No. CB254078) y PAPIIT; DGAPA, UNAM (proyecto No. IN210616).

Agradezco, especialmente, a mi tutor el Dr. Roberto Coria Ortega, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por acogerme en su laboratorio y asesorar este proyecto; por su atención y motivación en la realización del mismo.

Agradezco las observaciones y consejos recibidos de los miembros de mi comité tutorial: la Dra. Soledad Funes Argüello del Instituto de Fisiología Celular; y la Dra. Nuria Sánchez Puig del Instituto de Química de la UNAM.

Quiero agradecer enormemente al Dr. Salvador Uribe Carvajal, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por permitirme hacer uso de su laboratorio, equipos y reactivos. De este mismo laboratorio, mis sinceros agradecimientos a la Biol. Isareli Cruz Cruz por ayudarme en todo lo referente a la extracción de mitocondrias y medición de citocromos; por su paciencia, supervisión y gran disposición. También quiero agradecer a la M. en C. Norma Sánchez del laboratorio del Dr. Antonio Peña Díaz por su apoyo en la realización de las oximetrías.

Agradezco la asesoría técnica y teórica que me brindó la Dra. Laura Kawasaki Watanabe para la realización de varios experimentos reportados en el presente trabajo.

Agradezco también el apoyo técnico recibido del personal de la a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM: la Dra. Laura Ongay Larios, la Biol. María Guadalupe Codiz Huerta y la M en C. Minerva Mora Cabrera; así como el apoyo del personal de la Unidad de Cómputo: Gerardo Coello, Ana María Escalante, Juan Barbosa e Ivette Rosas.

A todos mis compañeros de laboratorio, por su amistad, compañerismo, consejos y apoyo experimental.

ABREVIATURAS

C Vps	complejo de proteínas que regulan la fusión de vesículas
CCCP	<i>p</i> -clorocarbonilcianuro fenilhidrazona
CYB2	citocromo b. gen del L-lactato citocromo c oxidoreductasa
Cyt	citocromo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DMSO	dimetil-o-sulfóxido
DOC	desoxicolato de sodio
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EtOh	etanol
Fps1p	acuagliceroporina. Permite la difusión pasiva de glicerol
FUN1	colorante vital para levaduras
Glu	glucosa
Gly	glicerol
GPCRs	receptores acoplados a proteínas G
Gut1p	proteína involucrada en la utilización de glicerol. Glicerol cinasa
Gut2p	glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial
Gα	subunidad alfa de las proteínas G heterotriméricas
Gβ	subunidad beta de las proteínas G heterotriméricas
Gγ	subunidad gamma de las proteínas G heterotriméricas
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Jen1	simportador de protones/monocarboxilatos
KDa	kilodaltones
L.LCR	citocromo c oxidoreductasa de lactato mitocondrial
LB	medio de enriquecimiento para <i>Escherichia coli</i> . Luria Broth
MAPK	proteínas cinasa activadas por mitógenos
MATa	factor de apareamiento tipo a
MAT	α Factor de apareamiento tipo alfa
MES	ácido 2-(N-Morfolino)etanolsulfónico
pGEM	vector de clonación multicopia
pYES	plásmido multicopia para la expresión de proteínas en levadura
Ras	proteína GTPasa pequeña
rho⁰/p⁰	indica la ausencia de genoma mitocondrial
STE18/ Gy	gen que codifica para la subunidad Gy de las proteínas G
STE18^{C107S}/Gy^{C107S}	gen que codifica para la subunidad Gy de las proteínas G mutado en el residuo107 por una serina
STL1	gen del simportador de glicerol/H ⁺ en la membrana plasmática.
TEA	trietanolamina
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
ΔE	coeficiente de extinción molar
ΔGy	levadura mutante de la subunidad Gy de las proteínas G heterotriméricas

CONTENIDO

	Número de página
I. Resumen	1
II. Abstract	2
III. Introducción	
1. Ciclo de vida de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.1 Apareamiento en respuesta a feromonas	4
- Proteínas G heterotriméricas	4
- Señalización por feromonas en la levadura	5
2. Metabolismo aerobio en <i>S. cerevisiae</i>	6
- Metabolismo del glicerol	6
- La mitocondria	8
- Fosforilación oxidativa	8
- Cadena transportadora de electrones	9
- Los citocromos	11
IV. Planteamiento del problema	14
V. Objetivos	14
VI. Justificación	15
VII. Materiales y Métodos	15
- Medios de cultivo	15
- Cepas empleadas	16
- Plásmidos	16
- Clonación del gen de la subunidad Gy, <i>STE18</i>	16
- Ensayo de apareamiento de la mutante ΔGy	21
- Ensayos de crecimiento en diluciones seriales	21
- Curvas de crecimiento	22
- Prueba de viabilidad con FUN1	22
- Observación de DNA mitocondrial	24
- Respiración	25
- Cuantificación de citocromos	26
- Análisis estadístico	28
VIII. Resultados	29
- La mutante ΔGy es estéril	29
- La deficiencia de crecimiento en glicerol está relacionada con la ausencia del gen Gy	29
- La mutante ΔGy tiene una deficiencia de crecimiento en lactato	33
- La viabilidad de la mutante ΔGy no está afectada en medio con glicerol	36
- La mutante ΔGy posee DNA mitocondrial	38
- La mutante ΔGy no tiene una deficiencia respiratoria	39

-	En medios respiratorios, la cantidad de citocromos es menor en la mutante ΔGy	42
IX.	Discusión	46
X.	Conclusiones	52
XI.	Perspectivas	53
XII.	Referencias	55

I. RESUMEN

En las levaduras, ante la presencia de feromonas, se activa la vía de apareamiento en donde la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas intercambia GDP por GTP y se separa del dímero $G\beta\gamma$, el cual activa efectores río abajo. El dímero $G\beta\gamma$ siempre funciona como una sola unidad y hasta la fecha no hay reportes de que la subunidad $G\gamma$ tenga una función particular y aislada en levaduras, y su única función conocida involucra esta vía de señalización.

En el laboratorio se encontró que la mutante $\Delta G\gamma$ de *Saccharomyces cerevisiae*, muestra una deficiencia de crecimiento en un medio de cultivo respiratorio en el cual se emplea al glicerol como única fuente de carbono. La glucosa es la fuente de carbono predilecta de esta levadura; sin embargo, puede utilizar al glicerol.

Se realizaron diferentes ensayos con la mutante $\Delta G\gamma$ para identificar las causas de su deficiencia de crecimiento en glicerol. Se determinó la capacidad de crecimiento de la mutante $\Delta G\gamma$ en distintas fuentes de carbono y la participación del gen de $G\gamma$ (*STE18*), en el problema de crecimiento observado. Los resultados indican que la deficiencia de crecimiento, aunque es mucho más marcada en glicerol, también se presenta en lactato, otro medio respiratorio. Asimismo, la sobreexpresión del gen $G\gamma$ (*STE18*), en la mutante, recupera su crecimiento en glicerol, por lo que esta deficiencia depende de la ausencia del gen. Además, se demostró que la mutante $\Delta G\gamma$ es viable en glicerol por lo que es posible que su incapacidad de crecer bien en este medio se deba a un problema metabólico.

Por ensayos de microscopía se encontró que la mutante $\Delta G\gamma$ tiene DNA mitocondrial. Cuando se midió la respiración en la célula completa, se encontró que la mutante no tiene un marcado defecto respiratorio comparado con la cepa silvestre. Sin embargo, la mutante si mostró una clara disminución en el contenido de citocromos cuando las células se cultivaron en lactato y glicerol. Por lo mismo, es importante medir la respiración en mitocondrias aisladas y determinar si el bajo contenido de citocromos afecta el flujo electrónico, el control respiratorio o el potencial de membrana.

II. ABSTRACT

In yeast the presence of pheromones trigger the mating pheromone response. In this pathway, the $G\alpha$ subunit of the G protein exchanges GDP for GTP, and then releases the $G\beta\gamma$ heterodimer which transmits the signal by binding to different downstream effectors. The $G\beta\gamma$ heterodimer always works as a sole unit and until now, there are no reports of a particular and isolated function of the $G\gamma$ subunit. Its only known function involves this signaling pathway.

In the laboratory, it was found that the null mutant of the $G\gamma$ subunit, $\Delta G\gamma$, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, has a growth deficiency when cultivated in a respiratory medium with glycerol as a sole carbon source. This yeast prefers glucose as a carbon source; however, it can use glycerol.

Several trials were conducted to identify the causes of glycerol growth deficiency on the $\Delta G\gamma$ mutant. The growth capacity of the $\Delta G\gamma$ mutant in different carbon sources and the participation of the $G\gamma$ gene (*STE18*), in this growth deficiency were determined. Results indicate that the growth deficiency, although much more marked in glycerol, also occurs in lactate, another respiratory medium. Likewise, the over expression of the $G\gamma$ gene (*STE18*) recovers the growth of the mutant in glycerol, so that the observed growth capacity depends on the absence of this gene. Besides, it was shown that the $\Delta G\gamma$ mutant is viable in glycerol, so it is possible that the growth inability is due to a metabolic issue.

Microscopy observations let us know that the $\Delta G\gamma$ mutant has mitochondrial DNA. When respiration was measured in complete cells, it was found that the mutant does not have a marked respiratory defect compared to the wild type strain. However, the mutant did show a clear deficiency in cytochrome content when the cells were grown in lactate and glycerol. Therefore, it is important to measure respiration in isolated mitochondria and to determine whether the low cytochrome content affects electronic flow, respiratory control or membrane potential.

III. INTRODUCCIÓN

1. Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae es una levadura gemante que pertenece al grupo de los hemiascomicetos. Es un hongo microscópico unicelular ampliamente utilizado en la industria alimenticia por su capacidad de llevar a cabo fermentación y como organismo modelo en el estudio de transducción de señales y genética molecular.

En la naturaleza, las levaduras pueden encontrarse en estado haploide o diploide. De acuerdo con la disponibilidad de nutrientes, tanto haploides como diploides pueden reproducirse asexualmente llevando a cabo varios ciclos de crecimiento vegetativo y mitosis. En la reproducción sexual participan dos procesos: la conjugación y la esporulación. En la conjugación, dos células haploides de sexos opuestos se fusionan, dando origen a una célula diploide. Las células haploides existen en dos formas conjugativas llamadas **a** y α . Cada tipo de levadura ya sea **a** o α produce una feromona que atrae al tipo opuesto. Estas feromonas son captadas por receptores específicos de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs) que como consecuencia arrestan a las células en la fase G1 del ciclo celular, detienen la proliferación y comienzan a desarrollar una protuberancia adquiriendo una forma de pera conocida como "shmoo". Eventualmente hay un contacto entre ambas células de sexo opuesto y se fusionan formando un individuo diploide. Estas células diploides crecen vegetativamente, pero cuando la fuente de carbono y nitrógeno es pobre, entran en meiosis y forman esporas. En este proceso de esporulación, cuatro esporas haploides, 2 de cada tipo (**a** o α), se producen en una estructura conocida como asca y son liberadas al medio, en donde germinarán cuando la cantidad de nutrientes sea la adecuada, y producirán nuevas células haploides (Fig. 1) (Dickinson y Schweizer, 2004).

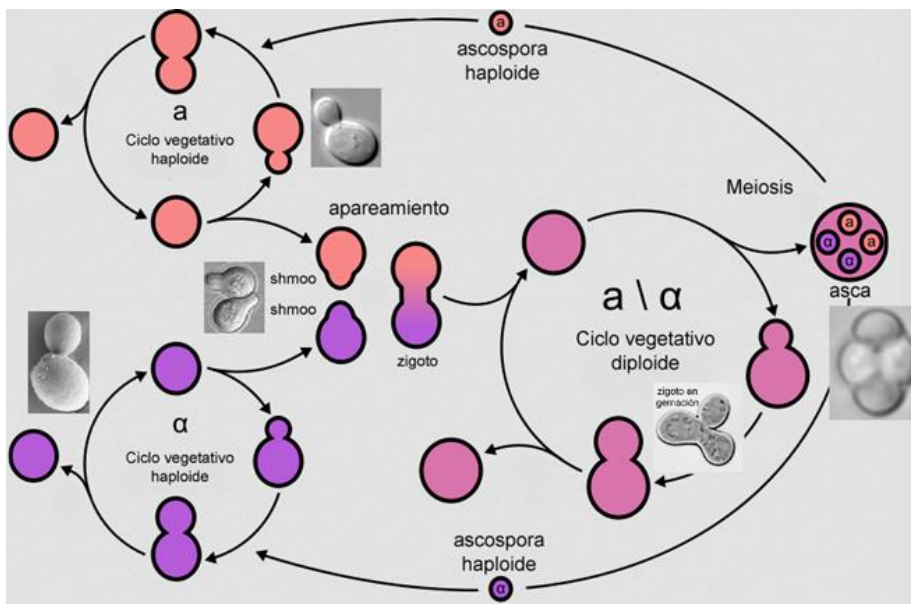


Figura 1: Ciclo de vida de *S. cerevisiae*. En el ciclo vegetativo los individuos haploides (**a** o **α**) se reproducen por gemación. En la reproducción sexual un individuo de tipo **a** se aparea con uno **α** para formar un individuo diploide el cual puede seguir un ciclo vegetativo o entrar en meiosis y producir nuevos individuos haploides.

1.1 Apareamiento en respuesta a feromonas

Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas están formadas por 3 subunidades designadas $G\alpha$ y el dímero $G\beta\gamma$. Las proteínas G reciben su nombre porque unen GTP o GDP en la subunidad $G\alpha$. En las levaduras hay dos especies de subunidades $G\alpha$, pero sólo una de ellas forma un heterotrímero con el dímero $G\beta\gamma$, Gpa1p, que está acoplada a los receptores a feromonas. Las subunidades $G\beta$ (Ste4) y $G\gamma$ (Ste18) se unen de manera no covalente para formar un complejo muy estable, de tal manera que actúan como una sola unidad funcional. El heterodímero $G\beta\gamma$ ayuda a estabilizar la forma $G\alpha$ unida a GDP y activa efectores para transmitir la señal (Spiegel *et al*, 1994).

Estas proteínas se encuentran ancladas a la membrana por modificaciones lipídicas del extremo amino terminal de la subunidad $G\alpha$ y en el extremo carboxilo terminal de la subunidad $G\gamma$ (Hamm, 1998). En la subunidad $G\gamma$ está el motivo CCAAX, formado por dos residuos de cisteína (C), dos residuos de aminoácidos no polares alifáticos (A) y un último residuo cualquiera (X). Este motivo es el blanco para modificaciones post-traduccionales de

tipo prenilación, que consiste en la adición de un grupo hidrofóbico farnesilo o geranilo (Whiteway y Thomas, 1994).

Señalización por feromonas en la levadura

Este proceso comienza con dos células haploides de tipo *MATa* y *MATα*, las cuales secretan feromonas **a** o **α**, respectivamente, que son captadas por el tipo celular opuesto mediante receptores heptahelicoidales acoplados a proteínas G heterotriméricas. Cuando el receptor es activado por la feromona, éste induce cambios conformacionales en la subunidad $G\alpha$ (*Gpa1*) lo que induce el intercambio de GDP por GTP en esta subunidad y su separación del dímero $G\beta\gamma$ (*Ste4/Ste18*) el cual es libre de activar efectores río abajo y así transmitir la señal a través de una cascada llevada a cabo por las MAP cinasas (Dohlman y Thorner, 2001; Bardwell, 2005).

El primer efector con el que tiene contacto el dímero $G\beta\gamma$ es *Cdc24p*, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) de una GTPasa pequeña, *Cdc42p*. *Cdc42* y *Cdc24* son necesarias para la generación de polaridad celular, la gemación de células en mitosis y la deformación a “shmoo” en células haploides en apareamiento. El siguiente efector en la cascada de señalización es la proteína *Ste20*, la cual para activarse interactúa con *Cdc42* unida a GTP. El sustrato de *Ste20p* es *Ste11p*, la primera MAPKKK, luego sigue *Ste7p* (MAPKK) que activa dos MAPK: *Fus3*, que participa en el apareamiento y *Kss1*, responsable de crecimiento filamentoso. Todas estas MAP cinasas interaccionan gracias a la proteína de andamiaje *Ste5*, la cual hace más eficiente la transferencia de la señal por fosforilación. El sustrato de *Fus3* es el transactivador nuclear *Ste12*, el cual es necesario para la expresión de genes de respuesta a feromonas. El dominio de unión a DNA de *Ste12* reconoce un motivo de 8 pares de bases llamado el elemento de respuesta a feromonas (PRE por sus siglas en inglés “pheromone response element”). Otros sustratos de *Fus3* son *Dig1*, *2* y *Far1*. *Dig1* y *2* son represores transcripcionales de *Ste12*; *Far1* inhibe la progresión del ciclo celular. También es una proteína adaptadora que une a $G\beta$, *Cdc24* y estimula el crecimiento polarizado hacia la célula con la que aparea (Figura 2) (Dohlman y Thorner, 2001; Bardwell, 2005).

La señal persiste hasta que el GTP es hidrolizado a GDP y las subunidades $G\alpha$ y $G\beta\gamma$ se re-asocian, completando el ciclo de activación. Como consecuencia de la activación de esta vía, se producen cambios en la estructura del citoesqueleto, lo que permite un

crecimiento polarizado, la inducción de la transcripción de genes involucrados en la producción de proteínas para la adhesión y fusión de las células y el arresto del ciclo celular en la fase G1, requerido para sincronizar los ciclos de las células en apareamiento (Dohlman y Thorner, 2001).

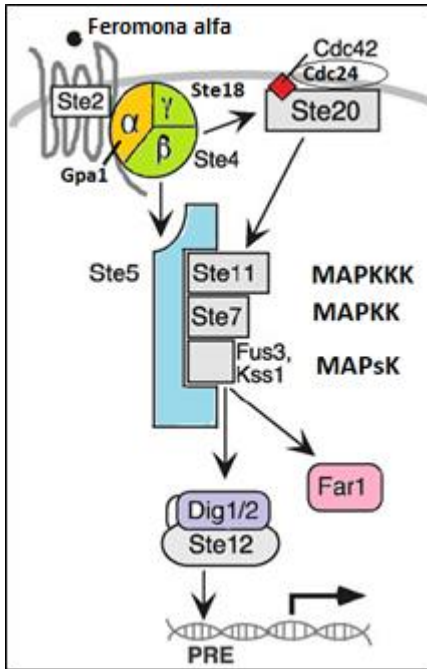


Figura 2: Vía de señalización de respuesta a feromonas. La feromona es captada por un receptor de membrana acoplado a proteínas G heterotriméricas. Estas proteínas van a activar una vía de señalización en donde participan las MAP cinasas y otros efectores para finalmente inducir la transcripción de genes involucrados en el apareamiento. Modificado de Bardwell, 2005.

2. Metabolismo aerobio en *S. cerevisiae*

Metabolismo del glicerol

La glucosa es la fuente de carbono predilecta de *Saccharomyces cerevisiae*. Cuando está presente en el medio de cultivo reprime la actividad de varias vías que no están relacionadas con el metabolismo glucolítico de las hexosas (ciclo de Krebs, cadena respiratoria y fosforilación oxidativa); asimismo, reprime la síntesis de enzimas que metabolizan disacáridos e incluso la expresión de genes involucrados en el catabolismo de fuentes de carbono no fermentables como el glicerol (Turcotte *et al*, 2009; Schüller, 2003).

La levadura *S. cerevisiae* puede utilizar al glicerol como única fuente de carbono y energía ya que posee enzimas esenciales para su catabolismo: la glicerol cinasa (Gut1p) y la glicerol3-P deshidrogenasa (Gut2p) (Sprague y Cronan, 1976). El glicerol puede atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva, difusión facilitada a través de la proteína Fps1p o por un sistema simportador glicerol/protón (Grauslund *et al*, 1999).

La degradación del glicerol se da por una vía fosforilativa. Primero el glicerol se convierte en glicerol-3-fosfato por la glicerol cinasa citosólica. Luego el glicerol-3-fosfato atraviesa la membrana mitocondrial externa y es oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por una enzima de la membrana mitocondrial interna, la glicerol- 3- fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD. DHAP regresa al citosol en donde puede ser utilizada en la glucólisis o usada para la síntesis de glucosa-6-fosfato en la gluconeogénesis (Grauslund *et al*, 1999). Mutantes defectuosas en estas enzimas no pueden crecer con glicerol como única fuente de carbono, pero son capaces de crecer en otros sustratos no fermentables. Esto sugiere que la vía fosforilativa es la ruta principal para la asimilación de glicerol en *S. cerevisiae* (Sprague y Cronan, 1976; Grauslund *et al*, 1999).

Las células con deficiencia respiratoria son llamadas “petites”. Se conoce que esta deficiencia está dada por una mutación en el genoma mitocondrial que produce la pérdida o la inactivación irreversible de los genes necesarios para la síntesis de enzimas respiratorias. Una manifestación de la deficiencia respiratoria es la incapacidad de utilizar fuentes de carbono no fermentables como el glicerol, lactato, acetato y etanol. Algunos análisis espectroscópicos han mostrado que estas mutantes carecen de citocromos *a*, *a₃*, y *b*, lo cual puede explicar la ausencia de varias actividades enzimáticas involucradas en el transporte de electrones, como la citocromo oxidasa, y la citocromo *c* reductasa (Sherman, 1962). Por otro lado, Wang y Deschenes (2006) encontraron que levaduras mutantes de las proteínas del complejo C Vps, las cuales regulan la fusión de vesículas en los endosomas y entre estos y la vacuola, presentan un defecto en el tráfico de Ras a la membrana plasmática y éste se acumula en las membranas mitocondriales lo cual les genera defectos mitocondriales que se manifiestan como deficiencia de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (etanol y glicerol) y alteración de su estructura mitocondrial.

El símbolo ρ se emplea para describir a las mutantes que llevan un solo alelo recesivo de un gen que resulta en la pérdida de la habilidad de crecer en sustratos no fermentables.

Los símbolos ρ^+ , ρ^- y ρ^0 designan la presencia, mutación y ausencia, respectivamente, de DNA mitocondrial requerido para la síntesis de enzimas respiratorias (Sherman, 1962).

La mitocondria

Las mitocondrias son organelos presentes en todos los organismos eucariontes. Tienen un tamaño aproximado de 0.5-1 μm , su morfología es altamente variable y depende del estado metabólico y del ciclo celular. En células en división, este organelo puede cambiar entre una morfología fragmentada, ovoide a una reticular con múltiples ramificaciones. Estos cambios están controlados por proteínas implicadas en la fusión y fisión mitocondrial, así como por elementos del citoesqueleto, incluidos los filamentos de actina y microtúbulos (Pon y Schatz, 1991).

Cada mitocondria está formada por dos membranas altamente especializadas, la interna y la externa, las cuales están separadas por el espacio intermembranal. El espacio rodeado por la membrana interna se denomina matriz mitocondrial. La membrana externa contiene muchas porinas y es altamente permeable al paso de moléculas de 5 KDa o menos. Por otro lado, la membrana interna es impermeable, selectiva y altamente especializada. Se encuentra plegada y forma estructuras conocidas como crestas que se proyectan en la matriz mitocondrial. Esta membrana contiene proteínas con tres tipos de funciones: 1) aquellas que realizan las reacciones de oxidación en la cadena transportadora de electrones, 2) la ATP sintasa que sintetiza ATP en la matriz y 3) proteínas de transporte que permiten el paso de pequeñas moléculas que son metabolizadas o requeridas por las enzimas mitocondriales ubicadas en la matriz. A través de esta membrana, se genera un gradiente electroquímico de H^+ , responsable de llevar a cabo la síntesis de ATP, por lo que debe ser impermeable a iones y moléculas cargadas (Alberts et al., 2008).

Fosforilación oxidativa

Las mitocondrias permiten la existencia de un metabolismo aerobio, lo que implica que los organismos pueden oxidar completamente la glucosa. El piruvato generado en la glucólisis se importa a la mitocondria y se oxida por acción del oxígeno a CO_2 y H_2O . Esto

permite que se produzca 15 veces más ATP del que se generaría únicamente en la glucólisis (Alberts et al., 2008).

Casi toda la energía disponible del catabolismo de carbohidratos y grasas en sus primeras etapas de oxidación se guarda en la forma de electrones de alta energía a partir de sustratos como el NAD^+ y FAD. Estos electrones transportados por el NADH y el FADH_2 pasan por una serie de acarreadores en la membrana interna de la mitocondria que tienen gran afinidad para los electrones hasta ser transferidos al oxígeno. Este movimiento de electrones a través de la cadena respiratoria genera un gradiente electroquímico de protones el cual conduce a la síntesis de ATP (Alberts et al., 2008).

Cadena transportadora de electrones

La cadena respiratoria incluye cuatro grandes complejos enzimáticos embebidos en la membrana mitocondrial (Figura 3). Cada uno de estos complejos multiproteicos contiene varios grupos prostéticos que participan en el movimiento de electrones. Entre estos grupos están los grupos hemo de los citocromos que tienen átomos de hierro y los centros hierro-azufre. Por otro lado, están las ubiquinonas, los únicos acarreadores que no son el grupo prostético de una proteína (Alberts et al., 2008).

- **Complejo I: NADH-CoQ óxido-reductasa:** El complejo I es la enzima más grande y complicada de la cadena respiratoria. En mitocondrias de eucariontes, consta de 14 subunidades centrales que contienen los centros redox, los mono-nucleótidos de flavina (FMN) y hasta nueve conglomerados de hierro azufre; además contiene 32 subunidades adicionales. Este complejo transfiere los electrones del NADH y los pasa a través de una flavina y varios centros hierro-azufre a una ubiquinona. Esta actividad está ligada a la formación del potencial electroquímico en la membrana mitocondrial, se bombean cuatro protones por cada par de electrones. La ubiquinona después transfiere estos electrones al complejo III o citocromo $b-c_1$ (Brandt, 2006).
- **Complejo II: Succinato-CoQ óxido-reductasa.** La succinato deshidrogenasa, enzima que oxida una molécula de succinato a fumarato en el ciclo de Krebs, es un componente integral de este complejo. Los dos electrones liberados de la conversión de succinato a

fumarato se transfieren primero a FAD, luego a un centro hierro-azufre y finalmente a la CoQ. Este complejo no bombea protones.

- **Complejo III: Citocromo *b-c*₁ o complejo CoQH₂- Citocromo *c* óxido-reductasa.** Contiene al menos once diferentes cadenas polipeptídicas y funciona como un dímero. Tiene tres proteínas acarreadoras de electrones; el citocromo *b* que contiene dos grupos hemo *b* (*b_L* y *b_H*), el citocromo *c*₁ el cual contiene al grupo hemo *c*, y una proteína con un centro hierro-azufre. Este complejo transfiere dos electrones del ubiquinol (QH₂) generado en el complejo I o II a dos moléculas de citocromo *c* que difunden por el espacio intermembranal hacia el siguiente complejo, asimismo deposita dos protones del ubiquinol en el espacio intermembranal y trasloca dos protones adicionales de la matriz al espacio intermembranal por cada par de electrones transferidos. Es este complejo es en donde se lleva a cabo el ciclo Q que consta de la oxidación de dos moléculas de ubiquinol a ubiquinona y la posterior reducción de una molécula de ubiquinona para generar una molécula de ubiquinol. Un ciclo Q completo requiere que ocurran dos ciclos redox en la proteína hierro-azufre, en el citocromo *c*₁ y en los dos hemos del citocromo *b* (Trumpower, 1990).
- **Complejo IV: Citocromo *c* oxidasa.** También funciona como dímero y es el aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Esta enzima contiene dos grupos hemo tipo *a* (*a* y *a*₃) y tres iones de cobre, arreglados en dos centros de cobre, designados CuA y CuB. Un centro (*CuA/ CuA*) acepta electrones de la forma reducida del citocromo *c*. El hemo *a* acarrea electrones del centro *CuA/ CuA* y el hemo *a*₃ pasa electrones a *CuB*, que está adyacente y finalmente al O₂ para formar H₂O. El complejo acepta un electrón a la vez del citocromo *c* y pasa cuatro a la vez hacia el oxígeno. La reducción de una sola molécula de oxígeno requiere que la citocromo *c* oxidasa tome cuatro electrones y cuatro protones para hacer 2H₂O; adicionalmente se bombean cuatro protones (Mills y Ferguson-Miller, 2003).

Los citocromos, centros de hierro-azufre y átomos de cobre sólo pueden acarrear un electrón a la vez. Aun así, cada NADH dona dos electrones, y cada molécula de oxígeno debe recibir cuatro electrones para producir agua. Por lo tanto, existen varios puntos colectores y dispersores de electrones a lo largo de la cadena transportadora de electrones que coordina estos cambios, como la citocromo oxidasa (Alberts et al., 2008).

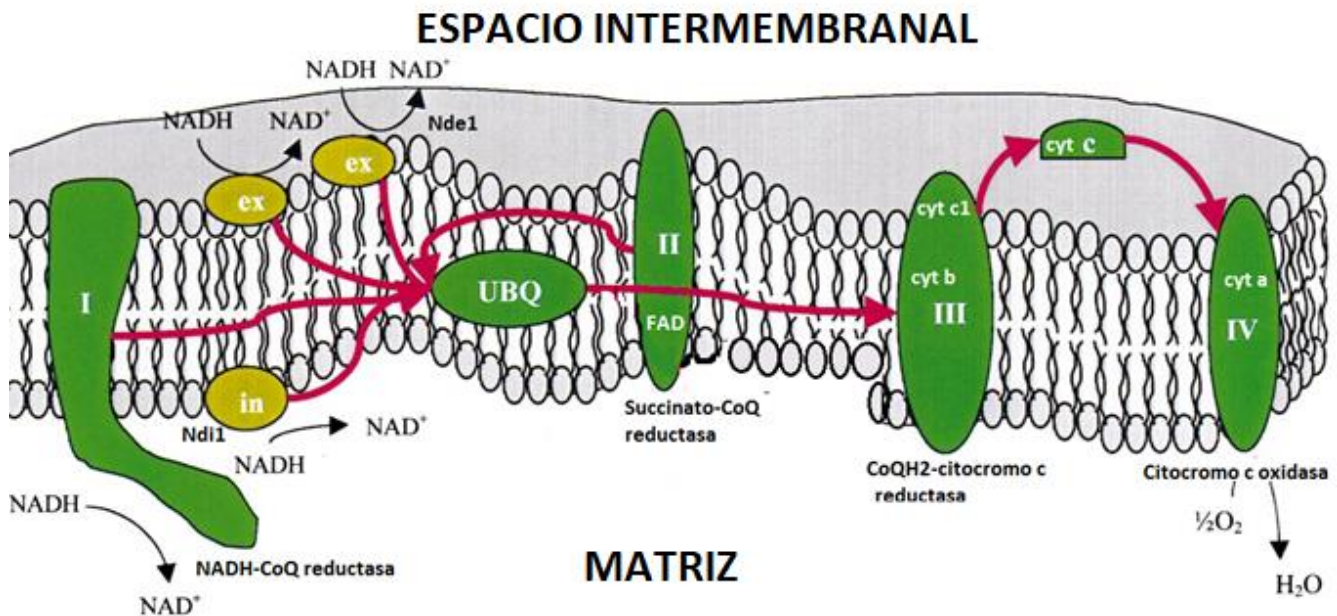


Figura 3: Cadena transportadora de electrones. Los electrones de la NADH o del succinato van a pasar por varios complejos y acarreadores que llevarán a cabo reacciones de oxido-reducción. El paso de los electrones (flechas rojas) producirá la liberación de protones al espacio intermembranal y finalmente serán aceptados por el oxígeno para formar agua. ex, NADH-CoQ óxido-reductasa externa; in, NADH-CoQ óxido-reductasa interna (Tomado y modificado de Horne et al, 2001).

La cadena respiratoria de *S. cerevisiae* difiere de la de mamíferos y otras especies de levadura en que no tiene complejo I. Presenta tres NADH deshidrogenasas alternas: una interna Ndi1p, que permite la entrada del NADH desde la matriz mitocondrial; y dos externas, Nde1p y Nde2p que permiten la entrada de electrones a la cadena respiratoria desde el espacio intermembranal (Horne et al, 2001). Las flavo enzimas presentes en estas NADH deshidrogenasas catalizan la misma reacción redox que el complejo I, pero no la acoplan al bombeo de protones o sodio al espacio intermembranal (Brandt, 2006).

Los citocromos

Los citocromos son proteínas que sufren de una rápida oxidación y reducción. Fueron descubiertos en 1925 y constituyen una familia que contienen un grupo hemo que consiste en un anillo de porfirina con un átomo de hierro unido rodeado de cuatro átomos de nitrógeno. Este átomo de hierro cambia del estado de oxidación Fe^{3+} (férrico, estado oxidado) a Fe^{2+} (ferroso, estado reducido) a cuando acepta un electrón (Lodish et al, 2003).

De acuerdo con el Subcomité de Nomenclatura de citocromos de la Unión Internacional Bioquímica existen cuatro tipos de citocromos que son clasificados con base en las características de su grupo prostético (Escamilla et al, 1985):

- a) Citocromo *c*, el grupo hemo está unido a las cisteínas de la cadena polipeptídica mediante un enlace covalente tiol éter (Trumpower, 1990)
- b) Citocromo *b*, su grupo prostético es un protohemo o un hemo análogo y está unido a la proteína por enlaces no covalentes a través de sus residuos de histidina (Trumpower, 1990).
- c) Citocromo *a*, sus grupos hemo poseen una cadena lateral formilo en la posición número 8 del tetrapirrol.
- d) Citocromo *d*, también conocido como citocromo a_2 contiene como grupo prostético un quelato tetrapirrónico de fierro en el que el grado de conjugación de los dobles enlaces en la porfirina es menor.

Los citocromos son designados por una letra minúscula que indica que el grupo prostético está en unión hemocromo, lo que significa que son compuestos de bajo spin en el estado reducido. Los citocromos de este tipo tienen espectros de absorción típicos de hemocromos, con bandas de absorción alfa y beta bien definidas en la región visible del espectro (500 a 600 nm) (Escamilla et al, 1985).

Las características especiales del grupo hemo han sido ampliamente aprovechadas en el estudio de la composición y cuantificación de citocromos presentes en los sistemas respiratorios. Cada tipo de hemo *a*, *b* o *c*, presenta hasta 3 bandas de absorción en el espectro visible; además el espectro del estado reducido es diferente al del estado oxidado lo que permite visualizar por espectrofotometría diferencial la reducción producida por determinados sustratos. Para estos estudios se requiere utilizar espectrofotómetros muy sensibles de haz partido o doble haz. En estos aparatos el rayo luminoso es enviado por dos caminos: a través de una celda de referencia que contendrá la preparación oxidada y a través de la celda problema que contendrá la preparación reducida por un sustrato fisiológico como NADH o un donador artificial de electrones como ditionita (Escamilla et al, 1985).

Los citocromos se pueden identificar por sus máximos de absorción, correspondiendo la primera cifra al pico alfa, la segunda al beta y la tercera al gamma: citocromo b_{555} (555, 526 y 427 nm) citocromo c_{548} (548, 521 y 416 nm) y citocromo aa_3 (602 y 443 nm) (Escamilla et al, 1985).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las levaduras se sabe que ante la presencia de feromonas se activa la vía apareamiento, en donde la subunidad $G\alpha$ de las proteínas G heterotriméricas intercambia GDP por GTP y se separa del dímero $G\beta\gamma$, el cual activa a los efectores río abajo. El dímero $G\beta\gamma$ siempre funciona como una sola unidad y hasta la fecha no hay reportes de que la subunidad $G\gamma$ tenga una función particular y aislada en levaduras, y su única función conocida involucra esta vía de señalización.

En el laboratorio, se encontró que la levadura mutante de la subunidad $G\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas tiene disminuido el crecimiento en un medio de cultivo respiratorio en el cual se emplea al glicerol como única fuente de carbono. Al comparar su crecimiento con la cepa silvestre, a la mutante le toma el triple del tiempo alcanzar una densidad óptica (600 nm) de 0.5. Debido a estas observaciones nos preguntamos por qué la mutante que carece de la subunidad $G\gamma$ tiene una deficiencia de crecimiento en glicerol.

V. OBJETIVOS

General:

Identificar las causas de la deficiencia de crecimiento en glicerol de la mutante de la subunidad $G\gamma$

Particulares:

- Determinar por qué la ausencia del gen que codifica para la subunidad $G\gamma$ produce una deficiencia de crecimiento en medios respiratorios.
- Determinar la capacidad de crecimiento de la mutante $\Delta G\gamma$ en distintas fuentes de carbono.
- Determinar la viabilidad de la mutante $\Delta G\gamma$ en glicerol.
- Identificar defectos mitocondriales en la mutante $\Delta G\gamma$.
- Evaluar la capacidad respiratoria y el contenido de citocromos de la mutante $\Delta G\gamma$.

VI. JUSTIFICACIÓN.

Con esta investigación se pretende aportar un nuevo conocimiento de la función de las proteínas G heterotriméricas en levadura, en particular del papel de la subunidad Gy en la utilización de fuentes de carbono no fermentables.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

- YPD: Medio rico para levaduras. Composición: extracto de levadura (1%), peptona (2%), glucosa (2%) y agar (2%).
- YPG: Medio rico aerobio. Composición: extracto de levadura (1%), peptona (2%), glicerol (3%) y agar (2%). Utilizado para inducir un metabolismo aerobio en la levadura ya que carece de una fuente de carbono fermentable.
- YPL: Medio rico aerobio. Composición: extracto de levadura (1%), peptona (%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.12%), KH_2PO_4 (0.1%), lactato (2%) y agar (2%). Utilizado para inducir un metabolismo aerobio en la levadura ya que carece de una fuente de carbono fermentable.
- LB: Medio de enriquecimiento para *Escherichia coli*. Composición: extracto de levadura (0.5%), NaCl (1%), bacto triptona (1%) y agar (2%). LB-ampicilina (100µg/ml): Usado para la selección de bacterias recombinantes.
- SD-Ura: Medio mínimo selectivo para selección de colonias de levadura transformadas con el plásmido pYES que tiene el marcador de auxotrofia URA3. Composición: extracto de levadura sin aminoácidos (0.67%), glucosa (2%), mezcla de aminoácidos y bases nitrogenadas sin uracilo (7%, bases nitrogenadas requeridas en una concentración 0.2% y 0.3% para Lys y Leu) y agar (2%).
- SD-leu: Medio mínimo selectivo para la mutante ΔGy ya que contiene un casete de leucina en el lugar donde se realizó la deleción del gen. Composición: es la misma que el medio SD-ura, pero en este caso se utiliza una mezcla de aminoácidos sin leucina.
- S-Rafinosa-Ura: Medio mínimo selectivo empleado para realizar la inducción con galactosa de los genes que están bajo el control del promotor de galactosa del vector pYES.

Cepas empleadas

- *Saccharomyces cerevisiae*

Cepa W303-1A. **Genotipo:** *MATa* {*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11, 15*} [*phi*⁺]

Cepa 70. **Genotipo:** *MATa* {*thr3, met1*}. Empleada para las pruebas de esterilidad de la mutante ΔGy ; cruza con la cepa W303.

- *Escherichia coli*

Cepa DH5 α . **Genotipo:** *dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 (hsdR17(rK-mK+)) supE44 thi-1 gyrA96 relA1*. Desarrollada para clonación, permite altas eficiencias en transformación. Se utilizó para la propagación de plásmidos y para producir DNA plasmídico para secuenciación.

Plásmidos

- pGEM T-Easy vector (Promega): Empleado para clonar y secuenciar productos de PCR.
- pYES vector (Invitrogen): Vector multicopia y de expresión para levaduras. Empleado para sobre-expresar el gen *Gy*. Tiene incorporado a *URA3* como marcador de auxotrofia.

Clonación del gen de la subunidad *Gy*, *STE18*

La región codificante del gen de la subunidad *Gy*, (*STE18* o *Gy*), ya se encontraba clonada en el vector pYES; por lo tanto, sólo se realizó el diseño de oligonucleótidos para clonar al gen *Gy* con su propio promotor.

Diseño de oligonucleótidos

A partir de la base de datos “*Saccharomyces* Genome Data Base”, se diseñó el oligo adecuado para clonar al gen *Gy*, con su promotor; es decir, se consideraron 1000 nucleótidos río arriba para el oligo “forward” (FWD). Ya se contaba con el oligo “reverse” (REV), tanto el silvestre como el que lleva una mutación en el residuo 107 del extremo carboxilo terminal, en el que se intercambia una cisteína por una serina. Esta mutación impide que la proteína de la subunidad *Gy* sufra modificaciones post-traduccionales

(farnesilación y palmitoilación) y por lo tanto sea incapaz de anclarse a la membrana plasmática.

Extracción de DNA genómico de S. cerevisiae

La extracción de DNA genómico se realizó de la cepa silvestre W303, por el método de fenol-cloroformo, tomado de Hoffman y Winston (*Gene*, 1987).

Programa de PCR

En esta técnica, desarrollada por Mullis, K. en 1983 (Mullis, K, 1986), se empleó la polimerasa Platinum *Pfx* de Invitrogen con una concentración 1.5 mM de MgSO₄. Esta enzima tiene una mayor fidelidad a comparación de la TAQ polimerasa ya que posee actividad de exonucleasa 3'→5'. Esta polimerasa deja extremos romos en los fragmentos amplificados por lo que, para clonar, fue necesario realizar una reacción de poli-adenilación con la TAQ polimerasa a 72°C por 30 min después de purificar el producto de PCR.

Programa de PCR:

- Desnaturalización inicial= 95°C / 5 min.
 - 30 ciclos:
 - *94°C / 30 seg.
 - * 55°C / 45 seg.
 - * 68°C / 1:20 min.
 - Extensión final= 68°C / 5 min.
 - Final= 4°C
- Longitud total del fragmento
amplificado:
G_y = 1330 nucleótidos

Purificación de las bandas de interés del gel de agarosa:

Después del PCR se separó la región amplificada mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1% y con amortiguador SB (Amortiguador de Borato de Sodio). La banda de interés se identificó al comparar el tamaño con el marcador molecular 1Kb Plus Ladder. El DNA amplificado se tiñó con GelRed (Biotium), un colorante fluorescente de ácidos nucleicos y se visualizó en un transiluminador (Maestro Gen MLB-16) mediante el uso de luz ultravioleta.

Las bandas con el tamaño adecuado se cortaron del gel de agarosa y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 µl para purificar el DNA con el protocolo Gene Clean Kit de MP

Biomedicals (Hoja técnica de MP Biomedicals GeneClean Kit), el cual se basa en el uso de “Glassmilk”, una matriz de sílice que une DNA y permite separarlo y posteriormente eluirlo.

Reacción de ligación

Como vector de clonación se usó al plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega). Es un plásmido multicopia que tiene un tamaño de 3015 pb; está linealizado y en cada extremo 3' terminal tiene una única timidina, lo cual tiene la ventaja de introducir de forma eficiente productos de PCR y prevenir la re-circularización del vector. El sitio múltiple de clonación se encuentra dentro de la región codificante del α -péptido de la enzima β -galactosidasa. De esta forma es sencillo identificar a las colonias recombinantes: si la colonia es azul significa que la bacteria se transformó con un vector al cual no se le insertó el gen de interés, por otro lado, si la colonia es blanca significa que la bacteria se transformó con un plásmido que probablemente tiene al gen de interés.

Para realizar la reacción de ligación se siguió el manual técnico de PROMEGA.

Transformación de E. coli

Las reacciones de ligación se incubaron a 4°C durante 18 hrs aproximadamente. Pasado este tiempo, se usaron para transformar células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli*. La transformación se realizó mediante un choque térmico: las células y la reacción de ligación se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 μ l; a continuación se incubaron en hielo durante 30 min; después de este tiempo se colocaron a 42°C durante 45 segundos, se regresaron a hielo, se les agregó medio LB y se dejaron incubar durante 1 hr a 37°C. Finalmente, se plaquearon de 90 a 100 μ l de células (procesadas a una D.O. de 0.5) en cajas con medio LB + ampicilina (100 μ g/ml) a las cuales previamente se les agregó 10 μ l de IPTG (0.4 M) y 40 μ l de X-GAL (2% en N, N-dimetil formamida). Se incubaron a 37°C durante 18 hrs. Se seleccionaron las colonias blancas de la placa.

Para realizar la transformación se siguió el manual técnico de PROMEGA.

Obtención del plásmido por minipreps

De las colonias blancas obtenidas en la transformación, se hicieron parches en nuevas cajas de medio LB + ampicilina, con el fin de obtener un mayor número de células de cada

colonia. Se dejó incubar a 37°C durante una noche. Pasado este tiempo se hicieron cultivos líquidos de cada parche en LB + ampicilina (100 µg/ml) y se dejaron a 37°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron 3 ml de medio de cada muestra en tubos eppendorf de 1.5 ml para precipitar las células y obtener la mayor cantidad de DNA posible.

Se realizaron dos protocolos distintos para la extracción del plásmido:

1. Primero se hizo un ensayo rápido llamado “miniprep de 10 minutos”; el cual se basa en la lisis de las bacterias con amortiguador TENS (Tris 10 mM, EDTA 7mM, NaOH 0.7N, 0.5% SDS) y precipitación del DNA plasmídico con etanol. Este procedimiento se realizó para obtener un primer vistazo del resultado de la transformación.
2. Después de obtener un resultado positivo de la digestión del miniprep rápido, con enzimas de restricción, se procedió a hacer un segundo miniprep de la misma colonia, pero ahora empleando el kit de QIAGEN. Este procedimiento se basa en la lisis alcalina de las células bacterianas seguido de la adsorción del DNA en membranas de sílice en presencia de una alta concentración de sal y su posterior elución con agua. El uso del kit permite obtener minipreps más limpios y elimina la necesidad de tratar las muestras con RNAasa, además de que se obtienen muestras adecuadas para secuenciar (QIAPrep Miniprep Handbook, 2015).

Transferencia del inserto del vector de clonación p-GEM al vector de expresión p-YES

Inicialmente se hizo un miniprep, con el kit de QIAGEN, del vector pYES. Posteriormente, para linealizarlo, se digirió con la misma enzima de restricción que se empleó para digerir al vector (pGEM T-easy) que contiene al gen de interés (37°C durante 1 hr). A continuación, la digestión, se trató con fosfatasa para eliminar los grupos fosfato de los extremos y así impedir que se vuelvan a unir entre ellos (37°C durante 2 hrs). En paralelo se digirió al vector pGEM T- easy que contiene al gen que se quiere ligar al vector de expresión.

Las digestiones se corrieron en un gel de electroforesis para separar las bandas de interés, las cuales se identificaron y recortaron de acuerdo con el tamaño esperado. Posteriormente se purificaron del gel de agarosa con el protocolo de Gene Clean, previamente descrito. Para ligar estos fragmentos, se empleó la ligasa T4 y se dejó la reacción en un baño a 16°C durante aproximadamente 18 horas. Con esta ligación se

transformó de nuevo a *E. coli* para obtener colonias con las cuales se realizaron nuevos minipreps y ensayos de restricción para comprobar que la ligación fue correcta y el inserto está dentro del vector. Como control de ligación se usó al vector pYES linealizado sin inserto.

Ensayos de restricción

Una vez aislados los plásmidos por minipreps, se procedió a realizar la digestión con las enzimas de restricción adecuadas de acuerdo con el tipo de vector y el inserto.

La digestión de los minipreps rápidos se realizó en 20 μ l con 3 o 5 μ l de plásmido, dependiendo de la concentración de la muestra. A los 10 minutos previos de terminar el tiempo de digestión se les agregó a las muestras 1 μ l de RNAasa 1:100 (stock 10 mg/ml). Los minipreps obtenidos del kit se digirieron en 10 μ l, usando 1 μ l de plásmido. Antes de digerirlos, estos minipreps se cuantificaron en el nanodrop (Thermo Scientific). Para las muestras que requerían digestiones dobles o triples, se buscó que los amortiguadores de cada enzima fueran compatibles.

Después de obtener los patrones esperados en los ensayos de restricción, las muestras se mandaron a secuenciar para comprobar que se tenía al gen deseado y que la secuencia se encontrara íntegra y sin mutaciones que pudieran alterar la función del gen.

Transformación de levaduras

Para transformar levaduras se siguió el protocolo de transformación por acetato de litio/PEG/DMSO (Adams et al., 1997) Primero se prepararon células competentes de las levaduras a ser transformadas: WT, $\Delta G\gamma$ (de la cepa W303). Posteriormente, en tubos eppendorf de 1.5 ml, se tomó 50 μ l de estas células a las cuales se les añadió 1-2 μ l de plásmido y 7 μ l de DNA de esperma de salmón (stock 7 μ g/ μ l). A continuación, a cada tubo se le agregó 300 μ l de la mezcla 1X de: PEG (800 μ l) /acetato de Li (100 μ l) / TE (100 μ l). Se aplicó un choque térmico a 42°C por 15 minutos. Se regresaron a hielo, se centrifugaron y finalmente se resuspendieron en agua para plaquearlas en medio SD-ura. Se incubaron a 30°C por 48 hrs. Se hicieron parches de algunas colonias resultantes para los ensayos de sobreexpresión por crecimiento en diluciones seriales.

Ensayo de apareamiento de la mutante $\Delta G\gamma$

El objetivo de este ensayo es evaluar la capacidad de las células para aparearse. Se aparean cepas haploides de sexos contrarios que se complementen genéticamente; en este caso la cepa 70 es MAT α , la W303-1A es MAT a. Como resultado del apareamiento se generan células diploides; la ausencia de diploides indicaría que al menos una de las cepas haploides empleadas es estéril (Adams et al., 1997).

Las cepas probadas en el apareamiento son la WT y la $\Delta G\gamma$ de la W303. A partir de glicerol, la cepa silvestre se estrió en medio YPD y la mutante $\Delta G\gamma$ en SD-leu (W303). Se incubaron a 30°C por 2-3 días. Se tomó una colonia de cada cepa y se cultivaron como pequeños parches, en medio rico YPD sólido por 24 hrs a 30°C.

La cepa 70, contra la que se realizó el apareamiento, primero se cultivó a partir de un glicerol en medio YPD líquido y se estrió en una placa Petri con YPD para obtener colonias. Se seleccionó una colonia y se hizo un overnight en medio YPD líquido. De este cultivo se tomaron 150 μ l para hacer un césped en una nueva caja de YPD y se dejó crecer a 30°C por 24 hrs.

Una vez que han crecido tanto los parches como el césped se procede a realizar el apareamiento. Para esto, los cultivos se replicaron en terciopelos y se incubaron en YPD a 30°C durante 6 horas. Después de este tiempo se pasaron a una caja de medio mínimo SD y se incubaron a 30°C durante 48 hrs para recuperar las células diploides. Pasado el tiempo se tomaron fotografías de las placas (Adams et al., 1997).

Ensayos de crecimiento en diluciones seriales

Este ensayo se realizó para ver el crecimiento en glicerol (medio YPG al 2 y 3%) de la WT y la $\Delta G\gamma$ y para ver el efecto de la complementación de la mutante $\Delta G\gamma$ ya sea con el gen silvestre ($G\gamma$ o $STE18$) o mutado ($G\gamma^{C107S}$ o $STE18^{C107S}$). Como control de crecimiento se empleó una mutante WT ρ^0 , la cual al carecer de genoma mitocondrial es incapaz de crecer en un medio respiratorio.

Una vez establecidos los cultivos, se tomó una colonia de cada cepa y se sembró en medio YPD líquido durante aproximadamente 18 horas. A continuación, a cada cultivo se le midió la densidad óptica en el espectrofotómetro (λ 600 nm) y se ajustó con medio YPG a una D.O de 0.5 (Dilución 1). De esta dilución se realizaron diluciones seriales 1:10 hasta tener 5. Esto se hizo en una caja multiwell de 96 pozos. Posteriormente se pipetearon 3 μ l de las diluciones realizadas en placas de YPG y YPD (control).

- Inducción con galactosa

Para ver el crecimiento de las cepas transformadas con el gen *Gy* sin su propio promotor insertado en el vector pYES, se dejó el overnight en medio S-rafinosa-ura. Al día siguiente, se ajustó la densidad óptica a 0.5 en un tubo de 5 ml con el mismo medio + 2% de galactosa (solución madre 10%). Se dejó incubar en el rotor a 30°C por 3 horas. Pasado el tiempo, se ajustó de nuevo la D.O. a 0.5 si se van a diluciones seriales o a 0.05 para hacer curvas de crecimiento.

Curvas de crecimiento

Se empleó un lector de placas automatizado BioScreen.

Para analizar el crecimiento en YPG se preparó un overnight (cultivo en medio líquido que se deja de 12 a 16 hrs) de cada cultivo con sus respectivos controles en medio YPD líquido o SD-Ura líquido. Pasado el tiempo del cultivo, a cada uno se le ajustó, en tubos eppendorf de 1.5, la densidad óptica a 0.05 con YPG. A continuación, se pipeteó por cada mutante (y los controles) 200 μ l (repetidos 4 veces) en una caja de 100 pozos especial para el espectrofotómetro. El ensayo se dejó 72hrs y se realizaron mediciones automatizadas cada 30 minutos. Los datos se extrajeron en formato de una hoja de Excel para ser analizados.

Prueba de viabilidad con FUN1

FUN1 (Molecular Probes) es un colorante vital verde que permite determinar la actividad metabólica de células fúngicas por microscopía de fluorescencia. Sólo las células metabólicamente activas transportan el colorante a la vacuola en donde el pH es ácido, por lo que cambia su color a rojo-naranja y forma estructuras intra-vacuolares cilíndricas con movimiento libre que pueden detectarse cuando las células se excitan a una longitud de onda

de 470-590 nm. En cambio, las células muertas o con poca actividad metabólica, muestran una tinción verde-amarilla extremadamente brillante, difusa y carecen de cuerpos intravacuolares (Probes for Yeast Viability, Product information, 2001).

Para realizar esta prueba, inicialmente se dejaron cultivos en 5 ml de YPD por 18 hrs a 30°C de la WT, la ΔGy y de la WT rho0 (cepa rho0 generada por tratamiento con bromuro de etidio). Se lavaron con amortiguador HEPES (0.1 M pH 7.2) para eliminar la glucosa presente en el medio y se ajustó la D.O (600 nm) a 0.1 con 5 ml de medio YPG (2 y 3%) y YPD (control). Se dejó a 30 °C por aproximadamente 16 hrs. Pasado el tiempo de incubación, se tomó el volumen necesario para tener una D.O. de 0.8 en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se lavaron las células con PBS 1X y a la pastilla se le agregó:

- 190-196 μ l de amortiguador glucosa-HEPES (2% glucosa y HEPES 10 mM)
- 5 μ l de calcofluor (opcional, para teñir la pared celular)
- 4 μ l de colorante FUN1 200 μ M

Para los controles negativos, de cada cepa, la pastilla se resuspendió en amortiguador PBS 1X y se calentó por 10 minutos a 92°C. Pasado el tiempo, se procedió a realizar la tinción con calcofluor y FUN1 como se menciona anteriormente.

A continuación, las células se incubaron con agitación ligera (300 rpm) y en la oscuridad a 35°C por 20 min. Después, se lavaron con PBS 1X y se resuspendieron en 200 μ l de amortiguador HEPES-glucosa y se incubaron de nuevo a 35°C por 15 min. Pasado el tiempo, se pueden lavar de nuevo las células con PBS 1X para concentrarlas o se pueden ver directamente en el microscopio.

Para visualizar las células, se empleó un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS (BX51) a un aumento de 100X (inmersión) con el filtro de excitación de luz azul WB y se tomaron fotografías de al menos 15 campos (claros y con fluorescencia) de cada levadura mediante el programa QCapture Pro 6.0 (QImaging Digital Camera 6.2.1.6).

Para determinar la viabilidad, se revisó cada campo y se contaron las células vivas y muertas con el programa ImageJ 1.51J. Finalmente se graficó el promedio del porcentaje de células vivas de cada cepa y tratamiento empleando el programa GraphPad Prism 6.01.

Observación de DNA mitocondrial

Para ver la morfología de las mitocondrias y comprobar que la mutante ΔGy tiene genoma mitocondrial, se realizó una tinción con MitoTracker (Red FM Thermo Fisher Scientific) y DAPI (Sigma Aldrich).

MitoTracker es un colorante rojo fluorescente (excitación/emisión $\approx 581/644$ nm) que tiñe mitocondrias en células vivas, difunde de forma pasiva y su acumulación depende del potencial de membrana (Thermo Fisher Scientific, Product Information, 2008). Por su parte, DAPI es un colorante azul fluorescente (excitación/ emisión del complejo con DNA $\approx 364/454$ nm) que tiñe ácidos nucleicos, preferentemente DNA de doble cadena. Este colorante se une a agrupaciones de AT en el surco menor del DNA, quedando 1 molécula de DAPI por cada 3 pares de bases (Sigma-Aldrich, Product Information).

Para realizar la tinción de las células, se dejaron cultivos en 5 ml de YPD por 16-18 hrs a 30°C de la WT, ΔGy y de la WT ρ^0 (control, cepa ρ^0 generada por tratamiento con bromuro de etidio). Al día siguiente se les ajustó la D.O (600 nm) a 0.2 y se dejaron crecer de 3-4 hrs hasta alcanzar una D.O de 0.5. Una vez alcanzada la D.O se pasó 1 ml de cultivo a un tubo eppendorf y se lavaron las células de 3-4 veces con PBS 1X para eliminar el medio de cultivo el cual presenta ligera fluorescencia. A continuación, las células se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X y se les agregó 1 μ l de MitoTracker (50 μ M). Se dejaron incubando en oscuridad por 15 min a 30°C. Pasado el tiempo, se lavaron 3 veces con PBS 1X, se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X y se tiñeron con 1 μ l de DAPI (1 mg/ml). Se dejaron incubando por 5 min en oscuridad y a temperatura ambiente y de nuevo se lavaron 3 veces con PBS 1X y se resuspendieron en 20 μ l de amortiguador para visualizarlas al microscopio de fluorescencia.

Para visualizar las células, se utilizó un microscopio de fluorescencia OLYMPUS (BX51) a un aumento de 100X (inmersión). Primero se observó la tinción con MitoTracker ($\approx 581/644$ nm), debido a que es menos estable, con el filtro de excitación con luz verde WG y posteriormente se observó el DNA mitocondrial teñido con DAPI (340-488 nm) con el filtro WU de excitación UV. Finalmente se observó el campo claro. Se tomaron fotografías de al

menos 10 campos (claros y con fluorescencia) de cada levadura mediante el programa QCapture Pro 6.0 (QImaging Digital Camera 6.2.1.6).

Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ 1.51J.

Respiración

Oximetría en células completas

Se realizó un cultivo de la WT y la mutante ΔGy en 500 ml de YPD el cual se incubó durante 24 hrs con agitación constante a 30°C. Concluido el tiempo de incubación, las células se centrifugaron y se resuspendieron en 250 ml de agua destilada estéril. A continuación, se dejaron incubando de nuevo de 16-18 hrs con agitación constante a 30°C. Al finalizar el tiempo, las células se centrifugaron y la pastilla se pesó para ver la cantidad (g) de células obtenidas. De acuerdo con el peso obtenido, la pastilla se resuspendió adicionando la misma cantidad de agua (en ml). Se dejaron en hielo.

Las mediciones se realizaron en un monitor de oxígeno YSI (Yellow Springs Instrument, USA), modelo 5300 (Biological Oxygen Monitor). Se empleó un multímetro Steren (MUL 600) y un electrodo de oxígeno de plata/platino inmerso en una cámara de 5 ml con agitación magnética (Agitador Cole Parmer) y temperatura constante de 30°C controlada por un baño HAAKE FE2. Los trazos se registraron en el programa MUL-600, versión 2.0.

Las reacciones se llevaron a cabo en medio MES-TEA pH 6, 0.1M ([final]=10 mM). Como sustrato respiratorio se usó glucosa 1M ([final]=20 mM), glicerol 1M ([final]=20 mM) y 3 μ l de etanol al 96%. Al medio MES-TEA se le agregó 100 μ l de la suspensión de células para obtener una curva de respiración basal. Posteriormente se realizaron mediciones con cada uno de los sustratos (glucosa, glicerol y etanol). Para cada sustrato se realizaron nuevas curvas de respiración en donde se usó CCCP como desacoplante (2 μ l, 10 mM), para comprobar que las mitocondrias están intactas y acopladas.

Cuantificación de citocromos

Aislamiento de mitocondrias

Este experimento se realizó en la WT y la ΔGy de la cepa W303. De ambas cepas se hicieron cultivos frescos en medio sólido YPD y SD-leu para la mutante. De estos cultivos, con cada colonia aislada se realizaron parches en otras cajas. Con estos parches se dejó un precultivo en 100 ml de medio YPD líquido. El precultivo se incubó a 30°C con agitación constante por 24 hrs. Pasado ese tiempo, el volumen total de cada precultivo se inoculó en 1 L de medio YPG (3%), YPL o YPD y se dejó incubar con agitación constante, por 24-hrs a los cultivos en YPD y por 48 hrs a los cultivos en YPG y YPL. Por cada cepa se hicieron 2 L de cultivo.

Se cosecharon los cultivos centrifugando a 5 mil rpm por 5 minutos en una centrífuga Beckman con el rotor JA-14 a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en agua destilada con ayuda de una varilla de vidrio. Se juntaron las levaduras obtenidas en 2 frascos de 250 ml y se centrifugaron a 4 mil rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en el amortiguador de extracción frío con albúmina al 0.1% (Manitol 0.6 M, MES 5 mM, pH 6.8 ajustado con TEA).

Se rompieron las células empleando un homogenizador (Bead-Beater Biospec Products, USA) con perlas de vidrio (0.45 mm) previamente lavadas con el amortiguador de extracción y luego con el amortiguador de extracción con albúmina. Las levaduras se pusieron en la cámara con perlas y se colocó una camisa de hielo para mantener todo frío. Se aplicaron tres pulsos de 20 segundos con 40 segundos de reposo entre cada pulso para homogenizar (Uribe et al, 1985). Se vertió el homogenizado en un vaso de precipitados frío y se lavó varias veces la cámara con amortiguador con albúmina para obtener la mayor cantidad posible. Con el homogenizado se llenaron 6 tubos de 50 ml para centrífuga.

Las mitocondrias se aislaron por centrifugación diferencial (Peña et al, 1977): se centrifugaron los tubos a 3 mil rpm por 5 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes en tubos limpios y se volvieron a centrifugar a 9500 rpm por 10 minutos. Se desecharon los sobrenadantes y con ayuda de un pincel y un poco de amortiguador de extracción se resuspendieron las pastillas (usualmente con una coloración rojiza). Se concentraron todos

los volúmenes en un solo tubo y se agregó un poco de amortiguador de extracción para completar 40 ml aprox. Se centrifugaron a 5500 rpm por 5 min. Se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y se volvió a centrifugar a 12000 rpm por 15 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla que contiene a las mitocondrias con 500 μ l aproximadamente, de amortiguador de extracción y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml. Todo el proceso se lleva a cabo en frío, el amortiguador usado es con albúmina al 0.1% y las centrifugaciones se realizan en una centrífuga Beckman con el rotor JA25.5.

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Biuret en un espectrofotómetro Beckman DU-50 a una longitud de onda de 540 nm. La interacción de los iones de Cu^{2+} del reactivo de Biuret con los pares de electrones no compartidos del nitrógeno de los enlaces peptídicos genera un cambio en la coloración, de azul a violeta. Existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas de la muestra, que se traduce en un cambio en la absorbancia (Gornall *et al*, 1949).

Para hacer la determinación, a 2ml de reactivo Biuret se le añadieron 125 μ l de desoxicolato de sodio (DOC) al 1%, 350 μ l de agua destilada y 25 μ l de la suspensión de mitocondrias. Se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó un blanco sin mitocondrias para calibrar el equipo.

La absorbancia obtenida de cada muestra se multiplica por 400, que es la cantidad de nano átomos gramo de oxígeno por ml de agua. Esa cantidad se le divide al producto de la concentración de proteínas requerida por 1000 (en este caso 2.5×1000). Este resultado nos dice la cantidad necesaria a tomar de la suspensión de mitocondrias para tener 2.5 mg/ml de proteína.

Espectros diferenciales

El contenido de citocromos en mitocondrias aisladas se determinó mediante la obtención de espectros diferenciales. Se realizó un barrido de 500 nm a 680 nm en un espectrofotómetro Olis Clarity VF UV/VIS (Olis Inc. Bogart, GA, EUA) con las siguientes especificaciones: modo Split; número de incrementos: 600; lecturas por dato: 15; Slits: 2 nm; cambio de lámpara a 300; ancho de banda: 8 nm.

Para obtener los espectros basales, se preparó por duplicado 350 μ l de una mezcla con 2.5 mg/ml de mitocondrias en el amortiguador MES-Manitol y se agitó en el vortex durante 1 minuto. A un tubo se le puso 10 μ l de APS (persulfato de amonio) (espectro oxidado) y al otro un poco de ditionita (hidrosulfito de sodio) (espectro reducido), se agitaron suavemente por inversión. Antes de medir las muestras, se puso un blanco con tinta china a una dilución de 1:10000.

Para obtener el espectro diferencial, al espectro reducido se le resta el espectro oxidado (Nicholls & Ferguson 2013; Escamilla et al, 1985). El contenido de citocromos por mg de proteína se calculó utilizando los siguientes coeficientes de extinción molar: citocromos a+a₃, $\Delta\epsilon_{605-630 \text{ nm}} = 16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; citocromo b, $\Delta\epsilon_{563-577 \text{ nm}} = 25.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; citocromo c+c₁, $\Delta\epsilon_{550-540 \text{ nm}} = 19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (*Methods in Enzimology* Vol 18).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism (Versión 6.01 para Windows, GraphPad Software, Inc. San Diego California, USA).

El promedio del porcentaje de viabilidad \pm S.E.M. en la prueba de FUN1 se analizó mediante una ANOVA de 2 vías (factor 1: cepa, WT o Δ Gy; factor 2: Tiempo y medio de cultivo), empleando una significancia de $p < 0.01$. Esta prueba se empleó para evaluar el efecto del medio de cultivo y el tiempo en el crecimiento de cada cepa. Posterior a un ANOVA significativo se aplicó la prueba *post hoc* de Bonferroni para las comparaciones múltiples. Se empleó una significancia de $p < 0.01$. Esto nos permitió ver la significancia de cada posible combinación de tratamientos. Se graficó el promedio del porcentaje \pm S.E.M.

VIII. RESULTADOS

La mutante $\Delta G\gamma$ es estéril

Este ensayo se realizó para evaluar la capacidad de apareamiento de la mutante $\Delta G\gamma$. La mutante $\Delta G\gamma$ es estéril debido a que la subunidad $G\beta$ es incapaz de localizarse en la membrana y formar el dímero con $G\gamma$, lo cual es necesario para activar la señal de apareamiento en respuesta a feromonas. Debido a que se trabajará con la mutante $\Delta G\gamma$, el ensayo de apareamiento permite comprobar el fenotipo de esterilidad de esta cepa y asegura que se esté trabajando con un cultivo adecuado.

Se comprobó la esterilidad de la $\Delta G\gamma$ (W303-1A, Mat α) por apareamiento con la cepa 70 (Mat α). Como resultado del apareamiento, la mutante $\Delta G\gamma$ fue incapaz de generar individuos diploides al contrario de la cepa silvestre (Figura 4).

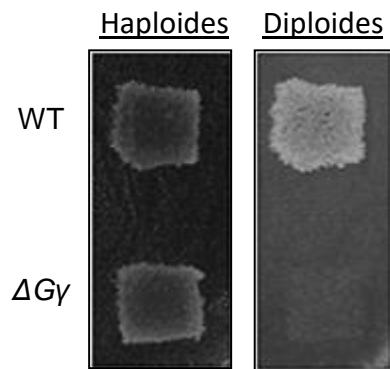


Figura 4: Ensayo de apareamiento de la cepa W303 (WT y $\Delta G\gamma$) con la cepa 70. Los parches del panel izquierdo representan los cultivos de las levaduras haploides, realizados antes del apareamiento en medio rico YPD. En el panel derecho se presentan las células diploides resultantes del apareamiento con la cepa 70. Seleccionadas en medio mínimo SD

La deficiencia de crecimiento en glicerol está relacionada con la ausencia del gen $G\gamma$

En este ensayo se comparó el crecimiento en glicerol (medio YPG al 2 y 3%) de la WT y la $\Delta G\gamma$ y se observó el efecto de la complementación de la mutante $\Delta G\gamma$ con el gen silvestre $G\gamma$ o con el gen mutado (cambio de una cisteína por una serina en el residuo 107) $G\gamma^{C107S}$.

En los ensayos de crecimiento en diluciones seriales, se encontró que la mutante $\Delta G\gamma$ crece más lento comparada con la cepa silvestre y con la mutante $\Delta G\beta$ al cultivarse en un medio aerobio con glicerol (3% y 2%) como única fuente de carbono (Figura 5A). Esto se confirmó con las curvas de crecimiento en medio YPG realizadas en el espectrofotómetro de placas (Figura 5B).

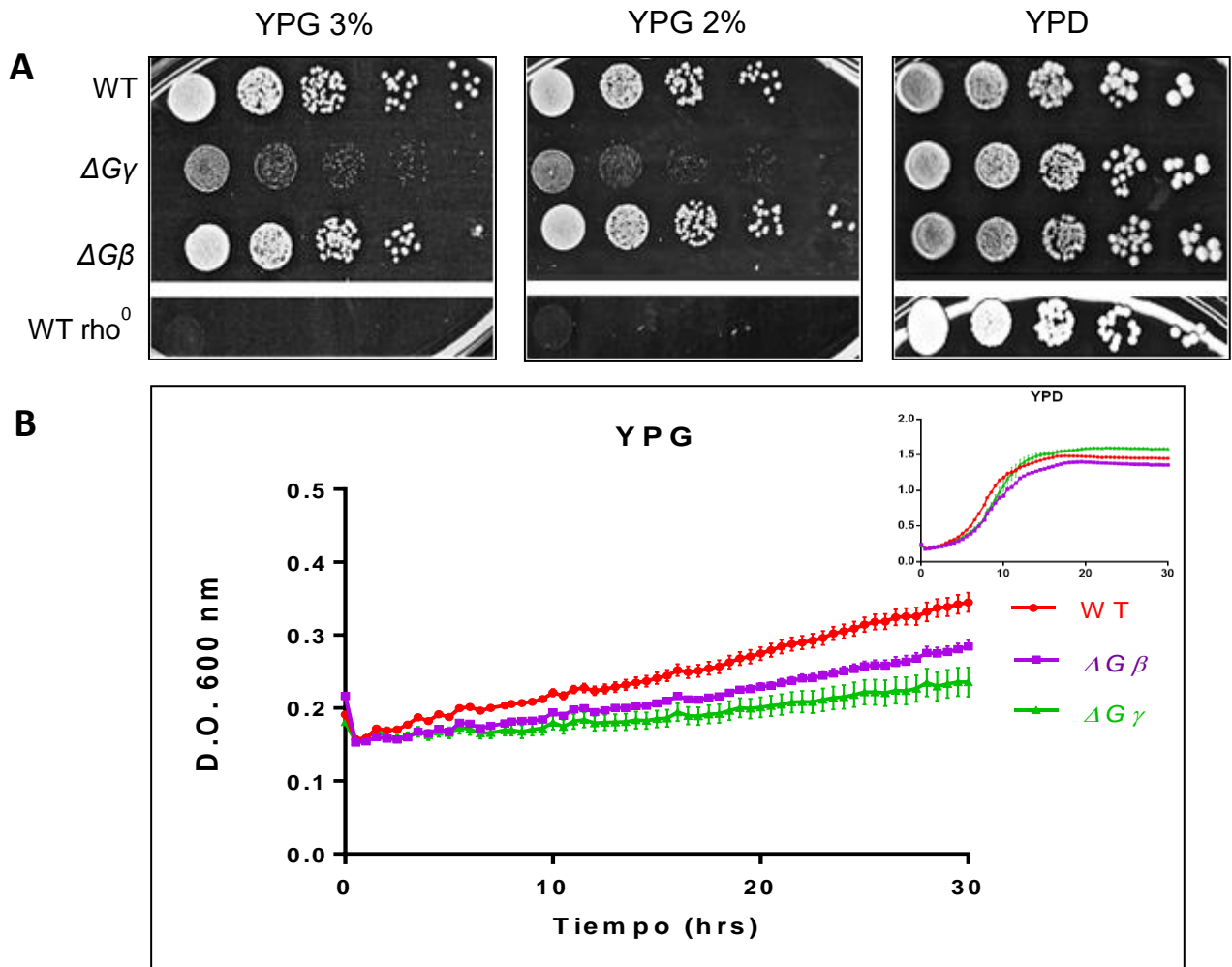


Figura 5: Crecimiento de la mutante $\Delta G\gamma$ en glicerol. (A) Ensayo de crecimiento en diluciones seriales en medio YPG 3% y 2%. Se empleó a la WT rho⁰ como control negativo de crecimiento ya que es incapaz de respirar. La densidad óptica inicial (600 nm) fue de 0.5. Las células se cultivaron a 30°C por 48 hrs. (B) Curvas de crecimiento en YPD y YPG de la WT, $\Delta G\gamma$ y la $\Delta G\beta$. La gráfica insertada a la derecha muestra el crecimiento en YPD. En la gráfica principal se observa la deficiencia de la $\Delta G\gamma$ para crecer en medio con glicerol. La curva roja pertenece a la cepa silvestre, la morada a la mutante $\Delta G\beta$ y la verde a la mutante $\Delta G\gamma$. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica (600 nm) de 0.05. Las células se cultivaron a 30°C. Se grafica el promedio \pm SEM.

En los ensayos de diluciones seriales y en las curvas de crecimiento en medio YPG (2 y 3%) se observó que la mutante $\Delta G\gamma$ recupera el crecimiento y presenta un comportamiento muy similar a la silvestre cuando se le expresa el gen $G\gamma$ silvestre y mutado $G\gamma^{C107S}$ (Figura 6). La recuperación de crecimiento se observó tanto en las transformantes en las que el gen se induce con el promotor de galactosa (Figuras 6) como en las que el gen se regula por su propio promotor (Figura 7); sin embargo, es más clara cuando se sobre-expresa con el promotor de galactosa (Figura 6).

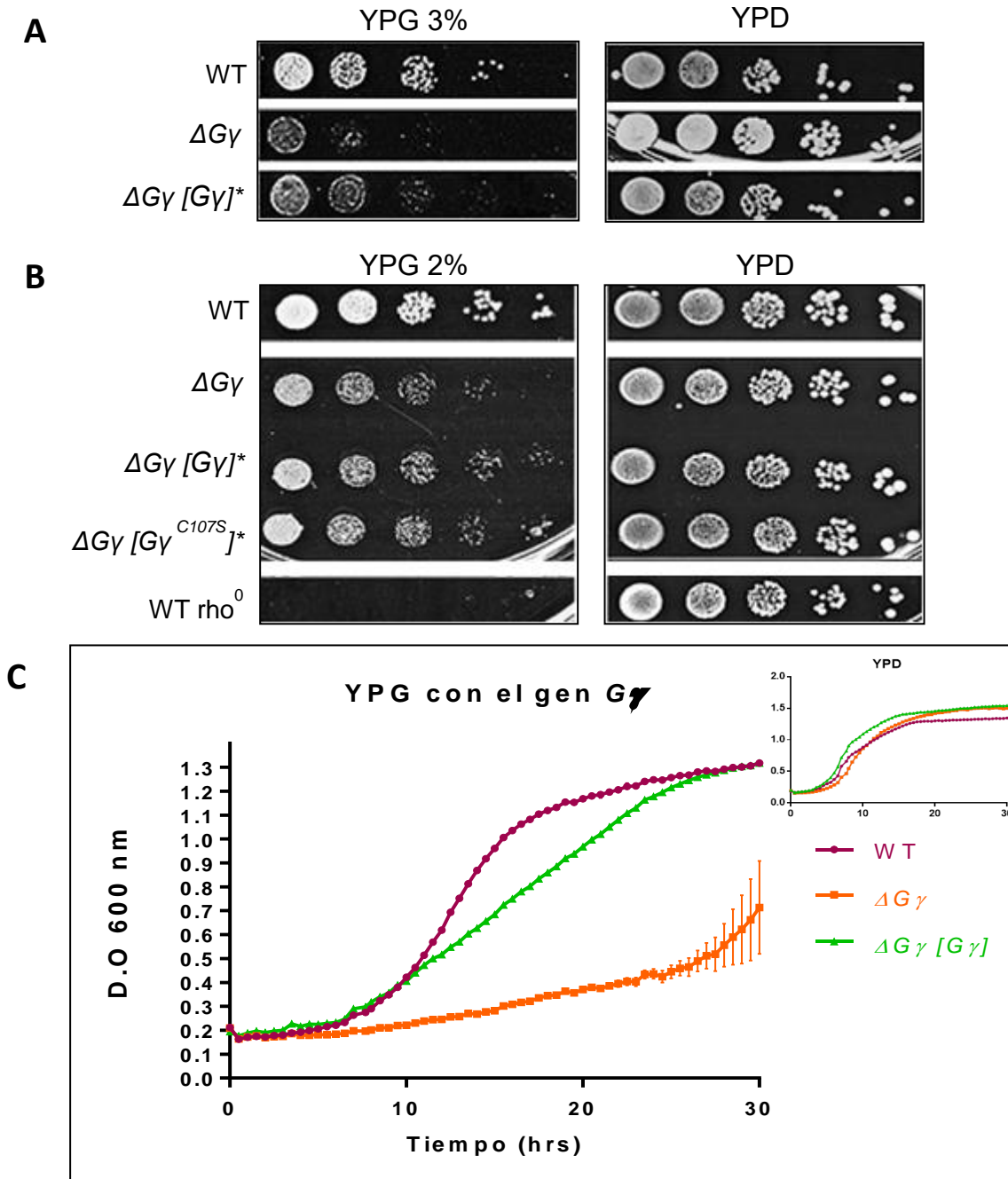


Figura 6: Crecimiento de la mutante con el gen Gy sobre-expresado e inducido por el promotor de galactosa. (A) Ensayo de crecimiento en diluciones seriales en medio YPG 3% de la WT y la ΔGy transformada con su gen *silvestre* Gy. (B) Ensayo de crecimiento en diluciones seriales en medio YPG 2% de la WT y la ΔGy transformada con su gen silvestre Gy y mutado Gy^{C107S} . *Gen inducido por el promotor de galactosa. La densidad óptica inicial (600 nm) fue de 0.5. Las células se cultivaron a 30°C por 48 hrs. (C) Curvas de crecimiento de la WT y la ΔGy con el gen Gy en medio YPD y YPG. La gráfica insertada a la derecha muestra el crecimiento en YPD. En la gráfica principal se observa la recuperación del crecimiento de la mutante ΔGy transformada con el gen silvestre Gy inducido por el promotor de galactosa. La curva roja pertenece a la cepa silvestre, la naranja a la mutante ΔGy y la verde a la mutante ΔGy con el gen Gy. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica (600 nm) de 0.05. Las células se cultivaron a 30°C. Se grafica el promedio \pm SEM.

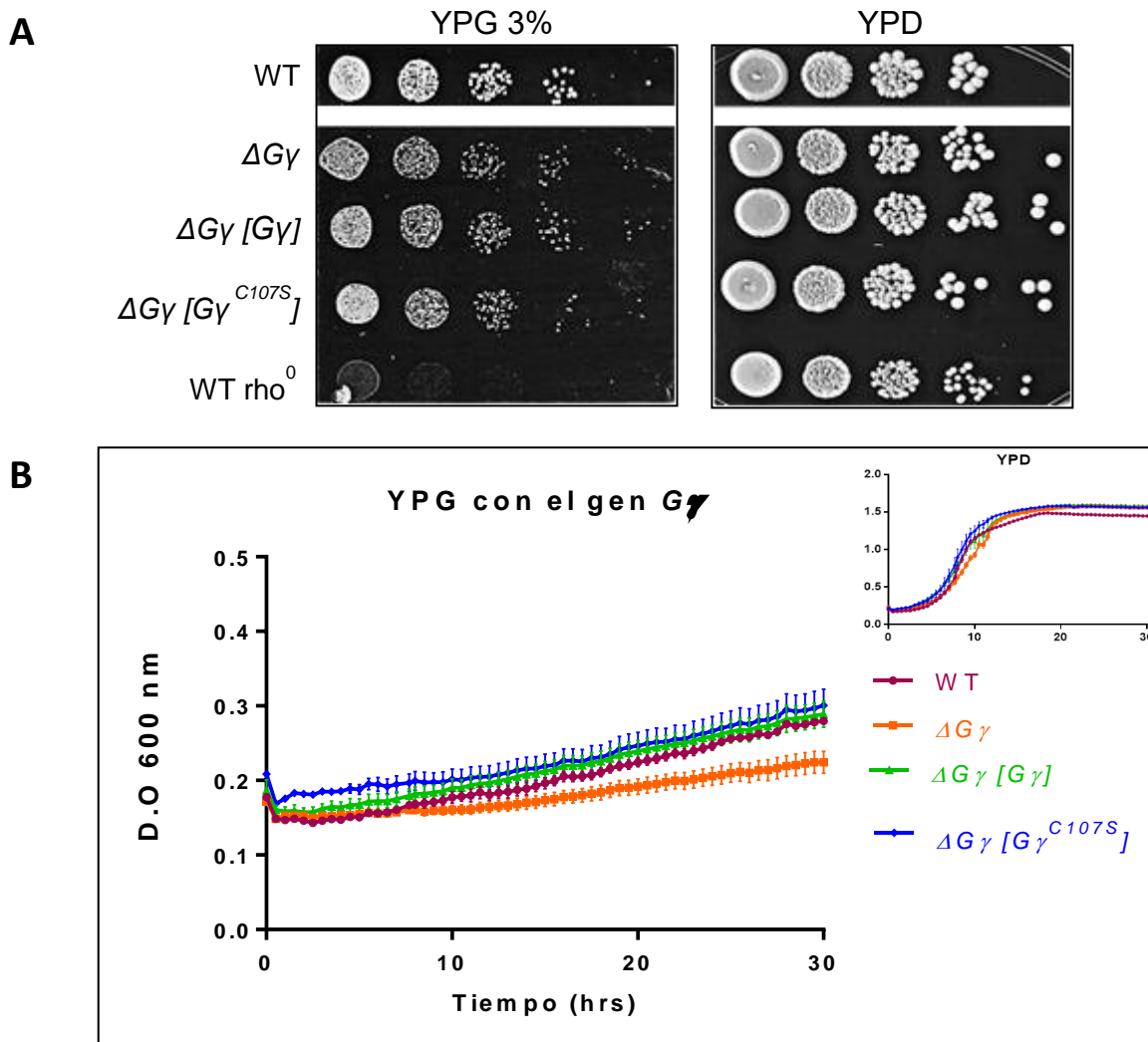


Figura 7: Crecimiento de la mutante con el gen Gy expresado y regulado por su propio promotor. (A) Ensayo de crecimiento en diluciones seriales en medio YPG 3% de la WT y la ΔGy

transformada con el gen silvestre $G\gamma$ y con el gen mutado $G\gamma^{C107S}$. La densidad óptica inicial (600 nm) fue de 0.5. Las células se cultivaron a 30°C por 48 hrs. (B) Curvas de crecimiento de la WT y la $\Delta G\gamma$ con el gen $G\gamma$ silvestre y mutado $G\gamma^{C107S}$. La gráfica insertada a la derecha muestra el crecimiento en YPD. En la gráfica principal se observa la recuperación del crecimiento de la mutante $\Delta G\gamma$ transformada con el gen silvestre $G\gamma$ y con el gen $G\gamma$ mutado. La curva roja pertenece a la cepa silvestre, la naranja a la mutante $\Delta G\gamma$, la verde a la mutante $\Delta G\gamma$ con el gen $G\gamma$ silvestre y la azul a la mutante $\Delta G\gamma$ con el gen $G\gamma$. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica (600 nm) de 0.05. Las células se cultivaron a 30°C. Se grafica el promedio \pm SEM.

Estos resultados confirman que la deficiencia de crecimiento en glicerol está relacionada con la ausencia del gen $G\gamma$. La mutación del gen $G\gamma$ ($G\gamma^{C107S}$) impide que la proteína se farnesile y por lo tanto sea incapaz de anclarse en la membrana plasmática. Este gen mutado se usó para ver si la recuperación de la deficiencia de crecimiento en glicerol depende de la localización de la proteína $G\gamma$. El comportamiento de las células con el gen mutante y con el gen silvestre es muy similar, por lo tanto, la deficiencia de crecimiento en glicerol es independiente de la localización de la subunidad $G\gamma$.

La mutante $\Delta G\gamma$ tiene una deficiencia de crecimiento en lactato

Debido a la deficiencia de crecimiento que presentó la mutante $\Delta G\gamma$ en glicerol, se utilizó un medio respiratorio con lactato como única fuente de carbono. En los ensayos de diluciones seriales en lactato se observó una deficiencia de crecimiento de la mutante $\Delta G\gamma$, aunque la diferencia con la cepa silvestre es moderada (Figura 8A). Por esta razón, la complementación con el gen silvestre y mutado de $G\gamma$ no parece tener efectos visibles (Figura 9A).

En lactato, las curvas de la WT, $\Delta G\gamma$ y la $\Delta G\beta$ son muy similares (Figura 8B); lo cual no concuerda con lo observado en los ensayos de diluciones seriales. Además, es difícil ver el efecto de la complementación con el gen silvestre y mutado de $G\gamma$ (Figura 9B). Cuando solo se grafican las primeras 10 horas, se puede apreciar más claramente que la mutante $\Delta G\gamma$ crece menos que la cepa silvestre y la $\Delta G\beta$ (Figura 8C).

Estos resultados indican que en lactato la $\Delta G\gamma$ presenta una deficiencia en su crecimiento, la que se observa claramente en los ensayos de diluciones seriales y en las

curvas de crecimiento se aprecia una diferencia moderada a las 15 hrs. Sin embargo, la complementación con el gen *G γ* no parece tener efectos visibles.

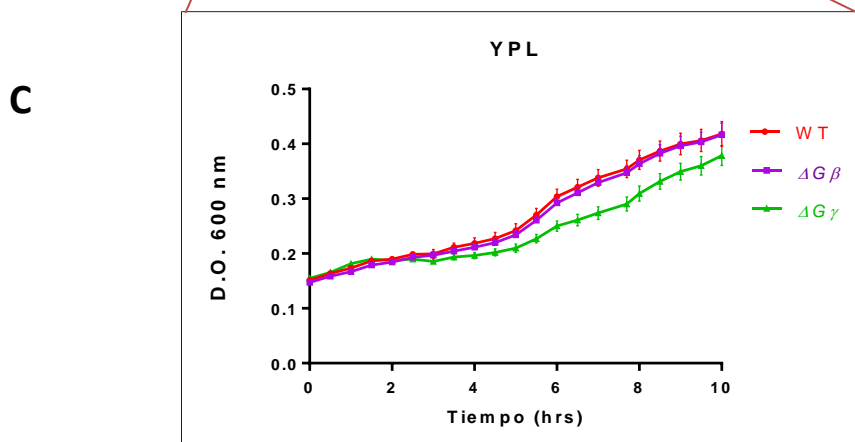
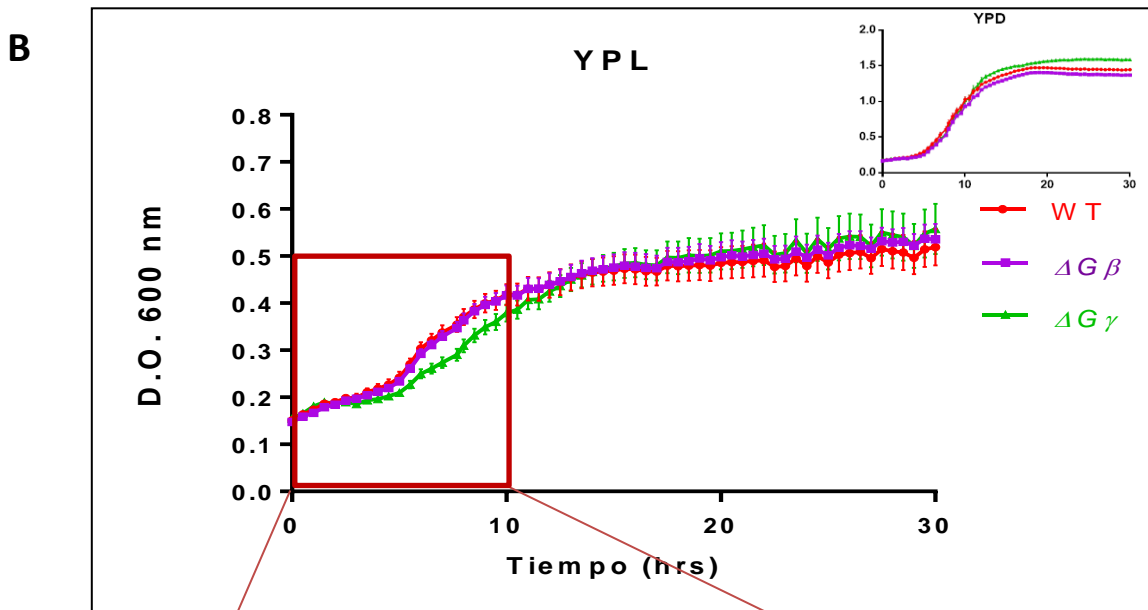
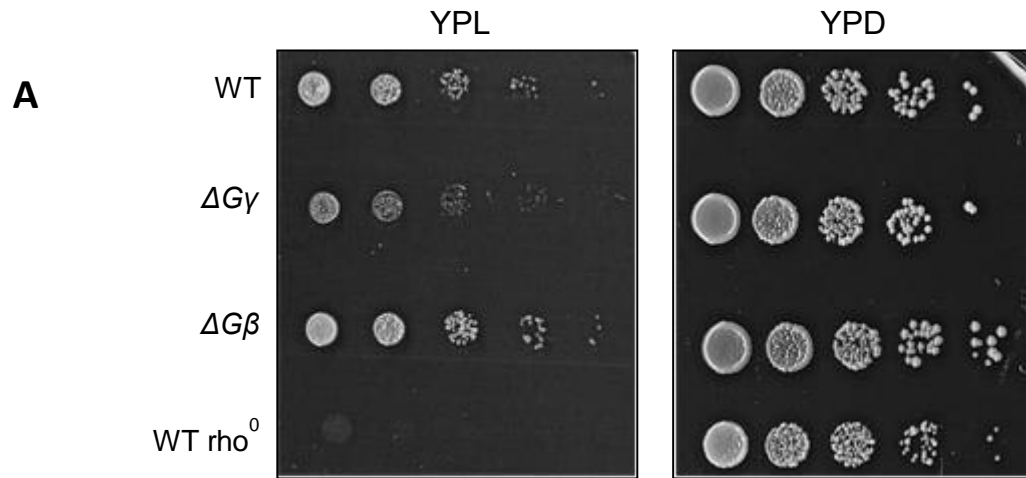


Figura 8: Crecimiento de la mutante $\Delta G\gamma$ en lactato. (A) Ensayo de crecimiento en diluciones seriales en medio YPL. Se empleó a la WT ρ^0 como control negativo de crecimiento ya que es incapaz de respirar. La densidad óptica inicial (600 nm) fue de 0.5. Las células se cultivaron a 30°C por 48 hrs. (B) Curvas de crecimiento de la WT, $\Delta G\gamma$ y la $\Delta G\beta$ en YPD y YPL. La gráfica insertada a la derecha muestra el crecimiento en YPD. En la gráfica principal se observa un crecimiento muy parecido de todas las cepas en medio YPL. (C) Curvas de crecimiento de la WT, $\Delta G\gamma$ y la $\Delta G\beta$ en YPL a las 10 hrs. Se observa un menor crecimiento de la $\Delta G\gamma$. La curva roja pertenece a la cepa silvestre, la morada a la mutante $\Delta G\beta$ y la verde a la mutante $\Delta G\gamma$. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica (600 nm) de 0.05. Las células se cultivaron a 30°C. Se grafica el promedio \pm SEM.

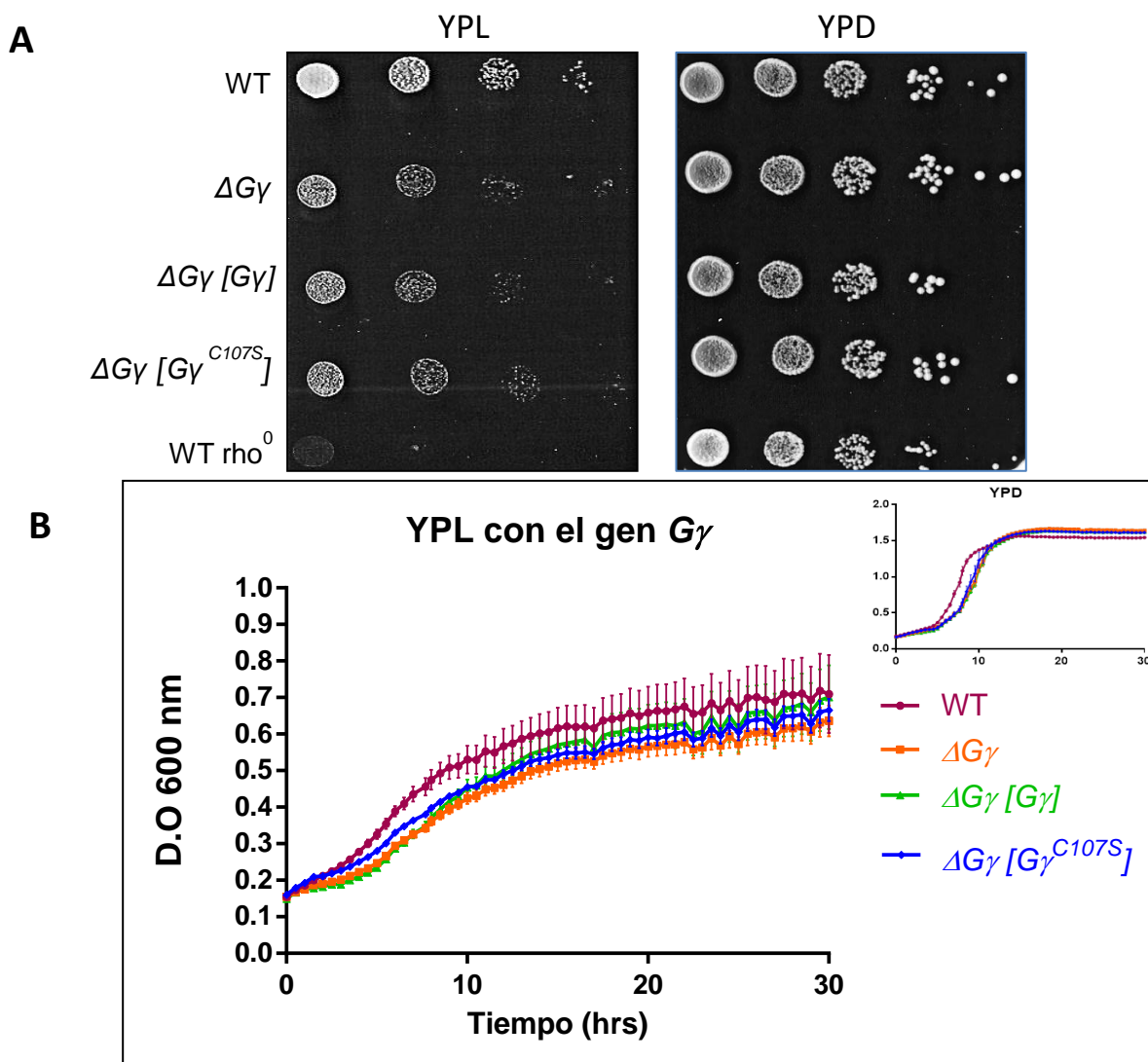


Figura 9: Crecimiento de la mutante con el gen $G\gamma$ silvestre y mutado ($G\gamma^{C107S}$) expresado y regulado por su propio promotor. (A) Ensayo de crecimiento en diluciones seriales en medio YPL de la WT y la $\Delta G\gamma$. La densidad óptica inicial (600 nm) fue de 0.5. Las células se cultivaron a 30°C por

48 hrs. (B) Curvas de crecimiento de la WT y la ΔGy en YPD y YPL. En la gráfica insertada a la derecha se muestra el crecimiento en YPD. En la gráfica principal se observa que en medio YPL el crecimiento es muy similar entre las levaduras transformadas y la cepa silvestre. La curva roja pertenece a la cepa silvestre, la naranja a la mutante ΔGy , la verde a la mutante ΔGy con el gen *Gy* silvestre y la azul a la mutante ΔGy con el gen *Gy* mutado. Los cultivos se ajustaron a una densidad óptica (600 nm) de 0.05. Las células se cultivaron a 30°C. Se grafica el promedio \pm SEM.

La viabilidad de la mutante ΔGy no está afectada en medio con glicerol

Para ver si la deficiencia de crecimiento en glicerol estaba relacionada con una menor viabilidad de la mutante ΔGy en este medio se realizó un ensayo de viabilidad. Una alteración en la viabilidad de la mutante en glicerol indicaría que este medio de cultivo le impide crecer adecuadamente y en consecuencia se explicaría la disminución en el crecimiento que presenta en este medio.

La viabilidad se determinó mediante el colorante vital FUN1, el cual tiñe a las células fúngicas vivas de color rojo-naranja. Estas células transportan el colorante, de color verde, a la vacuola en donde el pH es ácido por lo que cambia su color a rojo. En cambio, las levaduras muertas mantienen el color verde del colorante.

En este experimento se encontró que no hay diferencias significativas entre la viabilidad de la cepa silvestre y la ΔGy sin importar el tiempo (25 o 42 hrs) y medio de cultivo empleado (YPD o YPG) (Figura 10B). Se observa, que a las 42 hrs en medio aerobio hay una disminución significativa de la viabilidad de ambas cepas cuando se compara con medio YPD al mismo tiempo y con medio YPG a las 25 hrs. Esto indica que a las 42 hrs de cultivo en glicerol empiezan a morir las células; esto probablemente se deba a que las levaduras no están en un medio tan rico como el YPD.

Estos efectos se observaron por microscopía de fluorescencia en donde se hizo el conteo celular (Figura 10A).

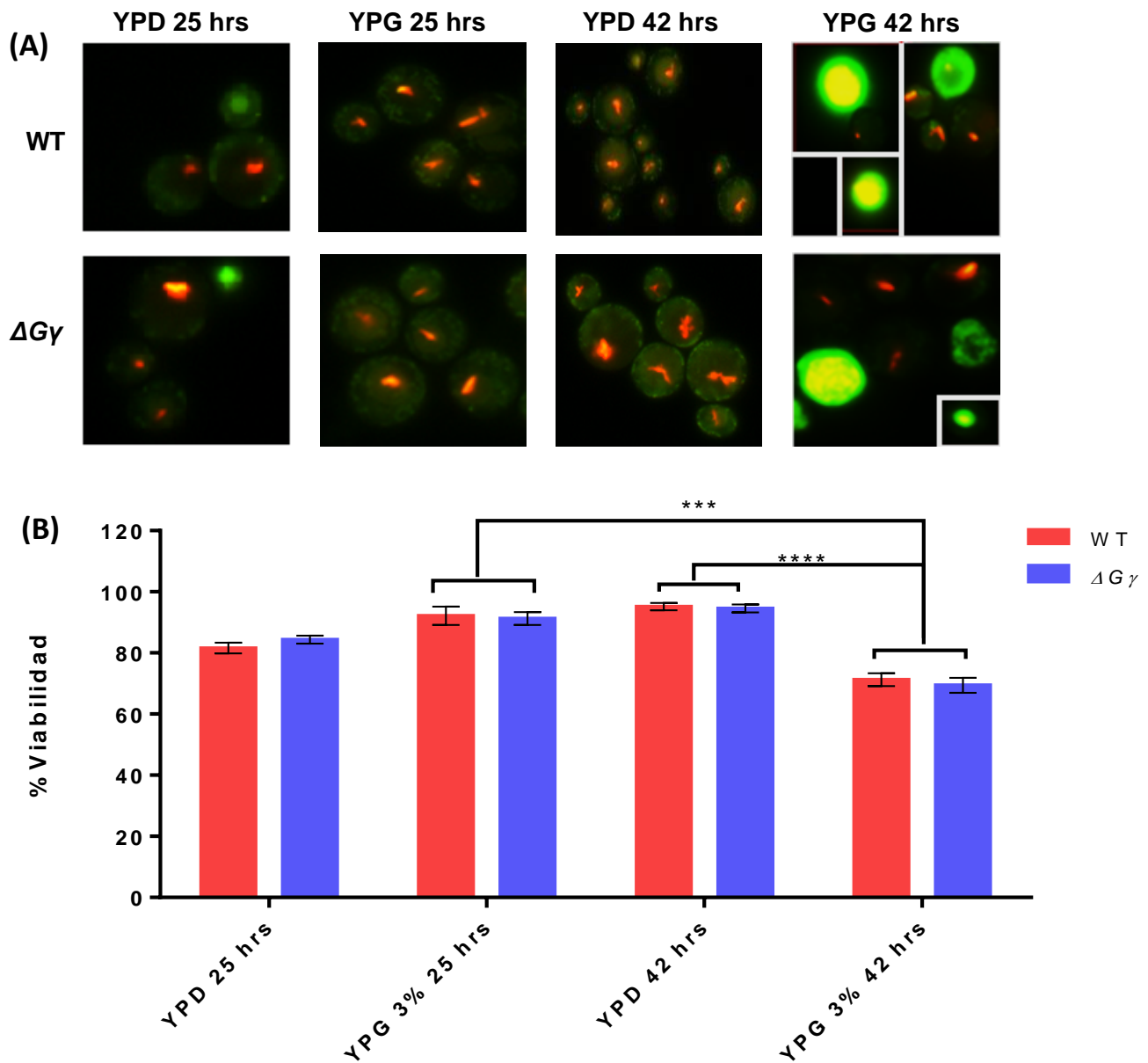


Figura 10: Prueba de viabilidad con el colorante vital FUN1. Se empearon dos medios de cultivo, uno aerobio y uno fermentativo y se siguió el crecimiento hasta las 42 hrs. (A) Se presentan una serie de paneles representativos de lo observado en el microscopio de fluorescencia de la tinción con FUN1 de la WT y la $\Delta G\gamma$ a dos tiempos distintos. (B) Promedio del porcentaje de viabilidad (SEM). Se realizó el conteo en 16 campos con 20-40 células por campo. A las 42 hrs en medio YPG disminuye significativamente la viabilidad tanto de las silvestres como de las mutantes cuando se compara con el mismo medio a las 25 hrs y con medio YPD a las 42 hrs. ANOVA de 2 vías, $p < 0.01$.

La mutante $\Delta G\gamma$ posee DNA mitocondrial

Es posible que la deficiencia de crecimiento en medios respiratorios se deba a que la mutante $\Delta G\gamma$ carece de DNA mitocondrial, por lo que decidimos hacer tinciones con DAPI en condiciones donde se puede visualizar el DNA nuclear y el DNA extra-cromosómico.

En este experimento, las levaduras se cultivaron en YPD y las tinciones se realizaron sin fijar las células, lo cual permitió una mejor tinción del DNA mitocondrial y no sólo de DNA nuclear. Bajo estas condiciones, la WT y la $\Delta G\gamma$ presentan pequeños puntos fluorescentes, teñidos con DAPI, que se traslapan con estructuras filamentosas teñidas con MitoTracker, morfología típica de las mitocondrias. Como control se empleó a la WT ρ^0 , la cual carece de DNA mitocondrial. Se puede observar que esta mutante no presenta el puntillero característico de las otras cepas y estos puntos no se traslapan con las mitocondrias, pues únicamente se está teñiendo el DNA nuclear. Gracias a esto, es posible afirmar que las tinciones con DAPI están marcando el DNA mitocondrial de la mutante $\Delta G\gamma$ (Figura 11). Con estas tinciones se concluye que la mutante $\Delta G\gamma$ tiene DNA mitocondrial, por lo tanto, esta no es la causa de su deficiencia de crecimiento en medios respiratorios.

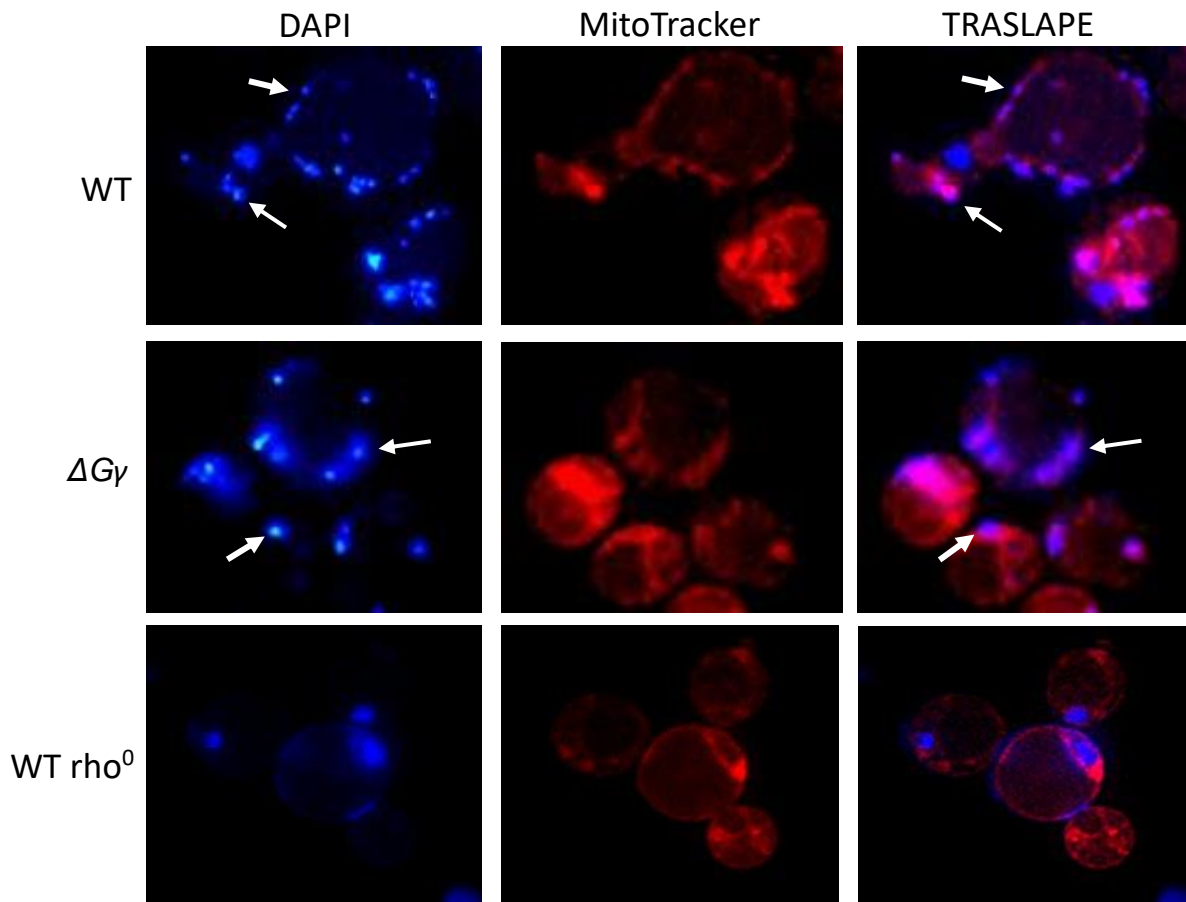


Figura 11: Tinción con DAPI y MitoTracker para la visualización de DNA mitocondrial y de la morfología mitocondrial. Los puntos de la tinción con DAPI que se observan en los paneles de la silvestre (WT) y la mutante ($\Delta G\gamma$) se traslapan con el MitoTracker, por lo que se trata de DNA mitocondrial. En los últimos paneles, la tinción con DAPI de la cepa control ρ^0 ; carece del puntillado característico de las otras cepas; además no se traslapa con las mitocondrias. Las flechas blancas señalan el DNA mitocondrial que se puede apreciar en los paneles de DAPI y en el traslape.

La mutante $\Delta G\gamma$ no tiene una deficiencia respiratoria

Se realizaron ensayos de respiración en célula completa en distintos sustratos para evaluar el consumo de oxígeno de la WT y la $\Delta G\gamma$ cultivadas en YPD por 24 hrs y ayunadas durante 16 hrs. Una alteración en la respiración explicaría porque la mutante de $G\gamma$ tiene una deficiencia de crecimiento en medios respiratorios.

Para este experimento, inicialmente se obtuvieron curvas de respiración sin sustrato (Figura 12A). Se puede observar que las células aún respiran y esto puede ser porque no

están completamente ayunadas o por aún tener sustratos endógenos. Se observa que la pendiente de la curva de consumo de oxígeno sin sustrato es ligeramente mayor en la ΔGy . El consumo de oxígeno de ambas cepas no cambia con respecto a las curvas basales cuando se emplea glicerol como sustrato (Figura 12B); pues aparentemente no son capaces de utilizarlo de forma directa. Cuando se emplean etanol y glucosa como sustratos, se observa un cambio en la pendiente de las curvas con respecto a la respiración sin sustrato, que muestra un aumento en la respiración. Con etanol (Figura 12C), ambas cepas consumen oxígeno en la misma medida. Con glucosa (Figura 12D), se observa que la mutante consume más oxígeno que la silvestre.

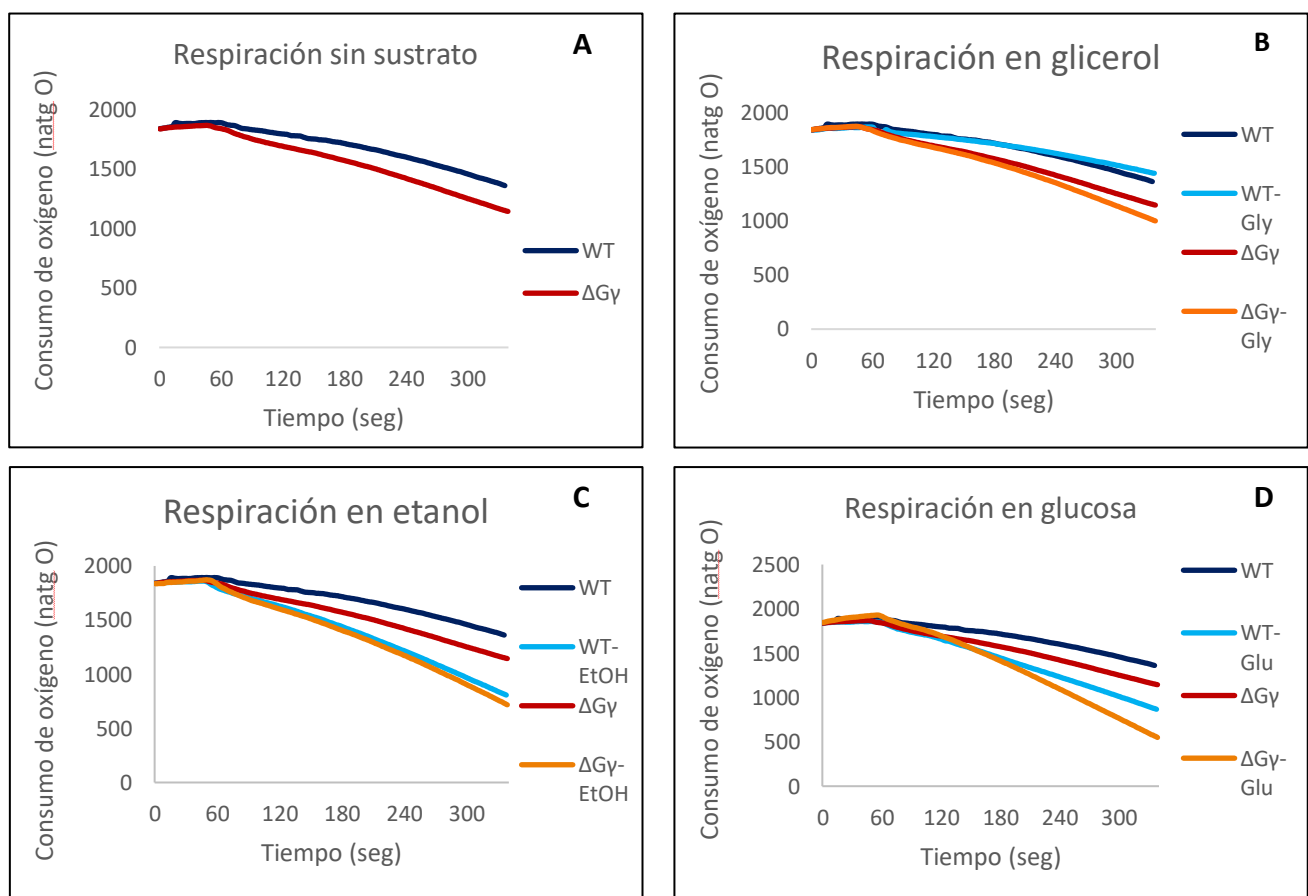


Figura 12: Respiración en célula completa con distintos sustratos. Se utilizaron células ayunadas por 16 hrs, para probar la respiración en glicerol (B), etanol (C) y glucosa (D). Primero se realizó una curva de la respiración sin sustrato para ver de forma basal en qué medida consumen oxígeno. La curva azul oscuro pertenece a la cepa silvestre sin sustrato, la roja a la mutante ΔGy sin sustrato, la azul claro a la silvestre con sustrato y la naranja a la mutante ΔGy con sustrato. Gly= glicerol, EtOH= etanol, Glu= glucosa.

Se utilizó el desacoplante CCCP con cada sustrato para ver si las células incrementan su consumo de oxígeno y comprobar que las mitocondrias están intactas y acopladas. En esta prueba se encontró que las células a las que se agrega glicerol como sustrato son incapaces de responder al CCCP, pues su consumo de oxígeno no se ve alterado (Figura 13A). En contraste, las células se desacoplan y se acelera el consumo de oxígeno de forma inmediata cuando se utiliza el desacoplante con etanol y glucosa (Figura 13B, C).

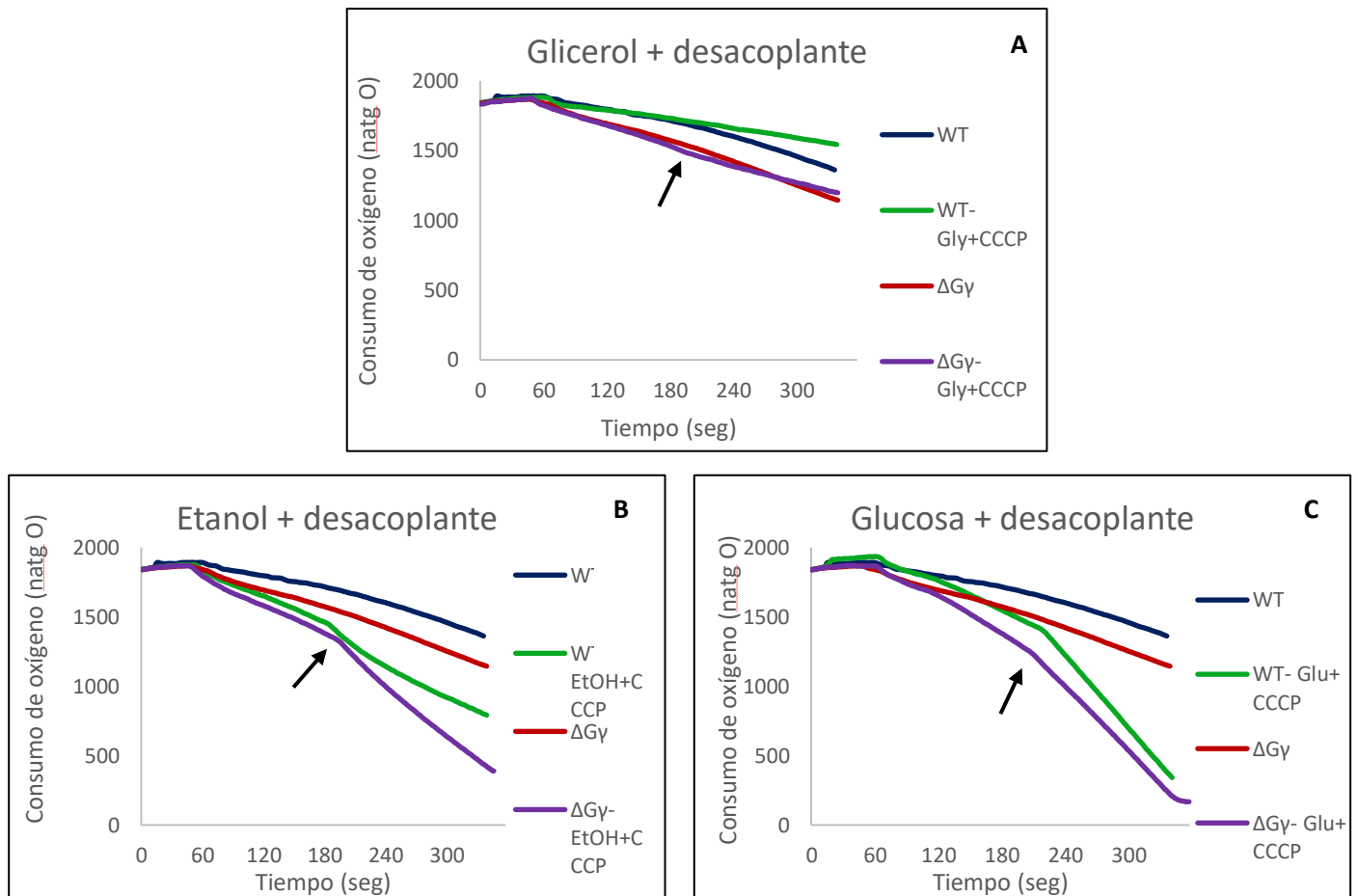


Figura 13: Respiración en célula completa con distintos sustratos empleando al CCCP como desacoplante. Se utilizaron células ayunadas por 16 hrs, para probar la respiración en glicerol (A), etanol (B) y glucosa (C). La curva azul oscuro pertenece a la cepa silvestre sin sustrato, la roja a la mutante Δ Gy sin sustrato, la verde a la silvestre con sustrato + CCCP y la morada a la mutante Δ Gy con sustrato + CCCP. La flecha negra indica el momento en que se agrega el desacoplante. Gly= glicerol, EtOH= etanol, Glu= glucosa.

Con estos experimentos se concluye que la deficiencia de crecimiento en glicerol y lactato de la mutante ΔGy no se debe a una alteración en la respiración; en particular cuando ésta se evalúa en células completas.

En medios respiratorios, la cantidad de citocromos es menor en la mutante ΔGy

La presencia de citocromos es importante para que la levadura pueda crecer en medios respiratorios ya que estos forman parte de la cadena respiratoria. Para ver si la deficiencia de crecimiento de la mutante ΔGy es causada por la cantidad de citocromos, se realizó un espectro diferencial de 500 a 680 nm de un homogenado de mitocondrias de la WT y la ΔGy .

Se usaron 3 medios de cultivos distintos: dos aerobios (YPG y YPL) y uno fermentativo (YPD). En la figura 14 se grafica la cantidad de citocromos bajo cada tratamiento y esos valores se muestran en la tabla 1.

En medio fermentativo (YPD), los espectros de citocromos de ambas cepas son muy similares (Figura 15) al igual que la cantidad de citocromo $c+c_1$ (0.06 nmol/mg para ambos), b (0.06 nmol/mg para ambos) y $a+a_3$ (0.02 nmol/mg para la WT y 0.004 nmol/mg para la ΔGy). Los picos de absorción máxima correspondientes a los diferentes citocromos son: 550-551 nm para el citocromo c y c_1 , 561 para el citocromo b y 601 nm para el a y a_3 .

En lactato (YPL) los picos de los espectros están bien definidos. Aparentemente, el pico máximo de citocromo $c+c_1$ (550 nm) es mayor que el del citocromo b (560 nm) en la silvestre; por el contrario, en la mutante se observa un pico más grande en el citocromo b (560 nm) que en el $c+c_1$ (552 nm) (Figura 16). Sin embargo, al momento de cuantificar la cantidad de cada citocromo, se encontró que ambas cepas tienen más citocromo $c+c_1$ (WT= 0.26 nmol/mg vs ΔGy 0.16 nmol/mg) que b (WT= 0.18 nmol/mg vs ΔGy = 0.13 nmol/mg), siendo mayor la cantidad en la silvestre. El citocromo $a+a_3$ no varía mucho entre ambas cepas (WT= 0.04 nmol/mg vs ΔGy = 0.01 nmol/mg) (Figura 14, Tabla 1).

En medio con glicerol (YPG), la cantidad de citocromos entre la silvestre y la mutante es muy diferente. Los picos de absorción máxima correspondiente a los diferentes citocromos

son: 550 nm para el citocromo $c+c_1$, 556 nm para el citocromo b y 605 nm para el $a+a_3$ (Figura 17). Se observa que en la cepa $\Delta G\gamma$ el pico que corresponde al citocromo $a+a_3$ se ve ligeramente disminuido, aunque la cantidad de citocromo por mg de proteína no difiere mucho con respecto a la silvestre ($\Delta G\gamma= 0.01$ nmol/mg vs WT=0.07 nmol/mg). Sin embargo, esta mutante carece de un pico de absorción máxima correspondiente al citocromo $c+c_1$. De acuerdo con el espectro no tiene citocromo c o este se encuentra muy disminuido en comparación con la silvestre ($\Delta G\gamma= 0.0536$ nmol/mg vs WT= 0.4233 nmol/mg de proteína). Por otro lado, la $\Delta G\gamma$ posee un pico bastante notorio y pequeño correspondiente al citocromo b cuya cantidad también se encuentra muy disminuida en comparación con la silvestre ($\Delta G\gamma= 0,0330$ nmol/mg vs WT= 0,3332 nm/mg proteína) (Tabla 1).

Estos resultados indican que la mutante $\Delta G\gamma$ tiene una menor cantidad de citocromo c y b en comparación a la cepa silvestre cuando se crece en medios respiratorios (glicerol y lactato).

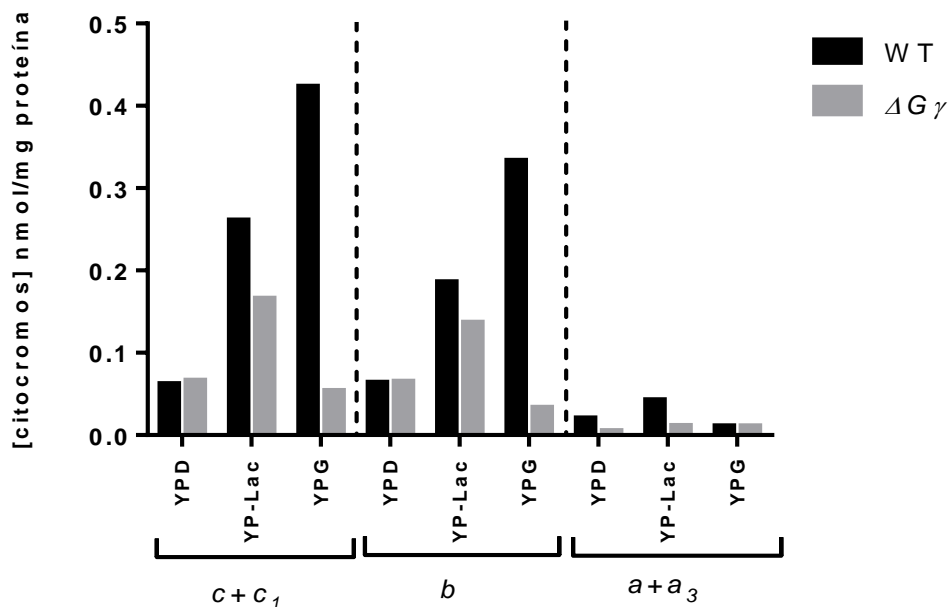


Figura 14: Gráfica de la concentración de citocromos en la WT y $\Delta G\gamma$ bajo diferentes medios de cultivo. Se observa claramente que en lactato (YP-Lac) y glicerol (YPG) la mutante $\Delta G\gamma$ tiene una menor cantidad de citocromo $c+c_1$ y b . Las barras negras corresponden a la silvestre y las grises a la mutante. Las líneas punteadas separan las gráficas por tipo de citocromo analizado. Esta gráfica se obtuvo de espectros realizados una sola vez.

Concentración de citocromos (nmol/mg de proteína)				
Cepa	Medio	Citocromo $c+c_1$	Citocromo b	Citocromo $a+a_3$
		$\Delta\epsilon_{550-540}=19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\Delta\epsilon_{563-577}= 25.6\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	$\Delta\epsilon_{605-630}= 16 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
WT	YPD	0,06183	0,06370	0,02029
WT	YPL	0,26057	0,18575	0,04216
WT	YPG	0,42330	0,33324	0,00754
$\Delta G\gamma$	YPD	0,06591	0,06495	0,00476
$\Delta G\gamma$	YPL	0,16584	0,13632	0,01100
$\Delta G\gamma$	YPG	0,05369	0,03305	0,01054

Tabla 1: Concentración de citocromos en mitocondrias aisladas de la cepa WT y $\Delta G\gamma$ crecidas en diferentes medios de cultivo. La concentración de citocromos se obtuvo a partir de los coeficientes de extinción molar de cada uno de ellos.

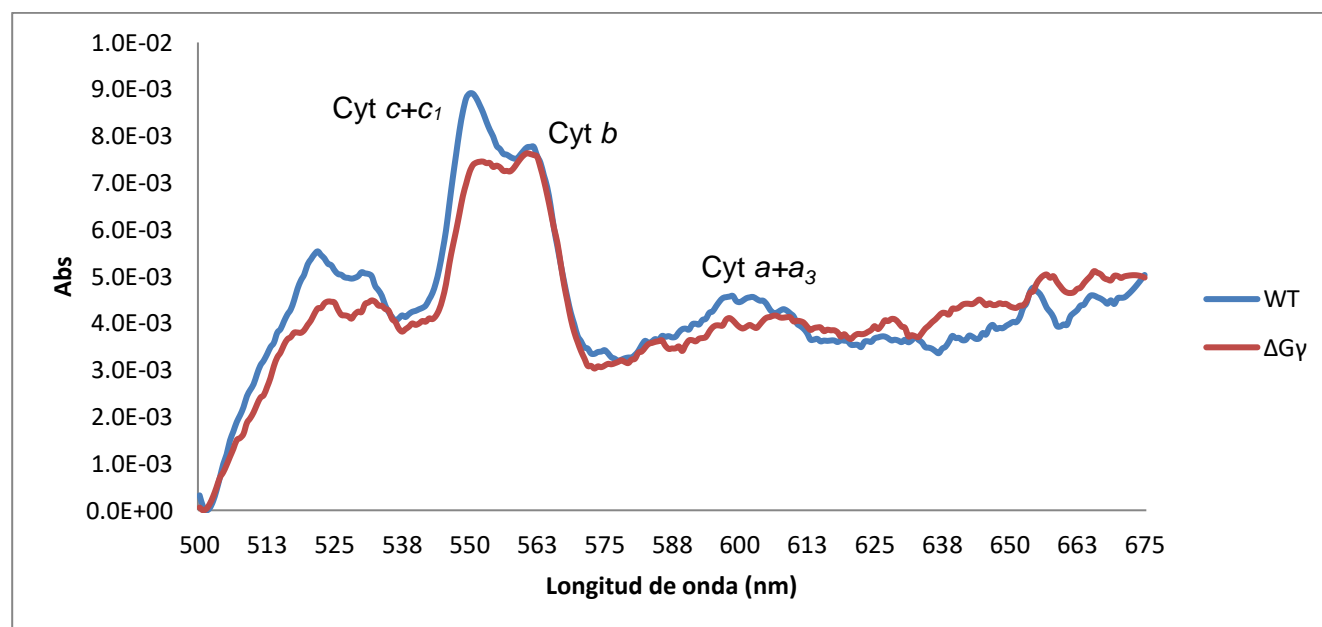


Figura 15: Espectro diferencial de los citocromos de las mitocondrias aisladas de las cepas WT y $\Delta G\gamma$ de *S. cerevisiae* (W303) crecidas en medio YPD. Obtenido de la resta del espectro reducido con ditionita menos el espectro oxidado con persulfato de amonio. El espectro se realizó con una concentración de mitocondrias de 2.5 mg/ml. El barrido se realizó de 500-680 nm. La curva azul pertenece a la cepa silvestre y la roja a la mutante $\Delta G\gamma$. Cyt= citocromo.

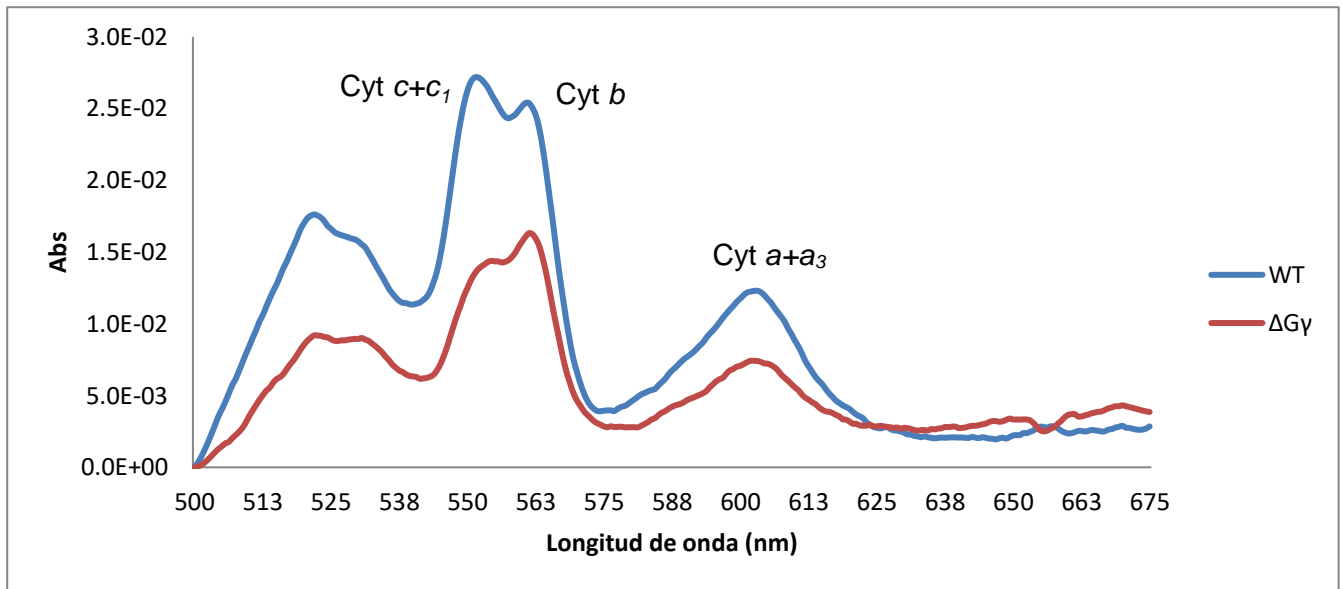


Figura 16: Espectro diferencial de los citocromos de las mitocondrias aisladas de las cepas WT y $\Delta G\gamma$ de *S. cerevisiae* (W303) crecidas en medio YPL. Obtenido de la resta del espectro reducido con ditionita menos el espectro oxidado con persulfato de amonio. El espectro se realizó con una concentración de mitocondrias de 2.5 mg/ml. El barrido se realizó de 500-680 nm. La curva azul pertenece a la cepa silvestre y la roja a la mutante $\Delta G\gamma$. Cyt= citocromo.

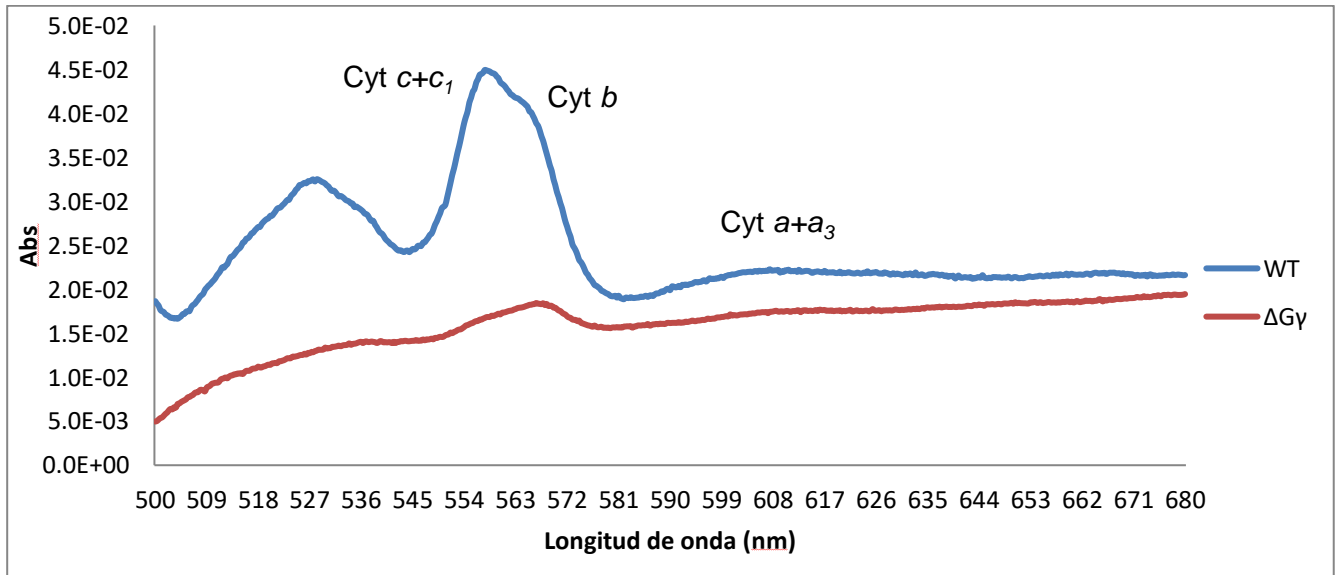


Figura 17: Espectro diferencial de los citocromos de las mitocondrias aisladas de las cepas WT y $\Delta G\gamma$ de *S. cerevisiae* (W303) crecidas en medio YPG. Obtenido de la resta del espectro reducido con ditionita menos el espectro oxidado con ferricianuro de potasio. El espectro se realizó con una concentración de mitocondrias de 2.5 mg/ml. El barrido se realizó de 500-680 nm. La curva azul pertenece a la cepa silvestre y la roja a la mutante $\Delta G\gamma$. Cyt= citocromo.

IX. Discusión

La proteína Gy es un componente esencial para el apareamiento en respuesta a feromonas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo, no se sabía de su participación en otros fenómenos o procesos celulares, sobre todo de su actividad independiente de la subunidad G β . En el presente trabajo, se encontró que la levadura carente del gen de la subunidad Gy, crece poco y muy lento en medio aerobio con glicerol como única fuente de carbono.

Se sabe que la levadura *S. cerevisiae* puede utilizar diversas fuentes de carbono para generar biomasa y energía; sin embargo, prefiere a los monosacáridos fácilmente fermentables como la glucosa y la fructosa. Sustratos no fermentables como el etanol, el glicerol, lactato, acetato u oleato también pueden ser metabolizados y esto requiere de la activación de vías regulatorias y la biosíntesis de enzimas requeridas para la utilización de estos sustratos. Más aun, las células, de forma rutinaria, utilizan fuentes de carbono no fermentables, como etanol y glicerol, que se producen cuando la cantidad de glucosa presente es excesiva (Schüller, 2003). Los sustratos no fermentables se usan para el metabolismo oxidativo en la mitocondria y para la gluconeogénesis.

Swinnen *et al* (2013), reportaron un estudio en donde describen que en general, las cepas de levadura empleadas con mayor frecuencia en los laboratorios como la CEN.PK, la W303-1A y la S288C, son incapaces de crecer en medio sintético con glicerol como única fuente de carbono y sin otros suplementos como el extracto de levadura y la peptona. Estos suplementos apoyan al crecimiento en glicerol permitiendo su utilización. En el presente trabajo, las levaduras son capaces de crecer en medio con glicerol gracias a los suplementos empleados; además se realizó un ensayo de viabilidad en medio con glicerol para ver si este afectaba de alguna forma la sobrevivencia de las células. Se encontró que la viabilidad de la mutante no está afectada por el glicerol. Esto indica que la deficiencia de crecimiento de la mutante ΔGy en glicerol no se debe a su incapacidad de crecer en este medio.

Se realizaron pruebas de crecimiento por diluciones seriales y curvas de crecimiento de la mutante ΔGy transformada con su gen silvestre para dilucidar si la deficiencia de crecimiento en medio con glicerol depende directamente de la subunidad Gy y no de otros

genes involucrados en su metabolismo. En este experimento se encontró que la sobreexpresión del gen silvestre revierte la deficiencia de crecimiento en glicerol. Esto indica que la deficiencia de crecimiento se debe a la ausencia del gen. Por otro lado, este efecto se observa más fácilmente cuando la expresión del gen *Gy* se encuentra sujeta al promotor de galactosa y no bajo la regulación de su propio promotor. Es posible que se tenga una mayor expresión del gen cuando éste se encuentre sujeto a un promotor inducible como el de galactosa o incluso por otros promotores como el de cobre, (inducido por sulfato cúprico), esto se ha comprobado en otros experimentos del laboratorio en donde se estudia la resistencia de la ΔGy a estrés de retículo endoplásmico. Esto se debe a que con un promotor inducible la expresión del gen depende de la cantidad de inductor que se utilice y no hay un mecanismo de regulación como sí puede ocurrir cuando el gen tiene su propio promotor.

La recuperación del crecimiento no depende de que la subunidad *Gy* se localice en la membrana o en el citoplasma debido a que la sobreexpresión del gen silvestre y del gen mutado (*Gy*^{C107S}) tienen el mismo efecto, a pesar de que la mutación impide que la proteína se ancle a la membrana plasmática (Hirschman y Jenness, 1999). Es posible que la subunidad *Gy* tenga alguna actividad en el citoplasma o incluso en otros compartimentos celulares como la mitocondria y el retículo endoplásmico; por ejemplo, no tener a la subunidad *Gy* genera un fenotipo similar a tener a la proteína Ras secuestrada en la mitocondria y estas levaduras presentan una deficiencia de crecimiento en medios respiratorios (Wang y Deschenes, 2006).

El crecimiento de la mutante ΔGy también se analizó en otro medio respiratorio, YPL (2%). El catabolismo del lactato involucra su transporte a la mitocondria a partir de un simportador de protones ejecutado por la permeasa Jen1. A diferencia del glicerol, el lactato es oxidado directamente a piruvato por acción de la citocromo c óxido-reductasa de lactato mitocondrial (L-LCR) codificada por el gen *CYB2*, localizado en el espacio intermembranal (Schüller, 2003). En medio con lactato se encontró que la mutante ΔGy crece menos que la silvestre y que la mutante $\Delta G\beta$, pero se observó un menor efecto respecto a su crecimiento en glicerol. Asimismo, en este medio, el efecto de la complementación de la ΔGy apenas es visible y esto puede deberse a que el crecimiento no difiere mucho con respecto a la silvestre. Esto indica que la mutante ΔGy tiene algún tipo de deficiencia respiratoria, la cual es más visible en glicerol que en lactato. Es necesario realizar más pruebas con este medio

respiratorio para aclarar los comportamientos encontrados. Asimismo, es necesario utilizar otros medios respiratorios que tengan etanol o acetato.

Desde los años cincuenta se ha descrito e investigado la existencia de levaduras mutantes deficientes respiratorias. En la mayoría de los cultivos, aproximadamente 1% de las células son deficientes respiratorias y a estas se les conoce como “petites”. Esta deficiencia se debe a mutaciones en el DNA mitocondrial o nuclear que impiden la síntesis de enzimas respiratorias que se traduce en la incapacidad de utilizar fuentes de carbono no fermentables (Sherman, 1962). Dentro de estas mutantes deficientes se encuentran las designadas p^0 , las cuales han perdido completamente el DNA mitocondrial. Las tinciones que se realizaron con DAPI y MitoTracker revelaron que la mutante ΔGy posee genoma mitocondrial por lo que esto no explica su deficiencia de crecimiento en glicerol. Esto es normal debido a que hay crecimiento de esta levadura en medios aerobios, aunque se encuentre disminuido.

La deficiencia de crecimiento de la mutante ΔGy puede deberse a la falta de integridad del genoma mitocondrial o a alguna mutación nuclear que afecta el metabolismo de fuentes de carbono no fermentables. Las mutaciones nucleares que causan deficiencias respiratorias tienen poco efecto en la morfología mitocondrial, siempre y cuando estas mutaciones no causen también pérdida del genoma mitocondrial (Pon y Schatz, 1991). En un experimento de microscopía, Egner *et al.*, (2002) observaron la morfología mitocondrial de levaduras de la cepa BY4743. Esta cepa es diploide y exhibe una estructura mitocondrial relativamente simple en fuentes de carbono fermentables como glucosa, pero las mitocondrias forman elaboradas ramificaciones cuando se cultivan las células en glicerol. Por su parte, Joseph McInnes *et al.*, (2013) encontraron que en la cepa CBS:12A, las células cultivadas en medio con etanol presentaron un enriquecimiento en mitocondrias en comparación a las células crecidas en glucosa y una morfología tubular y ligeramente más elongada. Las mitocondrias crecidas en medio a base de glicerol exhibieron una morfología más globular.

Comparando ambos estudios, la levadura regula la forma y el tamaño del compartimento mitocondrial dependiendo de la fuente de carbono y de las condiciones de crecimiento (Visser *et al.*, 1995). Además, esto depende de la cepa que se utiliza. En consecuencia, faltaría observar la estructura mitocondrial de células crecidas en glicerol, con

el fin de distinguir la morfología de la población de células que crecen en glicerol de las que crecen en glucosa.

Wang y Deschenes (2006) encontraron que las levaduras mutantes de las proteínas del complejo C Vps presentan un defecto en el tráfico de Ras a la membrana plasmática y éste se acumula en las membranas mitocondriales. Estas proteínas regulan la fusión de vesículas en los endosomas y entre estos y la vacuola. Las mutantes C Vps poseen defectos mitocondriales que se manifiestan como deficiencia de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables (etanol y glicerol) y su estructura mitocondrial está alterada: en la cepa silvestre, las mitocondrias exhiben una estructura tubular, mientras que en las mutantes aparecen punteadas. La proteína Ras y la subunidad Gy sufren de modificaciones post-traduccionales (una farnesilación y palmitoilación) en el residuo CaaX del C-terminal para poder anclarse a la membrana plasmática (Hirschman y Jenness, 1999; Wang y Deschenes, 2006). Esta similitud sugiere que no tener a la subunidad Gy genera un fenotipo similar a tener a la proteína Ras secuestrada en la mitocondria lo que estaría ocasionando la deficiencia de crecimiento en glicerol. Si los fenotipos de las mutantes C Vps y la ΔGy son similares, sería interesante determinar si en condiciones normales la subunidad Gy tiene alguna relación funcional con la mitocondria, por ejemplo, regulando directa o indirectamente la producción o estabilidad de los citocromos, regulando la homeostasis mitocondrial, su biogénesis o segregación ya que se sabe que las mitocondrias son redes tubulares y ramificadas, cuya continuidad depende de la frecuencia balanceada de eventos de fusión y fisión (Leboucher *et al.*, 2012).

De acuerdo con Egner *et al.*, (2002) la estructura mitocondrial de las células crecidas en glucosa es relativamente simple y Joseph McInnes *et al.*, (2013) mencionan que también se encuentran menos enriquecidas en mitocondrias. Esto podría verse reflejado en la cantidad de citocromos que presentan. Los espectros de las células de la WT y la ΔGy y la cantidad de citocromos de ambas cepas crecidas en YPD son muy parecidos entre sí. Esto puede estar relacionado con lo que se discutió previamente acerca de que en YPD hay un menor enriquecimiento mitocondrial.

Los espectros de citocromos de las células crecidas en medios aerobios fueron distintos entre las levaduras mutantes y las silvestres. En medio con lactato, la mutante ΔGy tuvo un

menor contenido de citocromo $c+c_1$ en comparación con la silvestre. En medio con glicerol se encontraron espectros muy diferentes entre la $\Delta G\gamma$ y la silvestre. La cantidad de citocromos $c+c_1$ y b de la mutante es de 8 y 10 veces menor, respectivamente, en comparación con la silvestre. Esto resulta inusual ya que en medios de cultivo con fuentes de carbono respiratorias hay un mayor enriquecimiento mitocondrial e incluso las mitocondrias son más robustas (Pon y Schatz, 1991; Joseph McInnes *et al*, 2013); esto es apreciable en la cepa silvestre, la cual presenta una gran cantidad de citocromos en esta condición.

Estos resultados indican que la mutante $\Delta G\gamma$ tiene una menor cantidad de citocromo c y b . Este resultado permite explicar la deficiencia de crecimiento de la $\Delta G\gamma$ en medio YPG y en menor medida YPL; debido a la participación de los citocromos b y c que forman parte del complejo III y IV de la cadena respiratoria. Análisis espectroscópicos de células con mutaciones en el genoma mitocondrial han revelado que la ausencia de citocromo a , a_3 y b , está relacionada con la ausencia de actividad enzimática involucrada en el transporte de electrones (Sherman, 1962). Sin embargo, en el presente estudio los citocromos c y el b son los que están alterados y no se observaron diferencias en el citocromo a , pero esta disminución en los citocromos también podría estar alterando el transporte de los electrones o la función del complejo III mitocondrial.

El metabolismo del glicerol trae como consecuencia cultivos con una mayor cantidad de grasa que impide la adecuada extracción de mitocondrias e incluso la obtención de las mismas. Joseph McInnes *et al*, (2013) observaron que cuando las células se crecen en glicerol sin otros suplementos complejos ni aminoácidos, presentan una fase lag muy larga de 31 hrs. Durante esta fase, un gran porcentaje de mitocondrias se localizan en los cuellos de las gemas y hay una disminución significativa en la herencia de mitocondrias de la célula madre a la gema; y las mitocondrias se encuentran más oxidadas. Después de las 31 horas, cuando se entra a la fase de crecimiento exponencial, la distribución de las mitocondrias se restaura, disminuyendo la acumulación en los cuellos de las gemas y aumentando su presencia en las mismas, patrón muy parecido al observado cuando se crecen las células en glucosa. Durante esta fase, también se restaura el estado redox de las mitocondrias y éstas se vuelven más reductoras. A partir de esta investigación, es posible que el crecimiento en

glicerol afecte la distribución de las mitocondrias lo que dificulta su obtención y análisis espectrofotométrico.

Al evaluar la respiración en célula completa, se encontró que tanto la cepa silvestre como la mutante ΔGy respiran bastante bien y son capaces de utilizar glucosa y etanol como sustratos respiratorios; pero son incapaces de respirar cuando se agrega glicerol al medio. Como lo mencionan Swinnen *et al* (2013), esto puede deberse a que la cepa W303-1A es incapaz de crecer en medio sintético con glicerol como única fuente de carbono y sin otros suplementos. También llama la atención que las células a las que se les agrega glicerol como sustrato respiratorio, no responden al desacoplante CCCP. Entonces, las células con glicerol ya están desacopladas o simplemente no hay un sustrato utilizable que active la cadena transportadora de electrones, por lo que no se ve ningún cambio en el consumo de oxígeno. En contraste, cuando se utiliza el desacoplante con etanol y glucosa, inmediatamente las células se desacoplan, es decir, rompen el acoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa y se acelera el consumo de oxígeno (Nicholls y Ferguson, 2002).

Resulta poco comprensible que una mutante que presenta una deficiencia de crecimiento en glicerol y tiene disminuidos los citocromos *b* y *c*, en presencia de medios no fermentativos, no tenga una deficiencia respiratoria. Es posible que se encuentre otro resultado si se mide la respiración de células crecidas en glicerol o lactato, ya que el medio de cultivo es muy relevante para la cantidad de citocromos. Por otro lado, se sabe que una mutante del complejo IV mitocondrial $\Delta shy1$ no crece en sustratos respiratorios y tiene disminuido el citocromo *a*, pero presenta respiración mitocondrial (Cruz, 2016). Esta proteína participa en el ensamblaje de la citocromo *c* oxidasa o complejo IV de la cadena respiratoria; pero la falta de ella no es suficiente para impedir el ensamblaje y funcionamiento de este complejo (Mashkevich *et al.*, 1997). Con esta información, existe la posibilidad de que la falta de la subunidad *Gy* puede estar afectando alguna función mitocondrial, pero no es suficiente para alterar la respiración de la mutante.

X. CONCLUSIONES

La disminución en la cantidad de citocromos de la mutante $\Delta G\gamma$ puede explicar la deficiencia de crecimiento que presenta en glicerol.

Los ensayos indican que la ausencia del gen está involucrada en el problema de crecimiento observado y no importa la localización de la subunidad $G\gamma$ (anclada en la membrana plasmática o libre en el citoplasma) para recuperar el crecimiento. Asimismo, la deficiencia de crecimiento, aunque es mucho más marcada en glicerol, también se presenta en lactato, otro medio respiratorio. Además, en el presente trabajo se demostró que la mutante $\Delta G\gamma$ es viable en glicerol por lo que es posible que su incapacidad de crecer bien en este medio se deba a una cuestión metabólica; a una alteración en la capacidad de cambiar la expresión de genes en presencia de distintas fuentes de carbono (fermentable \rightarrow no fermentable).

Con los ensayos de microscopía se descartó que la mutante $\Delta G\gamma$ careciera de genoma mitocondrial; pero con este experimento no fue posible identificar alteraciones en la estructura mitocondrial que pudieran explicar la deficiencia de crecimiento. Por otro lado, en las pruebas de espectrofotometría se encontró una disminución en la cantidad de citocromos cuando la mutante se crece en medios respiratorios (lactato y glicerol). Este resultado es muy importante ya que puede explicar la deficiencia de crecimiento en glicerol de la mutante $\Delta G\gamma$. Por otro lado, esta disminución en los citocromos debería reflejar alguna afectación en la respiración, pero los ensayos de respiración muestran que la mutante $\Delta G\gamma$ no tiene una deficiencia respiratoria cuando esta actividad se evalúa en la célula completa y cuando se crecen los cultivos en glucosa.

XI. PERSPECTIVAS

El presente trabajo arrojó muchos resultados, que han permitido caracterizar, en algunos aspectos, la deficiencia de crecimiento de la mutante ΔGy en glicerol. También abrió la posibilidad de llevar a cabo otros experimentos.

Se muestra que la deficiencia de crecimiento en glicerol está relacionada con la ausencia del gen de la subunidad Gy; sin embargo, la recuperación del crecimiento no es clara cuando el gen Gy está regulado por su propio promotor, sobre todo en los ensayos de diluciones seriales. Cuando la expresión del gen se induce por el promotor de galactosa se observa una mejor respuesta, y en esta sobreexpresión podría estar participando la galactosa, un azúcar fermentable. Por esta razón se propone clonar al gen de la subunidad Gy en otro plásmido.

La morfología de las mitocondrias, la cantidad y calidad de éstas, depende del medio de cultivo que se emplea. Debido a esto se pretende realizar la observación de las mitocondrias por distintas técnicas de microscopía. Esto permitirá distinguir entre la morfología de las células que crecen en glicerol y la morfología de las que crecen en glucosa y descartar posibles alteraciones en la estructura. Por otro lado, debido a que la morfología de las mitocondrias también depende de la frecuencia balanceada de eventos de fusión y fisión, se propone determinar el papel de la subunidad Gy en la biogénesis mitocondrial o en su segregación.

Se planteó que la ausencia de la subunidad Gy puede ser equivalente a tener a la proteína Ras secuestrada en la mitocondria; por lo tanto, se propone determinar la localización de la proteína Gy, ya que, si esta se asocia a la mitocondria, es posible que esté causando alguna alteración en el metabolismo aerobio.

Se encontró que los citocromos *b* y *c* de la mutante están muy disminuidos en medios de cultivo respiratorios en comparación con la cepa silvestre. Es necesario repetir estos experimentos para poder tener más datos que apoyen los resultados y de esta forma poder aplicar un análisis estadístico. Asimismo, es indispensable realizar espectros diferenciales de la mutante ΔGy transformada con su gen silvestre y mutado para determinar si la

introducción de este gen le permite tener una cantidad de citocromos similar a la que presenta la cepa silvestre. Este resultado indicaría que la falta de Gy afecta de forma directa la expresión de genes involucrados en la síntesis de los complejos respiratorios o en alguna cuestión de ensamblaje de los mismos. En consecuencia, con este resultado, se podría explicar una causa de la deficiencia de crecimiento en glicerol de la ΔGy . Aunado a esto, se plantea analizar la actividad particular de cada complejo mitocondrial. Esto permitirá identificar posibles alteraciones específicas de la función de alguna proteína o complejo mitocondrial.

Como se mencionó, es inusual que una mutante que presenta una deficiencia de crecimiento en glicerol y tiene disminuidos los citocromos no tenga una deficiencia respiratoria. Para resolver este conflicto, se propone medir la respiración en células crecidas en medios respiratorios para eliminar la posible interferencia de la glucosa en los resultados; asimismo, también es importante realizar oximetrías en mitocondrias aisladas y no solo en células completas, ya que esto nos permitirá cuantificar la cantidad de oxígeno que se consume y obtener un buen control respiratorio. Además, con este experimento se eliminan variables que pueden interferir con los resultados, como problemas para metabolizar el sustrato y la respiración basal presente en las células gracias a los nutrientes que tienen almacenados.

Cabe la posibilidad de que la mutante ΔGy no tenga alteraciones en la respiración y de que su deficiencia de crecimiento en medios de cultivo respiratorios esté más relacionada con un asunto metabólico. Debido a que la deficiencia de crecimiento se observa más en glicerol, se propone determinar la expresión de genes relacionados con el metabolismo del glicerol (*GUT1*, *GUT2*, *STL1*) o realizar una prueba de utilización del glicerol. Por otro lado, se sabe que en presencia de glucosa hay muchos genes que se encuentran reprimidos, entre estos están los que se encargan de metabolizar fuentes de carbono no fermentables. Cuando se cambia el cultivo a una fuente de carbono no fermentable es necesario que estos genes se des-repriman para que la célula pueda metabolizar el nuevo compuesto y crecer. En consecuencia, se pretende analizar el cambio en la expresión de estos genes.

XII. REFERENCIAS

1. Adams, A., Gottschling, D., Kaiser, C. y T. Stearns. 1997. Methods in yeast genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Edición de 1997. USA. Pp. 177.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K y Walter, P. 2008. Molecular Biology of the Cell. 5ª edición. Garland Science. USA. pp. 723-742
3. Bardwell, L. 2005. A walk-through of the yeast mating and pheromone response pathway. Review. *Peptides*. 26, 339-350.
4. Brandt, U. 2006. Energy Converting NADH: Quinone Oxidoreductase (Complex I). Review. *Annual Review of Biochemistry*. 75:69-92.
5. Cruz, I. 2016. Caracterización de la fosforilación oxidativa y el megacanal mitocondrial inespecífico de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* carente de Shy1. Tesis de Licenciatura para obtener el título de bióloga. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 63.
6. Dickinson, R. y Schweizer, M. 2004. The metabolism and molecular physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. 2a edición. CRC Press. Londres, Inglaterra. Pp. 476.
7. Dohlman, H. y Thorner, J. 2001. Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. Review. *Annu Rev. Biochem.* 70:703-54.
8. Egner, A. Jakobs, S. y S. Hell. 2002. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *PNAS*. Vol 99, No. 6. Pp. 3370-3375.
9. Escamilla, E., Contreras, M, Ramírez, R. y Linares, V. 1985. Organización, regulación y evolución del sistema respiratorio bacteriano. Capítulo en: Mensaje Bioquímico. Vol. VIII. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 289-336.
10. Gornall, A., Bardawill, C. y M. David. 1948. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*. 177: 751-766.
11. Grauslund, M. Lopes, J y Rønnow, B. 1999. Expression of *GUT1*, which encodes glycerol kinase in *Saccharomyces cerevisiae*, is controlled by the positive regulators Adr1p, Ino2p and Ino4p and the negative regulator Opi1p in a carbon source-dependent fashion. *Nucleic Acids Research*, Vol. 27, N° 22, 4391-4398.
12. Hamm, H. 1998. The many faces of G protein signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (2): 669-672.

13. Hirschman J. y D. Jenness. Dual lipid modification of the yeast γ subunit Ste18p determines membrane localization of Gbetagamma. *Mol Cell Biol* 19(11):7705-11.
14. Hoffman, C. y F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*. 57(2-3):267-72.
15. Horne, J., Hollomon, D. y Wood, O. 2001. Fungal respiration: A fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta- Bioenergetics*, 1504 (2-3). pp. 179-195.
16. Leboucher, G., Che, Y., Yang, M., Shaw, K., Zhou, M., Veenstra, T., Glickman, M. y A. Weissman. 2012. Stress-Induced Phosphorylation and Proteasomal Degradation of Mitofusin 2 Facilitates Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis. *Molecular Cell*. 47, 547-557.
17. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaira, P., Baltimore, D. y Darnell, J. 2003. *Molecular Cell Biology*. 5th edition. Editorial W.H. Freeman & Co Ltd. Pp. 1152.
18. Mashkevich, G., Repetto, B., Glerum, D., Jin, C y A. Tzagoloff. 1997. SHY1, the Yeast Homolog of the Mammalian SURF-1 Gene, Encodes a Mitochondrial Protein Required for Respiration. *Journal of Biological Chemistry*. 272(22), pp 14356-14364.
19. *Methods in Enzymology*. Vol 18.
20. Mills, D. y S. Ferguson-Miller. 2003. Understanding the mechanism of proton movement linked to oxygen reduction in cytochrome *c* oxidase: lessons from other proteins. Minireview. *FEBS Letters*. 545:47-51.
21. Molecular Probes. 2001. Probes for Yeast Viability. Product information. Pp 6.
22. MP Biomedicals. Hoja técnica GeneClean Kit. pp. 8-9.
23. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:263-73.
24. Nicholls, D. y Ferguson, S. 2002. *Bioenergetics* 3. 2nd edition. Pp. 297.
25. Nicholls, D. y Ferguson, S. 2013. 7-ATP Synthases and Bacterial Flagella Rotary Motors. *Bioenergetics*. 4th edition. Pp. 197-220.
26. Peña, A, Piña, MZ, Escamilla, E. y Piña, E. 1977. A novel method for the rapid preparation of coupled yeast mitochondria. *FEBS Letters*, 80 (1). Pp. 209-213.

27. Pon, L y G. Schatz, 1991. Biogenesis of Yeast Mitochondria en: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Vol. 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Editado por Broach, J., Pringle, J. y E. Jones. pp. 333-406.
28. Promega. Manual técnico de los sistemas de vectores pGEM-T y pGEM-T Easy. Pp. 28. www.promega.com.
29. QIAprep Miniprep Handbook. 2015. Manual técnico. 4a edición. Pp. 42. www.qiagen.com.
30. Schüller, H. 2003. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Review article. *Current Genetics* 43:139-160.
31. Sherman, F. 1962. Respiration-Deficient mutants of yeast. I. *Genetics*. 48: 375-385
32. Sigma Aldrich product information. DAPI. Pp. 2. www.sigmaaldrich.com.
33. Spiegel, A., Jones, T., Simonds, W. y Weinstein, L. 1994. G proteins. Molecular Biology Intelligence Unit. R.G. Landes Company, Austin, Texas, EUA. Pp. 144.
34. Sprague, G. y Cronan, J. 1976. Isolation and Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Defective in Glycerol Catabolism. *Journal of Bacteriology*. Vol 129, N° 3. P. 1335-1342.
35. Swinnen, S., Klein, M., Carrillo, M., McInnes, J, Nguyen, H y E. Nevoigt. 2013. Re-evaluation of glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an isolate that grows on glycerol without supporting supplements. *Biotechnology for Biofuels*. 6:157.
36. Thermo Fisher Scientific product information. 2008. MitoTracker Mitochondrion-Selective Probes. Pp. 6. www.thermofisher.com.
37. Trumpower, B. 1990. The Protonmotive Q Cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome *bc₁* complex. Minireview. *The Journal of biological chemistry*. Vol. 256, No. 20. pp. 11409-11412.
38. Turcotte, B., Liang, X., Robert, F. y N. Soontorngun. 2009. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. Minireview. *Federation of European Microbiological Societies*. 10: 2-13.
39. Uribe, S., Ramírez, J. y Peña, A. 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology*, 161 (3). Pp. 1195-1200.

40. Visser, W., van Spronsen, E., Nanninga, N., Pronk, J., Kuenen, G. y P. Dijken. 1995. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 67:243-253.
41. Wang, G. y R. Deschenes. 2006. Plasma Membrane Localization of Ras Requires Class C Vps Proteins and Functional Mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. Vol. 26, No. 8. Pp. 3243-3255.
42. Whiteway, M. y Thomas, D. 1994. Site-directed mutations altering the CAAX Box of the Ste18, the yeast pheromone-response pathway G γ subunit. *Genetics*. 137:967-976.