



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**INTERACCIÓN GENÉTICA ENTRE LOS GENES *CYS4* Y *CLN3* EN  
LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ROSARIO PAULINA MARTÍNEZ VELÁZQUEZ**



**Cd. Mx.**

**AÑO 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. Sobeida Sánchez Nieto

**VOCAL:** Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

**SECRETARIO:** Dr. José Francisco Torres Quiroz

**1er. SUPLENTE:** M. en C. Javier Axosco Marin

**2° SUPLENTE:** Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

**ESTA TESIS SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO 102 DEL EDIFICIO ORIENTE, EN EL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ESTRUCTURAL DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:** \_\_\_\_\_  
Dr. José Francisco Torres Quiroz

**SUPERVISOR TÉCNICO:** \_\_\_\_\_  
Dra. Paola Moreno Álvarez

**SUSTENTANTE:** \_\_\_\_\_  
Rosario Paulina Martínez Velázquez

---

## AGRADECIMIENTOS

---

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. José Francisco Torres Quiroz en el laboratorio 102-Oriente del departamento de Bioquímica y Biología Estructural en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Paola Moreno Álvarez para el desarrollo de este trabajo de tesis.

Se agradece al Dr. Roberto Coria Ortega y a miembros de su equipo de trabajo: la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y la Dra. Mariana Hernández-Elvira por las facilidades otorgadas con el microscopio de epifluorescencia, la asistencia y el préstamo de cepas y de reactivos.

Este proyecto contó con asesoría técnica de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, la Dra. Laura Ongay Larios, la Biól. María Guadalupe Codiz Huerta y la M en C. Minerva Mora Cabrera.

Se reconoce al Dr. Antonio Peña Díaz y a miembros de su equipo de trabajo: la Dra. Martha Eydi Ruse Calahorra Fuertes y la M en C. Norma Silvia Sánchez Sánchez por las facilidades para el uso del lector de placas.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IN209219.

---

## CONTENIDO

---

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	iv
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	vi
RESUMEN.....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Interacciones genéticas.....	1
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo experimental.....	2
1.3 El ciclo celular y la fase G1 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	4
1.4 <i>CYS4</i> y <i>CLN3</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
1.5 H <sub>2</sub> S y S-persulfuración.....	8
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>9</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos particulares.....	12
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
5.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos.....	13
5.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	16
5.3 Obtención de células competentes.....	16
5.4 Delección de <i>CLN3</i> para obtener la cepa mutante <i>cln3Δ</i> , transformación de células BY4742.....	17
5.5 Delección de <i>CLN3</i> para obtener la cepa doble mutante <i>cys4Δcln3Δ</i> , transformación de células <i>cys4Δ</i> .....	17
5.6 Comprobación de la delección de <i>CLN3</i> en las cepas <i>cln3Δ</i> y <i>cys4Δcln3Δ</i> .....	18
5.7 Clonación de <i>CLN3</i> en vector pJET1.2.....	19
5.8 Construcción de plásmidos.....	20
5.8.1 Transformación de levaduras con los plásmidos construidos.....	23
5.9 Cinéticas de crecimiento.....	24
5.10 Goteos.....	24
5.11 Análisis microscópico.....	24
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
6.1 Obtención de cepas mutantes <i>cln3Δ</i> .....	25
6.1.1 Eliminación del gen <i>CLN3</i> .....	26
6.1.2 Transformación de cepa BY4742 para obtención de cepas <i>cln3Δ</i> .....	28
6.1.3 Transformación de <i>cys4Δ</i> para obtener la cepa <i>cys4Δcln3Δ</i> .....	29
6.2 Confirmaciones de construcciones de plásmidos.....	31
6.2.1 Confirmación de subclonación de <i>CYS4</i> en el vector pRS46, plásmido pRM06....	31
6.2.2 Confirmación de subclonación de <i>CYS4</i> en el vector YEp352, plásmido pRM08...32	
6.2.3 Clonación y subclonación de <i>CLN3</i> .....	33
6.2.4 Confirmación de subclonación de <i>CLN3</i> en vectores pRS416 y YEp352, plásmidos pRM09 y pRM10.....	34
6.3 Interacción genética entre <i>CYS4</i> y <i>CLN3</i> .....	36
6.4 Fenotipo de las cepas BY4742, <i>cys4Δ</i> , <i>cln3Δ</i> y <i>cys4Δcln3Δ</i> en respuesta a estrés....39	
6.4.1 La ausencia de oxígeno no parece afectar la capacidad para dividirse de las células <i>cys4Δcln3Δ</i> .....	39

---

6.4.2 La mutante <i>cys4Δcln3Δ</i> es sensible a etanol.....	43
6.4.3 La mutante <i>cys4Δcln3Δ</i> es sensible a estrés oxidante.....	44
6.4.4 No hay una interacción genética entre <i>cys4Δ</i> y <i>cln3Δ</i> bajo presión osmótica.....	46
6.4.5 En estrés de retículo endoplásmico <i>cys4Δ</i> y <i>cln3Δ</i> tienen una interacción genética positiva.....	47
6.4.6 No se puede afirmar la interacción genética entre <i>CYS4</i> y <i>CLN3</i> al cambiar la fuente de carbono.....	48
6.4.7 La doble mutante <i>cys4Δcln3Δ</i> también muestra poca viabilidad en medios no fermentativos.....	50
6.4.8 La producción de H <sub>2</sub> S no se ve afectada en cepas con sobreexpresión de <i>CLN3</i> y <i>CYS4</i> .....	60
<b>7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
7.1 Obtención de mutantes para el análisis de su fenotipo.....	63
7.2 Determinación de la interacción genética entre <i>CYS4</i> y <i>CLN3</i> .....	63
7.3 La ausencia de oxígeno no afecta la división celular de la cepa <i>cys4Δcln3Δ</i> .....	66
7.4 La presencia de etanol en el medio es perjudicial para la doble mutante <i>cys4Δcln3Δ</i> .....	66
7.5 El estrés oxidante afecta a la cepa <i>cys4Δcln3Δ</i> .....	67
7.6 Bajo presión osmótica no se observa una interacción entre los genes <i>CYS4</i> y <i>CLN3</i> .....	68
7.7 <i>CYS4</i> y <i>CLN3</i> presentan una interacción bajo estrés de retículo endoplásmico.....	68
7.8 No es evidente la presencia de una interacción genética entre <i>CYS4</i> y <i>CLN3</i> al activar la respiración celular.....	69
7.9 La viabilidad de la cepa <i>cys4Δcln3Δ</i> también se ve afectada en medios no fermentativos.....	70
7.10 La producción de H <sub>2</sub> S no se ve afectada al sobre-expresar a los genes <i>CYS4</i> y <i>CLN3</i> .....	72
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>9. REFERENCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>80</b>
<b>Anexo I: Plásmidos.....</b>	<b>80</b>
<b>Anexo II: Esquemas.....</b>	<b>86</b>

---

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

### FIGURAS

Figura 1.1 Esquema del ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
Figura 1.2 Proteínas en ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
Figura 1.3 Esquema de la vía de la transulfuración en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	7
Figura 6.1 Electroforesis de productos de PCR de Tabla 5.5 y 5.6.....	25
Figura 6.2 Esquema del proceso mediante el cual se lleva a cabo la eliminación de genes en levaduras.....	26
Figura 6.3 Esquema del proceso de deleción del gen <i>CLN3</i> utilizando plásmido de deleción.....	27
Figura 6.4 Electroforesis para confirmar <i>cln3Δ</i> .....	29
Figura 6.5 Electroforesis para confirmar <i>cys4Δcln3Δ</i> .....	30
Figura 6.6 Confirmación de pRM06.....	31
Figura 6.7 Confirmación de pRM08.....	32
Figura 6.8 Amplificación de <i>CLN3</i> .....	33
Figura 6.9 Confirmación de pRM04.....	34
Figura 6.10 Confirmación de pRM09 y pRM10.....	35
Figura 6.11 Cinética de crecimiento de cepas WT (BY4742), <i>cys4Δ</i> , <i>cln3Δ</i> y <i>cys4Δcln3Δ</i> .....	36
Figura 6.12 Microscopía de cepas cultivadas en placas de 100 pozos.....	38
Figura 6.13 Goteos en medio YPD de los cultivos líquidos con mínima cantidad de oxígeno realizados a las 24, 48 y 72 h de incubación.....	40
Figura 6.14 Análisis de viabilidad por microscopía. Cultivos con mínima cantidad de oxígeno, tinciones realizadas a las 24 h de incubación.....	41
Figura 6.15 Análisis de viabilidad por microscopía. Cultivos con mínima cantidad de oxígeno, tinciones realizadas a las 48 h de incubación.....	41
Figura 6.16 Análisis de viabilidad por microscopía. Cultivos con mínima cantidad de oxígeno, tinciones realizadas a las 72 h de incubación.....	42
Figura 6.17 Goteos en medio YPD con diferentes concentraciones de etanol.....	43
Figura 6.18 Goteos en medio YPD con diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	45
Figura 6.19 Goteos en medio YPD adicionando diferentes solutos.....	46
Figura 6.20 Goteos en medio YPD adicionando diferentes concentraciones de tunicamicina.....	47
Figura 6.21 Goteos en medios con diferentes fuentes de carbono no fermentativo.....	49
Figura 6.22 Análisis microscópico de la morfología de las cepas en medios con diferentes fuentes de carbono a las 24 h de incubación.....	51
Figura 6.23 Análisis microscópico de la morfología de las cepas en medios con diferentes fuentes de carbono a las 48 h de incubación.....	53
Figura 6.24 Análisis de viabilidad de las cepas incubadas en medio YPD.....	55
Figura 6.25 Análisis de viabilidad de las cepas incubadas en medio YP-Lac 2%.....	56
Figura 6.26 Análisis de viabilidad de las cepas incubadas en medio YP-Lac/Glicerol 2%.....	57
Figura 6.27 Análisis de viabilidad de las cepas incubadas en medio YP-EtOH/Glicerol 2%.....	58
Figura 6.28 Producción de H <sub>2</sub> S. Transformaciones de cepas BY4742.....	61

---

Figura 6.29 Producción de H <sub>2</sub> S. Transformaciones de cepas <i>cys4Δ</i> .....	61
Figura 6.30 Producción de H <sub>2</sub> S. Transformaciones de cepas <i>cln3Δ</i> .....	62

## TABLAS

Tabla 5.1.1 Cepas utilizadas en este estudio.....	13
Tabla 5.1.2 Plásmidos utilizados en este estudio.....	14
Tabla 5.1.3 Oligonucleótidos utilizados en este estudio.....	15
Tabla 5.4 Mezcla y condiciones de PRC para delección de <i>CLN3</i> en BY4742.....	17
Tabla 5.5 Mezcla de PCR para delección de <i>CLN3</i> en <i>cys4Δ</i> .....	17
Tabla 5.6 Mezcla y programa de PCR de confirmación de la mutante sencilla <i>cln3Δ</i> .....	18
Tabla 5.6.1 Mezcla y programa de PCR de confirmación de la mutante sencilla y la doble mutante.....	19
Tabla 5.7 Condiciones de PCR para amplificación del gen <i>CLN3</i> con sitios de restricción <i>BamHI</i> y <i>XbaI</i> .....	19
Tabla 5.7.1 Enzimas de restricción utilizadas para digestión de plásmidos de los que se obtendrá en inserto.....	21
Tabla 5.7.2 Digestiones con enzimas específicas para confirmar la subclonación de los genes <i>CLN3</i> y <i>CYS4</i> en los vectores correspondientes.....	22
Tabla 5.8 Transformaciones de cepas con los plásmidos construidos.....	23



---

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

clonNAT	Nourseotricina N-acetil-transferasa
G418	Geneticina
Amp	Ampicilina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
pb	Pares de bases
LB	Medio Luria Bertani, rico para bacterias
YPD	Medio Yeast Extract Peptone Dextrose, rico parra levaduras
YP-Gal	Medio Yeast Extract Peptone Galactose
YP-Lac	Medio Yeast Extract Peptone Lactate
YP-Lac/glicerol	Medio Yeast Extract Peptone Lactate Glycerol
YP-EtOH/glicerol	Medio Yeast Extract Peptone Ethanol Glycerol
SD	Medio mínimo para levaduras
LiOAc	Acetato de litio
DMSO	Dimetil Sulfóxido
TM	Tunicamicina
EtOH	Etanol
ROS	Especies reactivas de oxígeno
D.O.	Densidad óptica
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados Celsius
seg	Segundos
min	Minutos
h	Hora(s)
ppi	Pixeles por pulgada

---

## RESUMEN

---

Una interacción genética se puede definir como una desviación del fenotipo esperado al combinar mutaciones genéticas múltiples y también mutaciones entre alelos. La determinación de una interacción genética entre dos genes se realiza con el análisis del fenotipo de las mutantes sencillas y el de la doble mutante para comprobar que el fenotipo observado no representa la suma de las mutaciones, suponiendo que las mutaciones individuales presentan un fenotipo diferente al de la cepa silvestre. En levaduras, las interacciones genéticas se evalúan por medio del *fitness* o aptitud biológica, que consiste en el análisis y comparación de la cinética de crecimiento de las cepas que poseen la mutación sencilla, la doble mutante y la cepa silvestre para determinar la existencia de una interacción genética.

El gen *CYS4* codifica a la proteína cistationina  $\beta$ -sintasa, responsable de convertir a la homocisteína y a la serina en cistationina, el primer paso comprometido en la biosíntesis de cisteína en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde se produce  $H_2S$  como metabolito secundario. También se ha demostrado que en el ciclo celular influye en el avance del checkpoint START al promover el crecimiento celular. Una mutante *cys4* $\Delta$  tiene una fase G1 prolongada.

Por otra parte, el gen *CLN3* codifica a la ciclina Cln3 de la fase G1 del ciclo celular de *S. cerevisiae*, activa a la cinasa Cdc28p promoviendo así la progresión de la fase G1 a la fase S. La mutante *cln3* $\Delta$  también tiene una fase G1 más larga. En estudios realizados en el laboratorio se descubrió que la proteína Cln3 puede sufrir persulfuración, una modificación post-traducciona que se lleva a cabo en residuos de cisteína, en el grupo tiol, utilizando  $H_2S$  en la reacción.

La relación que guardan los genes *CYS4* y *CLN3* con el ciclo celular y la función del  $H_2S$  en levaduras, condujo a analizar la posible existencia de una interacción genética entre dichos genes.

En este proyecto se utilizaron distintas técnicas de biología molecular para poder generar mutantes de los genes y así poder determinar la existencia de la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3*. Se determinó la interacción genética entre estos dos genes mediante cinéticas de crecimiento. También se analizó la habilidad de crecimiento en medios de crecimiento con distintos estresores para observar la presencia de interacciones genéticas positivas o negativas bajo diferentes condiciones.

Se observó la existencia de interacciones genéticas positivas y negativas entre los genes *CYS4* y *CLN3* dependiendo de la condición de crecimiento. Estos resultados sugieren que estos dos genes están conectados funcionalmente. La interacción genética se aprecia bajo ciertas condiciones biológicas como el estrés oxidante y el estrés en retículo endoplásmico.

El fenotipo morfológico y viabilidad que presenta la cepa con doble mutación *cys4* $\Delta$ *cln3* $\Delta$  en medios con diferentes fuentes de carbono puede deberse a la activación de la respiración celular, promoviendo la generación de especies reactivas de oxígeno y, por consecuencia, el estrés oxidante.

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1 Interacciones genéticas

Se puede definir a una interacción genética como la influencia de alelos de distinto locus para la determinación de un fenotipo. Son desviaciones de la genética mendeliana debido a que, a diferencia de la genética mendeliana, en la que el fenotipo observado se debe sólo a la expresión del gen dominante, cierto fenotipo observado puede ser el resultado de la expresión de un grupo de genes que, a su vez, pueden estar regulados por otro gen.

A inicios del siglo XX se observaron indicios de que algunos genes no actuaban solos y que la mutación de un solo gen podía tener múltiples efectos. A pesar de que el impacto que tienen una mutación se observa principalmente en la característica que se está investigando, muchas mutaciones producen efectos en otras características en la célula. Dichos efectos son llamados Efectos Pleiotrópicos. La pleiotropía se basa en la complejidad que presentan las interacciones genéticas en una célula<sup>1</sup>.

Por lo general, las interacciones genéticas se presentan en rutas bioquímicas o de desarrollo de un organismo. Como un ejemplo se puede mencionar a la planta de campanilla o especies de *Campanula*, en donde el fenotipo de la cepa silvestre consiste en la flor color azul, resultado de la expresión de dos genes, W1 y W2 (ejemplos), cuando se obtienen mutantes sencillas de W1 y W2, los fenotipos observados son flores color blanco en ambos casos, indicando que se requiere de la expresión de ambos genes para observar el fenotipo azul. El gen W1 codifica una enzima que se encarga de convertir al precursor que produce la coloración a un intermediario, el gen W2 codifica a otra enzima que convierte al intermediario en el pigmento antocianina, que brinda el color azul en la flor. Aquí se presenta una interacción genética ya que se requiere la expresión de ambos genes para que se pueda observar un fenotipo específico, sin la expresión de alguno de estos genes el fenotipo resultante se ve afectado<sup>1,2</sup>.

Se le denomina epistasis a la interacción genética al expresar un fenotipo, donde el alelo de un gen enmascara la expresión de los alelos de otro gen y expresa en su lugar su propio fenotipo y, como se mencionó anteriormente, es indicativa de genes que interactúan en una misma ruta bioquímica o de desarrollo. El término epistasis se utiliza en genética de población, en la que se utilizan herramientas estadísticas para el estudio del fenotipo. La epistasis, o interacción entre genes, ha sido fundamental para comprender la estructura y función de vías genéticas, así como la evolución de sistemas genéticos complejos<sup>1,2</sup>.

Para estudiar las interacciones genéticas, que contribuyen a cierta característica biológica, y disectar la complejidad entre ellas se hace uso de una metodología estándar en la genética. Esta consiste básicamente en producir mutaciones en las células, después estudiar las mutaciones para determinar cuántos *loci* hay involucrados y las mutaciones que son de alelos del mismo gen. Finalmente se combinan las mutaciones para formar cepas dobles mutantes para observar si interactúan, recordando que la interacción genética implica que los productos de dicha interacción repercuten en un fenotipo de la célula<sup>1,2</sup>. En organismos haploides, para poner en evidencia la presencia de interacciones genéticas entre ciertos genes, la estrategia consiste en crear mutantes sencillas de los genes de interés, seguido de la observación y análisis del fenotipo celular, terminando con la

generación de una doble mutante de los genes en cuestión para observar el fenotipo y determinar así la existencia de una interacción genética<sup>1,3</sup>.

El *fitness* se evalúa para poder determinar la existencia de una interacción genética. El *fitness* se puede traducir como una aptitud biológica, la capacidad que posee un organismo para reproducirse al contar con cierto genotipo. En epistasis, el *fitness* de la cepa con la doble mutación es el que indica la presencia de una interacción genética. Si la mutación en un organismo conlleva a la pérdida de cierta característica, se supone que la aptitud de dicho organismo para desarrollarse se verá disminuida al compararse con la cepa silvestre, cada gen tendrá un *fitness* propio. Se espera, entonces, que dos mutaciones empeorarían la capacidad del organismo para desarrollarse, pero si existe algún tipo de interacción genética entre los genes bajo estudio el fenotipo observado puede ser benéfico o perjudicial. Dos mutaciones son aditivas cuando el efecto de la doble mutación es la suma del efecto de las mutaciones individuales. Esto generalmente ocurre cuando se mutan genes de vías o procesos biológicos distintos, indicando que no existe una interacción genética entre los genes mutados<sup>4,5,6</sup>.

Las interacciones genéticas pueden ser positivas o negativas. El fenotipo se aprecia en cepas con doble mutación. Una interacción genética positiva (epistasis positiva) se presenta cuando la doble mutante tiene un fenotipo más apto que el esperado. Por otro lado, una interacción genética negativa (epistasis negativa) es evidente cuando el fenotipo de la doble mutante es menos apto que el que se espera por los efectos individuales de cada mutación, se pueden generar pérdidas de aptitud, es decir, la capacidad de un organismo para realizar adecuadamente cierta actividad o función, la habilidad natural que se tiene para desenvolverse adecuadamente bajo ciertas condiciones<sup>7,8</sup>.

### 1.2 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es utilizada comúnmente tanto en la industria como en la investigación por poseer ventajas intrínsecas que permiten utilizarla como un modelo de estudio de una gran gama de procesos biológicos y bioquímicos. Es uno de los microorganismos más estudiados. En el ámbito de la industria la levadura en cuestión se utiliza en procesos de síntesis de proteínas y compuestos o en la producción de alimentos como pan y bebidas alcohólicas.

*S. cerevisiae* es un organismo eucarionte, un hongo unicelular que posee un genoma relativamente pequeño, simplificando su análisis tanto genético como molecular. El genoma de *S. cerevisiae* fue secuenciado por completo y dado a conocer en 1996 en una colaboración de laboratorios de todo el mundo a cargo de André Goffeau, cuenta con aproximadamente 12 millones de pares de bases, cuatro veces mayor al genoma de la bacteria *Escherichia coli* y unas 200 veces menor al genoma humano. Una levadura haploide cuenta con 16 cromosomas en los que se encuentran entre 200 a 2200 Kb con poca cantidad de intrones. Se localizaron 6183 marcos de lectura abiertos (ORF) y se predijo que de 5800 pertenecía a genes que codificaban proteínas. Un 72% de su genoma es codificante, 30% de los genes se han caracterizado, un porcentaje del resto corresponden a genes que codifican para proteínas estructuralmente relacionadas con productos génicos caracterizados en levadura u otros organismos. Los genes son

relativamente pequeños, en promedio cuentan con 1.45Kb. Los cromosomas cuentan con retrotransposones, variando en número y posición dependiendo de la cepa de *S. cerevisiae*<sup>9, 10</sup>.

El genoma no nuclear de *Saccharomyces cerevisiae* consta del ADN mitocondrial, el cual codifica para un bajo porcentaje de proteínas mitocondriales y componentes para la transcripción mitocondrial. La mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* cuentan con plásmidos 2 $\mu$ , que se puede replicar y su ausencia en otras cepas no representa alguna modificación en el fenotipo<sup>11, 12</sup>.

El ciclo de vida de *S. cerevisiae* puede ser vegetativo o sexual. El ciclo de vida vegetativo consiste en la división celular por gemación, donde una célula hija crece produciendo una gema en la célula madre, prosigue la división nuclear y la síntesis de la pared celular para terminar con la separación de las células, se lleva a cabo una división mitótica. Este ciclo se puede presentar en células haploides y diploides. Las células haploides son las que se reproducirán sexualmente<sup>12</sup>.

Existen dos tipos sexuales de *S. cerevisiae*, los cuales son **a** y  **$\alpha$** , que son determinados por los alelos *MATa* y *MAT $\alpha$* . Si se hace un cultivo de dos cepas haploides, una *MATa* y otra *MAT $\alpha$* , formando así una célula diploide *MATa/MAT $\alpha$* , esto sólo ocurre cuando se tienen tipos sexuales diferentes. Las células diploides pueden esporular al mantenerse en condiciones en las que los nutrientes son limitados. En el proceso de esporulación, la célula diploide lleva a cabo división meiótica, dando como resultado a cuatro esporas haploides (que son células dentro de un asca), dos **a** y dos  **$\alpha$** . Se puede hacer uso de técnicas de microbiología para separar las células o disección de tétradas y hacer estudios de procesos como recombinación o segregación genética<sup>13, 14</sup>.

Otra de las características importantes de *S. cerevisiae* es que puede sufrir el proceso de transformación, una forma de transferencia horizontal de ADN. En este proceso se introduce una molécula de dicho material genético al interior de una célula, ampliando el genoma celular y pudiendo resultar en cambios heredables. Con estas inserciones genómicas se puede revertir alguna auxotrofia de una cepa silvestre para obtener una cepa protótrofa a cierta molécula. Para poder manipular el genoma y llevar a cabo una transformación se hace uso de protocolos en los que se rompe la pared celular y se permeabiliza la membrana para poder introducir el fragmento de ADN deseado. Son requeridos vectores que puedan recombinarse con el ADN genómico o replicarse dentro del organismo transformado. Es esencial el uso de marcadores genéticos o marcadores de selección, genes que determinen la síntesis de algún aminoácido o nucleótido o que confieran resistencia a algún antibiótico, con el fin de identificar a las células que llevaron a cabo la transformación, logrando introducir el fragmento de ADN. Los genes que se usan como marcadores de selección deben de estar incluidos en los vectores con los que se pretende transformar a las células<sup>1, 13, 14, 15</sup>.

Los primeros marcadores de selección utilizados en transformaciones de levaduras fueron *URA3*, *LEU2* e *HIS3*, que fueron clonados en plásmidos propios de *E. coli* y posteriormente utilizados para crear bibliotecas para *S. cerevisiae*. La construcción de plásmidos para levaduras es importante para estudios y desarrollo de técnicas de biología molecular en dichos organismos. Los vectores o plásmidos construidos cuentan con una importante característica que es la capacidad de replicarse en *E. coli* y en levaduras al

contar con orígenes de replicación en ambos organismos, también cuentan con marcadores de selección expresables en levaduras y otros expresados en la bacteria. Hay diferentes tipos de vectores construidos para levaduras, existen plásmidos que carecen de origen de replicación por lo que son integrativos, recombinan con el ADN genómico para permanecer en la levadura; los plásmidos  $2\mu$  pueden mantener 12 copias aproximadamente dentro de la célula; vectores que poseen una región de replicación autónoma (ARS) y una región centromérica (CEN) no se integrarán al genoma y la levadura sólo contará con una copia de dicho vector; se pueden construir plásmidos con los orígenes de replicación que se deseen para tener ciertas copias por célula<sup>14, 16, 17 18</sup>.

La importancia de los vectores para levaduras radica en el hecho de que pueden ser utilizados para clonar genes y revertir mutaciones, clonación de genes silvestres o la generación de mutantes para el estudio detallado o caracterización del gen bajo investigación. Estos experimentos se pueden realizar en células haploides como en diploides, siguiendo los debidos procedimientos<sup>14, 19, 20, 21</sup>.

*Saccharomyces cerevisiae* tomó gran relevancia cuando se descubrió una de sus características más importantes, la capacidad de fermentar azúcares, lo que ha sido aprovechado a lo largo de la historia de la humanidad y ha servido para el desarrollo de la industria alimenticia. Se utiliza la fermentación industrial en la preparación de alimentos como el vino, la cerveza, el pan, entre otros. La fermentación alcohólica que presenta esta levadura representó un gran avance en la ciencia desde que se descubrió que llevaba a cabo este proceso bioquímico, ya que se comenzaron a realizar estudios sobre el metabolismo que produce etanol y bióxido de carbono a partir de la glucosa. Generalmente, la fermentación se realiza en condiciones de anaerobiosis, pero *S. cerevisiae* puede tener activada esta vía metabólica aún en presencia de oxígeno, puede metabolizar carbohidratos como glucosa, galactosa, sacarosa, entre otros, la oxidación completa de los carbohidratos produce dos moléculas de etanol, dos moléculas de agua y dos moléculas de bióxido de carbono, además, con el proceso bioquímico antes mencionado se obtiene poca energía, ya que se generan dos moléculas de ATP. *S. cerevisiae* también puede obtener energía proveniente de fuentes de carbono no fermentables, activando vías metabólicas alternativas a la fermentación<sup>22, 23, 24, 25, 26</sup>.

Todas las características que se han descrito hasta el momento son las que convierten a *Saccharomyces cerevisiae* como un modelo perfecto en diversas áreas de investigación. Desde hace años se ha utilizado a dicha levadura como modelo biológico en investigación por el hecho de que tiene una reproducción rápida y los medios de cultivo son baratos, posee un ciclo de vida vegetativo y un ciclo de vida sexual, lo que implica estudios en organismos haploides y diploides fáciles de reproducir. Este organismo es utilizado para los estudios de genética, metabolismo, caracterización de genes y proteínas entre muchos otros.

### 1.3 El ciclo celular y la fase G1 en *Saccharomyces cerevisiae*

El ciclo celular se refiere a la progresión de fases, eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren en una célula teniendo como objetivo la reproducción celular. Para lograr la reproducción celular es necesario que la célula crezca, que duplique componentes celulares

---

y así dividirse. En todos los organismos las células deben dividir su material genético y éste debe ser repartido cuidadosamente entre la célula madre y la hija. Se ha utilizado a *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de investigación y ha servido de base para el estudio de eucariontes superiores.<sup>27, 28</sup>

Las fases que conforman este proceso biológico son cuatro (Figura 1.1). A grandes rasgos, en la fase G<sub>1</sub> la célula crece hasta llegar a un tamaño crítico y aumenta la masa al sintetizarse gran cantidad de proteínas y otras macromoléculas. Le sigue la fase S, en la que el ADN se replica, en eucarionte los cromosomas se duplican. Después, en la fase G<sub>2</sub>, la célula se prepara para la división celular, continua la síntesis de proteínas. Finalmente, en la fase M, se lleva a cabo la división celular (mitosis) para dar origen a una célula hija. Durante el ciclo celular participan una serie de proteínas para la progresión entre fases, las cuales varían entre células humanas y de levaduras<sup>27, 29</sup>.

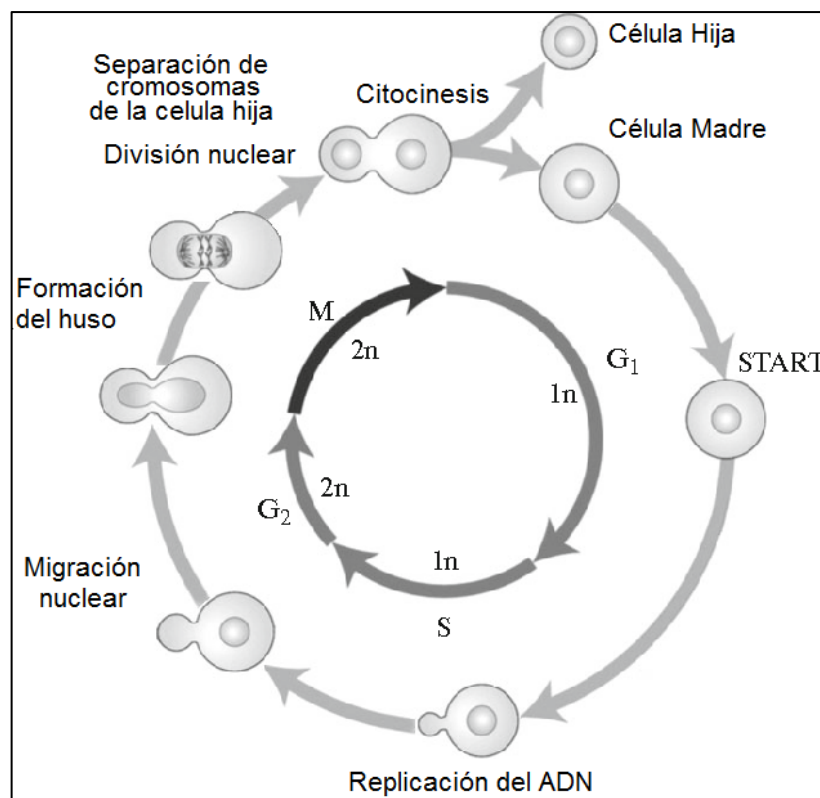


Figura 1.1 Esquema del ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Morfología celular y sucesos que se llevan a cabo durante las diferentes fases del proceso biológico<sup>27</sup>.

Las levaduras se dividen por gemación, por lo cual, la célula hija es de menor tamaño a la célula madre. La célula hija debe de alcanzar un tamaño crítico antes de iniciar la división celular<sup>28</sup>.

El desarrollo del ciclo celular está controlado por diversas ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDK's). Las ciclinas activan sitios específicos de las CDK y por medio de fosforilaciones de ciertos sustratos promueve el progreso del ciclo celular. Una vez que las ciclinas asociadas a la CDK cumplen su función, son ubiquitinizadas y

desactivan a la CDK. En *S. cerevisiae* la única CDK es la Cdc28p y es codificada por el gen *CDC28*, su nivel permanece constante durante todo el ciclo celular<sup>28</sup>.

Las ciclinas son las proteínas encargadas de dirigir los acontecimientos del ciclo celular. Existen diferentes tipos de ciclinas y su variación o abundancia depende de la fase en la que actúan (Figura 1.2). Las ciclinas de la fase G1 son necesarias para iniciar el ciclo celular, las ciclinas de la fase S se requieren para la replicación cromosómica y las ciclinas mitóticas son necesarias para la mitosis<sup>28</sup>.

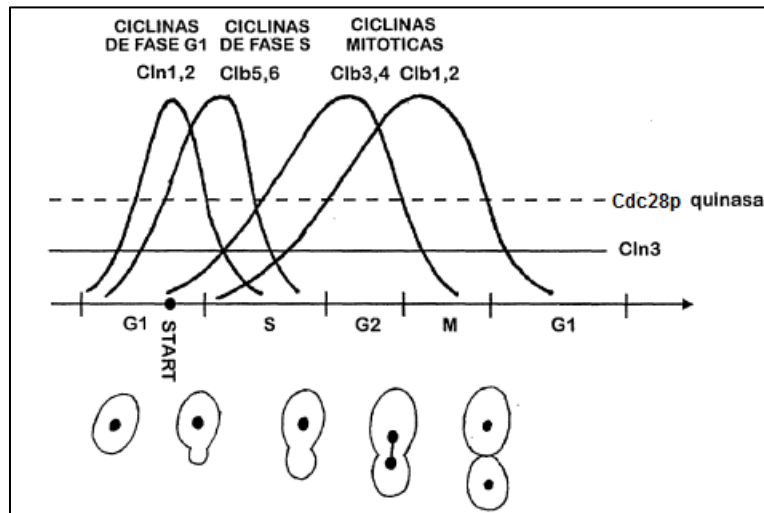


Figura 1.2 Proteínas en ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Variación relativa de las principales proteínas involucradas en el ciclo celular y morfología celular durante cada fase.

En la fase G1 del ciclo celular de *S. cerevisiae*, las proteínas importantes son la Cdc28p y Cln3. La CDK es activada por la ciclina Cln3 inicialmente, desencadenando una serie de reacciones de fosforilación y desfosforilación que tienen como fin la traducción de *CLN1* y *CLN2*. Las ciclinas Cln1 y Cln2 interactúan con la CDK para poder entrar al *checkpoint* START y proseguir con el ciclo celular. El nivel de Cln3 es constante durante todo el ciclo, aunque su vida media es muy corta<sup>28</sup>.

Uno de los puntos clave del ciclo celular en la fase G1 es START, un *checkpoint* en el que comienza a emerger la gema y va a comenzar la síntesis de ADN. Se verifican las condiciones y el tamaño celular sean los adecuados para progresar a la siguiente fase. Si la célula no tiene las condiciones necesarias, el ciclo celular se detiene en la fase G1. Una vez que la célula se encuentra en START, se compromete el progreso a la fase S<sup>27, 28</sup>.

Otro de los genes importantes durante el ciclo celular de *S. cerevisiae* es *CYS4*. No es un gen propio del ciclo celular, pero se ha observado relación con la duración de la fase G1 del ciclo celular. También se tienen registros en referencias que indican que la proteína Cys4p tiene una interacción física con la proteína Cdc28p.

#### 1.4 *CYS4* y *CLN3* en *Saccharomyces cerevisiae*

*CYS4* es un gen compuesto por 1523pb, localizado en el cromosoma VII del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Este gen codifica a la proteína cistationina β-sintasa (CBS), que



es la encargada de sintetizar cistationina a partir de homocisteína y serina. Este es el primer paso de la biosíntesis de cisteína por la vía de la transulfuración, este paso está comprometido (no es reversible). La vía de la transulfuración es la ruta metabólica en la que se interconvierte la homocisteína y cisteína formando como intermediario a la cistationina, se presenta en bacterias, mamíferos y levaduras, pero sólo *S. cerevisiae* cuenta con dos juegos de enzimas que catalizan las reacciones inversas, Cys4p y Cys3p son las enzimas responsables de convertir a la homocisteína a cisteína, mientras que Str2p y Str3p convierten a la cisteína en homocisteína (Figura 1.3)<sup>30, 31, 32, 33, 34</sup>.

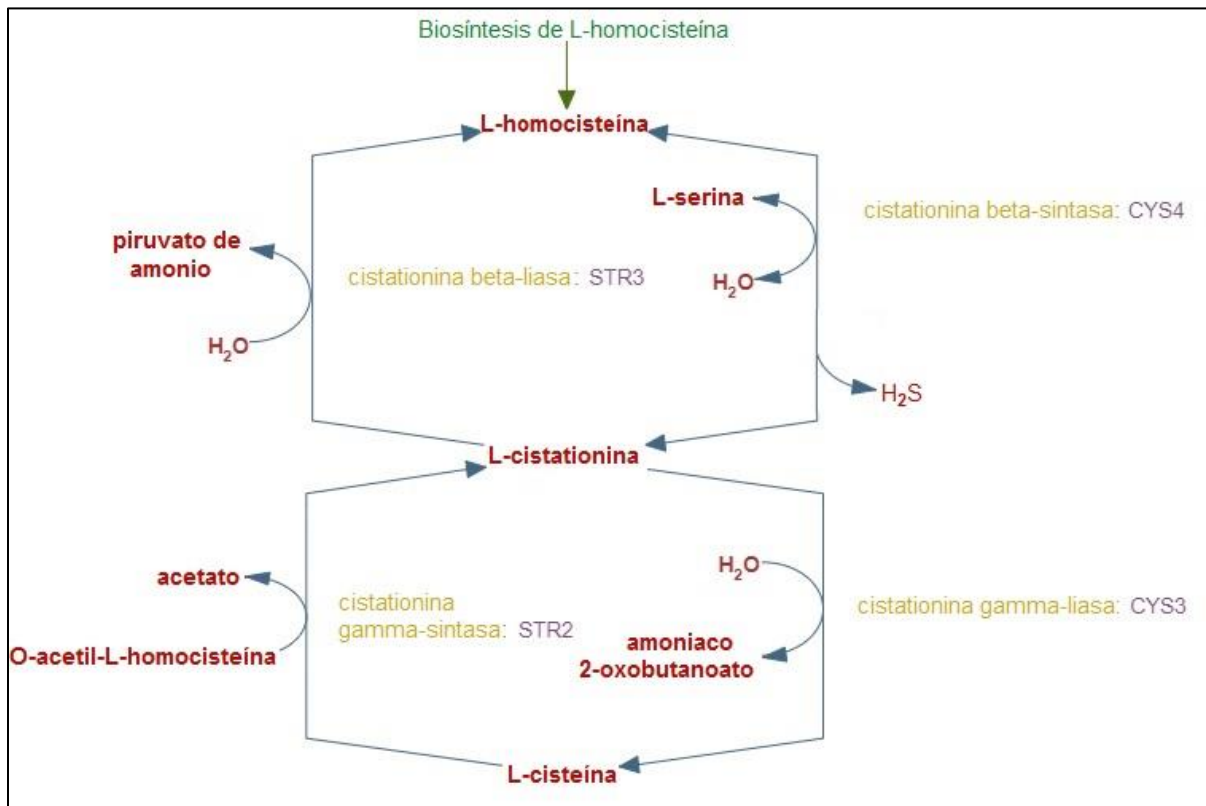


Figura 1.3 Esquema de la vía de la transulfuración en *Saccharomyces cerevisiae*. Reacciones que muestran la interconversión entre la homocisteína y la cisteína.

El gen *CYS4* de levadura posee un homólogo en humano, la cistationina  $\beta$ -sintasa (CBS) humana. Se han realizado estudios para la investigación de homocistinuria, enfermedad caracterizada por la acumulación de homocisteína debido a la deficiencia de la enzima. Se ha observado que la cistationina  $\beta$ -sintasa humana que es expresada en levaduras es funcional ya que revierte el fenotipo en cepas de levadura que no poseen el gen *CYS4*. La proteína de levadura y la humana son 38% idénticas y 72% similares, indicando la conservación evolutiva de dicha proteína<sup>35, 36, 37</sup>.

Se han realizado estudios en los que se observó que la actividad de la cistationina  $\beta$ -sintasa, en conjunto con la cistationina  $\gamma$ -liasa (responsable de convertir la cistationina a cisteína en la transulfuración) es responsable de la generación de  $H_2S$  intracelular. La CBS es la enzima que genera una mayor cantidad de  $H_2S$  en la ruta de la transulfuración. La proteína, tanto de levadura como la humana, producen  $H_2S$ <sup>38</sup>.

También se ha relacionado a *CYS4* con la transición de fases del ciclo celular en levaduras. Promueve el avance de START, un punto de control en la fase G1 del ciclo celular en *S. cerevisiae* y promueve el crecimiento celular<sup>39</sup>.

El gen *CLN3* consta de 1742pb, se encuentra en el cromosoma I y codifica a la proteína Cln3p, una ciclina involucrada en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular de *S. cerevisiae* al activar a la cinasa Cdc28p (única cinasa dependiente de ciclinas en este organismo). Regula la transcripción de otras ciclinas G1, Cln1 y Cln2, codificadas por los genes *CLN1* y *CLN2* respectivamente. Una vez que estas proteínas interactúan con la Cdc28p, la célula puede entrar al punto de control START<sup>40, 41, 42, 43, 44</sup>.

Las mutantes que no contienen a *CLN3* presentan un aumento en el tamaño celular y se alarga la fase G1 ya que se deben activar otros genes que son regulados por fosforilaciones y proteólisis para reponer la ausencia de *CLN3*<sup>45, 46</sup>.

Cuando se tiene la cantidad adecuada de nutrientes, las células dejan su estado de inactividad para iniciar el crecimiento y la posterior división celular. *CLN3* es de los primeros genes en activarse cuando se reponen los nutrientes. Estudios muestran que metabolitos como acetil-CoA favorecen la transcripción de *CLN3*, promoviendo así la entrada al ciclo celular<sup>47</sup>.

### 1.5 H<sub>2</sub>S y S-persulfuración

Se han realizado estudios del sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) por ser una molécula de señalización. Está involucrado en varios en varios procesos biológicos desde neurológicos hasta inmunológicos. Al tener un papel biológico importante, ha surgido la pregunta de cómo es el mecanismo de acción del gas en cuestión para lograr observar los efectos fisiológicos en organismos<sup>48, 49</sup>.

Una de las formas de señalización del H<sub>2</sub>S es la modulación de proteínas por medio de modificación denominada S-sulfhidratación, pero el término más adecuado es S-persulfuración. La S-persulfuración es una modificación oxidativa postraducciona que ocurre en el grupo tiol de residuos de cisteína, al igual que la S-nitrosación, S-sulfenilación y S-glutationilación. Esta modificación puede explicar los efectos del H<sub>2</sub>S ya que varias proteínas son controladas por la modificación mencionada<sup>48</sup>.

La S-persulfuración no ocurre con la reacción del grupo tiol directamente con el H<sub>2</sub>S. Se requiere que el grupo tiol esté oxidado y así reaccionar con un anión sulfuro. Otra manera de llevar a cabo la modificación es al reducir H<sub>2</sub>S con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obteniendo una molécula HSOH, que puede reaccionar con el grupo tiol de la cisteína produciendo la perulfuración; si HSOS reacciona con otra molécula de H<sub>2</sub>S se forma HSSH, que también puede ser atacado por el grupo tiol de la cisteína. Estas reacciones pueden ocurrir en condiciones fisiológicas<sup>50</sup>.

### 2. ANTECEDENTES

Las interacciones genéticas pueden estudiarse para disectar la complejidad que presentan los genes en determinadas rutas o procesos biológicos. En el punto anterior se explicó una manera de investigar y comprobar la existencia de interacciones genéticas. En organismos como *S. cerevisiae* el *fitness* que se evalúa es la cinética de crecimiento. Estos estudios se realizan en las cepas que poseen mutaciones sencillas de los genes bajo investigación, la cepa que cuenta con la doble mutación y la cepa silvestre, se esta manera se determina la existencia de una interacción entre los genes con los que se esté trabajando<sup>1, 6</sup>.

La cistationina  $\beta$ -sintasa, codificada por el gen *CYS4* en levadura, está altamente conservada entre humano y levadura. Ambas se relacionan con la producción de  $H_2S$  intracelular al llevar a cabo reacciones de la vía de transulfuración. Singh y colaboradores (2009) realizaron estudios de cinética enzimática en los que se analiza la actividad de la CBS humana y de *S. cerevisiae*. En este estudio determinaron que estas enzimas generan  $H_2S$  mediante un  $\beta$ -reemplazo de la cisteína por la homocisteína generando la cistationina. Estas enzimas generan  $H_2S$  en mayor cantidad comparándola con la otra enzima de la vía, la cistiotanina  $\gamma$ -liasa (CSE). Se sugiere que entre un 25-70% del  $H_2S$  generado en la ruta de la transulfuración es gracias a la enzima CBS y depende de la activación alostérica por S-adenosilmetionina<sup>38</sup>.

Se ha reportado una relación entre *CYS4* y la regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae*. Hoose y colaboradores (2012) muestran en un estudio en el que realizaron una serie de deleciones de una serie de genes, de los cuales, pocos eran los que alteraban el ciclo y el tamaño celulares. Para que la célula pueda comenzar su división, es necesario que se activen una serie de genes, biogénesis ribosómica, síntesis de proteínas y factores que aún no son relacionados con la regulación del ciclo celular. Descubrieron que una función no catalítica de la proteína codificada por *CYS4* promueve a START de dos maneras, una requiere la actividad catalítica de CBS y otra mediante una función no catalítica de la proteína. También se observó que la sobreexpresión de *CYS4* contribuye con el inicio temprano de START, disminuye el tamaño crítico celular y su tasa de crecimiento es mayor. Por otra parte, la cepa con eliminación de *CYS4* cuenta con una tasa de crecimiento menor, su proliferación es lenta. Realizando redes de interacciones de genes que codifican proteínas involucradas en una fase G1 larga, se encontró una relación entre *CYS4* y *CDC28*, este último está fuertemente relacionado con *CLN3*<sup>39</sup>.

Las cepas que cuentan con la eliminación del gen *CYS4*, en levaduras, producen una cantidad mayor de  $H_2S$  debido a la activación de la vía alterna de asimilación del azufre. También son auxótrofas a cisteína, en medios mínimos se requiere la adición de este aminoácido para la proliferación. Las cepas *cys4* $\Delta$  muestran un alargamiento de la fase G1 del ciclo celular y, por ende, el tamaño crítico celular aumenta. La mutante muestra una disminución en la tasa de reproducción<sup>39, 31</sup>.

Se ha reportado una interacción entre *CYS4* y *CDC28*. Gavin y colaboradores (2006) realizaron un estudio en el que estudiaron complejos proteicos en *S. cerevisiae*, purificaban proteínas por afinidad y los analizaban por espectrometría de masas. Relacionaron proteínas que tenían actividad en diversos procesos biológicos pero que se encuentran en el mismo complejo, de entre los cuales observaron la interacción física entre *CYS4* y *CDC28*<sup>51</sup>.

Uno de los genes importantes también relacionados con *CDC28* es *CLN3*. En *S. cerevisiae*, *CLN3* se expresa en mayor medida cuando la célula tiene los requerimientos necesarios para iniciar la división celular. Es la ciclina que activa a la Cdk única en levadura, Cdc28p, en la fase G1 del ciclo celular. Su activación desencadena una serie de fosforilaciones y proteólisis que permiten la transcripción de las demás ciclinas G1, *CLN1* y *CLN2*, que marcan la entrada a START. Se ha determinado que la ausencia de *CLN3* produce un aumento en el tamaño celular y el alargamiento de la fase G1 del ciclo celular<sup>45, 47</sup>.

La eliminación del gen *CLN3* en *S. cerevisiae* produce un alargamiento de la fase G1 de ciclo celular y, por consecuencia, el tamaño celular aumenta. Talarek y colaboradores (2017) observaron en un estudio que al colocar a mutantes *cln3Δ* en medios con fuentes de carbono no fermentativas las células disminuyen el tamaño celular<sup>45, 46</sup>.

En estudios realizados con anterioridad en nuestro laboratorio, se tuvieron indicios de que la proteína Cln3 podría ser blanco de S-persulfuración, una modificación postraduccional que se pueden presentar en residuos de cisteína en algunas proteínas. Para realizar esta modificación se requiere de un donador de azufre, H<sub>2</sub>S, y un grupo tiol libre en la proteína blanco.

### 3. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

Como se indicó en apartados anteriores, el organismo *Saccharomyces cerevisiae* se ha utilizado como modelo de investigación debido a todas las características que posee entre las que se encuentran la facilidad de modificar el genoma, su rápida reproducción, medios de cultivo relativamente baratos, se pueden tener cultivos de células haploides y diploides. Es por lo que representa una buena opción para investigar interacciones genéticas en dicho organismo.

Sabiendo que las interacciones genéticas se suelen presentar en genes que están relacionados con vías metabólicas o procesos biológicos y a eso sumamos lo que se sabe hasta el momento sobre los genes *CYS4* y *CLN3*, su implicación con la fase G1 del ciclo celular en *Saccharomyces cerevisiae* y la relación que podría existir con el H<sub>2</sub>S surge la pregunta sobre la posible interacción genética que podría presentarse entre los genes mencionados.

Al hacer uso de técnicas de biología molecular se pueden realizar ensayos en los que se pondría de manifiesto el fenotipo de las cepas adecuadas, según la literatura, para determinar así si existe una interacción genética entre los genes *CYS4* y *CLN3*. Los fenotipos que presenten las cepas generadas pueden variar dependiendo de las condiciones en las que se encuentren, por ello se puede determinar la existencia de interacciones genéticas en distintos contextos biológicos.

#### 3.1 Pregunta de Investigación

¿Existe algún tipo de interacción genética entre los genes *CYS4* y *CLN3* de *Saccharomyces cerevisiae*?

#### 3.2 Hipótesis

Si *CYS4* y *CLN3* tienen algún tipo de interacción genética en el control de la fase G1 y START del ciclo celular, ésta podría detectarse mediante el análisis fenotípico de las mutantes respectivas.

### 4. OBJETIVOS

#### Objetivo general:

- Determinar si existe una interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* en *Saccharomyces cerevisiae*.

#### Objetivos particulares:

- Realizar deleciones del gen *CLN3* para obtener la cepa con mutación sencilla *cln3Δ* y la cepa con doble mutación *cys4Δcln3Δ*.
- Evaluar por medio de curvas de crecimiento la existencia o no de una interacción genética.
- Observar y comparar el fenotipo de cepas mutantes *cys4Δ*, *cln3Δ*, la doble mutante *cys4Δcln3Δ* y la cepa silvestre en diferentes condiciones.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

## 5.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas utilizadas en el estudio se enlistan en las tablas 5.1.1, 5.1.2 y 5.1.3.

Cepa	Genotipo	Referencia
<b>Levaduras</b>		
BY4742	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0</i>	19
<i>cys4<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, cys4<math>\Delta</math>::clonNAT</i>	-
<i>cln3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, cln3<math>\Delta</math>:: clonNAT</i>	Este trabajo
<i>cys4<math>\Delta</math>cln3<math>\Delta</math></i>	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, cys4<math>\Delta</math>::ClonNat, cln3<math>\Delta</math>::G418</i>	Este trabajo
RPMV002	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, cys4<math>\Delta</math>:: clonNAT, pRS416::URA3</i>	Este trabajo
RPMV003	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, cys4<math>\Delta</math>:: clonNAT, YEp352::URA3</i>	Este trabajo
RPMV008	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, cys4<math>\Delta</math>:: clonNAT, pRM09::URA3</i>	Este trabajo
RPMV009	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, cys4<math>\Delta</math>:: clonNAT, pRM10::URA3</i>	Este trabajo
RPMV010	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, cln3<math>\Delta</math>:: clonNAT, pRS416::URA3</i>	Este trabajo
RPMV011	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, cln3<math>\Delta</math>:: clonNAT, YEp352::URA3</i>	Este trabajo
RPMV012	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, cln3<math>\Delta</math>:: clonNAT, pRM06::URA3</i>	Este trabajo
RPMV013	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, cln3<math>\Delta</math>::ClonNat, pRM08::URA3</i>	Este trabajo
RPMV014	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, pRS416::URA3</i>	Este trabajo
RPMV015	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, YEp352::URA3</i>	Este trabajo
RPMV016	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, pRM06::URA3</i>	Este trabajo
RPMV017	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, pRM08::URA3</i>	Este trabajo
RPMV018	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, pRM09::URA3</i>	Este trabajo
RPMV019	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0, pRM10::URA3</i>	Este trabajo
<b>Bacterias</b>		
<i>Escherichia coli DH5<math>\alpha</math></i>	F-80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1	-

Tabla 5.1.1 Cepas utilizadas en este estudio.

Plásmidos utilizados en este proyecto.

Plásmido	Descripción	Referencias
pAG25	Amp <sup>r</sup> para <i>E. coli</i> , contiene el gen NAT1 que codifica para nourseotricina N-acetil-transferasa, marcado de selección <i>clonNAT<sup>r</sup></i> para levaduras transformadas.	52
pUG6	Amp <sup>r</sup> para <i>E. coli</i> , contiene el gen <i>KanMX</i> de Tn903, confiere resistencia al antibiótico genético, marcador de selección G418 <sup>r</sup> para levaduras transformadas.	53
pRS416	Plásmido monocopia con marcador de selección URA3 para levaduras transformadas. Amp <sup>r</sup> para células <i>E. coli</i> .	54
YEp352	Plásmido multicopia con marcador de selección URA3 para levaduras transformadas. Amp <sup>r</sup> para células <i>E. coli</i> .	55
pPCR3	Clonación del gen <i>CYS4</i> en el vector pJET1.2. Amp <sup>r</sup> para células <i>E. coli</i> .	-
pRM04	Construcción de plásmido pRM04, ligación de clonación de <i>CLN3</i> con sitios de restricción BamHI y XbaI y el vector pJET1.2. Amp <sup>r</sup> para células <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	Este trabajo
pRM06	Construcción de plásmido pRM06, ligación de <i>CYS4</i> (Gen Completo) y el vector pRS416. Amp <sup>r</sup> para células <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	Este trabajo
pRM08	Construcción de plásmido pRM08, ligación del gen <i>CYS4</i> sin extremo carboxilo terminal y el vector YEp352. Amp <sup>r</sup> para células <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	Este trabajo
pRM09	Construcción de plásmido pRM09, ligación del gen <i>CLN3</i> y el vector pRS416. Amp <sup>r</sup> para células <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	Este trabajo
pRM10	Construcción de plásmido pRM10, ligación del gen <i>CLN3</i> y el vector YEp352. Amp <sup>r</sup> para células <i>E. coli</i> . URA3 para levaduras transformadas.	Este trabajo

Tabla 5.1.2 Plásmidos utilizados en este estudio

Los oligonucleótidos destinados para clonar y eliminar genes en este proyecto fueron diseñados en el programa Serial Cloner (versión 2.6, software desarrollado por Franck Perez, CNRS Institut Curie), la secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la confirmación de deleciones y secuenciación de plásmidos se obtuvieron de bases de datos. Todos fueron sintetizados por Sigma Aldrich.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Descripción
cln3F	TCTCCCTTTTACTCTCGTTCAAGACACTGA TTTGATACGCTTTCTGTACGcagctgaagcttcgt acgc	Oligonucleótido sentido para la delección del gen <i>CLN3</i>
cln3R	TTTGCAAATTTTAATTTATTTGTTGTTAAATG CATTTTTTTTTTGTTCGTTcataggccactagtggatc	Oligonucleótido antisentido para la delección del gen <i>CLN3</i>
Cln3A	GAGTCCCAGTCGCAATCTCACATC	Oligonucleótido sentido para la confirmación de la delección del gen <i>CLN3</i>
Cln3D	ACGATAGTAATCGTATTTTAGGTTGTGC	Oligonucleótido antisentido para la confirmación de la delección del gen <i>CLN3</i>
TEFprom	CGGCGTGGGGACAATTCAA	Oligonucleótido sentido para la confirmación de la delección del gen <i>CLN3</i>
MataF	GCACGGAATATGGGACTACTTCG	Oligonucleótido sentido utilizado como control para la confirmación de la delección del gen <i>CLN3</i>
MataR	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG	Oligonucleótido antisentido utilizado como control para la confirmación de la delección del gen <i>CLN3</i>
Cln3-BamHI	catagcggatccAGCCAAAGAGGCCGGTTTTCC	Oligonucleótido sentido para la clonación del gen <i>CLN3</i> con sitio de restricción <i>BamHI</i>
Cln3-XbaI	agcctatctagaGAGAGGGGCAGATGTTCAAGC	Oligonucleótido antisentido para la clonación del gen <i>CLN3</i> con sitio de restricción <i>XbaI</i>

Tabla 5.1.3 Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

### 5.2 Medios de Cultivo y condiciones de crecimiento

Los cultivos de *E. coli* para la extracción de los plásmidos utilizados en el proyecto se realizaron en 10 mL de medio Luria Bertani (LB, 1% de triptona, 1% de NaCl y 0.5% de extracto de levadura) adicionando Ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, se incubaron a 37°C toda una noche con agitación constante. Las placas para cultivos de bacterias se realizaron con medio LB adicionando 2% de Bacto agar.

Los cultivos de las diferentes cepas de levaduras utilizadas en el proyecto se realizaron en 10 mL de medio Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD, 1% de extracto de levadura, 2% de peptona de gelatina y 2% de dextrosa) incubándose a 30°C toda la noche con agitación constante. Cuando era necesario. Las placas para los cultivos de levaduras se realizaron con medio YPD adicionando 2% de Bacto agar. De ser requerido, se adicionó antibiótico en las siguientes concentraciones: clonNAT 100 µg/mL o 50 µg/mL y G418 100 µg/mL o 50 µg/mL dependiendo de la sensibilidad de las cepas.

Para observar los fenotipos de las cepas de levadura utilizadas en este proyecto, se realizaron en los siguientes medios, incubándose todos a 30°C durante 3 días:

Medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de gelatina, 2% de dextrosa y 2% de Bacto agar) adicionando: EtOH en una concentración final de 2%, 4%, 8% y 10%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 mM, 5 mM y 7 mM; Sorbitol 1 mM; NaCl 0.5 M; Tunicamicina 0.25 µg/mL, 0.5 µg/mL y 0.7 µg/mL.

Medio YP-Gal (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de gelatina, 2% de Galactosa y 2% de Bacto agar).

Medio YP-Lac (1% de extracto de levadura, 1% de peptona de gelatina, 0.12% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Sulfato de amonio), 0.1% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fosfato monopotásico), 2% de ácido láctico y 2% de Bacto agar) ajustando el pH a 5.5 con NaOH antes de esterilizar en autoclave.

Medio YP-Glicerol (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de gelatina, 2% de glicerol y 2% de Bacto agar).

Medio YP-EtOH (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de gelatina, 2% de EtOH y 2% de Bacto agar).

Medio YP-Glicerol/EtOH (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de gelatina, 2% de Glicerol/EtOH en proporción 1:1 y 2% de Bacto agar).

### 5.3 Obtención de células competentes

Se utilizaron células BY4742, *cys4Δ* y *cln3Δ* para obtener células competentes de cada cepa siguiendo los siguientes pasos: se dejó un pre-cultivo de ambas cepas en 10 mL de YPD con el que posteriormente se inocularon 50 mL de YPD y se incubó hasta que se alcanzara una DO<sub>600</sub> de 0.5-0.7, se colocaron en tubos de 50 mL y se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, se realizaron dos lavados a las células, primero con 5 mL de agua estéril y después con 5 mL de SORB estéril (LiOAc 100 mM, TRIS pH 8.0 10 Mm, EDTA 1 mM y

---

sorbitol 1 M) finalmente se re-suspendió el botón en 360µL de SORB y 40µL de DNA (salmon sperm 10 mg/mL), se almacenaron las células a -80°C.

#### 5.4 Delección de *CLN3* para obtener la cepa mutante *cln3Δ*, transformación de células BY4742

Para obtener a la cepa *cln3Δ* se transformaron a células competentes de la cepa BY4742 con el producto de PCR para deletar a *CLN3*, obtenido conforme se menciona en la Tabla 5.4. Para la transformación se utilizaron 20 µL de células competentes BY4742 mezclándolos con 10 µL del producto de PCR y 100 µL de Plate Mixture (LiOAc 100 mM, TRIS HCl pH 8.0 10 mM, EDTA/NaOH pH 8.0 1 mM y PEG 3350 40%), se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 15 µL de DMSO y se dio un choque térmico a 42°C por 15 min, centrifugamos a 14000 rpm por 10 seg para descartar sobrenadante y resuspender el botón en 500 µL de YPD, se incubó a 30°C por 4 h y se plaqueó en placas de YPD y el marcador de selección clonNAT 50 ng/mL. Se incubó a 30°C de 2 a 3 días.

Mezcla para PCR		Condiciones de PCR	
Volumen	Reactivo		
cbp 20 µL	Agua	Desnaturalización inicial	95°C, 30 seg
4.0 µL	Buffer Phusion HF 5X	Desnaturalización	95°C, 10 seg
0.4 µL	dNTP's 10 mM	Hibridación	55°C, 30 seg
2.0 µL	Templado pAG25 1 ng/µL	Extensión	72°C, 30 seg
1.0 µL	Oligonucleótido Cln3F 10 µM	Final de extensión	72°C, 10 min
1.0 µL	Oligonucleótido Cln3R 10 µM	Hold	10°C ∞
0.2 µL	Pushion DNAPolimerasa	Número de Ciclos	35

Tabla 5.4 Mezcla y condiciones de PRC para delección de *CLN3* en BY4742.

#### 5.5 Delección de *CLN3* para obtener la cepa doble mutante *cys4Δcln3Δ*, transformación de células *cys4Δ*

Para la obtención de la doble mutante *cys4Δcln3Δ* se transformó a la cepa *cys4Δ* con el producto de PCR obtenido conforme la Tabla 5.5. La transformación se realizó siguiendo los pasos del punto anterior, pero utilizando células competentes *cys4Δ* y plaqueando al final en YPD utilizando como marcador de selección el antibiótico G418 a 100 ng/mL y también clonNAT100 mg/mL.

Mezcla para PCR		Condiciones de PCR	
Volumen	Reactivo		
cbp 20 µL	Agua	Desnaturalización inicial	95°C, 3 min
2.5 µL	Buffer Dreamtaq 10X	Desnaturalización	95°C, 10 seg
0.4 µL	dNTP's 10mM	Hibridación	55°C, 30 seg
0.5 µL	Templado pUG6 10ng/µL	Extensión	72°C, 1 min
1.0 µL	Oligonucleótido Cln3F 10µM	Final de extensión	72°C, 10 min
1.0 µL	Oligonucleótido Cln3R 10µM	Hold	10°C ∞
0.2 µL	DreamTaq DNAPolimerasa	Número de Ciclos	35

Tabla 5.5 Mezcla de PCR para delección de *CLN3* en *cys4Δ*.

### 5.6 Comprobación de la delección de *CLN3* en las cepas *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ*

Para confirmar la delección del gen *CLN3* se realizaron PCR con oligonucleótidos para amplificar el gen completo o parte del gen (utilizando como templado DNA genómico de BY4742) y amplificar el plásmido de delección utilizado (pAG25 o pUG6) en caso de las mutantes *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* (utilizando como templado DNA genómico de colonias transformantes).

Para la extracción del DNA genómico de las cepas se dejó un cultivo en 10 mL de YPD toda la noche y se centrifugó en tubos de 15 mL a 1500 rpm durante 3 min, se realizó un lavado con agua y se traspasó a tubos de 1.5 mL añadiendo 200  $\mu$ L de QTP (Triton 2%, DSD1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM), Fenol/cloroformo 1:1 y 300 mg de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. Se mezcló en vortex durante 4 min y se añadieron 200  $\mu$ L de amortiguador TE 1X pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo, se adicionó 1 mL de EtOH absoluto frío y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 400  $\mu$ L de amortiguador TE 1X, se añadieron 3  $\mu$ L de RNAsa 10 mg/mL y se incubó a 37°C durante 5 min. Se adicionaron 10  $\mu$ L de acetato de amonio 4 M y 1 mL de EtOH absoluto previamente enfriado, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min, se retiró el sobrenadante y se dejó secar durante 15 min, finalmente se resuspendió el botón en 100  $\mu$ L de agua.

Las condiciones de PCR con los oligonucleótidos A y D fueron las mismas para el control, la mutante sencilla y la doble mutante. Al utilizar los oligonucleótidos A y TEFprom, se cambiaron las condiciones de PCR respecto a las anteriores, pero fueron las mismas en el control y en la mutante sencilla.

Mezcla para PCR		Condiciones de PCR	
Volumen	Reactivo		
cbp 25 $\mu$ L	Agua	Desnaturalización inicial	95°C, 3 min
2.5 $\mu$ L	Buffer ACtaq 10X	Desnaturalización	95°C, 10 seg
0.5 $\mu$ L	dNTP's 10 mM	Hibridación	55°C, 30 seg
0.5 $\mu$ L	Templado DNA genómico*	Extensión	72°C, 1.5 min
0.5 $\mu$ L	Oligonucleótido Cln3A 10 $\mu$ M	Final de extensión	72°C, 10 min
0.5 $\mu$ L	Oligonucleótido TEFprom	Hold	10°C $\infty$
	200 ng/mL	Número de Ciclos	35
0.2 $\mu$ L	ACTaq DNAPolimerasa		

Tabla 5.6 Mezcla y programa de PCR de confirmación de la mutante sencilla *cln3Δ* \*Como control se utilizaron los oligonucleótidos: MataF y MataR ambos a una concentración de 200ng/mL y el templado fue el mismo.

Mezcla para PCR		Condiciones de PCR	
Volumen	Reactivo		
cbp 25 µL	Agua	Desnaturalización inicial	95°C, 3 min
2.5 µL	Buffer ACtaq 10X	Desnaturalización	95°C, 10 seg
0.5 µL	dNTP's 10mM	Hibridación	55°C, 30 seg
0.5 µL	Templado DNA genómico*	Extensión	72°C, 1 min
0.5 µL	Oligonucleótido Cln3A 10 µM	Final de extensión	72°C, 10 min
0.5 µL	Oligonucleótido Cln3D 10 µM	Hold	10°C ∞
0.2 µL	DreamTaq DNApolimerasa	Número de Ciclos	35

Tabla 5.6.1 Mezcla y programa de PCR de confirmación de la mutante sencilla y la doble mutante.

\*Como control, se utilizó el DNA genómico de la cepa silvestre BY4742 como templado.

### 5.7 Clonación de *CLN3* en vector pJET1.2

Se utilizaron los oligonucleótidos *CLN3*-BamHI (sentido) y *CLN3*-XbaI (antisentido) para amplificar el gen *CLN3* por medio de la técnica de PCR, empleando como templado en DNA genómico de la cepa silvestre BY4742 y la Pfu DNA Polimerasa de Thermo Scientifics, las condiciones se muestran en la Tabla 5.7.

Se empleó el ClonetJET PCR Cloning Kit de Thermo Scientific para hacer una ligación del DNA amplificado con los sitios de restricción correspondientes y el vector pJET1.2<sup>6</sup>. En la reacción de ligación se utilizaron 150 ng del DNA del producto de PCR, 50 ng del vector de clonación, 20 µL del anortiguador T4DNA ligasa 10X y 0.2 µL de la enzima T4DNA Ligasa, de Thermo Scientifics, en un volumen final de 20 µL. Se incubó a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente se transformaron células componentes de la cepa de *E. coli DH5α* por medio de choque térmico y se plaquearon en medio LB Ampicilina (100 ng/mL).

Se realizó un mini-prep a las colonias transformantes y se hicieron digestiones para confirmar la clonación de *CLN3* con sitios de restricción en el vector pJET1.2 se utilizaron la enzima *HindIII*, que genera bandas de 4079 pb y 1678 pb.

Mezcla para PCR		Condiciones de PCR	
Volumen	Reactivo		
cbp 25 µL	Agua	Desnaturalización inicial	95°C, 3 min
2.5 µL	Buffer Pfu + MgSO <sub>4</sub> 10X	Desnaturalización	95°C, 10 seg
0.5 µL	dNTP's 10 mM	Hibridación	47°C, 30 seg
0.5 µL	Templado DNA genómico	Extensión	72°C, 3 min
0.5 µL	Oligonucleótido Cln3-BamHI 10 µM	Final de extensión	72°C, 10 min
0.5 µL	Oligonucleótido Cln3-XbaI 10 µM	Hold	10°C ∞
0.25 µL	Pfu DNA polimerasa	Número de Ciclos	35

Tabla 5.7 Condiciones de PCR para amplificación del gen *CLN3* con sitios de restricción *BamHI* y *XbaI*.

### 5.8 Construcción de plásmidos

Se realizó la construcción de diversos plásmidos con el fin de observar algún cambio en el fenotipo de las cepas BY4742, *cys4Δ* y *cln3Δ* transformadas con plásmidos que se especificarán más adelante. Los plásmidos que se utilizaron para subclonar a los genes *CYS4* y *CLN3* son los vectores pRS416 y YEp352, ambos cuentan con cassette de resistencia a ampicilina así como con el operón Lac, los cuales se pueden llegar a expresar cuando se encuentra en *E. coli*, su marcador de selección en levaduras es *URA3*, por lo que las levaduras que contengan esos plásmidos crecerán en medio mínimo sin presencia de uracilo, también contienen una región MCS (multiple cloning site) para insertar fragmentos de DNA, cuentan con sitio de origen de replicación en bacterias. La diferencia entre los vectores de clonación mencionados anteriormente es que el plásmido pRS416 posee un centrómero *CEN6* fusionada a una secuencia de replicación autónoma (CEN/ARS), indicando que sólo puede haber una copia del plásmido en la célula de levadura; mientras que el plásmido YEp352 posee una región 2 $\mu$  ori, por lo que la célula puede poseer más de una copia del vector.

La subclonación de los genes *CYS4* y *CLN3* en los diferentes vectores se realizó con el fin de observar cambios en el fenotipo de las cepas mencionadas con anterioridad al sobreexpresar en diferentes niveles alguno de los genes en cuestión, en el apartado 6.4.8 se explica lo que se pretende observar en el experimento.

Las subclonaciones se realizan extrayendo un gen específico de un plásmido e insertándolo en un plásmido diferente. El laboratorio contaba con el plásmido pPCR3, el cual contenía al gen *CYS4* y se describe en la Tabla 5.1.2. La subclonación de *CYS4* se realizó purificando a dicho gen de la digestión que se le hizo al plásmido pPCR3, secuenciado previamente para verificar que el gen no contara con alguna mutación.

Se realizaron las ligaciones de *CYS4* con los vectores pRS416 Y YEp352, digeridos previamente con las mismas enzimas con las que se digirió el plásmido pPCR3, y se transformaron bacterias *E. coli DH5 $\alpha$* , para confirmar la correcta construcción se realizaron digestiones del plásmido de las bacterias transformantes con enzimas de restricción que cortaran en una parte del gen clonado y en una parte del vector. Las digestiones para confirmar la correcta construcción de los plásmidos se realizaron con las enzimas indicadas en la Tabla 5.7.2.

Se realizaron digestiones de los plásmidos para poder purificar los fragmentos requeridos para subclonar los genes *CYS4* y *CLN3* en los vectores pRS426 y YEp352. En la Tabla 5.7.1 se muestran las enzimas utilizadas, los fragmentos que se generan y los fragmentos que se purificarán. La purificación se realizó utilizando el GenJET Gel Extraction Kit de Thermo Scientific. Se cortaron las bandas correspondientes y se colocaron en tubos de 1.5 mL y se agregó 1:1 (relación masa volumen) de Binding Buffer para incubarse posteriormente a 60°C durante 10 min. La mezcla se colocó en las columnas del kit y se centrifugó durante 1 min a 14000 rpm, se añadieron 100  $\mu$ L de Binding Buffer para volver a centrifugar durante 1 min, se adicionaron 700  $\mu$ L de Wash Buffer y se centrifugó durante 2 min, todos los sobrenadantes fueron desechados. Finalmente se adicionaron a la columna 50  $\mu$ L de agua destilada para posteriormente centrifugar durante 1 min y el sobrenadante se conservó para determinar la concentración de DNA.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la construcción de los plásmidos que contuvieran al gen *CYS4* y al gen *CLN3*, se utilizó la enzima 4T DNA Ligasa 5 U/μL, de Thermo Scientific, para ligar los fragmentos siguiéndose los siguientes pasos, una vez digeridos los plásmidos: En la reacción de ligación se colocaron 2.0 μL de amortiguador 4T DNA ligasa 10X, una relación 1:1 y 1:5 de vector/inserto, y se llevó a un volumen total de 20 μL con agua destilada. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se transformaron células competentes de la cepa *DH5α* de *Escherichia coli* para obtener más copias del plásmido, la transformación se realizó mezclando 100 μL de células competentes y 10 μL de la reacción de ligación, se incubaron durante 30 minutos en hielo para posteriormente dar un choque térmico a 42°C durante 45 seg. Se incubaron 5 min en hielo, se adicionaron 500 μL de medio LB y se volvieron a incubar ahora a 37°C durante 45 min. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 seg, se descartó la mayoría del sobrenadante y se resuspendió el botón en el resto. Se plaqueó en cajas de medio LB ampicilina 100 μg/mL y se incubó a 37°C toda la noche.

Plásmido	Enzima(s) de restricción	Fragmentos liberados (pb)	Fragmento purificado(pb)
pPCR3	<i>SacI, KpnI</i>	2988 2441	2441
pRM04	<i>BamHI, XbaI, PvuI</i>	2765 1985 990 17	2765
pRS416	<i>SacI, KpnI</i>	4796 102	4796
Yep352	<i>SacI, KpnI</i>	5175 6	5175
pRS416	<i>BamHI, XbaI</i>	4886 12	4886
Yep352	<i>BamHI, XbaI</i>	5175 6	5175

Tabla 5.7.1 Enzimas de restricción utilizadas para digestión de plásmidos de los que se obtendrá en inserto. Los vectores fueron cortados con las enzimas de restricción similares a las utilizadas en los insertos.

Para determinar que los plásmidos de las células transformantes contenían la construcción requerida, se hizo una purificación de ellos de las células transformantes previamente estriadas en medio LB ampicilina 100 μg/mL, con ayuda de palillos se retiró la mayor cantidad de células y se colocaron en 100 μL de agua en tubos de 1.5 mL, se adicionaron 300 μL de amortiguador TENS (NaOH 1 N, SDS 0.5%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y se agitó en vórtex durante 4 seg, se adicionaron 150 μL de acetato de sodio 3 M y se mezcló nuevamente en vórtex durante 4 seg. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C, se pasó el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL nuevo, se añadieron 900 μL de EtOH absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min a 4°C. Se realizaron dos lavados con 1 mL de EtOH 70%, se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar y se resuspendió el botón en 100 μL de agua.

Una vez purificados los plásmidos, se realizaron digestiones que permitieran diferenciarlos del plásmido de referencia. La Tabla 5.7.2 muestra las enzimas de restricción utilizadas y las bandas que se generan por la digestión.

Plásmido construido	Plásmido de referencia (vector)	Enzima(s) de restricción	Fragmentos liberados en plásmido construido (pb)	Fragmentos liberados en plásmido de referencia (pb)
pRM04	pJET1.2	<i>HindIII</i>	4079 1678	2721 253
pRM06	pRS416	<i>EcoRV</i> <i>XbaI</i>	4024 2477 736	3419 1443 36
pRM08	YEp352	<i>EcoRV</i> <i>BamHI</i>	5591 1085 940	4214 940
pRM09	pRS416	<i>EcoRV</i> <i>EcoRI</i>	4321 1881 1443	3449 1443 6
pRM10	YEp352	<i>EcoRV</i> <i>XhoI</i>	4531 3409	5181

Tabla 5.7.2 Digestiones con enzimas específicas para confirmar la subclonación de los genes *CLN3* y *CYS4* en los vectores correspondientes.

El anexo I muestra los mapas de restricción de todos los plásmidos utilizados en este proyecto.



### 5.8.1 Transformación de levaduras con los plásmidos construidos

Las células competentes (obtenidas según el punto 5.3) de las cepas BY4742, *cys4Δ* y *cln3Δ* fueron transformadas con los plásmidos construidos y con los vectores vacíos tal como lo muestra la siguiente tabla.

Cepa	Plásmido	Cepa generada
BY4742	pRS416	RPMV014
	YEp352	RPMV015
	pRM06	RPMV016
	pRM08	RPMV017
	pRM09	RPMV018
	pRM10	RPMV019
<i>cys4Δ</i>	pRS416	RPMV002
	YEp352	RPMV003
	pRM09	RPMV008
	pRM10	RPMV009
<i>cln3Δ</i>	pRS416	RPMV010
	YEp352	RPMV011
	pRM06	RPMV012
	pRM08	RPMV013

Tabla 5.8 Transformaciones de cepas con los plásmidos construidos.

Al concluir con la transformación, repitiendo los pasos indicados en el punto 5.4 de este apartado, se plaqueó en Medio Mínimo (SD con 0.17% de Bacto yeast nitrogen base, 2% de dextrosa, 0.5% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% de Bacto agar, Dropout -His -Ura 1X e histidina 1X), se adicionó cisteína a una concentración 1X para los precultivos de las mutantes de *cys4Δ* transformadas con los vectores vacíos. Finalmente se incubaron las placas a 30°C durante 72 h.

El Dropout -His -Ura 10X contiene 0.02% de alanina, 0.02% de arginina, 0.1% de asparagina, 0.1% de ácido glutámico, 0.06% de leucina, 0.02% de lisina, 0.02% de metionina, 0.05% de fenilalanina, 0.375% de serina, 0.2% de treonina, 0.04% de triptófano, 0.03% de tirosina y 0.15% de valina. Es esterilizado por filtración y almacenado en refrigeración a 4°C. Se incorpora al medio SD después de que éste es esterilizado en autoclave y cuando se enfría lo suficiente.

Los stocks 100X de aminoácidos (histidina y cisteína) se preparan 100 mg/50mL de agua destilada y es filtrado para su esterilización. Se añade al medio de la misma manera que se agrega el Dropout.

### 5.9 Cinéticas de crecimiento

Para la evaluación de crecimiento de las cepas generadas, se realizaron ensayos de cinética de crecimiento. Se inocularon 2 mL de medio YPD, realizando diez réplicas independientes de las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* y se incubaron durante 24 h a 30°C. Se realizó una dilución 1:10, en 100 μL de agua destilada, de cada cultivo y se midió la D.O.<sub>600</sub> para después ajustarla a 0.01 en 200 μL de medio YPD en placas de 100 pozos del lector de placas Microplate Reader Standard Operating Procedure Synergy-HT Biotek. Una vez inoculados los pozos correspondientes, se monitoreó la absorbancia cada 15 min durante 48 h a una temperatura de 30°C sin agitación. Finalizadas las 48 h se recopilaron los datos de D.O.<sub>600</sub> y se realizaron gráficas de D.O.<sub>600</sub> vs Tiempo.

### 5.10 Goteos

Para poner en evidencia el fenotipo de las cepas generadas se realizaron goteos en diferentes medios. Para ello se realizaron precultivos en 10 mL de YPD de las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* incubados a 30°C por 24 hrs. Se realizaron diluciones 1:20 y se midió la D.O.<sub>600</sub> para posteriormente ajustarla a 1 D.O en 1 ml de agua estéril. Se realizaron diluciones consecutivas para tener las densidades ópticas de 1, 0.1 0.01, 0.001 y 0.0001. Se colocó una gota de 10 μL de cada dilución de todas las cepas en las placas que se incubaron a 30°C durante 72 h o más, en algunos casos. Las placas fueron escaneadas con una resolución de 300 ppi.

Los goteos en medio YPD, para poder observar la producción de H<sub>2</sub>S, se realizaron con las cepas indicadas en la Tabla 5.8, se incluyeron los controles BY4742, *cys4Δ* y *cln3Δ*. Se realizaron precultivos de 10 mL en YPD de los controles y precultivos de 10 mL en medio SD, se incubaron por 48 h a 30°C. Se realizaron diluciones 1:20 y se midió la D.O.<sub>600</sub> para posteriormente ajustarla a 1 en 1 mL de agua estéril. Finalmente se colocaron gotas de 10 μl en las placas que fueron incubadas a 30°C por 3 días. Finalmente, las placas fueron escaneadas con una resolución de 300 ppi.

### 5.11 Análisis microscópico

Para observar el fenotipo de las cepas obtenidas y hacer una comparación de dichos fenotipos, se realizaron observaciones al microscopio. Se realizaron tinciones con el colorante Azul de Tripano 0.4%, el cual es utilizado para hacer ensayos de viabilidad y así poder diferenciar las células vivas de las células muertas debido a que el colorante puede atravesar solamente la membrana de células muertas. Se colocaron 5 μL del colorante y se mezclaron con 7μL de los cultivos en cuestión, se colocó la mezcla en portaobjetos y se observaron en el Microscopio de Fluorescencia OLYMPUS BX51 con un objetivo 100X. Se recolectaron fotografías tomadas con el software QCapture Pro.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Obtención de cepas mutantes *cln3Δ*

Para eliminar genes en organismos, se hace uso de plásmidos de deleción. Dichas estructuras de DNA contienen cassettes de resistencia a antibióticos (en bacterias y levaduras), los cuales son utilizados como marcadores de selección al realizar transformaciones de células competentes. Estos plásmidos también cuentan con sitios de origen de replicación en bacterias. Regiones de estos plásmidos son insertados en el genoma y remplazan a un gen deseado por medio de un evento de doble recombinación homóloga. Para lograrlo se tienen que realizar PCR's con oligonucleótidos específicos que se diseñan de tal manera que una parte corresponda a una región común en diferentes plásmidos de deleción y otra parte corresponda a 50 bases río arriba (para el oligonucleótido sentido) y 50 bases río abajo (para el oligonucleótido antisentido) del gen que se planea eliminar, de esta forma, al realizar la PCR correspondiente, se puede utilizar como templado cualquier plásmido de deleción y el DNA amplificado corresponderá a la sección del plásmido que contiene el cassette de resistencia a antibiótico en levaduras y los extremos corresponderán a regiones río abajo y río arriba del gen por eliminar.

En este proyecto se utilizaron los plásmidos pAG25 y pUG6 para eliminar el gen *CLN3* y obtener las cepas *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ*, correspondientemente, en la Tabla 5.1.2 se encuentra la información pertinente de cada plásmido. Se realizaron los PCR's como se indica en la Tabla 5.4 para pAG25 y en la Tabla 5.5 para pUG6 en ambos casos con los oligonucleótidos de deleción de *CLN3* y se realizó la electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos amplificados. La amplificación utilizando como templado a pAG25 y pUG6 debe de generar bandas de 1407 pb y 1712 pb, respectivamente al observarse en la electroforesis de la Figura 6.1.

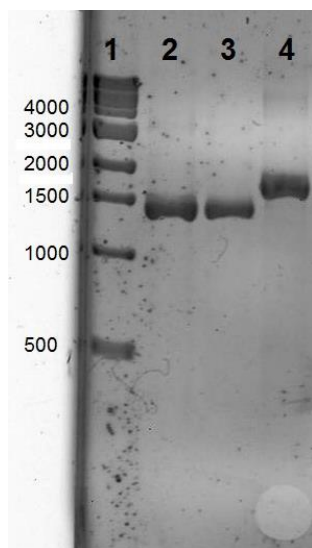


Figura 6.1 Electroforesis de productos de PCR de Tabla 5.5 y 5.6. Gel de agarosa que muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; Carril 2 y 3 muestran los productos de la amplificación del plásmido pAG25 con oligonucleótidos de deleción de *CLN3* (1407 pb); Carril 4 muestra los productos de la amplificación del plásmido pUG6 con oligonucleótidos de deleción de *CLN3* (1712 pb).

Las bandas correspondieron a los tamaños esperados (Figura 6.1), indicando que se amplificaron tanto el plásmido de deleción como los sitios pertenecientes a las regiones de *CLN3*, por lo que se procedió a transformar las células competentes BY4742 con el producto de PCR del carril 2 o 3 y se transforman células competentes de *cys4Δ* con el producto de PCR del carril 4.

### 6.1.1 Eliminación del gen *CLN3*

Como se mencionó en el apartado anterior, la eliminación del gen *CLN3* se realiza por medio de un evento de doble recombinación homóloga, en la que se intercambia el gen por el fragmento amplificado por PCR. El esquema que se muestra a en la Figura 6.2 ilustra cómo es que se lleva a cabo la eliminación de un gen.

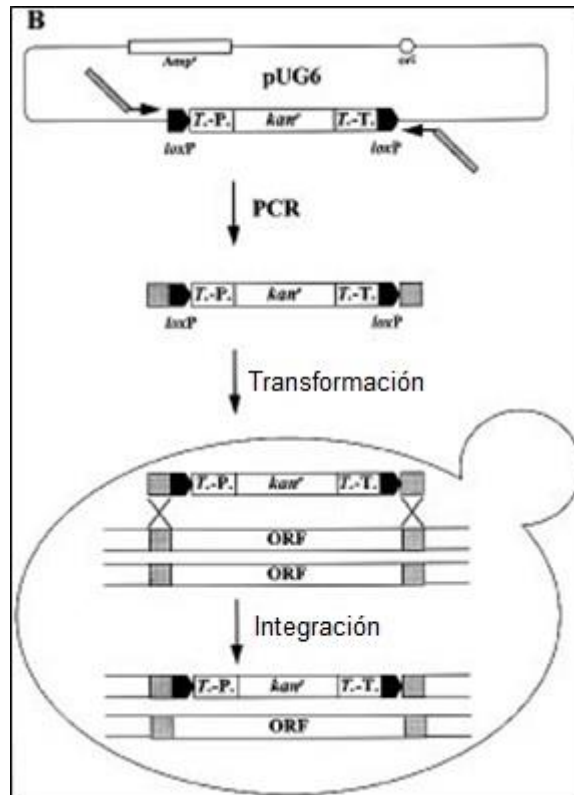


Figura 6.2 Esquema del proceso mediante el cual se lleva a cabo la eliminación de genes en levaduras, utilizando como ejemplo el plásmido pUG6. (Güldener et al., 1996)

Para obtener a la mutante sencilla *cln3Δ* se debe realizar la transformación de células competentes BY4742 con el producto de PCR obtenido según lo indica la Tabla 5.4. La doble mutante *cys4Δcln3Δ* se obtiene al transformar células competentes *cys4Δ* con el producto de PCR obtenido conforme la Tabla 5.5, la eliminación del gen *CYS4* fue realizada previamente en el laboratorio de investigación. Las transformaciones se realizaron como se indica en los apartados 5.4 y 5.5.

En la figura 6.3 se muestra un esquema con el proceso general de cómo es que se llevó a cabo la delección del gen *CLN3* y cómo se puede hacer la confirmación de dicha eliminación.

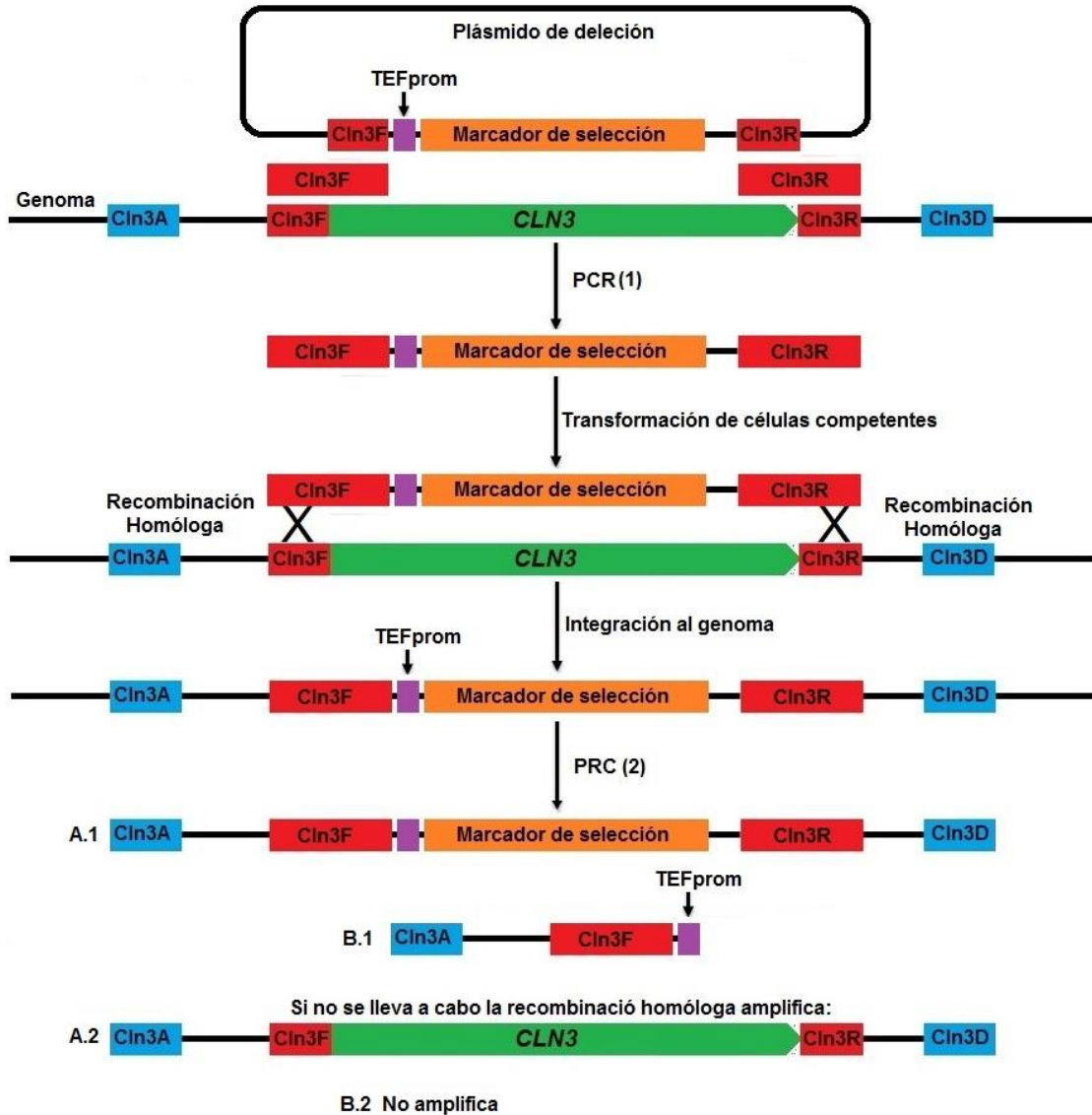


Figura 6.3 Esquema del proceso de deleción del gen *CLN3* utilizando plásmido de deleción. PCR (1) corresponde al que se realiza para obtener el fragmento de DNA con el que se transformarán células competentes. PCR (2) corresponde a la amplificación para confirmar la deleción del gen *CLN3*. Los oligos Cln3A y Cln3D amplifican el marcador de selección en caso de que se haya dado el evento de recombinação. Dependiendo del tamaño amplificado se puede distinguir entre los dos escenarios. En color verde se encuentra representado el gen *CLN3*. El marcador de selección está representado en color naranja. La zona color roja corresponde a los oligos Cln3F, Cln3R y su región complementaria en el genoma y en el plásmido de deleción, con estos oligos se realiza la PCR(1). En color azul se encuentra la región complementaria de los oligos Cln3A y Cln3D, con los que se realiza el PCR(2) para los escenarios A.1 y A.2. La zona morada corresponde al promotor TEF, complementaria al oligo TEFprom y junto con el oligo Cln3A, se puede realizar el PCR(2) para los escenarios B.1 y B.2.

En los siguientes apartados se describirá de manera más detallada la comprobación de la eliminación del gen *CLN3* para obtener a las cepas *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ*.

### 6.1.2 Transformación de cepa BY4742 para obtención de cepas *cln3Δ*

Para poder confirmar que el fragmento de DNA amplificado reemplazó al gen *CLN3*, se tiene que realizar un PCR de confirmación y se puede realizar de diversas maneras, una de ellas es utilizando oligonucleótidos que correspondan a regiones no codificantes del gen ubicadas río arriba y río abajo. Al momento de realizar la PCR, la cantidad de bases que se amplifican al existir la mutación en el genoma es diferente a las que se amplificarían si el gen en cuestión estuviera en el genoma, por lo cual se utiliza como control un PCR con el DNA genómico de la cepa silvestre, en este caso la BY4742. Otra manera de confirmar la eliminación de un gen por PCR es utilizando oligonucleótidos, uno de los cuales corresponde a una región no codificante cercana al gen y el otro correspondiente a una región del plásmido que se utilizó para realizar la mutación, por lo tanto, al realizar la PCR correspondiente sólo amplifica cuando está presente el fragmento del plásmido que sustituyó al gen, en este caso se utiliza como control los oligonucleótidos MataF y MataR, los cuales amplifican el alelo sexual *MAT $\alpha$* , que es el que posee la cepa BY4742, la que se utilizó en este proyecto, por lo tanto, si la PCR sólo amplifica el control y no se observa amplificación al utilizar el oligonucleótido correspondiente al fragmento de plásmido, indica que la recombinación homóloga no se llevó a cabo y por consecuencia no existe una eliminación del gen en el genoma.

Se transformaron células competentes BY4742 con el producto de PCR de la Tabla 5.4, se les extrajo el DNA genómico y se realizaron PCR's de confirmación correspondientes a las Tablas 5.6 y 5.6.1. Se corrieron 5  $\mu$ L de cada producto de PCR de las confirmaciones en un gel de agarosa 0.8% (Figura 6.4). El producto de PCR, utilizando los oligonucleótidos Cln3A (sentido), TEFprom (antisentido) y el DNA genómico de la cepa mutante, debe de corresponder a un producto de 493 pb, en cuanto al control, en donde se utiliza el mismo templado y los oligonucleótidos MataF y MataR, se tiene que observar la amplificación. Por otro lado, el producto de PCR utilizando los oligonucleótidos Cln3A (sentido) y Cln3D (antisentido) con el DNA genómico de la cepa mutante como templado tiene que amplificar 1673 pb, mientras que el control, en donde se utiliza como templado el DNA genómico de la cepa silvestre BY4742, se amplifican 2109 pb.

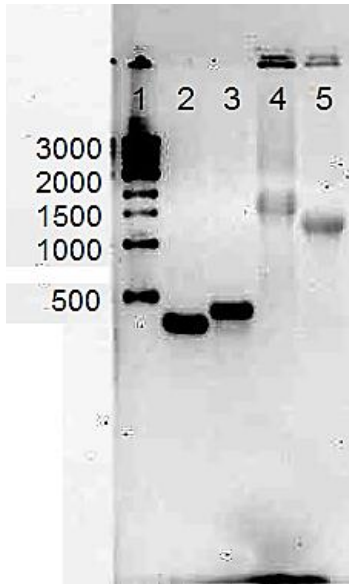


Figura 6.4 Electroforesis para confirmar *cln3Δ*. Gel de agarosa que muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; Carril 2: Control de candidata a mutante (Oligonucleótidos Mat $\alpha$ F y Mat $\alpha$ R; 403 pb). Carril 3: Candidata a mutante (Oligonucleótidos Cln3A y TEFprom: 493 pb); Carril 4: Cepa silvestre BY4742 (Oligonucleótidos Cln3A y Cln3D: 2109 pb); Carril 5 Candidata a mutante (Oligonucleótidos Cln3A y Cln3D: 1673 pb).

En la Figura 6.4 en el Carril 3 se observa una banda del peso esperado para la cepa *cln3Δ* (493 pb), el oligonucleótido Cln3A corresponde un sitio río arriba al gen *CLN3* y el oligonucleótido TEFprom reconoce a un segmento del plásmido de delección que se ocupó, en este caso pAG25, y la amplificación significa que se llevó a cabo la recombinación homóloga durante la transformación y se eliminó el gen *CLN3*. El control, Carril 2, muestra que se amplificó al alelo *MAT $\alpha$* , por lo tanto, se puede confirmar la obtención de la mutante sencilla *cln3Δ*.

Por otra parte, el oligonucleótido Cln3D corresponde a una secuencia río abajo al gen *CLN3* y al utilizarlo en un PCR con el oligonucleótido Cln3A se amplificará el gen *CLN3* y unas pares de bases más (en total 2109pb) lo que indica que el gen *CLN3* está presente en el genoma y se observa en el Carril 4. Si la eliminación del gen por medio de una recombinación homóloga con un plásmido de delección se lleva a cabo, entonces la cantidad de pares de bases amplificadas se modifica dependiendo del plásmido utilizado, en este caso al utilizar pAG25, las pares de bases que resultarían son 1673pb, que corresponden a la banda observada en el Carril 5, confirma lo observado en los carriles anteriores y se puede decir que se logró eliminar el gen *CLN3*, obteniendo así la cepa *cln3Δ*.

### 6.1.3 Transformación de *cys4Δ* para obtener la cepa *cys4Δcln3Δ*

Para la obtención de la doble mutante se transformaron células competentes de *cys4Δ* (cepa que ya se tenía en el laboratorio de investigación) con el producto de PCR obtenido al utilizar las condiciones indicadas en la Tabla 5.5. Se extrajo el DNA genómico de las candidatas a mutante y se realizaron PCR's de confirmación con las condiciones que se indican en la Tabla 5.6.1.

Al utilizar los oligonucleótidos Cln3A y Cln3D se espera que las bases amplificadas al hacer uso del plásmido pUG6 para la eliminación de *CLN3* sean diferentes a las que amplifican en la cepa sin mutaciones. Al utilizar pUG6 se espera que se amplifiquen 2229 pb y el control (cepa BY4742), como se dijo en el apartado anterior, genera 2109 pb.

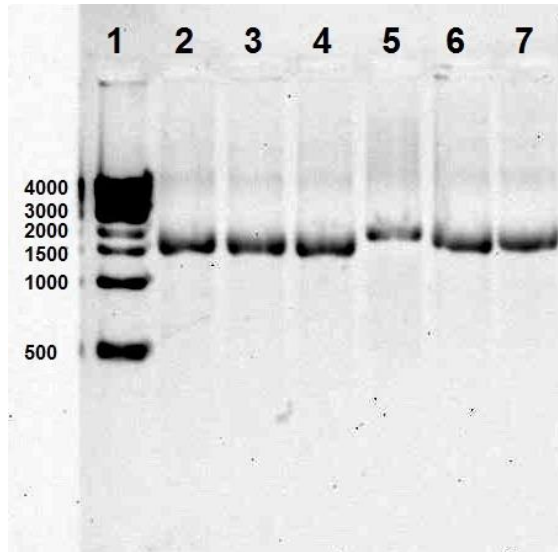


Figura 6.5 Electroforesis para confirmar *cys4Δcln3Δ*. Gel de agarosa que muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; Carriles 2 y 7 Control (WT BY4742, 2109 pb); Carriles 3-6 Colonias transformantes número 1 a 5; Carril 5 Candidata a doble mutante (2229 pb).

Los resultados se presentan en la Figura 6.5, en donde los carriles cuyo peso corresponde al mismo que el del control (BY4742, 2109pb) indican que el gen *CLN3* sigue en el genoma y no se llevó a cabo la recombinación homóloga durante la transformación. En el Carril 5 se observa un peso diferente y mayor al control, lo que indica que en este caso el gen *CLN3* no está en el genoma y en su lugar se encuentra el plásmido pUG6, por lo tanto, podemos decir que la cepa ya cuenta con la doble mutación y es correspondiente a la doble mutante *cys4Δcln3Δ*.



## 6.2 Confirmaciones de construcciones de plásmidos

Las electroforesis de las digestiones de los plásmidos según la Tabla 5.7.2 se muestran de las Figuras 6.6 a 6.10. Para confirmar la correcta construcción de plásmidos, en este estudio se les realizaron a los plásmidos construidos digestiones con enzimas de restricción cuyos sitios de corte se ubicaran dentro del gen insertado y en cualquier lugar del vector utilizado, lo cual genera bandas de tamaño específicos, permitiendo así observar una diferencia entre los plásmidos digeridos con las mismas enzimas.

### 6.2.1 Confirmación de subclonación de *CYS4* en el vector pRS46, plásmido pRM06

Después de ligar el fragmento de DNA correspondiente a *CYS4* con el vector pRS146 (Tabla 5.7.1), se realizó la transformación correspondiente. Se asignó el nombre pRM06 a esta construcción, se purificó el plásmido de las colonias transformantes para posteriormente hacer digestiones específicas con enzimas de restricción que mostraran una diferencia entre el plásmido del que se obtuvo el inserto y el vector pRS416. Se realizaron las digestiones con las enzimas *EcoRV* y *XbaI*, incubadas a 37°C durante toda la noche para posteriormente correr la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 6.6). La digestión del plásmido pPCR3, de donde proviene el inserto, produce bandas de 3662pb, 1091 pb y 736 pb; la digestión del vector pRS416 produce bandas de 3416 pb, 1443 pb y 36 pb (imperceptible en el gel); la digestión del plásmido pRM06 genera bandas de 4024 pb, 2477 pb y 736 pb.

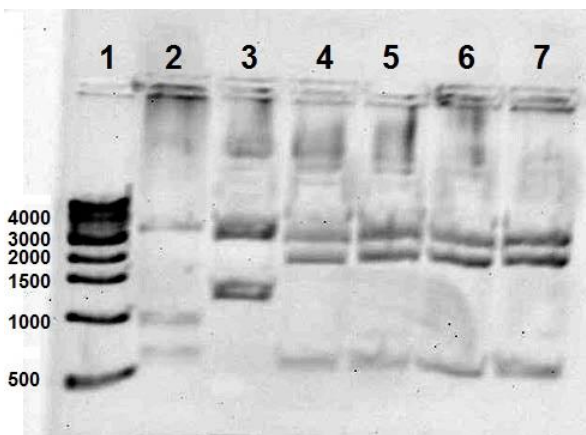


Figura 6.6 Confirmación de pRM06. Gel de agarosa que muestra en el Carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; Carril 2 muestra la digestión de pPCR3; Carril 3 muestra la digestión de pRS416; Carriles 4 a 7 muestran la digestión del plásmido de las colonias transformantes 1 a 4. Se confirma la correcta construcción del plásmido pRM06 de las colonias 1 a 4.

Las bandas observadas en los Carriles 2 y 3 que muestran las digestiones de los controles (pPCR3 y pRS416) corresponden a los pesos esperados. Las bandas observadas de los Carriles 4 a 7 corresponden a los pesos esperados si se trata del plásmido pRM06, por lo que se confirma la correcta construcción del plásmido pRM06.

### 6.2.2 Confirmación de subclonación de *CYS4* en el vector YEp352, plásmido pRM08

Después de la ligación entre los fragmentos de DNA correspondientes a *CYS4* y el vector YEp352 (Tabla 5.7.1) se transformaron células competentes de *DH5α* de *E. coli* como se indica en el apartado 5.8, asignándole el nombre pRM08 a esta construcción. Se purificó el plásmido de las células transformantes y se realizaron las digestiones para confirmar la correcta construcción del plásmido pRM08. Se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRV* y *BamHI*, la digestión de pRM06 (de donde se obtiene el inserto) sólo genera un fragmento de 5757 pb; la digestión del vector YEp352 genera dos fragmentos de 4241 pb y 940 pb; la digestión del plásmido pRM08 debe generar fragmentos de 5591 pb, 1085 pb y 940 pb, por lo tanto, las digestiones de los plásmidos de las colonias transformantes que generen dichos fragmentos corresponderán al plásmido anteriormente mencionado.



Figura 6.7 Confirmación de pRM08. Gel de agarosa que muestra en el Carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; Carril 2 muestra la digestión del plásmido pRM06; Carril 3 muestra la digestión de YEp352; Carriles 3 a 7 muestran la digestión de los plásmidos purificados de las colonias transformantes. Se confirma la correcta construcción del plásmido pRM08 (Carril 6).

En la Figura 6.7 las bandas observadas en el Carril 2 corresponden a la banda de tamaño esperado para el plásmido pRM06 y las bandas observadas en el Carril 3 corresponden al peso de los fragmentos esperados para el vector YEp352. Por otro lado, sólo el Carril 6 muestra los pesos de los fragmentos que se esperarían por la digestión de pRM08 con las enzimas de restricción utilizadas. Por lo tanto, el plásmido de la colonia transformante del carril 6 corresponde a la correcta construcción de pRM08.

### 6.2.3 Clonación y subclonación de *CLN3*

Para la clonación subclonación se requiere la amplificación del gen *CLN3* por medio de la técnica de PCR incluyendo en la secuencia sitios de corte para enzimas de digestión que se insertarán río abajo y río arriba del gen, con el fin de utilizar dichas regiones para realizar la subclonación. Una vez obteniendo suficiente número de copias del gen se puede proceder con la clonación, que consiste en la ligación del fragmento obtenido con un vector de clonación, por lo general, dichos vectores son adquiridos en kits de clonación. En este estudio se utilizó el CloneJET PCR Cloning Kit de Thermo Scientific para realizar la clonación.

Para la clonación de *CLN3* se realizó la PCR con los oligonucleótidos y condiciones mostrados en la Tabla 5.7. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el tamaño molecular que se espera es el obtenido al amplificar a *CLN3* (1742 pb) con los sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I ubicados a 700 nucleótidos río arriba y 317 nucleótidos río abajo del gen. Por lo tanto, se amplificarán un fragmento de 2783 pb, al realizar la electroforesis de los productos de PCR se comprobaron los tamaños moleculares de los productos esperados (Figura 6.8).

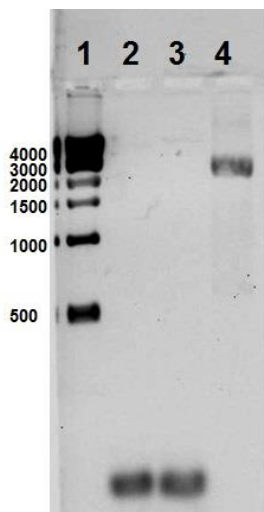


Figura 6.8 Amplificación de *CLN3*. Gel de agarosa que muestra en el Carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; Carril 4 muestra el producto de PCR que amplificó a *CLN3* con los sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I (2783 pb).

El Carril 4 en la Figura 6.8 muestra una banda en la región entre las 2000 pb y 3000 pb, por lo que se logró amplificar las pares de bases esperadas.

La clonación de *CLN3* en el vector pJET1.2 se confirmó transformando bacterias *E. coli* *DH5* $\alpha$  con la ligación correspondiente, se purificó el plásmido de las colonias transformantes. Las digestiones de los plásmidos con la enzima de restricción *Hind*III, cuyos sitios de corte se localizan en el vector y el gen clonado (Tabla 5.7.2) se muestran en la Figura 6.9. Al plásmido conformado por *CLN3* y pJET1.2 se le asignó el nombre de pRM04.

Para comprobar la construcción del plásmido se realizaron digestiones con enzimas de restricción cuyo sitio de corte se localice dentro del inserto y dentro del vector. La digestión de pRM04 con *HindIII* genera fragmentos de 4079 pb y 1678 pb; la digestión del vector vacío pJET1.2 genera un fragmento de 2721 pb.



Figura 6.9 Confirmación de pRM04. Gel de agarosa que muestra en el Carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; Carril 2 muestra la digestión del vector pJET1.2; Carriles 2-8 muestran la digestión del plásmido de las colonias transformantes.

En el Carril 2 de la Figura 6.9 se observa la única banda generada por la digestión de pJET1.2 correspondiente a las 2721 pb. De los Carriles 4 a 8 se observan las dos bandas esperadas correspondientes a las 4079 pb y 1670 pb que se esperan, por lo tanto, se confirma la correcta construcción del plásmido pRM04.

Una vez confirmada la clonación del gen *CLN3*, se envió a secuenciar el gen con los oligonucleótidos Cln3A y Cln3D a la Unidad de Biología Molecular del IFC, para descartar que existiera alguna mutación en dicho gen. La secuencia generada fue alineada con la secuencia obtenida en la base de datos y coincidieron todas las bases que conforman el gen, no se encontró ninguna mutación en *CLN3* clonado en pJET1.2.

Se prosiguió con la subclonación de *CLN3* en los vectores pRS416 y YEp352, se realizó la digestión y purificación de *CLN3*, proveniente del plásmido pRM04, así como de los vectores mencionados (Tabla 5.7.1). Se realizaron las ligaciones correspondientes y se transformaron bacterias *E. coli DH5α* tal como se indica en el apartado 5.8. Para confirmar la correcta construcción se purificaron los plásmidos de las colonias transformantes haciendo digestiones con enzimas de restricción cuyo sitio de corte se localizara en el vector utilizado y en el gen clonado (Tabla 5.7.2). Al plásmido generado entre *CLN3* y pRS416 se le asignó el nombre de pRM09, al plásmido generado entre *CLN3* y YEp352 se le asignó el nombre de pRM10.

#### 6.2.4 Confirmación de subclonación de *CLN3* en vectores pRS416 y YEp352, plásmidos pRM09 y pRM10

Para la confirmación de la correcta construcción de pRM09 se realizaron digestiones de los plásmidos pRM04 (de donde sale el inserto), pRS416 (vector) y pRM09 con las enzimas de restricción *EcoRI* y *EcoRV*. La digestión de pRM04 genera fragmentos de 3256 pb y 2501 pb; la digestión de pRS416 genera fragmentos de 3449 pb y 1443 pb; y la digestión de pRM09 genera fragmentos de 3421 pb, 1881 pb y 1443 pb.

Para confirmar la correcta construcción de pRM10 se utilizaron las enzimas de restricción *EcoRV* y *XhoI* para digerir los plásmidos YEp352 (vector) y pRM10. La digestión de YEp352 genera un fragmento de 5181 pb y la digestión de pRM10 genera fragmentos de 5431 pb y 3409 pb.

Se realizó la electroforesis, en un gel de agarosa 0.8% (Figura 6.10), de todas las digestiones mencionadas.

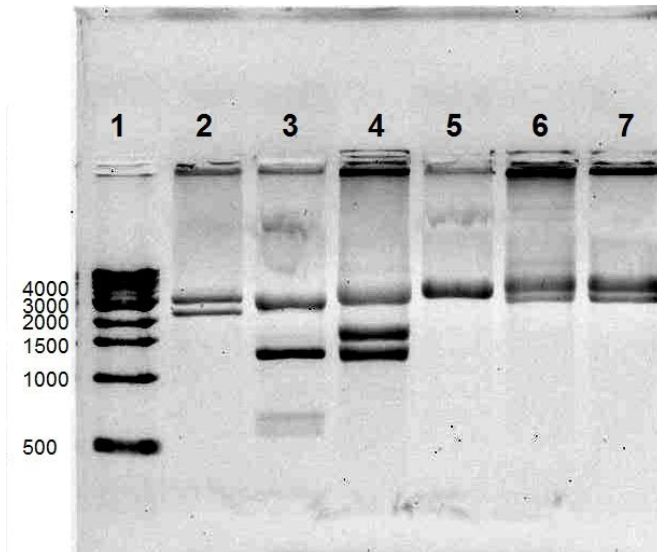


Figura 6.10 Confirmación de pRM09 y pRM10. Gel de agarosa que muestra en el Carril 1 el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder; Carril 2 muestra la digestión pRM04; Carril 3 muestra la digestión pRS416; Carril 4 muestra la digestión del plásmido de la colonia transformante A; Carril 5 muestra la digestión de Yep352; Carriles 6 y 7 muestran la digestión de las colonias transformantes B.

El Carril 2 del gel de la Figura 6.10 muestra las dos bandas del tamaño esperado, producidos por la digestión de pRM04, el carril 3 muestra las bandas correspondientes a los pesos que se esperan por la digestión de pRS416. El Carril 4, digestión del plásmido de la colonia transformante A, muestra bandas correspondientes a la 3421 pb, 1881 pb y 1443 pb, que son las que confirman la correcta construcción del plásmido pRM09.

El Carril 5 muestra la única banda generada por la digestión de YEp352 y los Carriles 6 y 7, colonias transformantes B, muestran las bandas correspondientes a 5431 pb y 3409 pb, que son las que se espera generar por la digestión de PRM10, confirmando así la correcta construcción del plásmido.

Una vez construidos todos los plásmidos se puede proceder con la transformación de cepas de levaduras, lo cual se describirá a más detalle en el apartado 6.4.8.

### 6.3 Interacción genética entre *CYS4* y *CLN3*

Para evaluar la existencia de una interacción de tipo genética entre *CYS4* y *CLN3* se realizaron ensayos de cinética de crecimiento, para observar el fenotipo entre la cepa silvestre, las mutantes sencillas (*cys4Δ* y *cln3Δ*) y la doble mutante (*cys4Δcln3Δ*). La cinética de crecimiento se evaluó durante 48 h SIN agitación midiendo la densidad óptica a 600nm cada 15 min (apartado 5.9), los datos recopilados nos muestran los fenotipos de crecimiento que las diferentes cepas presentan. Los datos fueron graficados D.O.<sub>600</sub> vs Tiempo (días) (Figura 6.11).

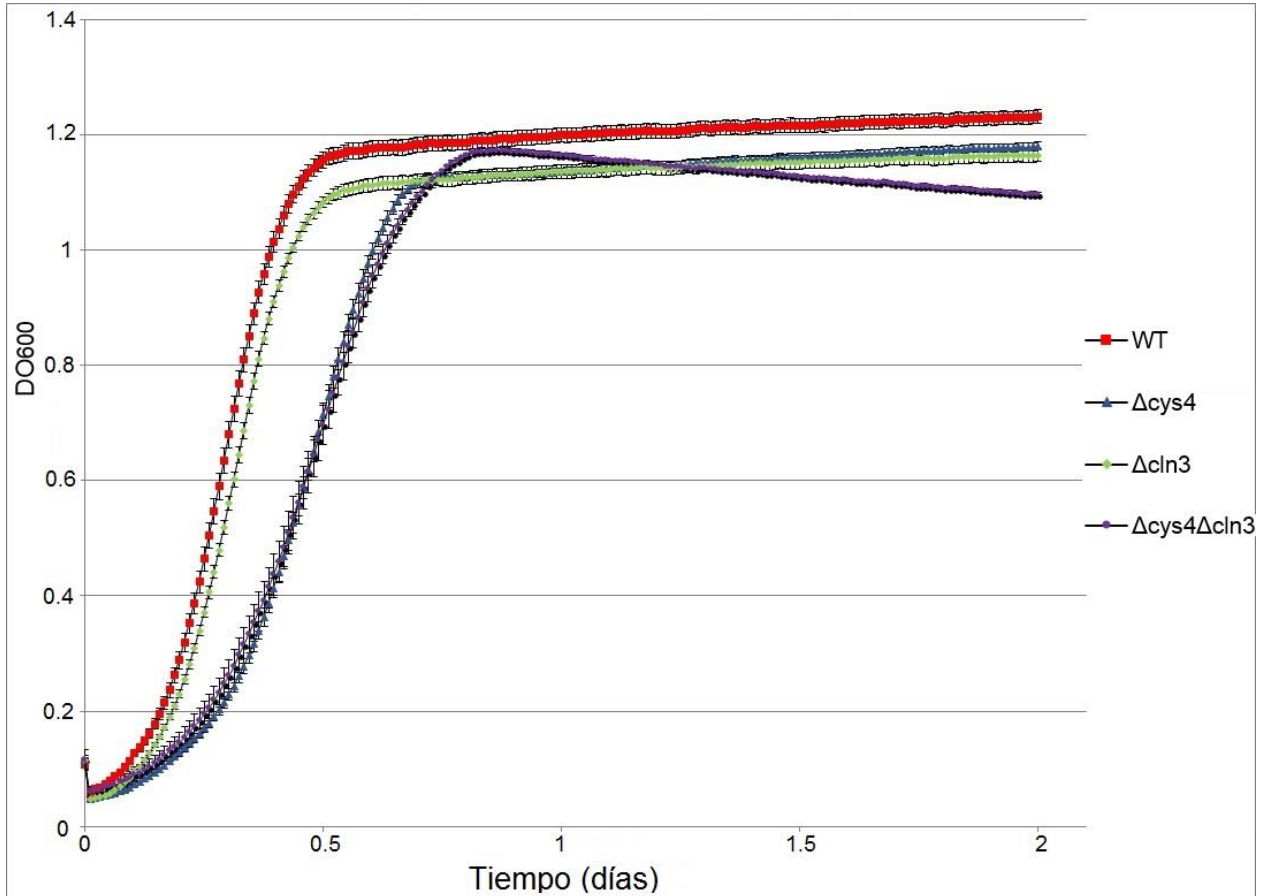


Figura 6.11 Cinética de crecimiento de cepas WT (BY4742), *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ*.

La cinética de crecimiento de la mutante sencilla *cys4Δ* está muy por debajo de la curva de crecimiento de la cepa de referencia WT BY4742, por lo tanto, *cys4Δ* crece de manera más lenta. Por otra parte, la cinética de crecimiento de *cln3Δ* es parecida a la curva de crecimiento de la cepa silvestre, aunque siempre está por debajo la de *cln3Δ*. Esta diferencia se hace más evidente en la fase estacionaria, *cln3Δ* crece ligeramente más lento que la WT. En la fase estacionaria, las cinéticas de crecimiento de las mutantes sencillas se iguala.

En el caso de la cepa *cys4Δcln3Δ*, se observa una cinética de crecimiento similar al de la mutante *cys4Δ*, en un punto la curva de crecimiento supera a las mutantes sencillas, pero en la fase estacionaria comienza a descender hasta que alcanza valores menores a los de las mutantes sencillas. La tendencia a disminuir es probable que se seguiría viendo si se hubiera monitoreado por más tiempo.

Como se observa un fenotipo de *cys4Δcln3Δ* que no corresponde a la suma de fenotipos de las mutantes sencillas, se sugiere que hay una interacción genética entre los genes *CLN3* y *CYS4* en *Saccharomyces cerevisiae* y al tratarse de una cinética de crecimiento parecida y no menor a la cinética correspondiente a *cys4Δ*, podemos decir que se trata de una interacción genética positiva ya que el fenotipo observado es más apto para crecer de lo esperado.

En algunos de los experimentos realizados, al término de las determinaciones de las lecturas de D.O. se observó que las células de la cepa *cys4Δcln3Δ* se acumulaban en las orillas del pozo o al centro del pozo, lo que producía errores en las lecturas. Se realizaron observaciones al microscopio para observar el fenotipo celular de cada cepa, las muestras analizadas provienen de la placa de 100 pozos utilizada para la determinación de las cinéticas de crecimiento. Para observar la viabilidad de las cepas, se realizaron tinciones con 5μL de azul de tripano 0.4% y 7μL del cultivo de cada cepa. El colorante azul de tripano es utilizado para ensayos de viabilidad, es un compuesto derivado del tolueno que emite fluorescencia a 640-660nm y su rango de absorbancia va de 400-620nm.

En la Figura 6.12 se muestran imágenes correspondientes a la morfología de cada una de las cepas, así como su viabilidad.

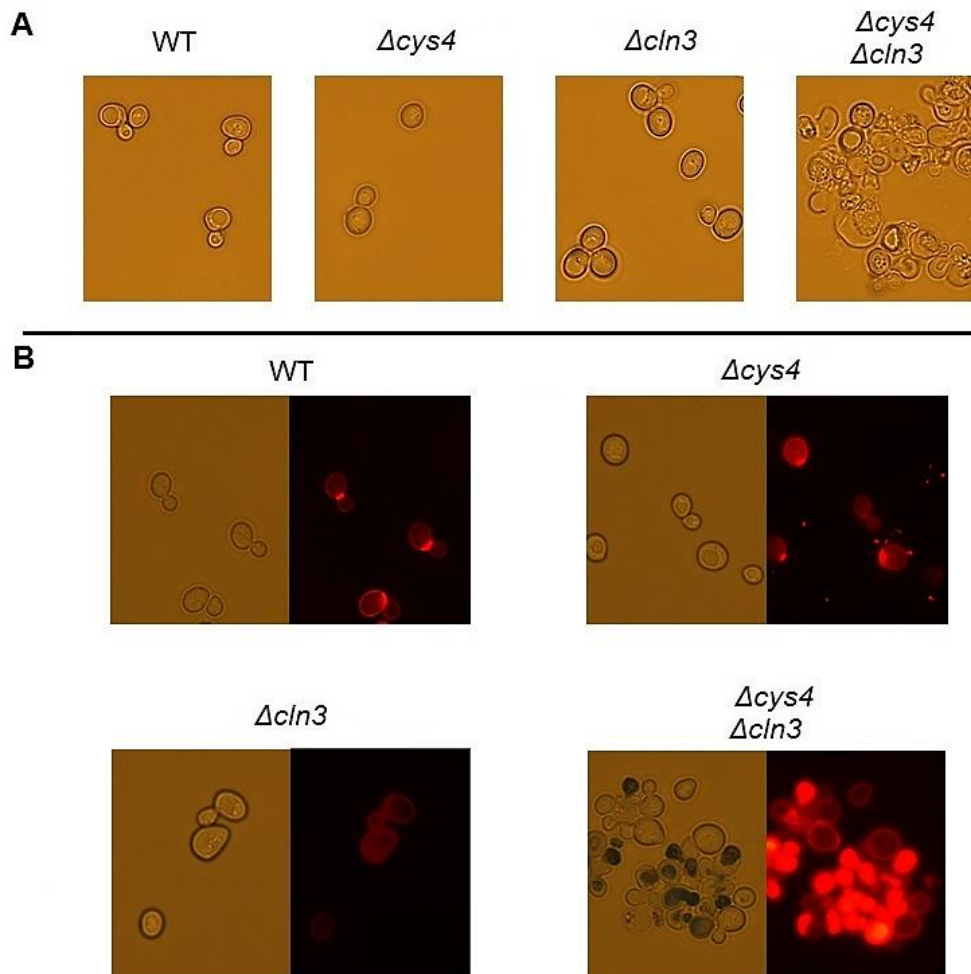


Figura 6.12 Microscopía de cepas cultivadas en placas de 100 pozos. Cepas WT (BY4742), *cys4* $\Delta$ , *cln3* $\Delta$  y *cys4* $\Delta$ *cln3* $\Delta$ , objetivo 100X. A) Fotografías en campo claro. B) Viabilidad de las cepas utilizando Azul de Tripano.

Es evidente que las células de la cepa *cys4* $\Delta$ *cln3* $\Delta$  se aglomeran y parecen lisarse (Figura 6.12). La prueba de viabilidad confirma que las células de la doble mutante están muertas, lo que explica la tendencia a disminuir de la cinética de crecimiento de dicha cepa. Debido a las condiciones del experimento puede haber dos explicaciones para este fenotipo, la primera consiste en la ausencia de oxígeno ya que las placas que se utilizan para determinar las cinéticas de crecimiento no permiten la circulación de oxígeno, provocando que el poco gas presente se consuma afectando la viabilidad de la cepa; la segunda causa podría ser la acumulación de EtOH producido por la fermentación que llevan a cabo las levaduras y que represente un metabolito dañino (la evaluación se detalla en los apartados 6.4.1 y 6.4.2 respectivamente).

Para comprobar las hipótesis surgidas, se analizó el crecimiento de las cepas bajo diferentes tipos de estrés y comprobar también si la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3*.



### 6.4 Fenotipo de las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* en respuesta a estrés

Como se mencionó anteriormente, las interacciones genéticas pueden ser positivas o negativas y para poner en evidencia el tipo de interacción y a qué nivel se puede presentar, se debe de hacer una comparación del crecimiento de todas las cepas en diferentes condiciones estresoras.

Se realizaron goteos en placas de YPD, en algunos casos adicionando compuestos o reemplazando la fuente de carbono para poder observar el tipo de interacción que se presentara. A partir de diluciones de precultivos de las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* y se realizaron los goteos respectivos. En algunos casos se revisó la morfología de las células por microscopía.

#### 6.4.1 La ausencia de oxígeno no parece afectar la capacidad para dividirse de las células *cys4Δcln3Δ*

En algunos organismos, la ausencia de oxígeno implica que el metabolismo de carbohidratos no siga a la vía correspondiente de la respiración celular aerobia. Las condiciones anaerobias conducen a que los organismos lleven a cabo la fermentación, en la que los carbohidratos son oxidados hasta lactato (principalmente en tejidos de animales) o etanol (principalmente en levaduras). La ausencia de oxígeno no permite que se lleve a cabo la fosforilación oxidativa en la que el O<sub>2</sub> es necesario para reducirse en la cadena transportadora de electrones y llevar a cabo así la respiración celular.

Los cultivos de las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* se realizaron en 27 mL de medio YPD ajustando la D.O.<sub>600</sub> a 0.1, partiendo de precultivos de 24 h. Se llenaron casi por completo los tubos de ensaye, los cuales fueron tapados herméticamente, asegurándose así que en el interior se encontrara la menor cantidad de oxígeno posible (Figura 6.13). Se realizaron goteos a las 24, 48 y 72 h de incubación a 30°C, así como un análisis microscópico para observar la viabilidad de las cepas realizando una tinción con Azul de Tripiano como se indica en el punto 5.11 (Figura 6.14, 6.15 y 6.16). Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 h.

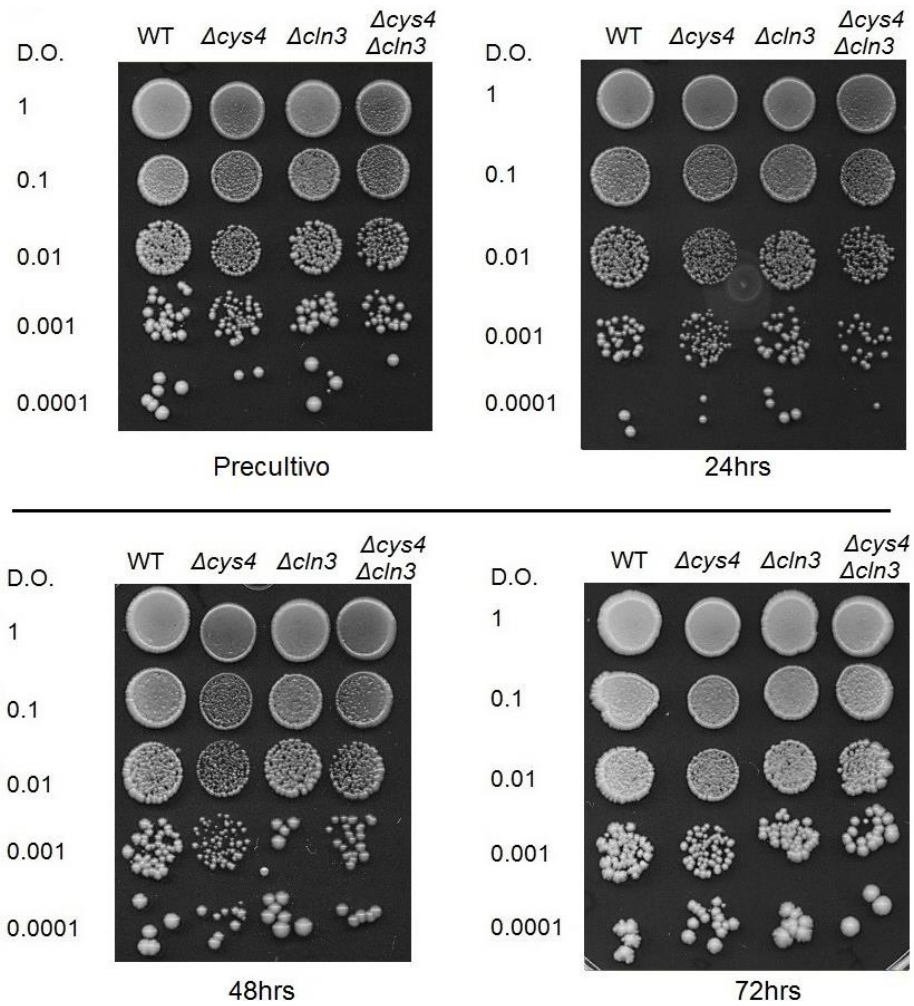


Figura 6.13 Goteos en medio YPD de los cultivos líquidos con mínima cantidad de oxígeno realizados a las 24, 48 y 72 h de incubación.

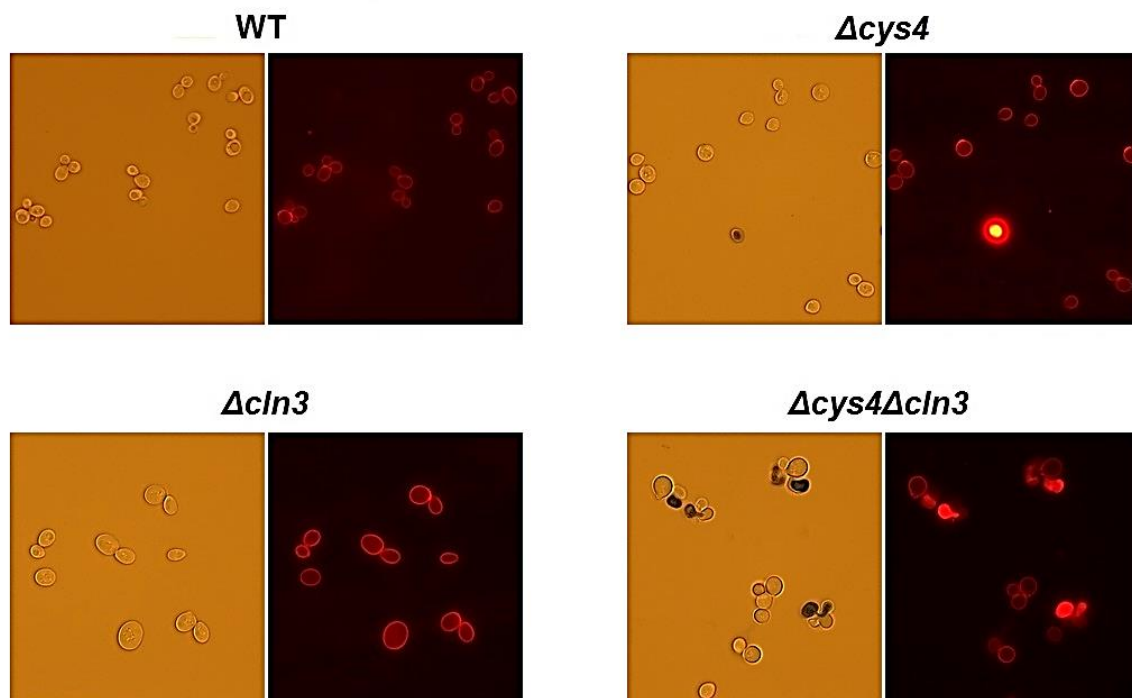


Figura 6.14 Análisis de viabilidad por microscopía. Cultivos con mínima cantidad de oxígeno, tinciones realizadas a las 24 h de incubación. Objetivo 100X.

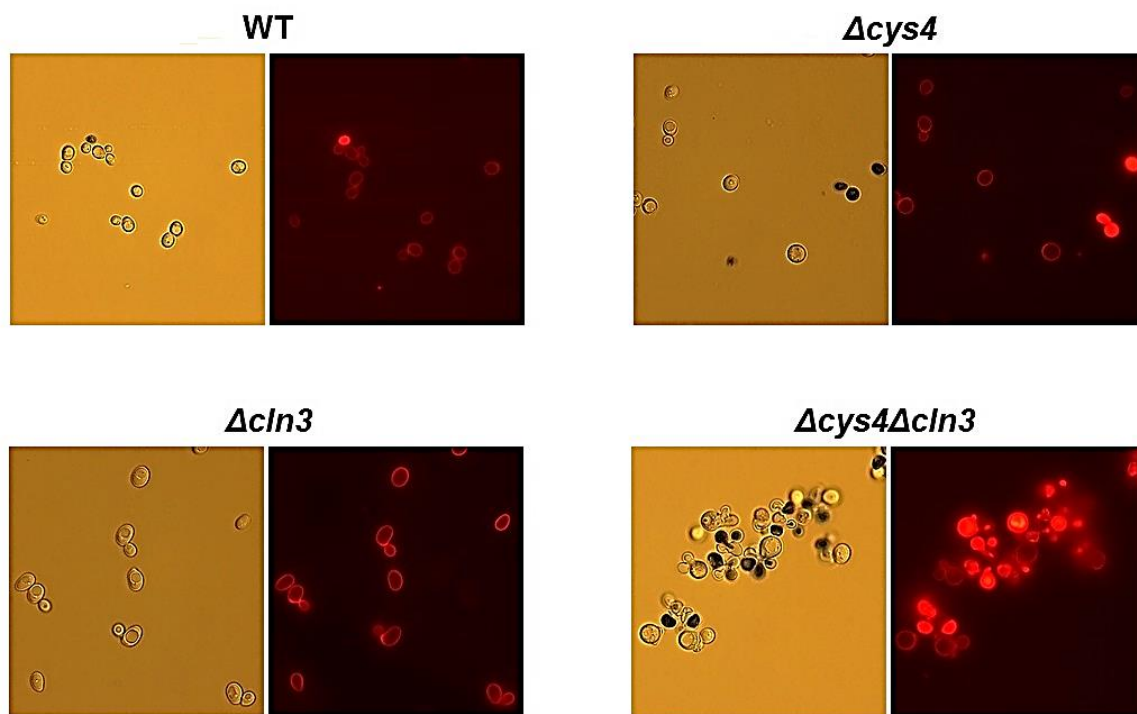


Figura 6.15 Análisis de viabilidad por microscopía. Cultivos con mínima cantidad de oxígeno, tinciones realizadas a las 48 h de incubación. Objetivo 100X.

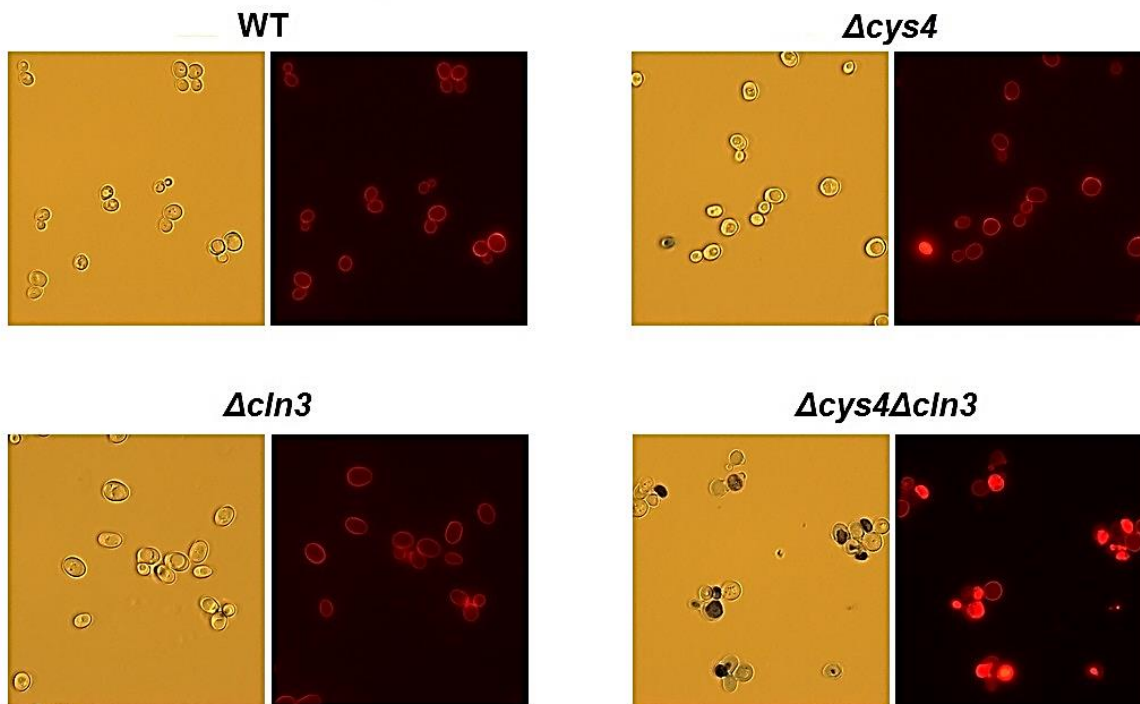


Figura 6.16 Análisis de viabilidad por microscopía. Cultivos con mínima cantidad de oxígeno, tinciones realizadas a las 72 h de incubación. Objetivo 100X.

Los goteos en medio YPD (Figura 6.13) muestran que el crecimiento de las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* no se ve afectado por la ausencia de oxígeno. Se observa el crecimiento de colonias de todas las cepas en la dilución correspondiente a una D.O. de 0.0001. Esto se aprecia en los goteos realizados a las 24, 48 y 72 h de incubación, hay un crecimiento normal igual al del precultivo.

La viabilidad que presentan las células de las cepas BY4742, *cln3Δ* no se ve afectada por la ausencia de oxígeno. Las observaciones y fotografías tomadas no muestran células muertas en ninguna de las horas en las que se realizó la tinción. La cepa *cys4Δ* muestra una cantidad mínima de células muertas durante todas las horas analizadas (Figuras 6.14 a 6.16).

La cantidad de células muertas que se encontraron en muestras del cultivo de *cys4Δcln3Δ* es mayor a comparación de lo visto con la cepa *cys4Δ*. Esto se observa en todas las horas en las que se realizó el análisis. Las células de la doble mutante se encuentran en aglomeraciones. Si se compara la viabilidad de la doble mutante a las 24 h (Figura 6.14) con la de las 48 h (Figura 6.15), la cantidad de células muertas aumenta. A las 72 h (Figura 6.16) también hay presencia de células muertas, pero parecen o estar tan aglomeradas como a las 48 h.

Los resultados observados en las Figuras 6.13 a 6.16, nos indican que no parece ser la cantidad de oxígeno en los cultivos lo que afecta la viabilidad de la cepa *cys4Δcln3Δ*. La producción de EtOH derivado de la fermentación de la glucosa del medio puede ser responsable de la muerte células en la cepa antes mencionada. Para poder observar si el etanol afecta a la doble mutante se realizaron experimentos adicionando dicho compuesto.

#### 6.4.2 La mutante *cys4Δcln3Δ* es sensible a etanol

*S. cerevisiae* utiliza la fermentación alcohólica como principal vía de catabolismo de azúcares y de obtención de energía, los productos finales de este proceso son etanol y CO<sub>2</sub>. Esta vía se encuentra activa principalmente en condiciones de anaerobiosis, aunque también está activa en presencia de oxígeno. Cuando los cultivos líquidos de *S. cerevisiae* se encuentran en fase exponencial, la fermentación se encuentra activa y al llegar a la fase estacionaria, los azúcares ya fueron degradados a CO<sub>2</sub> y EtOH, este último se puede utilizar como nueva fuente de carbono.

Se prepararon placas de YPD suplementados con etanol a diferentes concentraciones, emulando un medio fermentado por la presencia de dicho compuesto para observar si su presencia en el medio puede significar un compuesto perjudicial para la doble mutante *cys4Δcln3Δ*, que anteriormente ha mostrado tener poca viabilidad en condiciones y medios fermentativos (Figura 6.17).

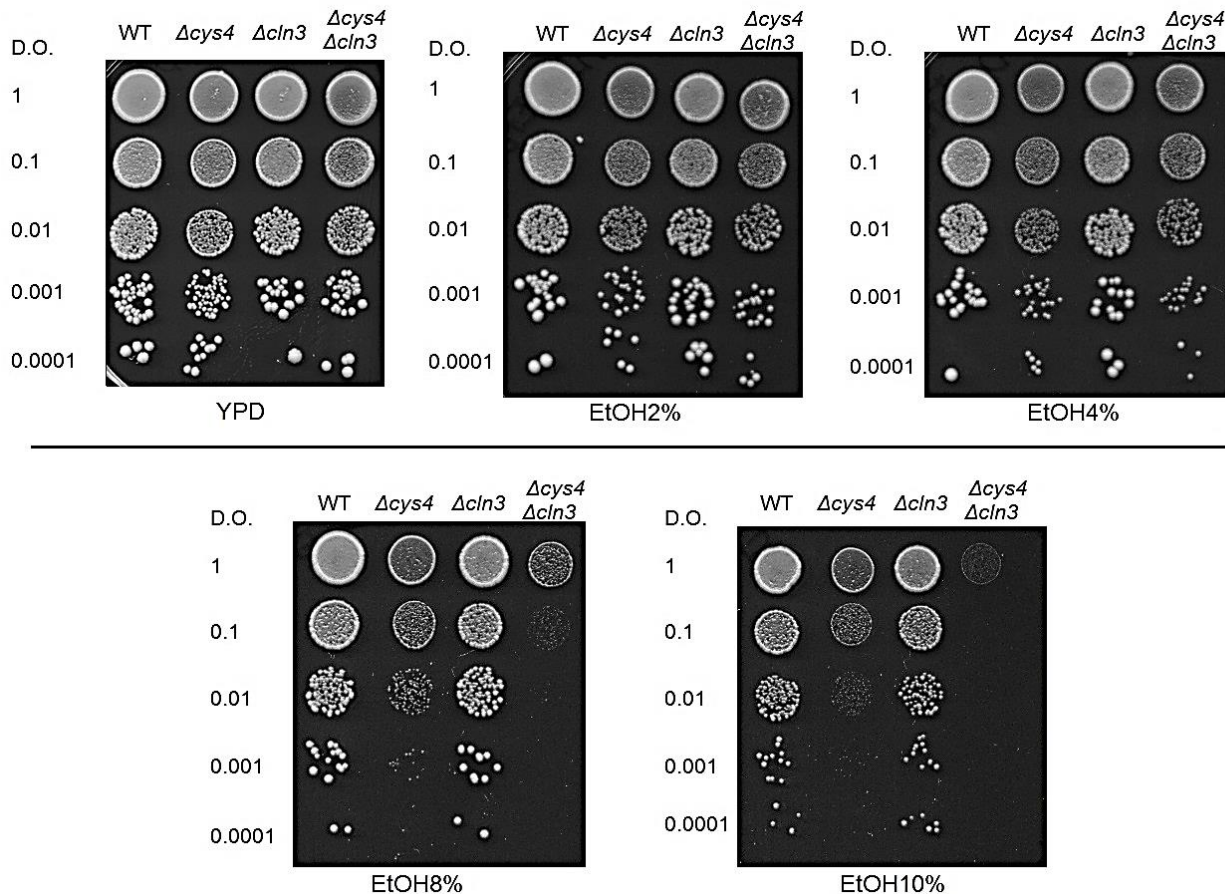


Figura 6.17 Goteos en medio YPD con diferentes concentraciones de etanol, simulando un medio fermentado.

Al comparar el crecimiento de las cepas en los medios con diferentes concentraciones de etanol (Figura 6.17) podemos observar que la cepa  $\Delta cys4 \Delta cln3$  fue más sensible que las mutantes sencillas para crecer en el medio al que se le adiciona un 8% de etanol, pues a la dilución 0.01 no hubo crecimiento. La mutante sencilla  $\Delta cys4$

también muestra ser sensible en medio con etanol al 8% pero el crecimiento se ve menos afectado que en la doble mutante.

En el medio con etanol al 10% es aún más evidente la afectación que poseen la doble mutante *cys4Δcln3Δ* y la mutante sencilla *Δcys4* para crecer bajo esta condición. El crecimiento de *cys4Δcln3Δ* apenas es perceptible en la dilución correspondiente a la D.O. de 1 y la cepa *cys4Δ* apenas muestra crecimiento en la dilución con D.O. DE 0.01. Por lo tanto, bajo esta condición, la interacción genética entre los genes *CYS4* y *CLN3* es negativa.

### 6.4.3 La mutante *cys4Δcln3Δ* es sensible a estrés oxidante.

El estrés oxidante se presenta en las células cuando se pierde la homeostasis entre compuestos oxidantes y antioxidantes, habiendo mayor cantidad de los primeros. La sobreproducción de especies oxidantes como el  $H_2O_2$  y de radicales libres son responsables del estrés oxidante. El anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo son intermediarios que se forman en el proceso de reducción de una molécula de oxígeno. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es producido en algunos procesos biológicos por ciertas enzimas y hay otras enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa que lo transforman en agua, oxígeno y, en el caso de la última enzima, en otras especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidante puede producir daño en macromoléculas como en DNA, los lípidos, proteínas y polisacáridos.

Se utilizó  $H_2O_2$  adicionándolo en diferentes concentraciones a placas de YPD para crear un medio que propiciara un estrés oxidante en las células. Se utilizaron precultivos de 24 h en 10 mL de medio YPD y se realizaron los goteos correspondientes mostrados en la Figura 6.18.

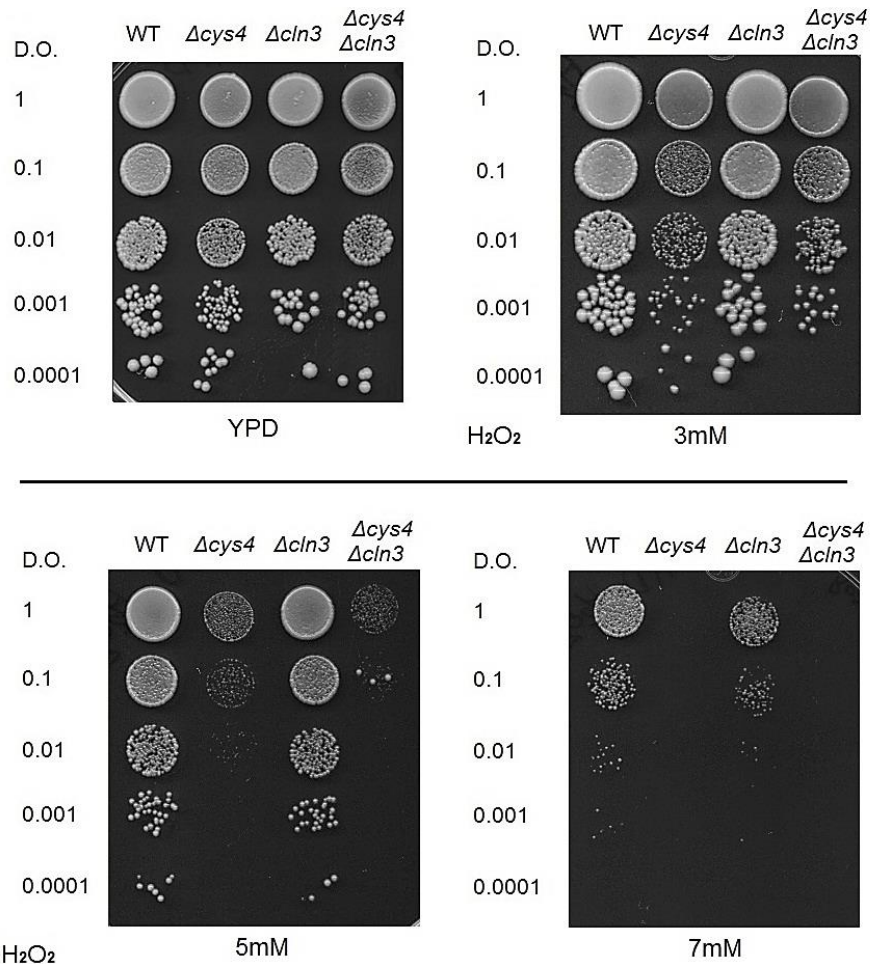


Figura 6.18 Goteos en medio YPD con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  para generar estrés oxidante.

Los goteos de la Figura 6.18 muestran que la cepa  $\Delta cys4 \Delta cln3$  tiene más problemas de crecimiento que la mutante sencilla de  $\Delta cys4$ , apreciable en el medio que contiene  $H_2O_2$  5 mM, esto nos indica que la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* es negativa en este caso.

Las cepas BY4742 y *cln3* $\Delta$  presentan un crecimiento perceptible hasta en el medio con la concentración más alta de  $H_2O_2$  utilizada, que fue 7 mM. Indicando que el estrés oxidante no los afecta a comparación de las otras cepas.

La mutante sencilla *cys4* $\Delta$  es ligeramente sensible al estrés oxidante. Se observan colonias en el medio que contenía  $H_2O_2$  5 mM, en la gota correspondiente a la dilución con D.O. de 0.01. Las colonias son de menor tamaño, pero perceptibles.

Se puede apreciar la sensibilidad al estrés oxidante que presenta la cepa *cys4* $\Delta$ *cln3* $\Delta$ . En el goteo en medio con una concentración 5 mM de  $H_2O_2$ , se logra distinguir el crecimiento de colonias pequeñas en la gota correspondiente a la D.O. de 1. Se observan tres colonias de mayor tamaño en la dilución con D.O. de 0.1, esto se puede atribuir a que

surgen mutaciones espontáneas en las células para poder sobrevivir a las condiciones de estrés en las que se encuentran.

#### 6.4.4 No hay una interacción genética entre *cys4Δ* y *cln3Δ* bajo presión osmótica

La presión osmótica es la presión que se requiere para frenar el flujo de disolvente a través de una membrana semipermeable, dicha membrana separa a dos compartimentos cada uno con una cantidad de solutos y se procura siempre mantener un equilibrio entre las concentraciones de solutos. En las células la membrana plasmática actúa como membrana semipermeable cuando las células se encuentran rodeadas de un disolvente con una concentración de solutos diferente a la del citoplasma y el agua (disolvente) fluye de un lado a otro de la membrana, un proceso llamado ósmosis.

Para observar si la presión osmótica se veía afectada por las mutaciones en las cepas se realizaron goteos en placas con NaCl 0.5 M y Sorbitol 1 M, y así poder observar si hay alguna modificación en la regulación de transporte de membrana. Se utilizaron precultivos de 24 h en 10 mL de medio YPD (Figura 6.19).

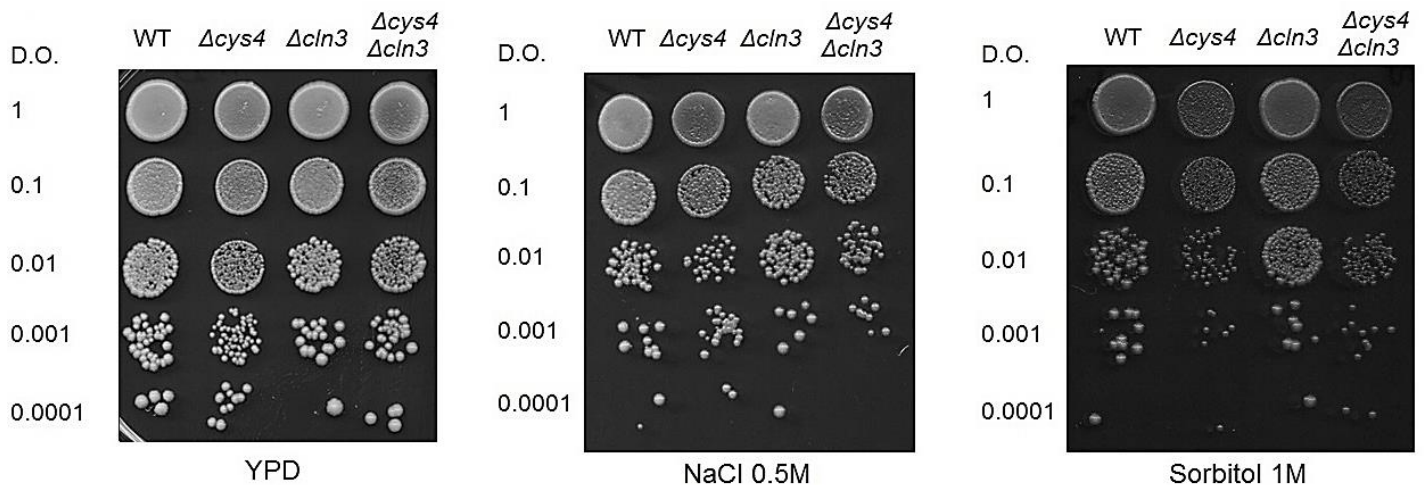


Figura 6.19 Goteos en medio YPD adicionando diferentes solutos.

En la Figura 6.19, los goteos en los medios tanto con NaCl como con Sorbitol muestran que las cepas no presentan problemas de crecimiento, no se observa un fenotipo diferente entre las mutantes sencillas y la doble mutante, ésta última no muestra ser ni más ni menos apta para crecer en los medios con mayor cantidad de solutos, por lo tanto, no se observa ninguna interacción genética bajo esta condición.



#### 6.4.5 En estrés de retículo endoplásmico *cys4Δ* y *cln3Δ* tienen una interacción genética positiva

El estrés del Retículo Endoplásmico (RE) puede ser generado por diversos factores que producen la acumulación de proteínas mal plegadas en dicho organelo. El estrés en el Retículo Endoplásmico es un tipo de estrés celular y es caracterizado por la activación de cascadas de señalización que tienen como fin detener la síntesis de proteínas para evitar la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, modulando la síntesis proteica.

Se utilizó el antibiótico Tunicamicina a diferentes concentraciones, este antibiótico simula un estrés en el Retículo Endoplásmico ya que bloquea la N-Glicosilación en eucariontes al inhibir la formación del intermediario N-acetilglucosamina-Dolico-Fosfato. La glicosilación es una modificación post-traduccional frecuente en proteínas localizadas en el Retículo Endoplásmico. La ausencia de glicosilación evita que las proteínas puedan salir del retículo endoplásmico, esto provoca su acumulación en el organelo provocando así que las proteínas no se plieguen correctamente<sup>63, 63, 65</sup>. Los goteos se realizaron con precultivos de 24 h de incubación a 30°C. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 48 h (Figura 6.20).

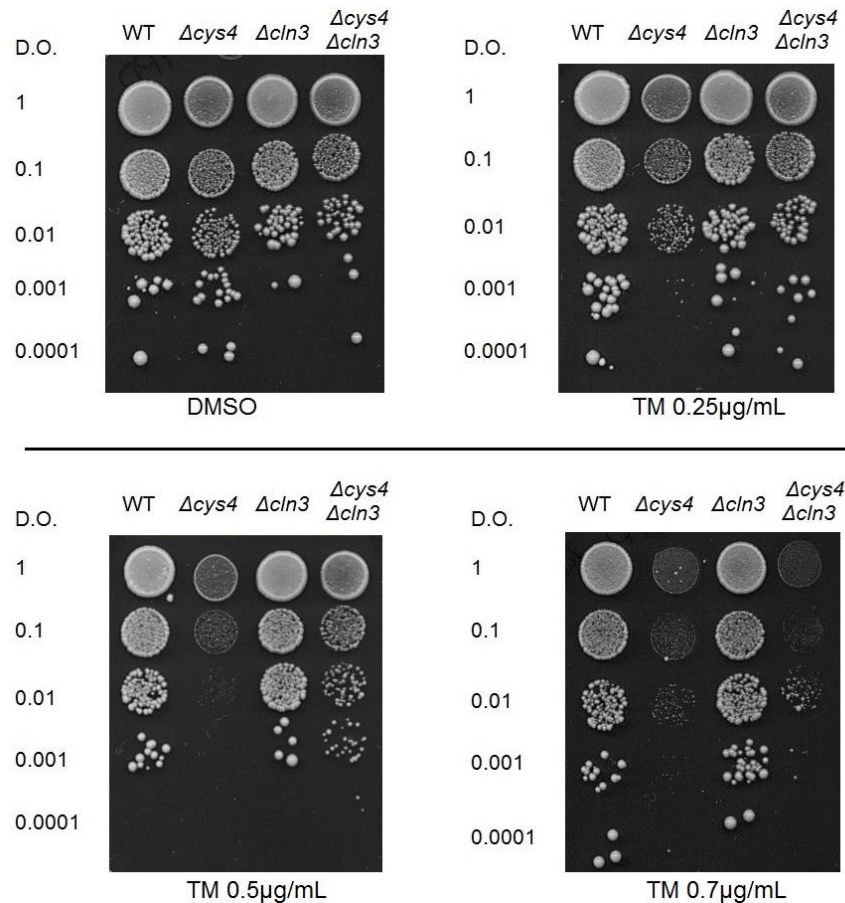


Figura 6.20 Goteos en medio YPD adicionando diferentes concentraciones de tunicamicina para inducir estrés en el Retículo Endoplásmico.

El DMSO es utilizado como vehículo para la tunicamicina y los goteos en el medio al que se le adicionó dicho compuesto se realizaron para verificar que no afectara por sí sólo el crecimiento de las cepas, lo cual se puede comprobar y los resultados que se observan en los goteos de la Figura 6.20 con las diferentes concentraciones de tunicamicina se deberán al antibiótico y no al vehículo.

Las cepas BY4742 y *cln3Δ* no parecen ser afectadas por el estrés en retículo endoplásmico. Muestran un crecimiento parecido en todos los medios, desde el que contiene sólo el vehículo hasta el que contiene la concentración más alta de tunicamicina (0.7 µg/mL).

La mutante sencilla *cys4Δ* presenta problemas de crecimiento apreciables en el medio con tunicamicina a 0.25 µg/mL. A penas son perceptibles colonias, de menor tamaño al de otras cepas, en la gota correspondiente a la D.O. de 0.001. Es más evidente en el medio con una concentración de tunicamicina a 0.5 µg/mL, en donde las colonias pequeñas se observan en la gota de la dilución con D.O. de 0.01.

La cepa *cys4Δcln3Δ* muestra una capacidad mejor que la de la mutante sencilla *cys4Δ* para crecer en condiciones de estrés en retículo endoplásmico. En el medio con la concentración de tunicamicina 0.5 µg/mL se observa crecimiento de colonias de la doble mutante en la gota correspondiente a la dilución con D.O. de 0.001.

Estos resultados indican la existencia de una interacción genética positiva entre los genes *CYS4* y *CLN3* bajo esta condición de crecimiento, esto debido a que la cepa *cys4Δcln3Δ* crece mejor que la mutante sencilla *cys4Δ* en el medio que contiene tunicamicina a una concentración de 0.25 µg/mL y a 0.5 µg/mL.

### **6.4.6 No se puede afirmar la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* al cambiar la fuente de carbono**

Las levaduras llevan a cabo la respiración anaerobia y aerobia, como se mencionó anteriormente, *Saccharomyces cerevisiae* puede degradar azúcares y obtener energía en el proceso sin utilizar oxígeno en un proceso llamado fermentación (respiración celular anaerobia), pero también es capaz de degradar azúcares y obtener mayor cantidad de energía utilizando oxígeno, primero se activa la vía del ciclo del Krebs y posteriormente se activa la fosforilación oxidativa, donde el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones, llevando así a cabo la respiración celular aerobia. En *S. cerevisiae* la respiración aerobia puede favorecerse al utilizar en los medios de cultivos fuentes de carbono no fermentables

La galactosa es una fuente de carbono similar a la glucosa, la cual también puede conducir al proceso de fermentación.

El lactato, el etanol y el glicerol son fuentes de carbono no fermentables. El lactato es convertido en el citosol a piruvato y cuando el piruvato entra a la mitocondria es convertido a oxalacetato, uno de los componentes del ciclo de Krebs, junto acetil-CoA y la enzima correspondiente producen citrato. El metabolismo del glicerol produce FADH<sub>2</sub> utilizado en la fosforilación oxidativa. El etanol es convertido a acetil-CoA por una serie de reacciones y el incorporado al ciclo de Krebs.

## 6. RESULTADOS

Se realizaron goteos en medios que contenían diferentes fuentes de carbono, tal como lo indica el punto 5.2, para observar cambios en la capacidad de crecimiento de las cepas estos medios no fermentables, se removió la dextrosa y se adicionó a cada medio 2% de galactosa, 2% de lactato, 2% de etanol, 2% de glicerol y 2% de una mezcla de etanol/glicerol, respectivamente. Los goteos se hicieron a partir de precultivos de 24 h de incubación a 30°C en medio YPD. Las placas fueron incubadas a 30°C durante cuatro días (Figura 6.21).

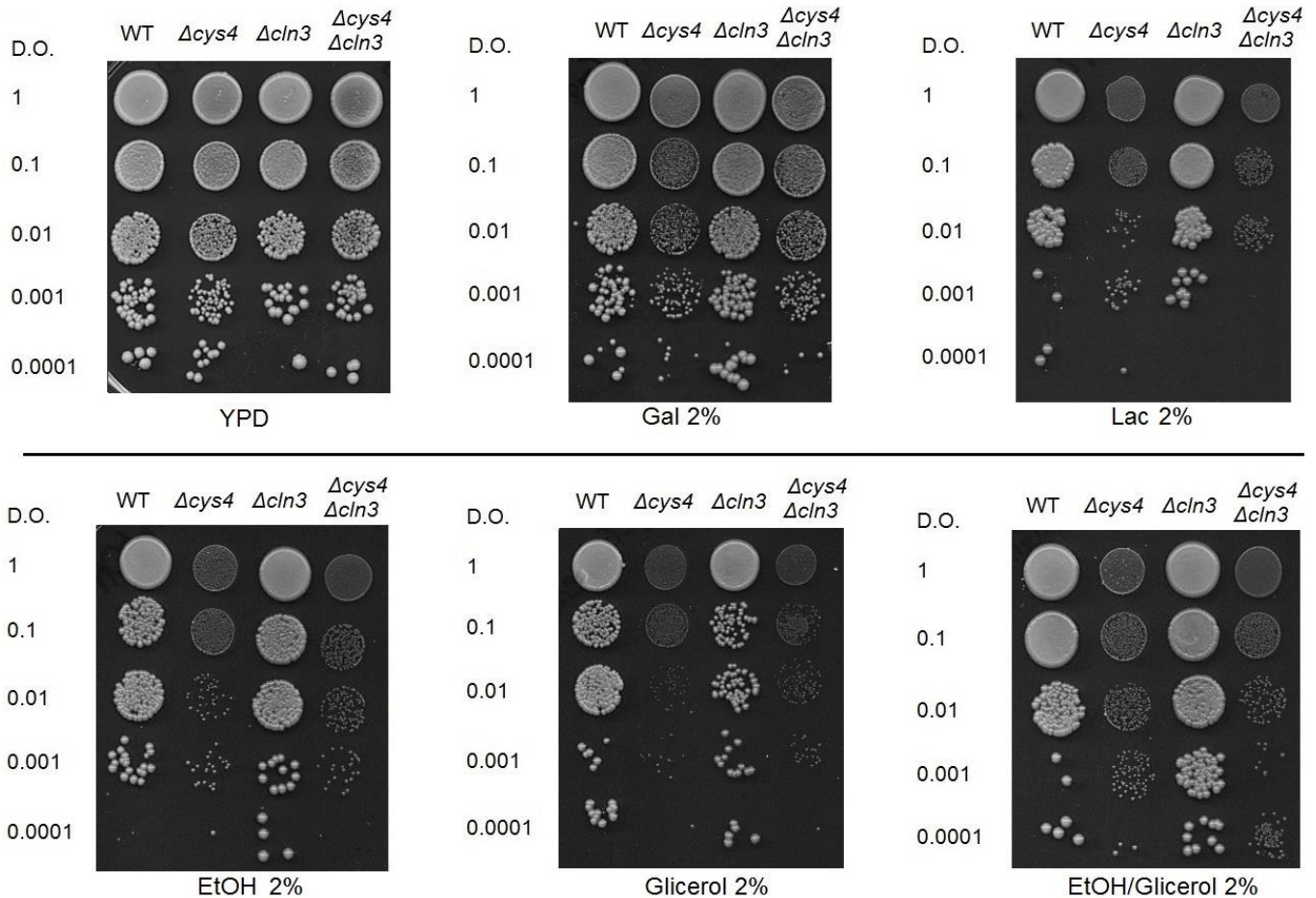


Figura 6.21 Goteos en medios con diferentes fuentes de carbono no fermentativo. Evaluación de capacidad de respiración.

La Figura 6.21 muestra que las cepas BY4742 y  $cln3\Delta$  no presentan problemas para desarrollarse en ninguno de los medios utilizados. Indicando que no tienen ningún problema aparente de fermentación ni de respiración celular aeróbica.

Los goteos en medio con galactosa como fuente de carbono nos muestran que ni las mutantes sencillas ni la doble mutante presentan problemas de crecimiento.

En el medio con lactato, los goteos muestran que la cepa  $cys4\Delta cln3\Delta$  es ligeramente menos apta para desarrollarse en dicho medio. Ya no se observa crecimiento de colonias en el goteo correspondiente a la dilución con D.O. de 0.001. Esto se puede indicar la existencia de algún problema de respiración celular.

En el medio con glicerol se puede apreciar ligeramente una diferencia en el crecimiento de las cepas *cys4Δ cys4Δcln3Δ*, en las gotas correspondientes a la dilución con D.O. de 0.1. Por otra parte, en los medios con etanol y la mezcla de etanol/glicerol se observa un crecimiento similar entre las cepas *cys4Δ* y *cys4Δcln3Δ*. Lo anterior puede significar que la doble mutante presenta un ligero problema de respiración al contar con glicerol como fuente de carbono.

Las cepas *cys4Δ* y *cys4Δcln3Δ* muestran colonias de menor tamaño al compararlo con las cepas BY4742 y *cln3Δ* en los medios con fuentes de carbono no fermentables. Esto sugiere que la mutante sencilla *cys4Δ* y la doble mutante *cys4Δcln3Δ* pueden tener problemas de respiración celular.

No se puede afirmar la existencia de una interacción entre *CYS4* y *CLN3* bajo estas condiciones de crecimiento.

Para observar si existía alguna relación entre el posible problema de respiración que presenta la doble mutante y la morfología de las células se procedió a hacer un análisis microscópico en medios no fermentativos.

### **6.4.7 La doble mutante *cys4Δcln3Δ* también muestra poca viabilidad en medios no fermentativos**

Se tiene información en la literatura que indica que al cambiar de medio a las mutantes *cln3Δ* a un medio no fermentativo, éstas modifican su tamaño, se observa un tamaño menor al que se presenta en medios fermentativos; otros datos informan que una delección de *CLN3* disminuye la tasa de fermentación en cepas utilizadas en la producción de sake, y quizá por eso la mutante *cln3Δ* no presenta problemas de crecimiento en medios no fermentativos. Sabiendo lo anterior surgió la pregunta sobre si se observaría algún fenotipo en la doble mutante que llegara a presentar en fuentes de carbono no fermentables que pueda estar relacionado con el problema de respiración, realizando experimento descrito a continuación.

Se realizó un análisis microscópico, se analizó la morfología y la viabilidad de las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* en diferentes medios con fuentes de carbono no fermentativas comparándolas con las cepas creciendo en medio YPD, el cuál posee una fuente de carbono fermentativa.

Se partió de precultivos de 10 mL de YPD incubados 24 h, se midió y se ajustó la D.O.<sub>600</sub> a 0.1 en 10 mL de los medios mencionados a continuación: YPD, YP-Lac 2%, YP-Lac/glicerol 2% y YP-EtOH/glicerol 2%. Los cultivos se incubaron a 30°C, a las 24 h y 48 h se tomaron muestras para observarlas al microscopio (Figura 6.22 y 6.23) y otras para hacer una tinción con azul de tripano 0.4%, analizando también al microscopio (Figura 6.24, 6.25, 6.26 y 6.27), objetivo 100X.

El análisis al microscopio se realizó a las 24 h y a las 48 h para tener un seguimiento de la morfología y viabilidad de las cepas.

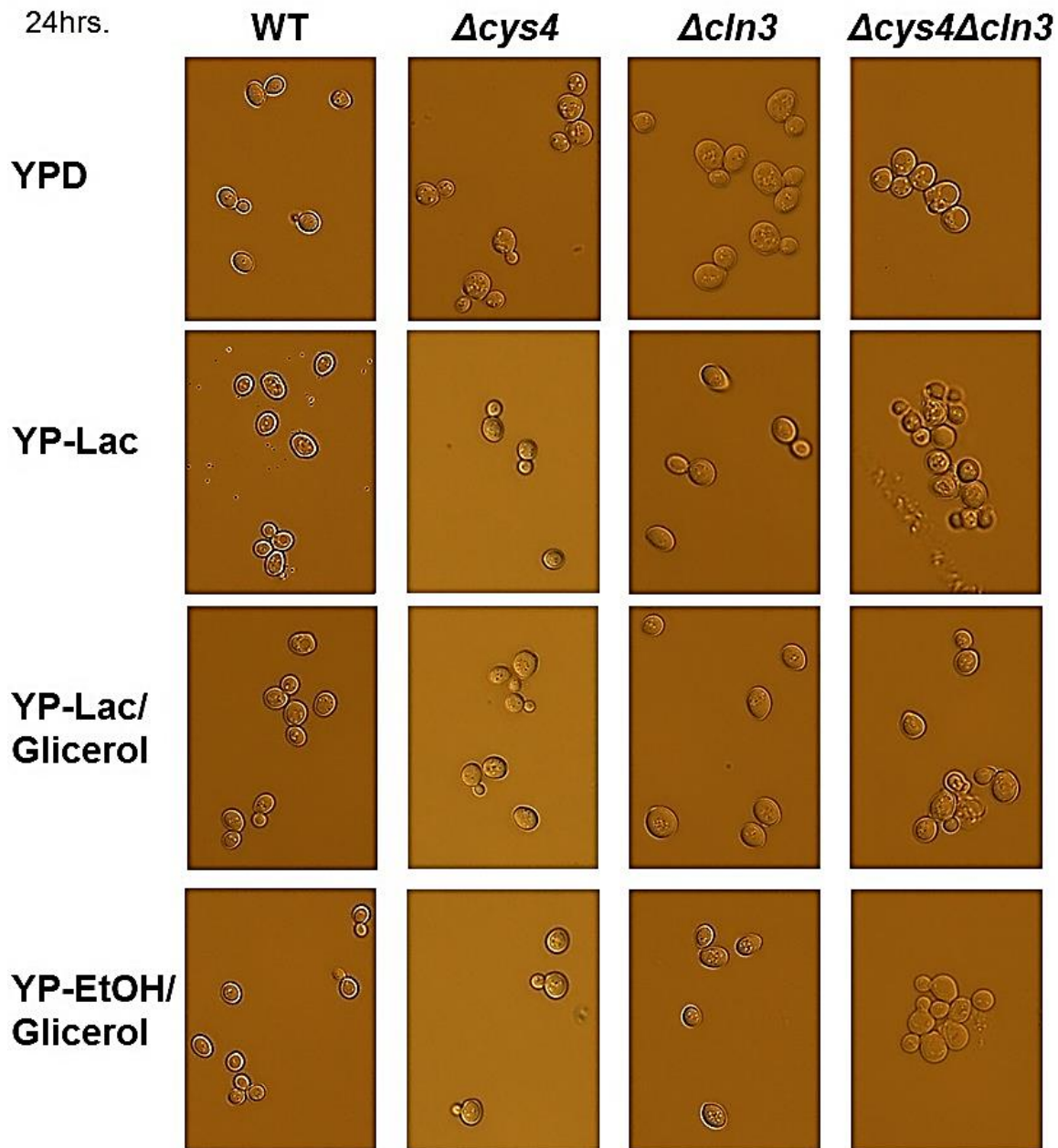


Figura 6.22 Análisis microscópico de la morfología de las cepas en medios con diferentes fuentes de carbono a las 24 h de incubación. Objetivo 100X

Con el análisis microscópico se pudieron realizar las siguientes observaciones sobre la morfología que presentaron las cepas a las 24 h de incubación (Figura 6.22):

La cepa de referencia (BY4742) sólo muestra células de menor tamaño en el medio con la mezcla de etanol/glicerol, comparándolo con el medio YPD. Esto puede deberse a que el catabolismo de estas fuentes de carbono es más rápido, haciendo que la célula tenga que reducir el tamaño crítico para dividirse.

Por otra parte, las células de la cepa silvestre en medio YP-Lac no se encontraban en gemación. Por la morfología, podríamos indicar que células se encuentran en la fase G1

y, por el tamaño, las células podrían dividirse de manera más rápida en este medio que en los otros.

La cepa *cys4Δ* muestra en todos los medios células en proceso de división. En el medio YP-Lac, el tamaño celular y la cantidad de células eran menores en comparación al resto. Esta cepa podría asimilar el lactato de manera lenta, disminuyendo la tasa de reproducción, por eso no hay gran cantidad de células.

Comparando las células de la cepa *cln3Δ* en medio YPD con el resto de los medios, el correspondiente a la mezcla lactato/glicerol muestra células de menor tamaño. El tamaño celular observado en el resto de los medios no fermentativos es ligeramente menor al visto en medio YPD. La disminución en el tamaño celular puede deberse a que la cepa *cln3Δ* asimila de manera diferente, o más lento o rápido, con lo que disminuye el tamaño crítico para dividirse.

La cepa *cln3Δ* no muestra células en gemación en los medios con mezclas lactato/glicerol y etanol/glicerol. Indicando que se encuentran en fase G1 del ciclo celular.

Las células de la doble mutante *cys4Δcln3Δ* se encuentran en agregaciones en todos los medios probados, lo que dificulta analizar el tamaño. Aun así, se puede ver que las células del medio YP-Lac presentan un tamaño menor a comparación del resto.

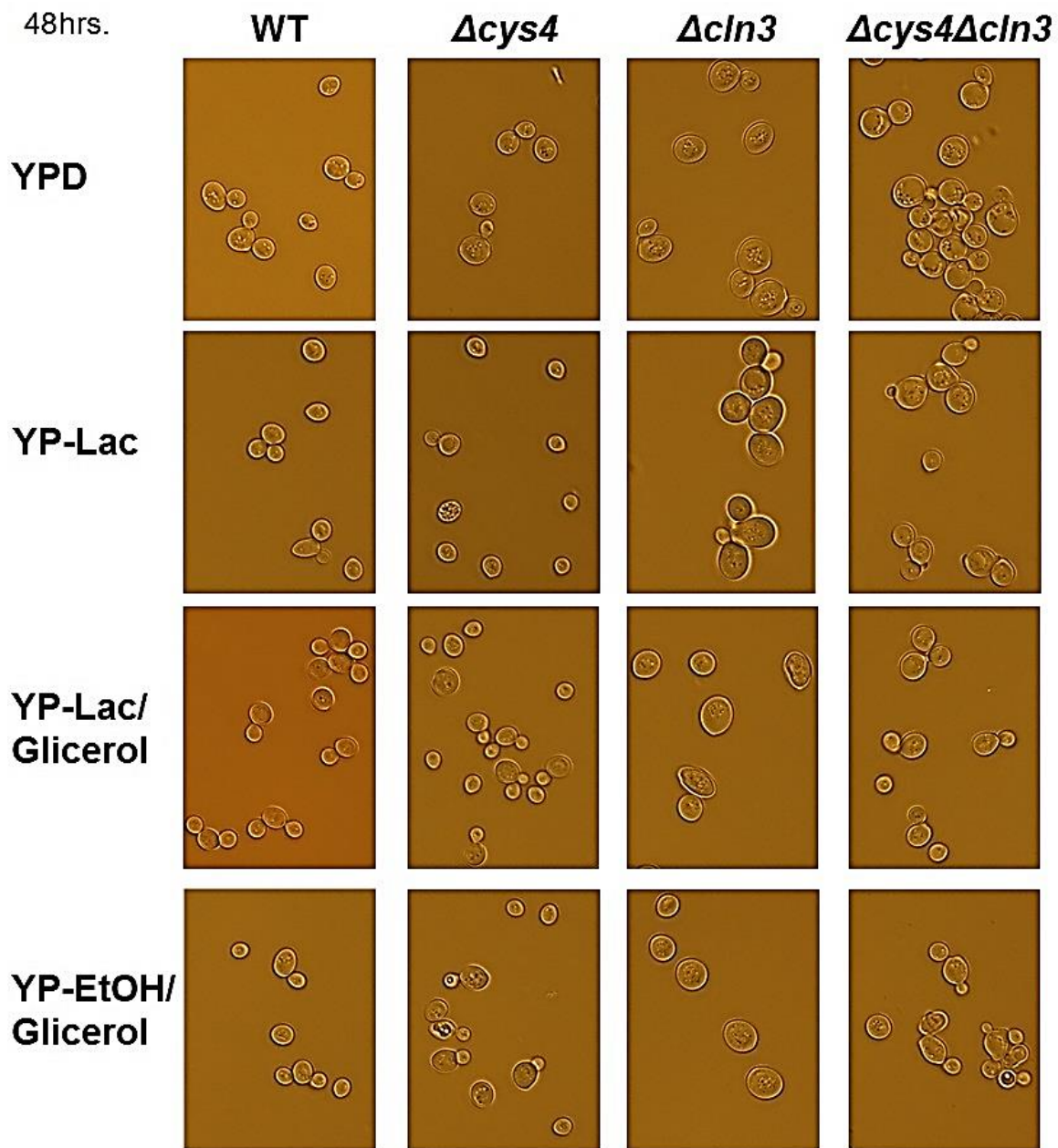


Figura 6.23 Análisis microscópico de la morfología de las cepas en medios con diferentes fuentes de carbono a las 48 h de incubación. Objetivo 100X

Por otra parte, las muestras tomadas a las 48 h de incubación (Figura 6.23) nos permitieron hacer las siguientes observaciones con respecto a la morfología:

La células de la cepa silvestre BY4742 en todos los medios utilizados presentan un tamaño similar y se encuentran en gemación. Indicando que a este tiempo de incubación la cepa es capaz de asimilar adecuadamente las fuentes de carbono y puede dividirse sin problemas.

Las células de *cys4Δ* en medios no fermentativos muestran un tamaño celular parecido y se encuentran en proceso de división, en el caso del medio YP-Lac, la cantidad de células en proceso de división es menor.

El tamaño celular de la cepa *clin3Δ* en todos los medios es mayor al que se observó a las 24 h de incubación y es más evidente en los medios con fuentes de carbono no fermentables. Al igual que a las 24 h, casi no se encuentran células en gemación de la cepa *clin3Δ* en los medios que contienen glicerol como fuente de carbono. Esto puede ser debido a que estas fuentes de carbono no fermentables son asimiladas más lento y el ciclo celular se alarga más que en fuentes de carbono fermentables.

Las muestras de los cultivos de la cepa *cys4Δclin3Δ* ya no presentan aglomeraciones tan grandes como se observa en el medio YPD. El tamaño celular observado es mayor al de la cepa *cys4Δ*. En medio YP-Lac, el tamaño celular es mayor que el observado a las 24 h de incubación, pudiendo significar que el metabolismo del lactato sea más lento en la cepa y se alargue el ciclo celular, aumentando el tamaño crítico celular.

El análisis de viabilidad también se realizó a las 24 h y 48 h de incubación en todos los medios con el fin de poder observar si en éstos medios se encontrarían resultados similares a los vistos en el medio fermentativo utilizado anteriormente.



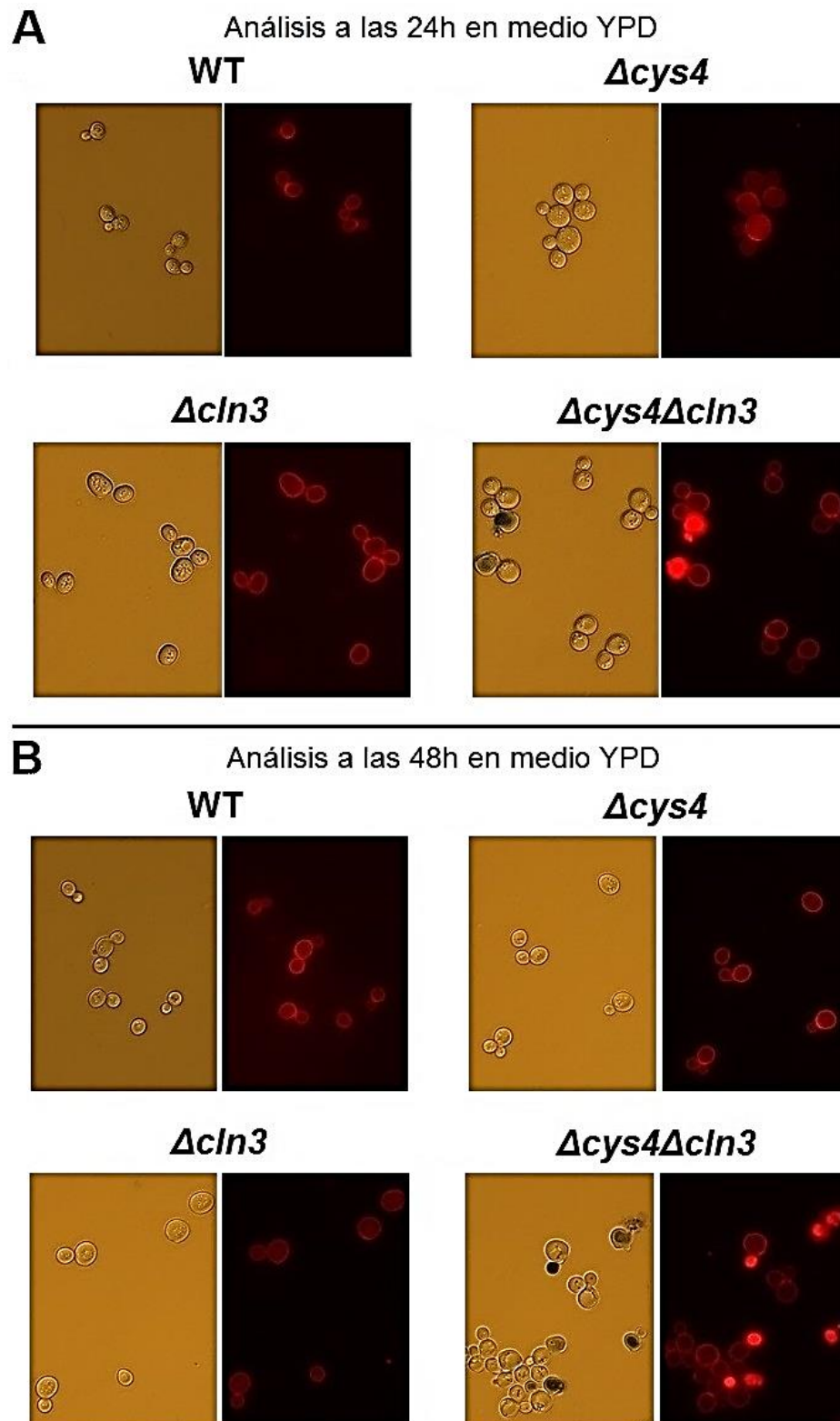


Figura 6.24 Análisis de viabilidad de las cepas incubadas en medio YPD. Microscopía de campo claro y microscopía de fluorescencia, objetivo 100X. A) muestras tomadas a las 24 horas de incubación. B) muestras tomadas a las 48 horas de incubación.

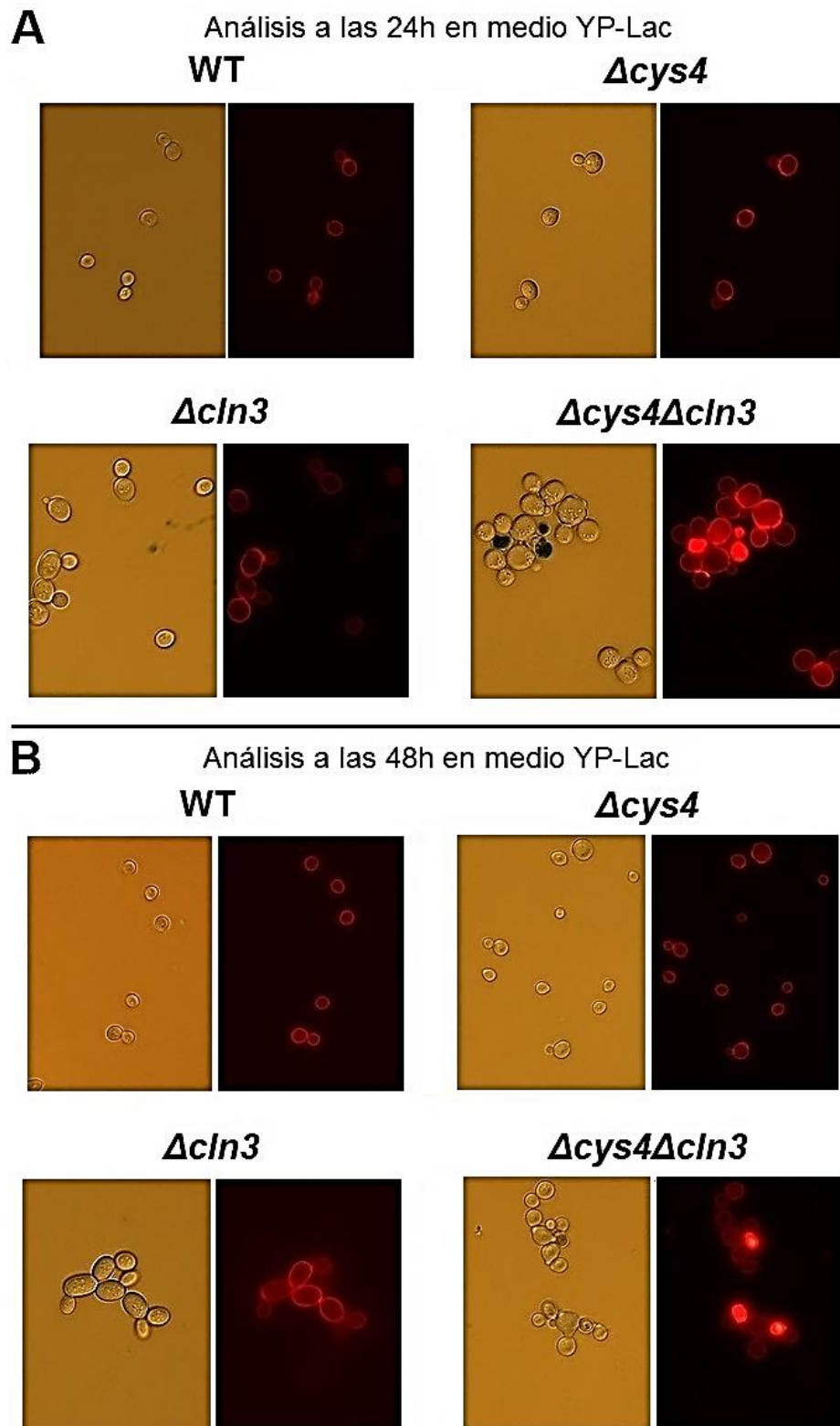


Figura 6.25 Análisis de viabilidad de las cepas incubadas en medio YP-Lac 2%. Microscopía de campo claro y microscopía de fluorescencia, objetivo 100X. A) muestras tomadas a las 24 horas de incubación. B) muestras tomadas a las 48 horas de incubación.

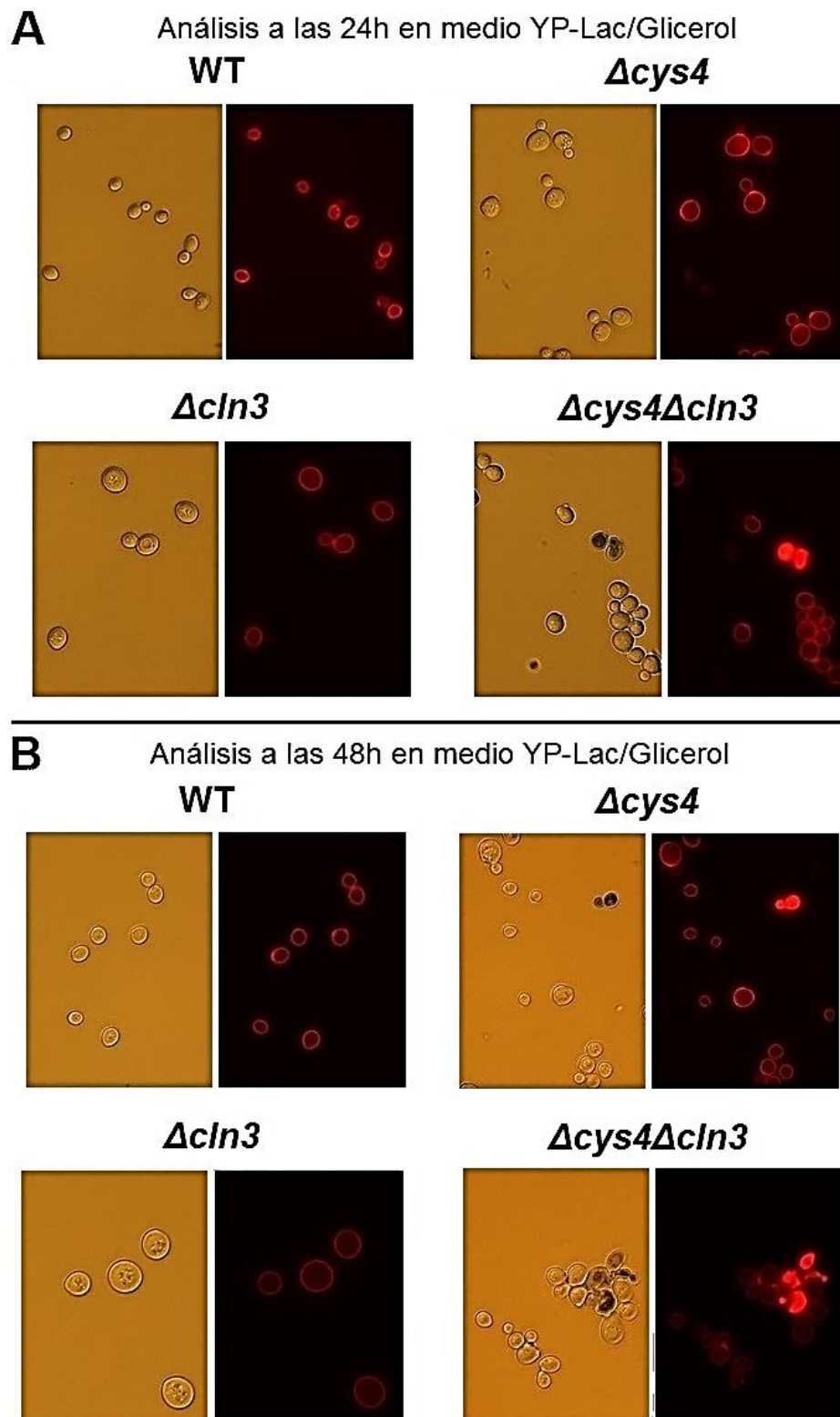


Figura 6.26 Análisis de viabilidad de las cepas incubadas en medio YP-Lac/Glicerol 2%. Microscopía de campo claro y microscopía de fluorescencia, objetivo 100X. A) muestras tomadas a las 24 horas de incubación. B) muestras tomadas a las 48 horas de incubación.

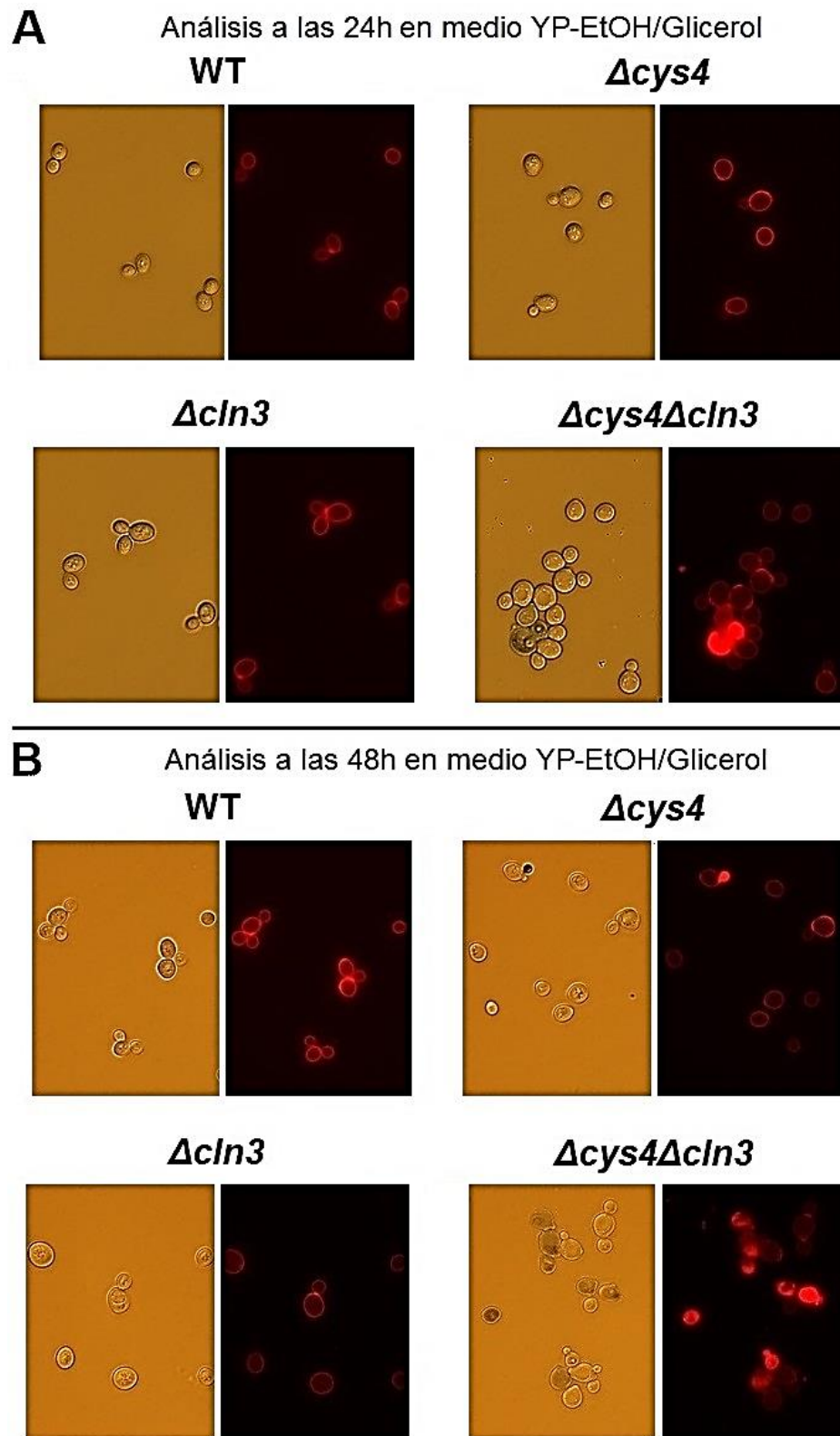


Figura 6.27 Análisis de viabilidad de las cepas incubadas en medio YP-EtOH/Glicerol 2%. Microscopía de campo claro y microscopía de fluorescencia, objetivo 100X. A) muestras tomadas a las 24 horas de incubación. B) muestras tomadas a las 48 horas de incubación.

La cepa BY4742 no muestra células muertas en ninguno de los medios, ni a las 24 h ni a las 48 h de incubación. La viabilidad de la cepa silvestre no se ve afectada por la fuente de carbono presente en el medio (Figura 6.24 a 6.27).

Lo mismo se puede decir de la cepa *cln3Δ*, no hay presencia de células muertas en todas las muestras tomadas de los cultivos de esta mutante sencilla. La fuente de carbono no afecta la viabilidad de la cepa (Figura 6.24 a 6.27).

La cepa *cys4Δ* sólo muestran células muertas en la muestra tomada a las 48 h de incubación de los cultivos con mezclas de lactato/glicerol y etanol/glicerol (Figura 6.26 y 6.27). El número de células no viables es mínimo comparándolo con los próximos resultados por analizar. El hecho de que se encuentren en los medios con glicerol como fuente de carbono, puede indicar que durante el metabolismo de este compuesto se produzca algún metabolito que afecte a la célula de alguna manera, como DHA o DHAP.

La doble mutante *cys4Δcln3Δ*, en medio YPD (Figura 6.24), muestra lo que se observó anteriormente. La viabilidad se ve afectada a las 24 h de incubación y a las 48 h es más evidente, junto con las aglomeraciones que se forman. La muerte de la doble mutante en este medio, se puede deber a la acumulación de etanol, como se vio anteriormente.

En medio YP-Lac (Figura 6.25), la doble mutante, a las 24 h de incubación las células se encuentran en aglomeraciones parecidas a las presentes en medio YPD. A las 48 h las aglomeraciones son de menor tamaño. En ambas muestras analizadas se observan células muertas de la cepa *cys4Δcln3Δ* y conforme pasa el tiempo aumenta el número, lo que podría deberse también a la acumulación de algún metabolito producido por la oxidación de la lactosa.

En el medio YP-Lac/glicerol (Figura 6.26) se observa un fenómeno parecido al del medio YP-Lac, a las 48 h de incubación las aglomeraciones de células de *cys4Δcln3Δ* disminuyen. La viabilidad se ve afectada ya que la cantidad de células muertas es mayor a las 48 h de incubación, lo que puede atribuirse a la acumulación de algún compuesto.

La viabilidad de *cys4Δcln3Δ* en medio YP-EtOH/glicerol (Figura 6.27) es parecida a la del medio mencionado anteriormente. Hay mayor cantidad de células muertas a las 48 h de incubación. Las aglomeraciones también disminuyen.

Como se mencionó anteriormente y debido a que la doble mutante *cys4Δcln3Δ* presenta más cantidad de células muertas al paso del tiempo, se puede suponer que la acumulación de algún metabolito puede ser el causante de la muerte celular y podría estar al mismo tiempo relacionado con la eliminación del gen *CYS4* ya que en la cepa mutante *cys4Δ* se observan pocas células muertas a las 48 horas de incubación. Al estar trabajando con medios no fermentativos, hay un aumento de especies oxidantes que pueden producir daño celular, afectando así la viabilidad de las células.

#### 6.4.8 La producción de H<sub>2</sub>S no se ve afectada en cepas con sobreexpresión de *CLN3* y *CYS4*

Sabemos que *CLN3* es una de las proteínas clave en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular de *Saccharomyces cerevisiae* y, por experimentos realizados en el laboratorio, podría ser un blanco de persulfuración. También se sabe que la eliminación *CYS4* modifica en la duración de START en la fase G1 del ciclo celular y es productora de H<sub>2</sub>S<sup>38, 39</sup>. En este trabajo se confirmó la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3*. Con la información mencionada surgió la pregunta sobre si habría un cambio en la producción de H<sub>2</sub>S. Con la eliminación de *CYS4* la producción de H<sub>2</sub>S se ve aumentada ya que se activa la vía de asimilación de sulfatos.

Lo que se planteó observar fue algún tipo de variación en la producción de H<sub>2</sub>S en cepas con la eliminación de *CYS4* con plásmidos que contienen a *CLN3*, cepas con la eliminación de *CLN3* con plásmidos que contienen a *CYS4* y cepas WT con plásmidos que contienen a *CYS4* y otras con plásmidos que contienen a *CLN3*. La Tabla 5.8 indica las cepas que se utilizaron en este experimento.

Se partió de precultivos de las cepas en 10 mL de medio SD -Ura (+Cys en caso de las cepas  $\Delta cys4$ ) de 48 h y se ajustó la D.O.<sub>600</sub> a 1 en agua estéril para posteriormente colocar 10  $\mu$ L en medio YPD, el cual contiene nitrato de plomo [Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] que es el indicador de producción de H<sub>2</sub>S debido a la siguiente reacción:  $Pb(NO_3)_2 + H_2S \rightarrow PbS\downarrow + 2HNO_3$ . El PbS es precipitado en el medio y es de color oscuro.

Los controles utilizados son las cepas BY4742 (WT), *cys4* $\Delta$  y *cln3* $\Delta$  sin haber sido transformados con plásmidos. Se esperaba que la WT y *cln3* $\Delta$  presenten un color blanco, el color en la *cys4* $\Delta$  debe ser negro por la activación de la vía de asimilación de sulfatos, la cual produce más cantidad de H<sub>2</sub>S. Las transformaciones con los vectores vacíos se realizaron para comprobar que dichos plásmidos no interfieren con la producción de H<sub>2</sub>S y que si se llega a observar alguna diferencia se deberá a la expresión de los genes.

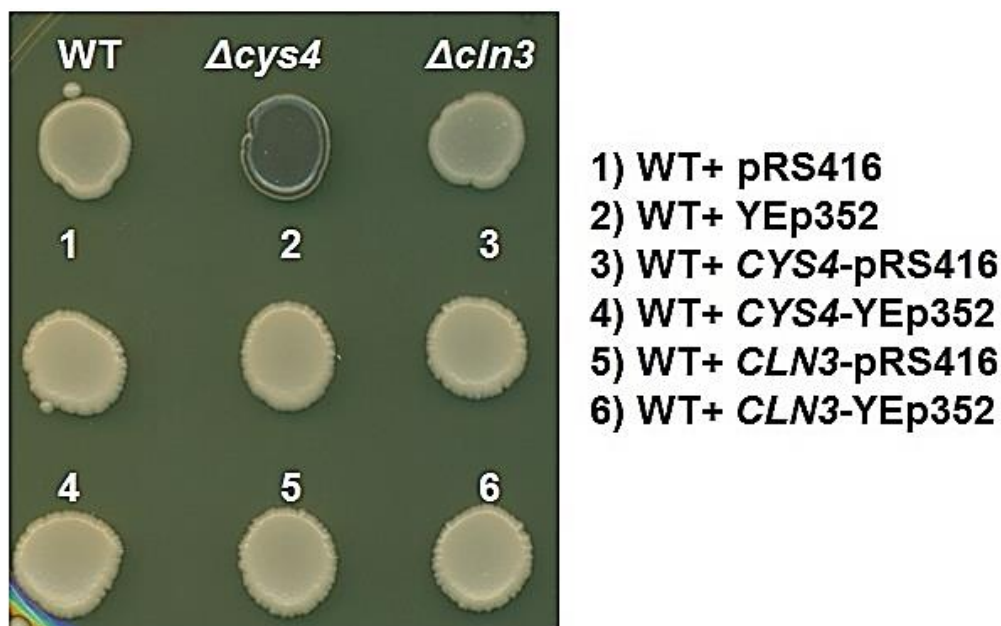


Figura 6.28 Producción de H<sub>2</sub>S. Transformaciones de cepas BY4742 con los plásmidos pRS416 (vector monocopia vacío), YEp352 (vector multicopia vacío), pRM06, pRM08, pRM09 y pRM10 correspondientemente.

Los goteos realizados con las cepas *WT* no muestran ninguna variación en la producción de H<sub>2</sub>S al sobreexpresar los genes *CYS4* o *CLN3*. La coloración que se observa en los goteos de los controles *WT* y *cln3Δ* es muy similar, lo que indica que la eliminación del gen *CLN3* no modifica la cantidad de H<sub>2</sub>S producido (Figura 6.28).

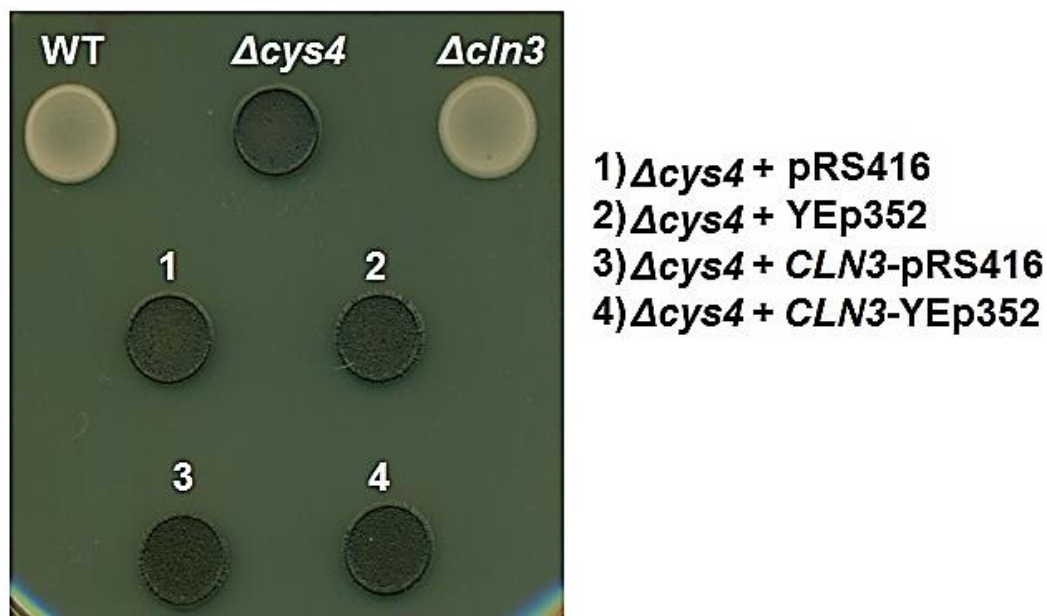


Figura 6.29 Producción de H<sub>2</sub>S. Transformaciones de cepas *cys4Δ* con los plásmidos pRS416, YEp352, pRM09 y pRM10 correspondientemente.

Los goteos realizados con las transformaciones de la cepa *cys4Δ* muestran que la sobreexpresión de *CLN3* no modifica de alguna manera la producción de  $H_2S$ , por lo que la vía de asimilación de azufre sigue activa (Figura 6.29).

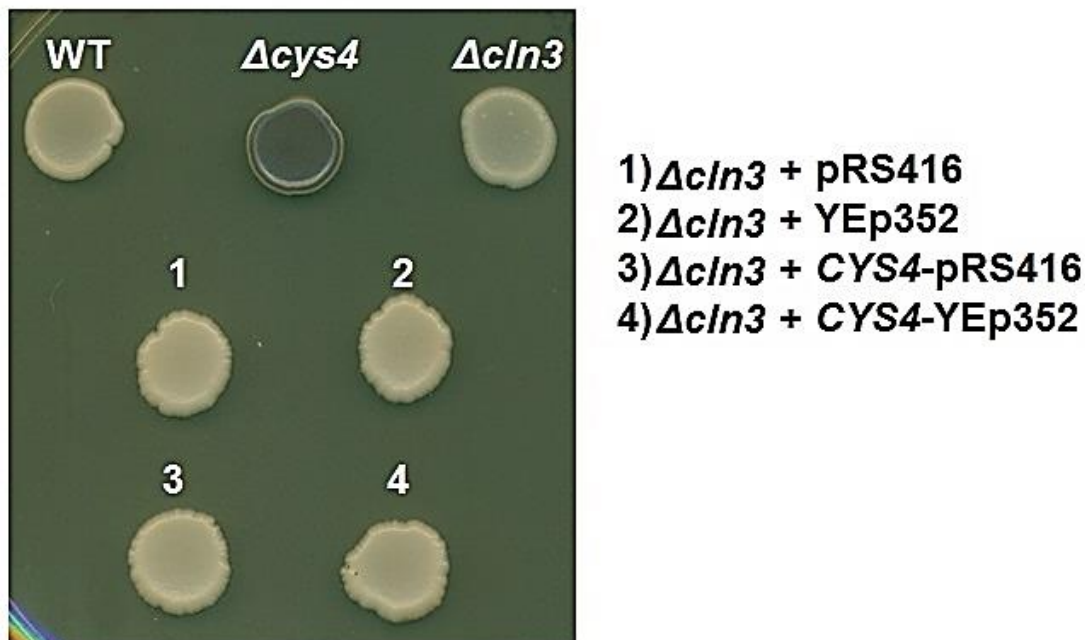


Figura 6.30 Producción de  $H_2S$ . Transformaciones de cepas *cln3Δ* con los plásmidos pRS416, YEp352, pRM06 y pRM08.

Los observado en los goteos realizados con las transformaciones de la cepa *cln3Δ* tampoco muestran que una sobreexpresión de *CYS4* modifique la cantidad de  $H_2S$  producido al no contar con el gen *CLN3* (Figura 6.30).

Los resultados anteriores indican que, al menos, en la producción de  $H_2S$  la sobreexpresión de uno de los genes cuando no se cuenta con el otro no se ve afectada. Lo anterior no significa que se descarte la posibilidad de que el  $H_2S$  producido por *CYS4* pueda ser utilizado como sustrato para la posible persulfuración de *CLN3*, se tendrían que hacer más experimentos para comprobar la persulfuración en *CLN3* y el posible residuo en el que ocurre.



### 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El objetivo principal de comprobar la existencia de una interacción genética entre los genes *CYS4* y *CLN3* de *Saccharomyces cerevisiae* se puede realizar gracias al análisis de las gráficas de cinética de crecimiento realizadas, principal fenotipo con el que se determinó la existencia de una interacción genética.

Las diferentes condiciones de crecimiento estresoras a las que se sometieron las diferentes cepas ayudó a determinar la existencia de interacciones genéticas negativas o positivas entre los genes *CYS4* y *CLN3*.

#### 7.1 Obtención de mutantes para el análisis de su fenotipo

Es importante la obtención de las cepas *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ* para poder evaluar la existencia de una interacción genética entre *CYS4* y *CLN3*. Se utilizó a la cepa silvestre BY4742 para la obtención del resto. La cepa *cys4Δ* fue obtenida con anterioridad en el laboratorio de investigación 102-Ote del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

La mutación que se necesitó realizar en este proyecto fue la eliminación del gen *CLN3* para obtener una mutante sencilla *cln3Δ* y la doble mutante *cys4Δcln3Δ*, utilizando los plásmidos de delección pA25<sup>52</sup> y pUG6<sup>53</sup>. Las figuras 6.4 y 6.5 muestran la electroforesis que contienen la amplificación del segmento de ADN genómico en el que se llevó a cabo la recombinación homóloga. En ambos casos, las bandas observadas confirman que *CLN3* es eliminado del genoma.

#### 7.2 Determinación de la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3*

El *fitness* o la aptitud biológica que se evaluó primero para la determinación de una interacción genética fue la cinética de crecimiento que presentaban las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ*, que es, por lo general, el fenotipo evaluado en levaduras. Se evaluaron 48 h de crecimiento (Figura 6.11).

Al evaluar la capacidad de crecimiento que presenta cada cepa se destaca lo siguiente:

- La curva de crecimiento de la cepa silvestre BY4742, que está representada por la línea color roja, llega a la fase estacionaria antes de las 12 horas de la determinación. Es la cepa que presenta el crecimiento más rápido y es la única cuya D.O.<sub>600</sub> pasa las 1.2 unidades en la fase estacionaria. Ninguna de las otras cepas presenta un crecimiento mejor a la cepa silvestre, indicando que las mutaciones realizadas, de los genes *CYS4* y *CLN3*, son perjudiciales para este fenotipo. Tengamos en cuenta que la cepa silvestre sirve como referencia para determinar el fenotipo que presentan las mutantes sencillas.
- La cepa con mutación sencilla *cln3Δ* presenta una cinética de crecimiento, representada por la línea color verde, similar a la que presenta la cepa de referencia BY4742. También llega a una fase estacionaria antes de las 12 h del análisis, pero se observa un ligero defecto de crecimiento ya que esta cepa no supera la D.O.<sub>600</sub> de 1.2 como lo hizo la cepa silvestre.

- La cinética de crecimiento de la mutante sencilla *cys4Δ* está representada por la línea color azul. Es inferior a las que presenta la cepa silvestre BY4742 y la cepa *cln3Δ*, su fase logarítmica es más prolongada ya que tiene una duración mayor a las 12 h, indicando que la eliminación del gen en cuestión produce el lento crecimiento de la cepa. Al igual que la cepa  $\Delta cln3$ , no rebasa la D.O.<sub>600</sub> de 1.2, pero sobresale ligeramente a la cinética de la mutante antes mencionada en la fase estacionaria.

Hasta ahora se ha observado que las mutaciones individuales de ambos genes representan una desventaja para el crecimiento de las cepas, aunque en medidas diferentes, ya que *cys4Δ* presenta una afectación en crecimiento mayor que *cln3Δ*. Una vez analizadas las cinéticas de crecimiento de las cepas BY4742, *cys4* y  $\Delta cln3\Delta$ , se procedió a analizar la cinética de crecimiento de la doble mutante.

- En el caso de la cepa *cys4Δcln3Δ*, se observa una cinética de crecimiento representada por la línea color morado. Es similar al de la mutante *cys4Δ*, cuenta con una fase logarítmica de más de 12 h, indicando un lento crecimiento, pero la D.O.<sub>600</sub> de esta fase es mayor a la que se observa en las mutantes sencillas y llega a colocarse ligeramente por debajo de la fase estacionaria de la cepa de referencia BY4742. Además de esto, la fase estacionaria de la cinética presenta una disminución de la D.O.<sub>600</sub>, tendencia que se observa el resto de las 48 h de duración del análisis. Entre las 24 y 36 h de evaluación la curva de crecimiento muestra valores de D.O.<sub>600</sub> menores a los de las mutantes sencillas *cys4Δ* y *cln3Δ*, lo que podría indicar la muerte celular. La tendencia a disminuir se seguiría viendo si se hubiera monitoreado por más tiempo. Es evidente que esta cepa también muestra una desventaja de crecimiento en comparación con la cepa BY4742 y *cln3Δ*, pero es similar a *cys4Δ*.

En el trabajo realizado, el análisis de la cinética de crecimiento de la doble mutante *cys4Δcln3Δ*, muestra un crecimiento similar al de la mutante sencilla *cys4Δ*, por lo que la medición de las pendientes no se realizó, ya que éstas pendientes tendrían un valor semejante. El fenotipo de *cys4Δ* y *cln3Δ* muestran un defecto en la capacidad de crecimiento o proliferación, observado en las cinéticas de crecimiento, la suma de fenotipos en la doble mutante correspondería a una curva de crecimiento cuya fase logarítmica se encuentre por debajo de ambas curvas, en este caso no se observó ese fenómeno. La reducción que se observa en la cinética de crecimiento de doble mutante puede indicar la lisis y muerte celular.

Con lo explicado anteriormente podemos decir que el fenotipo de la cepa *cys4Δcln3Δ* no corresponde a la suma de fenotipos de las mutantes sencillas *cys4Δ* y *cln3Δ* y, por ende, se puede afirmar la existencia de una interacción genética entre los genes *CYS4* y *CLN3* en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Una vez determinada la existencia de una interacción genética, se puede establecer el tipo de interacción que presenta el *fitness* evaluado, si se trata de una interacción genética positiva o una interacción genética negativa dependiendo de la aptitud que muestra la doble mutante de los genes bajo estudio<sup>7, 8</sup>. Como se vio en el análisis de las cinéticas de crecimiento, las mutaciones individuales de *CYS4* y *CLN3* son perjudiciales para *S. cerevisiae* ya que se ve disminuida su capacidad de crecimiento o proliferación. Por otro lado, la doble mutante *cys4Δcln3Δ* también presenta esta dificultad, pero es similar a la cepa *cys4Δ*. Aún con las dos mutaciones el organismo presenta un fenotipo más apto,

ya que prolifera mejor de lo esperado y podemos decir, entonces, que se trata de una interacción genética positiva.

Durante el trabajo de investigación, se realizaron determinaciones de las cinéticas de crecimiento como se indica en el apartado de materiales y métodos, pero cambiando una condición, la agitación, que fue constante durante las 48 h de duración del ensayo. Al analizar los datos se observó que las curvas de crecimiento presentaban error considerable en las mediciones, sobre todo la doble mutante.

Se realizó la gráfica correspondiente, que muestra las cinéticas de crecimiento de las cepas BY4742, *cys4Δ*, *cln3Δ* y *cys4Δcln3Δ*, con tendencias similares a las observadas en la Gráfica 1, pero las barras de error demuestran una variación en las mediciones de D.O.<sub>600</sub>, sobre todo en la curva de crecimiento de la cepa *cys4Δcln3Δ*. Se debe destacar que, al terminar las mediciones en estos ensayos, en los pozos de las placas del crecínómetro en las que se encontraban los cultivos de la cepa *cys4Δcln3Δ* se podían observar aglomeraciones, lo que pudo interferir con las mediciones realizadas.

Al observar el hecho de que la cepa *cys4Δcln3Δ* se aglomeran y parecen lisarse se realizó una tinción con azul de tripano para determinar si, en efecto, las células estaban muriendo. El azul de tripano tiene la propiedad de introducirse a las células cuya membrana está dañada, por consecuencia están muertas y no son viables. Al hacer observaciones microscópicas, las células cuyo interior sea azul son cuya pared y membrana están dañadas. Como el colorante utilizado emite fluorescencia a 640-660nm y su rango de absorbancia va de 400-620nm se puede hacer uso de un microscopio de epifluorescencia para comprobar que las células con coloración azul en efecto no son viables. Se recolectaron fotografías en pares de la muestra, una en campo claro y otra al excitarla, emitiendo un color rojo.

Las imágenes de la Figura 6.16 muestran que, en efecto, las células de la cepa *cys4Δcln3Δ* se encuentran en aglomeraciones y lisadas. La tinción con azul de tripano también comprueba que las células de un cultivo de 48 h de la mutante *cys4Δcln3Δ* se encuentran, en mayor cantidad, muertas a comparación del resto de las cepas analizadas, lo que explica la tendencia a disminuir de la cinética de crecimiento de la doble mutante.

Se buscaron factores que pudieran explicar el fenotipo observado en la cepa *cys4Δcln3Δ*. Primero se pensó que las placas del lector de placas, al ser sellado por completo, no contenía una cantidad suficiente de oxígeno y no se permitía la circulación de dicho gas. Al consumirse por completo el oxígeno se vería afectada la viabilidad de las células.

Otro factor analizado fue la acumulación de etanol en el medio. A las 24 horas de incubación de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio rico en nutrientes, como el utilizado en este proyecto, los azúcares son fermentados por completo, generando como metabolito al etanol<sup>22, 23, 57</sup>. El análisis de las cinéticas de crecimiento duró 48 horas y después de las 24 h comienza a disminuir la densidad óptica, cuando la cantidad de etanol en el medio es alta.

### 7.3 La ausencia de oxígeno no afecta la división celular de la cepa *cys4Δcln3Δ*

Para comprobar si la ausencia de oxígeno afecta la viabilidad de las células de la doble mutante, se realizaron goteos para observar la capacidad de reproducirse y se hicieron tinciones con azul de tripano para determinar la viabilidad de las células. Recordemos que los cultivos no contaban con oxígeno y se realizaron determinaciones a las 24, 48 y 72 h, observando lo siguiente:

El crecimiento en placas (Figura 6.13) no se ve afectado por la ausencia de oxígeno ya que los goteos realizados a las 24, 48 y 72 h de incubación muestran un crecimiento normal. Con respecto a la viabilidad de las células (Figura 6.14, 6.15 y 6.16), las cepas WT y *cln3Δ* no presentan células muertas y en el caso de *cys4Δ* la cantidad de células muertas es menor a la doble mutante.

Por lo tanto, la viabilidad de las células de la cepa *cys4Δcln3Δ* sí se ve afectada. En el caso de *cys4Δ* la cantidad de células muertas no es significativa como en caso de la doble mutante.

El hecho de que se observe un crecimiento normal en los goteos de *cys4Δcln3Δ* realizados en YPD, pero el análisis microscópico muestra gran cantidad de células muertas, puede tener la siguiente explicación. Las células que sobreviven no pierden la capacidad que tienen de dividirse, por lo que hay presencia de colonias en los goteos realizados a las diferentes horas en que se tomó la muestra. Parece que la cantidad de oxígeno en los cultivos sí afecta la viabilidad.

Recordando que, en ausencia de oxígeno la vía de obtención de energía que se encuentra activa es la fermentación y a las 24 h de incubación se termina la glucosa y es convertida a etanol, se puede reafirmar la suposición: la producción de etanol derivado de la fermentación de la glucosa del medio puede ser responsable de la muerte células de la cepa *cys4Δcln3Δ*.

### 7.4 La presencia de etanol en el medio es perjudicial para la doble mutante *cys4Δcln3Δ*

Aún en presencia de oxígeno, en *Saccharomyces cerevisiae* se mantiene activa la vía de fermentación de azúcares, produciendo etanol, el cual funciona como fuente de carbono para que la célula pueda seguir obteniendo energía. Para comprobar que el etanol que se produce y que se encuentra en los medios es perjudicial para la doble mutante *cys4Δcln3Δ*, se emuló un medio fermentado al añadir etanol en las placas de YPD.

Las cepas BY4742 y *cln3Δ* presentan un crecimiento normal en todas las condiciones, desde el medio con la menor concentración de etanol hasta el medio con la mayor concentración. La mutante *cys4Δ*, por otro lado, es ligeramente sensible ya que se observa que deja de crecer en un medio con una concentración con 8% de etanol, en una D.O. de 0.001.

La doble mutante *cys4Δcln3Δ* no es tan apta para crecer en medios que contengan cierta concentración de etanol. Tiene dificultades de crecimiento apreciables en el medio al que se le adiciona un 8% de etanol, que a una D.O de 0.01 ya no se observan colonias. En

el medio con etanol al 10%, es más evidente la dificultad de la doble mutante para crecer ya que a una D.O. de 1 a penas logra apreciarse crecimiento.

Al tratarse de un fenotipo menos apto para desarrollarse bajo esta condición, la interacción genética entre los genes *CYS4* y *CLN3* es una interacción negativa, en este caso.

Las principales afectaciones que el etanol produce en las células de levaduras son membranas celulares, proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas y retículo endoplásmico. La estructura y función de la membrana parece ser el principal blanco del etanol. Al exponer a las células a grandes concentraciones de etanol, se observa un aumento en la fluidez de la membrana seguido de la disminución de su función<sup>58, 59</sup>.

La doble mutante es sensible al etanol y puede que éste sea responsable de la morfología celular observada a las 24 horas de incubación, afecta a las membranas celulares y por eso se observan aglomeraciones de células y algunas células lisadas.

### 7.5 El estrés oxidante afecta a la cepa *cys4Δcln3Δ*.

El estrés oxidante se presenta en las células cuando la cantidad de compuestos oxidantes supera a la de compuestos antioxidantes. El estrés oxidante es perjudicial para la célula ya que puede dañar a macromoléculas como en ADN, polisacáridos, lípidos y proteínas. El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es producido en algunos procesos biológicos, es uno de los principales responsables del estrés oxidante y el más utilizado en investigación<sup>60, 61, 62</sup>.

El  $H_2O_2$  puede ser generado en las células al reducir oxígeno ( $O_2$ ) a agua ( $H_2O$ ). Puede generarse espontáneamente o por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Existen enzimas encargadas de transformar al peróxido de hidrógeno en agua, como la catalasa y la glutatión peroxidasa, pero se pueden generar más especies reactivas que contribuyan con el estrés oxidante<sup>60, 61</sup>.

Para comprobar que el estrés oxidante afecta a la doble mutante, se añadió  $H_2O_2$  a diferentes concentraciones en el medio y se realizaron goteos. Se pudieron hacer las siguientes observaciones.

La cepa *cys4Δcln3Δ* tiene más problemas de crecimiento que la mutante sencilla *cys4Δ*, al ser menos apta para desarrollarse condiciones de estrés oxidante, podemos decir que la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* es negativa en este caso.

La sensibilidad de la doble mutante se puede deber a que el estrés oxidante afecta a macromoléculas como el ADN y los lípidos, lo que puede llegar a producir daño en las membranas celulares y alteraciones en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular, que es regulador de varios procesos. La doble mutante es menos apta para crecer en medios que generan estrés oxidante y podría deberse a la morfología que han presentado las células, la agregación que se observa a microscopio, puede vulnerar la membrana celular haciendo que el daño que generan las especies reactivas de oxígeno sea mayor.

### 7.6 Bajo presión osmótica no se observa una interacción entre los genes *CYS4* y *CLN3*

La adición de diferentes solutos en el medio de cultivo en el que se realizaron los goteos ayuda a observar si la presión osmótica afecta a las células, favoreciendo el flujo de agua a través de la membrana. Se pueden hacer las siguientes observaciones.

Todas las cepas analizadas, tanto en medio con NaCl 0.5 M y sorbitol 1 M, crecieron adecuadamente, el fenotipo apreciado entre la cepa silvestre, las mutantes sencillas y la doble mutante es similar. No presentan problemas de crecimiento. Las cuatro cepas son aptas para desarrollarse bajo presión osmótica, resisten la alta concentración de solutos.

Dicho lo anterior, podemos decir que los genes *CYS4* y *CLN3* no presentan una interacción genética al someter a las células a presión osmótica.

### 7.7 *CYS4* y *CLN3* presentan una interacción bajo estrés de retículo endoplásmico

El estrés en el retículo endoplásmico (RE) se refiere al tipo de estrés celular caracterizado por la activación de cascadas de señalización que tienen como fin detener la síntesis de proteínas para evitar la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, modulando la síntesis proteica. Puede ser generado por diversos factores en los que se acumulan proteínas mal plegadas<sup>63</sup>.

La tunicamicina es un antibiótico que simula condiciones de estrés en retículo endoplásmico. Bloquea la N-glicosilación en organismos eucariontes, inhibiendo la formación de un intermediario de dicha modificación postraducciona, N-acetilglucosamina-Dolico-Fosfato. En el RE se lleva a cabo con frecuencia la N-glicosilación. Si no se realiza provoca que proteínas salgan del RE y su acumulación y el mal plegamiento en dicho organelo<sup>64, 65</sup>.

Se utilizaron diferentes concentraciones de tunicamicina en los medios para poder observar la existencia de la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* al estar en condiciones de estrés de retículo endoplásmico. Se puede destacar lo siguiente.

- Los goteos en la Figura 6.20 muestran una interacción genética positiva ya que la cepa *cys4Δcln3Δ* crece mejor que la mutante sencilla *cys4Δ* en el medio que contiene tunicamicina a una concentración de 0.25 µg/mL y se aprecia con más claridad en el medio con 0.5 µg/mL de tunicamicina, donde la cepa *cys4Δ* presenta un problema al crecimiento aún mayor que el presentado por la doble mutante *cys4Δcln3Δ*.

Como *cys4Δcln3Δ* muestra ser más apta que la cepa *cys4Δ* para desarrollarse en las condiciones de estrés de retículo endoplásmico, se puede decir que la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* es positiva.

Se ha observado que la fase G1 del ciclo celular de *S. cerevisiae* se alarga cuando se elimina el gen *CLN3*. Al retrasar la transición de fases del ciclo celular se infiere que, en el proceso, hay una acumulación de macromoléculas que eviten, prevengan y combatan el estrés en el retículo endoplásmico. Proteínas chaperonas son las responsables de realizar plegamiento de otras proteínas. Si hay mayor cantidad de chaperonas, entonces se evita la acumulación de proteínas mal plegadas, previniendo el estrés en el retículo endoplásmico.

Mientras se realiza la transición de la fase G1 a S se siguen transcribiendo genes y sintetizando proteínas, por lo que se puede suponer una gran cantidad de ribosomas en la célula, lo que también evitaría en cierta medida el estrés en el retículo endoplásmico.

Otra posible explicación es que se active de manera rápida la respuesta llamada *Unfolded Protein Response* (UPR), cuya finalidad es recuperar la actividad normal del retículo endoplásmico. Se activan genes que codifican proteínas como chaperonas, proteínas encargadas del plegamiento, proteínas mediadoras del transporte entre membranas, entre otras<sup>63</sup>.

La doble mutación de *CYS4* y *CLN3* pueden contribuir a la traducción y acumulación de gran cantidad de chaperonas que previene el estrés en el retículo endoplásmico, a eso se debe la interacción genética positiva que muestra el fenotipo de la doble mutante.

### **7.8 No es evidente la presencia de una interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* al activar la respiración celular**

El propósito de colocar diferentes fuentes de carbono en el medio fue determinar si este factor afectaba el desarrollo de las cepas con mutaciones de los genes *CYS4* y *CLN3*. Se utilizaron fuentes de carbono fermentables y no fermentables. La glucosa y la galactosa, fuentes de carbono fermentables, conducen a la producción de etanol y bióxido de carbono. El lactato, el etanol y el glicerol activan la respiración celular aerobia al ser fuentes de carbono no fermentables.

La galactosa es similar a la glucosa. Al ingresar a la célula se convierte en galactosa-1-fosfato y posteriormente, por una serie de reacciones, puede convertirse en glucosa-1-fosfato o glucosa-6-fosfato para poder entrar a la vía de la glucólisis, generar piruvato y terminar por realizar la fermentación alcohólica<sup>66</sup>.

En el citosol, el lactato es convertido a piruvato. Cuando el piruvato se introduce en la mitocondria es convertido a oxalacetato, encontrándose en la mitocondria junto con acetil-CoA y la enzima adecuada activan el ciclo de Krebs produciendo NADH y FADH<sub>2</sub>. Los productos son utilizados en la fosforilación oxidativa, produciendo mayor cantidad de energía<sup>66</sup>.

Cuando se tiene etanol en el medio como única fuente de carbono, la enzima alcohol deshidrogenasa lo convierte en acetaldehído. Después por acción de la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALD) y la acetil-CoA sintetasa (ACS) se convierte en acetil-CoA, que sirve de sustrato en el ciclo de Krebs para seguir con otras vías metabólicas<sup>67</sup>.

El glicerol como única fuente de carbono se introduce a las células de *S. cerevisiae* activando la vía L-glicerol 3-fosfato (G3P) y la vía de la dihidroxiacetona (DHA) de catabolismo del glicerol. En la vía G3P es necesaria una FAD-dependiente de glicerol 3-phosphate deshidrogenasa, localizada en la membrana mitocondrial, mandando directamente a los electrones a la cadena respiratoria por medio de FADH<sub>2</sub><sup>68, 69</sup>.

Con los resultados de la Figura 6.21 se pudieron hacer las siguientes observaciones.

- En medio YPD y con galactosa, las todas las cepas crecen parecido. Lo que indica que, aparentemente, no presentan problemas de fermentación.

- El crecimiento de las cepas *cys4Δ* y *cys4Δcys4Δ* en medios con fuentes de carbono es menor al de la cepa BY4742 Y *cln3Δ*.

No se puede determinar que el cambio en la fuente de carbono afecta drásticamente la aptitud de las cepas *cys4Δ* y *cys4Δcln3Δ* para desarrollarse ya que la diferencia en el crecimiento no es tan significativa, como se ha podido observar resultados anteriores.

El hecho de que las cepas anteriormente mencionadas muestren colonias de menor tamaño al de las cepas BY4742 y *cln3Δ*, puede significar que estas cepas tengan algún problema de respiración. El supuesto problema no perjudica la capacidad de dividirse de las células.

Se realizaron observaciones microscópicas de cultivos en medios con diferentes fuentes de carbono para comparar con los resultados vistos en el medio YPD.

### **7.9 La viabilidad de la cepa *cys4Δcln3Δ* también se ve afectada en medios no fermentativos**

En apartados anteriores se ha estado hablando sobre el ciclo celular y cómo se ve afectado por la eliminación de los genes bajo estudio. Ambos genes, *CYS4* y *CLN3*, están relacionados con la fase G1 del ciclo celular, las mutantes sencillas de cada gen alargan esa fase y el tamaño celular aumenta. Se han realizado estudios en donde mutantes de *CLN3* en medios no fermentativos, reducen el tamaño celular. En parte, es por lo que se realizó el análisis de morfología celular y viabilidad se realizaron en medios con diferentes fuentes de carbono (glucosa, lactato, lactato/glicerol y etanol/glicerol). También se realizó para comparar el fenotipo entre cepas y ver si la respiración celular afectaba de cierta manera a la cepa *cys4Δcln3Δ*, como se observó en medio fermentativo YPD<sup>39, 45</sup>.

El hecho de que las células tengan un tamaño diferente en los distintos medios utilizados puede deberse a que el tamaño crítico celular al que las células comienzan la división celular cambia dependiendo del medio en el que se encuentren las células. La morfología de las levaduras podría indicarnos en qué fase del ciclo celular se encuentra la célula, la Figura 1.1 lo ejemplifica.

Al variar a fuente de carbono en el medio, se puede decir que ésta es responsable de que ciertas cepas se encuentren en fase G1 del ciclo celular. Sin embargo, sólo se puede suponer que la metabolización de las fuentes de carbono no fermentables no es tan rápida como la fermentación y por eso no se tiene la energía necesaria para poder reproducirse.

La cepa silvestre muestra que es capaz de proliferar sin mayor problema en medios con distintas fuentes de carbono. Sólo se observa, en el medio YP-Lac, un ciclo celular diferente al del resto de los medios, lo que podría indicar la asimilación lenta del lactato.

Al comparar las imágenes de las 24 y 48 h de incubación de *cys4Δ* en YP-Lac, podemos decir que esta cepa metaboliza de manera lenta el lactato, alargando el ciclo celular. Por eso la cantidad de células es menor, tarda más en dividirse.

En la cepa *cln3Δ*, el aumento de tamaño a medida que avanza el tiempo de incubación, puede significar que las fuentes de carbono no fermentables son asimiladas más lento. El metabolismo del glicerol puede ser más lento, por lo que las células en los



medios con dicho compuesto presentan un ciclo celular diferente al resto, no hay células en gemación.

En el medio PY-Lac, la cepa *cys4Δcln3Δ* metaboliza de diferente manera el lactato, ya que es el único medio en el que se observa un aumento de tamaño celular, que también podría influir en el ciclo celular y su duración.

Para poder afirmar que los ciclos celulares se ven modificados por el medio en el que se encuentran las cepas, se deben realizar más experimentos para determinar la fase del ciclo celular en la que se encuentran las células a determinadas horas de incubación. Se requeriría seleccionar por centrifugación a las células en fase G1 e inocular los diferentes medios a analizar, después deben tomar muestras, realizar ciertas tinciones y analizar por citometría de flujo. Así se podría observar si hay cambios en el ciclo celular de las cepas.

Otro aspecto interesante es la morfología y viabilidad de *cys4Δcln3Δ*. Como las aglomeraciones de dicha cepa en los medios no fermentativos no son como las observadas en el medio fermentativo, el análisis de viabilidad sirvió para comprobar si, tal como pasa en medios fermentativos, las células mueren.

Ya se observó que, sin importar la fuente de carbono en el medio, la doble mutante *cys4Δcln3Δ* muestra células muertas desde las 24 h de incubación y aumenta el número en el transcurso del tiempo. Recordando que después de las 24 h de incubación de un cultivo de *S. cerevisiae*, la glucosa fue fermentada por completo y el etanol es utilizado como fuente de carbono, podemos decir que, al tomar la primera muestra de todos los cultivos examinados, la respiración celular aerobia estaba activada. Podría ser un compuesto producido durante este proceso el responsable de la muerte celular de la doble mutante.

La cepa *cys4Δcln3Δ* es sensible al estrés oxidante. El  $H_2O_2$  es generado al reducir  $O_2$  a  $H_2O$ , lo cual sucede durante la respiración celular. La manera de obtención de energía en los cultivos analizados anteriormente era por medio de la respiración celular aerobia, por lo que la generación de especies reactivas de oxígeno puede aumentar, produciendo estrés oxidante en las células. Es por lo que, en medios tanto fermentativos como no fermentativos se observan células de la cepa *cys4Δcln3Δ* muertas.

Se sabe que la respuesta a estrés por etanol en *S. cerevisiae* está comprometida por restricciones energéticas, por lo que aumenta la expresión de genes relacionados con la glucólisis y función mitocondrial<sup>58</sup>. Es por lo que se podría observar un mayor número de células muertas en medios fermentativos, aunado al daño que el etanol produce en las células.

Tanto la presencia de etanol como el estrés oxidante pueden producir daños en la membrana celular. En medio YPD el etanol presente y el estrés oxidante que se genera al estar activa la respiración celular, producen un daño en membrana más significativo. En medios no fermentativo el daño en membranas sólo sería originado por el estrés oxidante. La disminución de las aglomeraciones de células de la cepa *cys4Δcln3Δ* en medios no fermentativos puede deberse al hecho de que no hay etanol presente en el medio para producir el daño celular observado en medio fermentativo.

### 7.10 La producción de H<sub>2</sub>S no se ve afectada al sobre-expresar a los genes *CYS4* y *CLN3*

Al surgir la pregunta sobre si el H<sub>2</sub>S generado por la actividad de la CBS es utilizado por la ciclina Cln3, se decidió observar si la sobreexpresión de los genes *CYS4* y *CLN3* podrían modificar la cantidad de H<sub>2</sub>S producido.

El nitrato de plomo presente en el medio YPDL es el responsable de poner en evidencia la producción de H<sub>2</sub>S, se lleva a cabo la reacción:  $Pb(NO_3)_2 + H_2S \rightarrow PbS\downarrow + 2HNO_3$ . El sulfuro de plomo que se produce hace que las colonias adquieran un color negro/café.

Las cepas de levaduras que carecen de *CYS4* muestran un aumento en la producción de H<sub>2</sub>S. Esto debido a que se activa la vía alterna, la vía de asimilación de azufre, en la que se produce una mayor cantidad de H<sub>2</sub>S, provocando que en medios con plomo las colonias sean color negro o café oscuro. Por otra parte, las cepas silvestres (que cuentan con el gen *CYS4*) en medios con plomo muestran colonias de color blanco/crema.

Con lo explicado anteriormente y sabiendo que la CBS genera H<sub>2</sub>S, se esperaba que en la sobre expresión de *CYS4* la cantidad del gas en cuestión sería mayor y se observarían cepas con coloración café. Si la ciclina Cln3 utiliza el H<sub>2</sub>S producido por la CBS y las cepas silvestres muestran una coloración crema en medios con plomo, se esperaba que una sobreexpresión de *CLN3* generara colonias más blancas en el medio antes mencionado. Sin embargo, los goteos muestran otra cosa.

Las cepas utilizadas como control son BY4742, *cys4Δ* y *cln3Δ*. La cepa silvestre y la mutante *cln3Δ* producen colonias color crema en el medio YPDL, mientras que *cys4Δ* muestra colonias color café obscuro, casi negro. La eliminación del gen *CLN3* no modifica la cantidad de H<sub>2</sub>S producido.

Hay que tener en cuenta que el plásmido YEp352, al ser un plásmido multicopia, genera una traducción mayor de los genes ya que puede haber más de dos copias por célula. El plásmido pRS416 es unicopia, sólo se encuentra un plásmido por célula, incrementa la expresión de los genes, pero en menor cantidad. Los goteos de las cepas que contienen a los vectores vacíos se realizaron para demostrar que el efecto que se ve es debido al gen clonado en los plásmidos y no a estos.

Los goteos con las cepas silvestres transformadas con los plásmidos construidos muestran lo siguiente:

- La sobreexpresión de *CYS4* y *CLN3* en la cepa BY4742 no afecta la producción de H<sub>2</sub>S. Se esperaba que al aumentar la expresión de *CYS4* el color de las colonias oscureciera, pero el color es similar al control. En el caso de la sobreexpresión de *CLN3*, se esperaba que, al haber más ciclina, esta utilizara más cantidad de H<sub>2</sub>S para persulfurarse y aclarar así el color de las colonias, pero el color es similar al control.

Las observaciones que se hacen con respecto a la mutante *cys4Δ* son:

- La sobreexpresión de *CLN3* no afecta la cantidad de H<sub>2</sub>S producido en mutantes *cys4Δ*. Ya se dijo que en mutantes *cys4Δ* la cantidad del gas mencionado aumenta por la activación de la vía alterna. Por lo que se esperaba que, si hay más cantidad de la ciclina Cln3, el

color de las colonias se aclararía, sin embargo, no se observa cambio en la coloración de ninguna de las cepas transformadas.

Finalmente, con los goteos de la mutante *cln3Δ* se hacen las siguientes observaciones:

- No se modifica la cantidad de H<sub>2</sub>S al sobreexpresar *CYS4* en mutantes *cln3Δ*. Se esperaría que una mayor cantidad de CBS produciría más H<sub>2</sub>S y, al no haber ciclina Cln3, el gas no es utilizado para persulfurar y es acumulado para mostrar colonias con una ligera coloración oscura. Por el contrario, la coloración observada es parecida a los controles BY4742 y *cln3Δ*.

El H<sub>2</sub>S es un gas difícil de cuantificar, por lo que se hace uso de métodos como el utilizado en este trabajo para poner en evidencia su presencia. Por lo que los resultados anteriores indican que el sobreexpresar uno de los genes en ausencia del otro no modifica la cantidad de H<sub>2</sub>S generado. Aun así, no se puede descartar la posibilidad de que el H<sub>2</sub>S producido por *CYS4* pueda ser utilizado como sustrato para la posible persulfuración de *CLN3*, se requerirían más experimentos para comprobar la persulfuración de Cln3 y el sitio en el que ocurre.

### 8. CONCLUSIONES

- Existe una interacción de tipo genética entre los genes *CYS4* y *CLN3* en *Saccharomyces cerevisiae* y se logra observar bajo diferentes contextos biológicos.
- Se logró eliminar al gen *CLN3* para generar las cepas que sirven de herramienta para determinar la existencia de la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3*.
- La interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* es positiva en cuanto a la aptitud de la doble mutante para crecer.
- La ausencia de oxígeno no afecta la capacidad de división de la doble mutante *cys4Δcln3Δ*, pero sí la viabilidad de las células. Las células que son viables logran reproducirse sin problema.
- La doble mutante *cys4Δcln3Δ* es sensible al etanol a una concentración mayor a 4%, por lo que bajo estas condiciones la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* es negativa.
- El estrés oxidante afecta más a la cepa *cys4Δcln3Δ*, por lo que la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3* es negativa bajo esta condición.
- En condiciones de estrés de retículo endoplásmico, la doble mutante *cys4Δcln3Δ* muestra ser más apta para crecer que la mutante sencilla *cys4Δ*, por lo que se presenta una interacción genética positiva entre *CYS4* y *CLN3*.
- En condiciones de presión osmótica, la cepa *cys4Δcln3Δ* muestra un fenotipo parecido a las mutantes sencillas respectivas, por lo que no es apreciable una interacción genética.
- Las fuentes de carbono no fermentables no perjudican la capacidad de las células de la cepa *cys4Δcln3Δ* para dividirse. Bajo estas condiciones no se puede apreciar la interacción genética entre *CYS4* y *CLN3*.
- La disminución de las aglomeraciones de la doble mutante *cys4Δcln3Δ* en medios no fermentativos a las 48 horas de incubación se puede atribuir sólo al efecto del estrés oxidante, sin sumarle el efecto de etanol.
- En medios de cultivo con fuentes de carbono no fermentativo, la cepa *cys4Δcln3Δ* muestra una viabilidad similar a la observada en fuentes de carbono fermentativas.
- El estrés oxidante generado por la respiración celular parece ser el responsable de la morfología y viabilidad que presenta la doble mutante *cys4Δcln3Δ*, sin importar el medio en el que se encuentre.

- Se logró crear una colección de plásmidos que permiten la expresión y sobre-expresión de los genes *CYS4* y *CLN3*, que pueden ser empleados en futuros trabajos.

## 9. REFERENCIAS

1. Griffiths A. J. F. et al. 2007. "Introduction to Genetic Analysis". 9° edición. W. H. Freeman. pp 197-209.
2. Phillips P. C. 2008. "Epistasis – the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems". *Nat Rev Genet*, Nov;9(11):855-67. doi: 10.1038/nrg2452.
3. Henriques J. A. P., Moustacchi E. 1981. "Interactions between mutations for sensitivity to psoralen photoaddition (pso) and radiation (rad) in *Saccharomyces cerevisiae*". *J Bacteriol*, Oct;148(1):248-56.
4. Kauffman S. A. 1993. "The origins of order: self-organization and selection in evolution". New York: Oxford University Press.
5. Sober E. 2001. "The Two Faces of Fitness". *Thinking about Evolution: Historical, Philosophical, and Political Perspectives*. Cambridge University Press, pp.309-321
6. Orr H. A. 2009. "Fitness and its role in evolutionary genetics". *Nat Rev Genet*, Aug;10(8):531-9. doi: 10.1038/nrg2603.
7. He X. et al. 2010. "Prevalent positive epistasis in *E. coli* and *S. cerevisiae* metabolic networks". *Nat Genet*, Mar;42(3):272-6. doi: 10.1038/ng.524. Epub 2010 Jan 24.
8. Acevedo R. B. et al. 2006 "Sexual reproduction selects for robustness and negative epistasis in artificial gene networks". *Nature*, Mar 2;440(7080):87-90.
9. Dujon, B. 1996. "The yeast project: what did we learn?". *Trends Genet*, 12(7):263-70.
10. Mewes, H. W., et al. 1997. "Overview of the yeast genome". *Nature*, May 29;387(6632 Suppl):7-65.
11. Broach, J. R. et al. 1991. "The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*" Vol. 1. Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y.
12. Pringle, J. R. et al. 1993. "The Molecular and Cell Biology of *Saccharomyces cerevisiae*". Vol. 3. Cell Cycle and Cell Biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY.
13. Hinnen, A., J. B. Hicks, and G. R. Fink. 1978. "Transformation of yeast". *Proc Natl Acad Sci U S A*, Apr;75(4):1929-33.
14. Guthrie, C. and G. R. Fink. 1991. "A guide to yeast genetics and molecular biology in: *Methods in Ezymology*". Academic Press N. Y. 194: 1- 495.
15. Gietz R. D. and Woods R. A. 2002. "Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method". *Meth. Enzymol*, 350:87-96.
16. Lodish H. et al. 2000. "DNA Cloning with Plasmid Vectors". W. H. Freeman. New York.
17. Bell S. P. and Stillman B. 1992. "ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex". *Nature*, May 14;357(6374):128-34.
18. Murray A. W. and Szostak J. W. 1983. "Construction of artificial chromosomes in yeast". *Nature*, Sep 15-21;305(5931):189-93.
19. Brachmann C. B. et al. 1998 "Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications". *Yeast*. Jan 30;14(2):115-32.
20. Mortimer R. K. and Johnstone J. R. 1986 "Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center". *Genetics*. May;113(1):35-43.
21. Winston F., Dollard C. and Ricupero-Hovasse S. L. 1995 "Construction of a Set of Convenient *Saccharomyces cerevisiae*. Strains that are Isogenic to S288C". *Yeast*, Jan;11(1):53-5.

22. Rolland F., Winderickx J. and Thevelein J. 2002. "Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast". *FEMS Yeast Res.* May;2(2):183-201.
23. Trevelyan W. E. et al. 1952 "Studies on yeast metabolism. II. Synthesis of cell carbohydrates during glucose fermentation and its inhibition by azide". *Biochem J.* Jan;50(3):303-10.
24. Andreasen A. A. and Stier T. J. 1953. "Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium". *J Cell Comp Physiol.* Feb;41(1):23-36.
25. Bonnet J.A. and Jonge P. H. 1969. "The influence of some organic acids on the alcoholic fermentation in yeasts of the genus *Saccharomyces*". *Antonie Van Leeuwenhoek.* Jun;35:Suppl:G27-8.
26. Kayikci O. and Nielsen J. 2015 Minireview "Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Yeast Res.* Sep;15(6). pii: fov068. doi: 10.1093/femsyr/fov068. Epub 2015 Jul 22.
27. Zhuk A. S. et al. 2016. "Evaluation of methods of synchronization of cell division in yeast *Saccharomyces cerevisiae*". *Tsitologiya.* 58(12):936-46.
28. Herrero E., Martí A. y Gallego C. 1997. "El ciclo celular de las levaduras ¿Un buen modelo eucariótico?". Universidad de Lleida, España.
29. Alberts B. et al. 2004. "Introducción a la biología celular". 2° edición. Editorial médica panamericana. México DF.
30. Skala J., Nawrocki A. and Goffeau A. 1995 "The Sequence of a 27 kb Segment on the Right Arm of Chromosome VII from *Saccharomyces cerevisiae* Reveals MOLI, NAT2, RPL30B, RSRI, CYS4, PEMIICH02, NSRI Genes and Ten New Open Reading Frames". *Yeast.* Nov;11(14):1421-7.
31. Cherest H., Thomas D. and Surdin-Kerjan Y. 1993 "Cysteine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* Occurs through the Transsulfuration Pathway Which Has Been Built Up by Enzyme Recruitment". *J Bacteriol.* Sep;175(17):5366-74.
32. Thomas D. and Surdin-Kerjan Y. 1997. "Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*". *Microbiol Mol Biol Rev.* Dec;61(4):503-32.
33. Ono B. et al. 1988 "Cystein Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Mutation that confers Cystathionine  $\beta$ -Synthase deficiency". *J Bacteriol.* Dec;170(12):5883-9.
34. Ono B. et al. 1994 "Purification and Properties of *Saccharomyces cerevisiae* Cystathionine  $\beta$ -Synthase". *Yeast.* Mar;10(3):333-9.
35. Shan X. and Kruger D. W. 1998 "Correction of disease-causing CBS mutations in yeast". *Nat Genet.* May;19(1):91-3.
36. Kruger W. D. and Cox D. R. 1994 "A yeast system for expression of human cystathionine  $\beta$ -synthase: Structural and functional conservation of the human and yeast genes". *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 5;91(14):6614-8.
37. Mayfield J. A. et al. 2012 "Surrogate Genetics and Metabolic Profiling for Characterization of Human Disease Alleles". *Genetics.* Apr;190(4):1309-23. doi: 10.1534/genetics.111.137471. Epub 2012 Jan 20.
38. Shing S. et al. 2009 "Relative Contributions of Cystathionine  $\beta$ -Synthase and  $\gamma$ -Cystathionase to H<sub>2</sub>S Biogenesis via Alternative Trans-sulfuration Reactions". *J Biol Chem.* Aug 14;284(33):22457-66. doi: 10.1074/jbc.M109.010868. Epub 2009 Jun 16.
39. Hoose S. A. et al. 2012 "A Systematic Analysis of Cell Cycle Regulators in Yeast Reveals That Most Factors Act Independently of Cell Size to Control Initiation of Division". *PLoS Genet.* 8(3):e1002590. doi: 10.1371/journal.pgen.1002590. Epub 2012 Mar 15.

- 
40. Coleman KG, et al. 1986. "Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and characterization of the CDC24 gene and adjacent regions of the chromosome". *Mol Cell Biol.* Dec;6(12):4516-25.
  41. Mortimer RK, et al. 1992. "Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast.* Oct;8(10):817-902.
  42. Mike T., George T., and Bruce F. 1993 "Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins". *EMBO J.* May;12(5):1955-68.
  43. Tyers M., Tokiwa G., Nash R. and Futcher B. 1992 "The Cln3 - Cdc28 kinase complex of *S.cerevisiae* is regulated by proteolysis and phosphorylation". *EMBO J.* May;11(5):1773-84.
  44. Cross F. R. and Blake C. M. 1993 "The Yeast Cln3 Protein Is an Unstable Activator of Cdc28". *Mol Cell Biol.* Jun;13(6):3266-71.
  45. Talarek N., Gueydon E. and Schwob E. 2017. "Homeostatic control of START through negative feedback between Cln3-Cdk1 and Rim15/Greatwall kinase in budding yeast". *Elife.* Jun 10;6. pii: e26233. doi: 10.7554/eLife.26233.
  46. Stuart D. and Wittenberg C. 1995 "*CLN3*, not positive feedback, determines the timing of *CLN2* transcription in cycling cells". *Genes & Development.* 2780-2794
  47. Shi L. and Tu B. P. 2013 "Acetyl-CoA induces transcription of the key G1 cyclin *CLN3* to promote entry into the cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genes Dev.* Nov 15;9(22):2780-94.
  48. Filipovic M. R. 2015. "Persulfidation (S-sulfhydration) and H<sub>2</sub>S". *Handb Exp Pharmacol.* 230:29-59. doi: 10.1007/978-3-319-18144-8\_2.
  49. Filipovic M. R. et al. 2018. "Chemical Biology of H<sub>2</sub>S. Signaling through Persulfidation". *Chem Rev.* Feb 14;118(3):1253-1337. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00205. Epub 2017 Nov 7.
  50. Mishanina T. V., Libiad M. and Banerjee R. 2015. "Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways". *Nat Chem Biol.* Jul;11(7):457-64. doi: 10.1038/nchembio.1834. Epub 2015 Jun 17.
  51. Gavin A.C., et al. 2006. "Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery". *Nature.* Mar 30;440(7084):631-6. Epub 2006 Jan 22.
  52. Goldstein A. et al. 1999. "Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*". *Yeast.* Oct;15(14):1541-53.
  53. Güldener U. et al. 1996. "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast". *Nucleic Acids Res.* Jul 1;24(13):2519-24.
  54. SnapGene, GSL Biotech. pRS416 [online]. Available on: [https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=yeast\\_plasmids&plasmid=pRS416](https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=yeast_plasmids&plasmid=pRS416)
  55. SnapGene, GSL Biotech. YEp352 [online]. Available on: [https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=yeast\\_plasmids&plasmid=YEp352](https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=yeast_plasmids&plasmid=YEp352)
  56. Thermo Scientific™. CloneJET PCR Cloning Kit [online]. Available on: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>
  57. Merico A. et al. 2007. "Fermentative lifestyles in yeast belonging to the *Saccharomyces* complex". *FEBS J.* Feb;274(4):976-89. Epub 2007 Jan 18.
  58. Brosnan M. P., et al. 2000. "The stress response is repressed during fermentation in brewery strains of yeast". *J Appl Microbiol.* May;88(5):746-55.
-



- 
59. Stanley D. et al. 2010. "The ethanol stressresponse and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*". J Appl Microbiol. Jul;109(1):13-24. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x. Epub 2010 Jan 11.
60. Grzegorz Bartosz. 2009. "Reactive oxygen species: Destroyers or messengers?". Biochem Pharmacol. Apr 15;77(8):1303-15. doi: 10.1016/j.bcp.2008.11.009. Epub 2008 Nov 24.
61. G. Lavranos, et al. 2012. "Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways". Reprod Toxicol. Nov;34(3):298-307. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.06.007. Epub 2012 Jun 28.
62. Mena S., Ortega A. and Estrela J.M. 2009. "Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis". Mutat Res. Mar 31;674(1-2):36-44. doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.017. Epub 2008 Oct 11.
63. Kaufman R. J. 1999. "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls". Genes Dev. May 15;13(10):1211-33.
64. Kou S. C. and Lampen J. O. 1974. "Tunicamycin. An inhibitor of the yeast glycoprotein synthesis". Biochem Biophys Res Commun. May 7;58(1):287-95.
65. Sharma C. B., Lehle L. and Tanner w. 1981. "N-Glycosylation of yeast proteins". Eur J Biochem. May;116(1):101-8.
66. Murray R. K. et al. 2012. "Harper. Bioquímica ilustrada". McGraw-Hill. 29° edición. México D.F. pp 156,167.
67. Kozak B. U. et al. 2016. "Replacement of the initial steps of ethanol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* by ATP-independent acetylating acetaldehyde dehydrogenase". FEMS Yeast Res. Mar;16(2):fow006. doi: 10.1093/femsyr/fow006. Epub 2016 Jan 26.
68. Klein M. et al. 2017. "Glycerol metabolism and transport in yeast and fungi: established knowledge and ambiguities". Environ Microbiol. Mar;19(3):878-893. doi: 10.1111/1462-2920.13617. Epub 2017 Jan 30.
69. Aßkamp M. R., Klein M. and Nevoigt E. 2019. "Involvement of the external mitochondrial NADH dehydrogenase Nde1 in glycerol metabolism by wild-type and engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains". FEMS Yeast Res. May 1;19(3). pii: foz026. doi: 10.1093/femsyr/foz026.

## ANEXO I: Plásmidos

Mapas de restricción de los plásmidos utilizados y construidos en el proyecto.

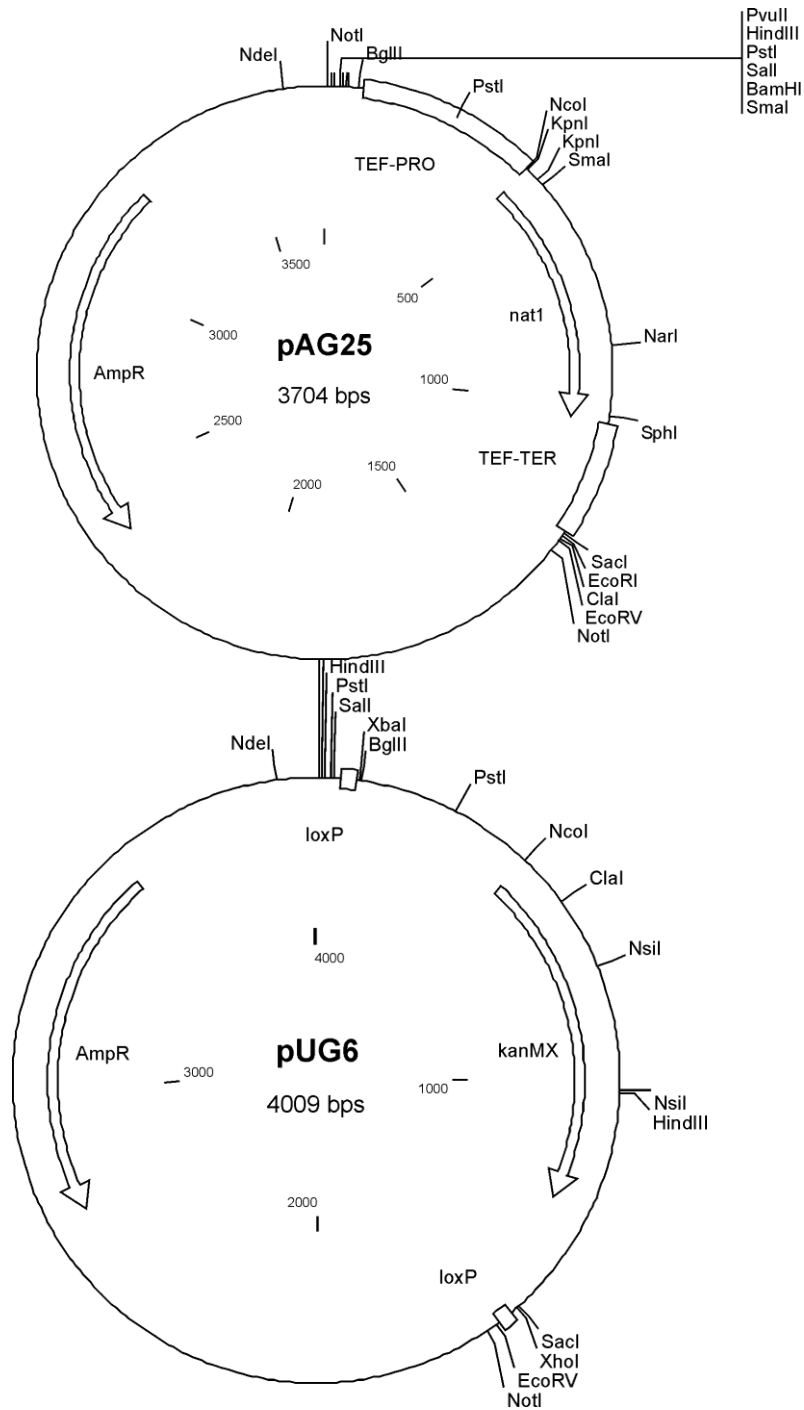


Figura 9.1 Mapas de restricción de los plásmidos de delección pAG25<sup>52</sup> y pUG6<sup>53</sup>, utilizados en este trabajo.

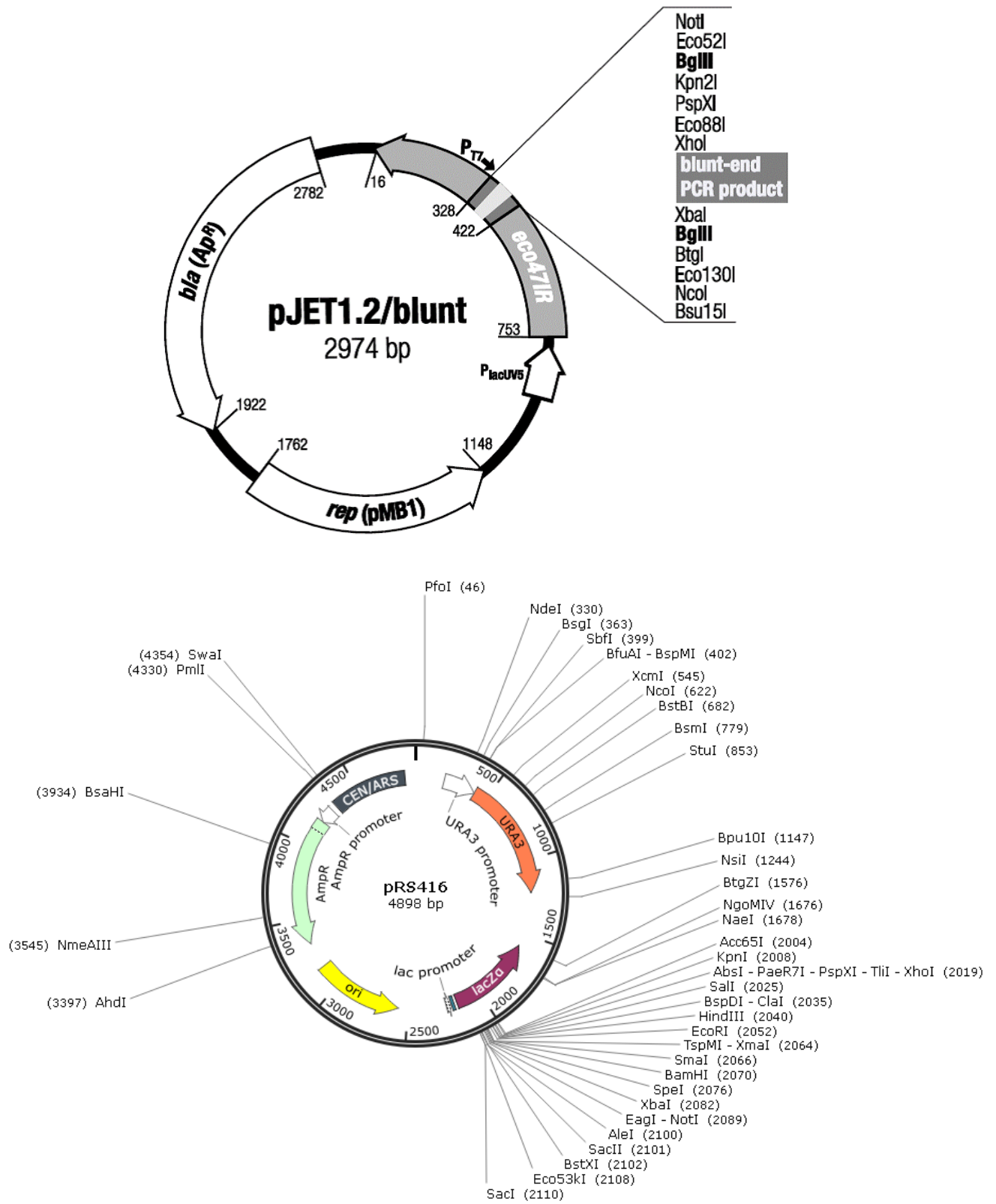


Figura 9.2 Mapas de restricción del plásmido de clonación pJET1.2<sup>56</sup> y del plásmido monocopia pRS416<sup>54</sup> utilizados en este trabajo.

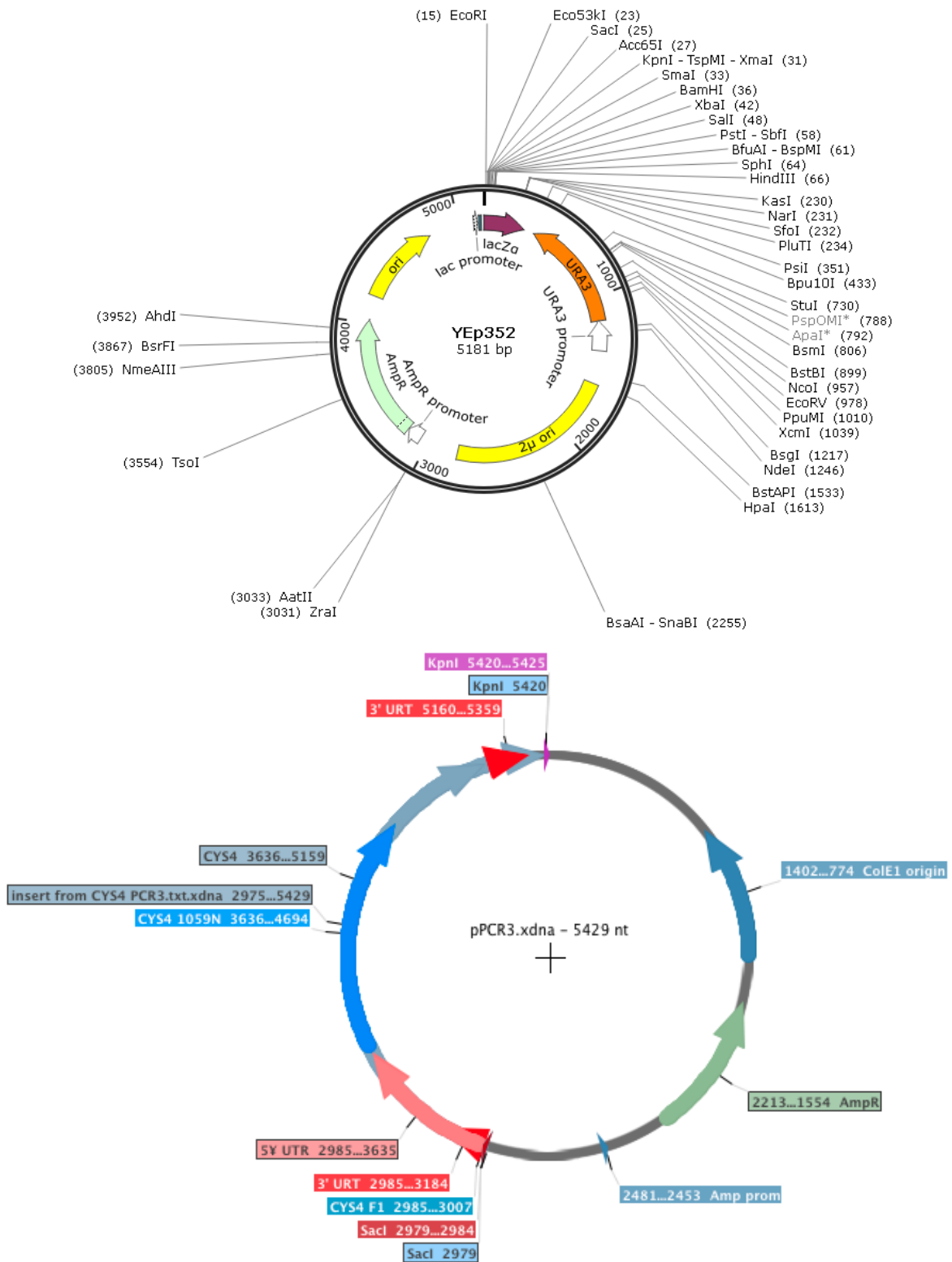


Figura 9.3 Mapas de restricción del plásmido multicopia YEp352<sup>55</sup> y del plásmido pPCR3 que contiene a CYS4.

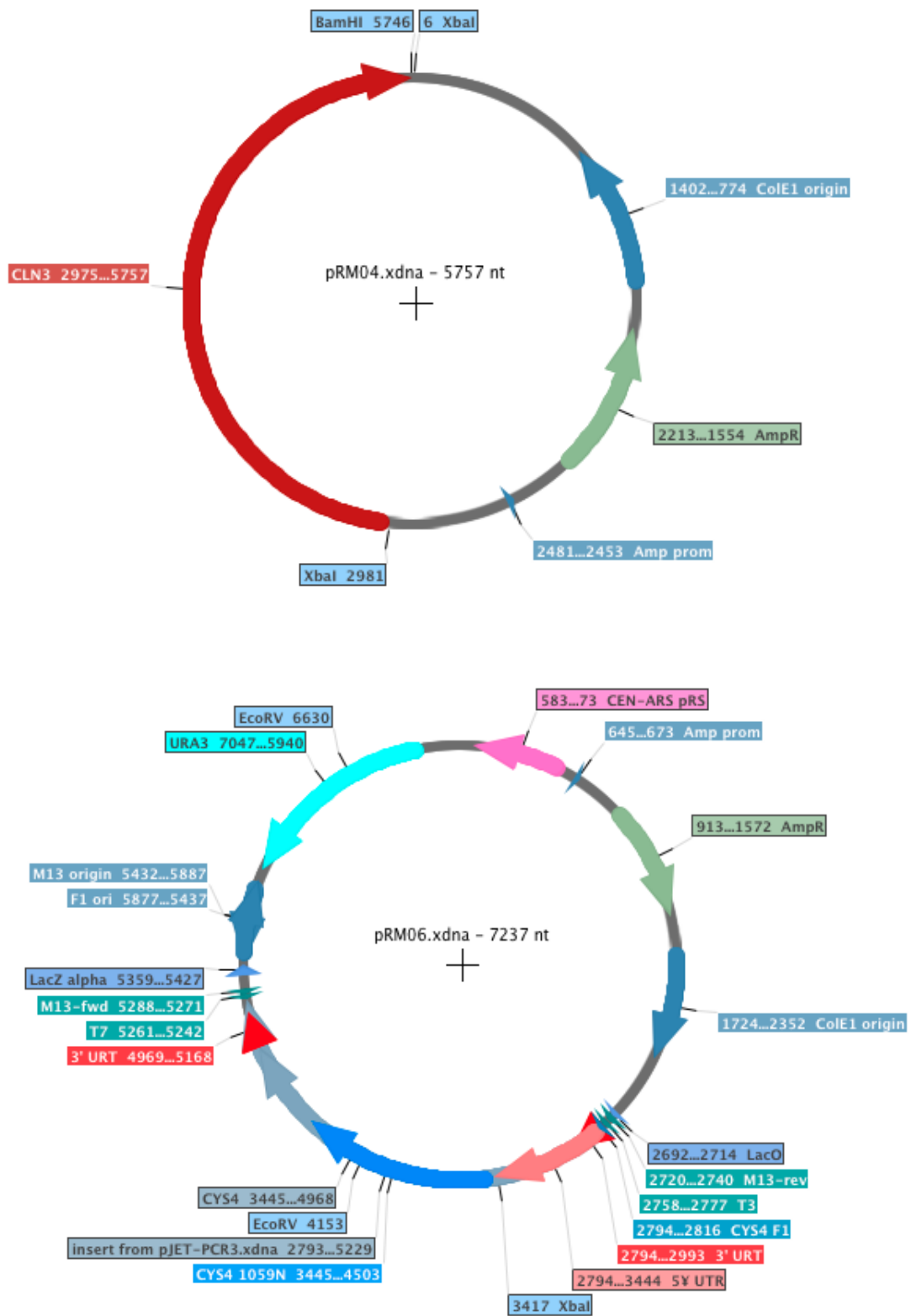


Figura 9.4 Mapas de restricción del plásmido pRM04 que contiene a *CLN3* y el plásmido construido pRM06.

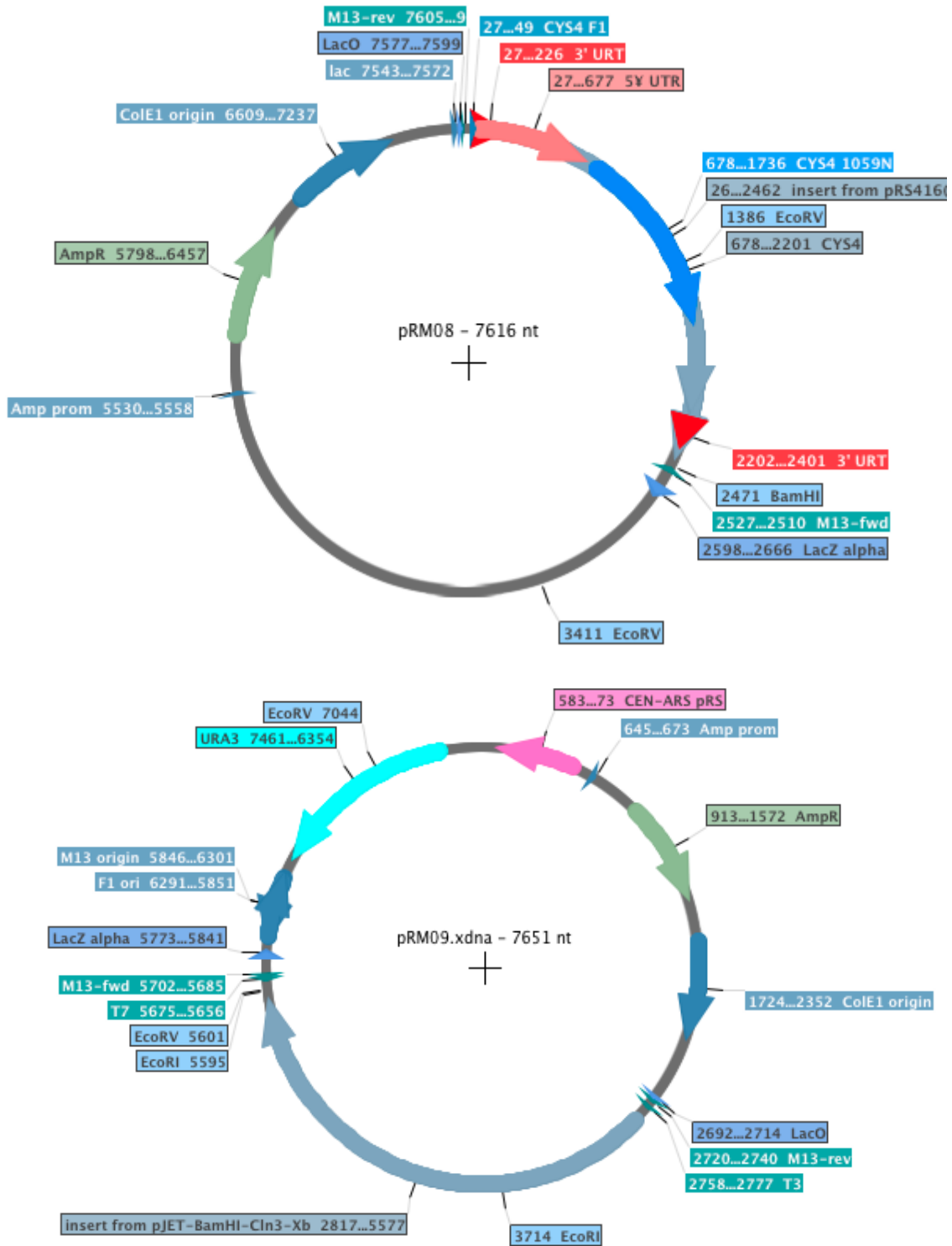


Figura 9.5 Mapas de restricción de los plásmidos construidos pRM08 y pRM09.

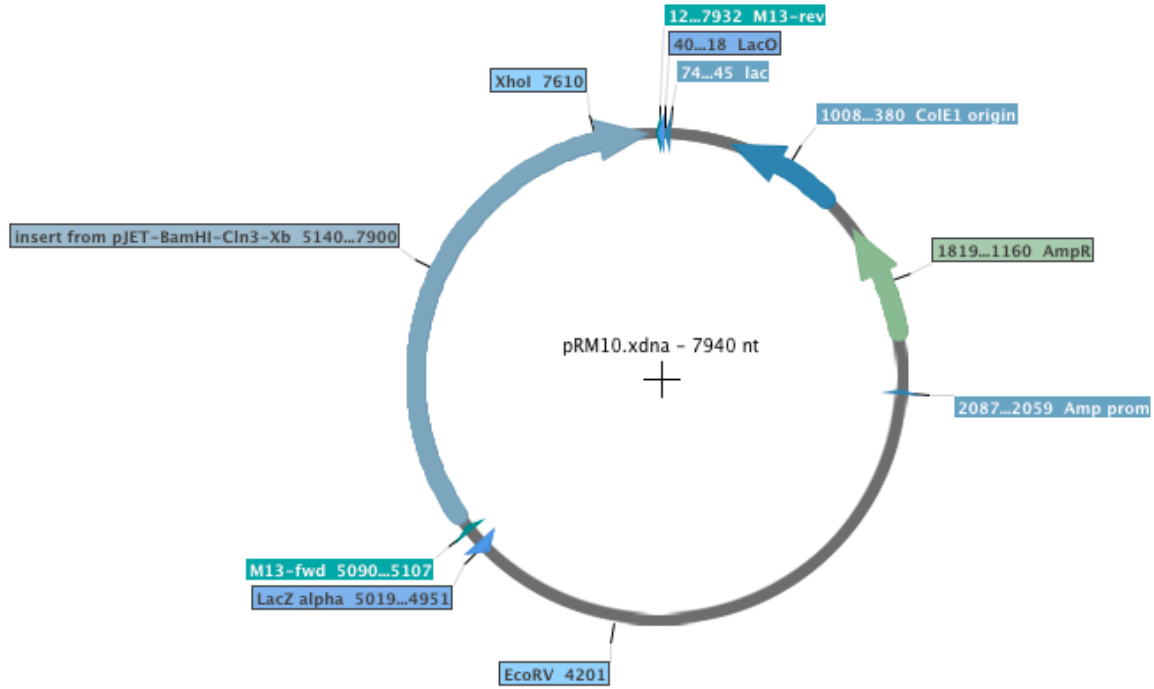


Figura 9.6 Mapas de restricción del plásmido construido pRM10.

Anexo II: Esquemas

Representación esquemática de los pasos para construcción de plásmidos que contienen al gen *CYS4*, indicando el plásmido del que proviene y el plásmido al que se subclona.

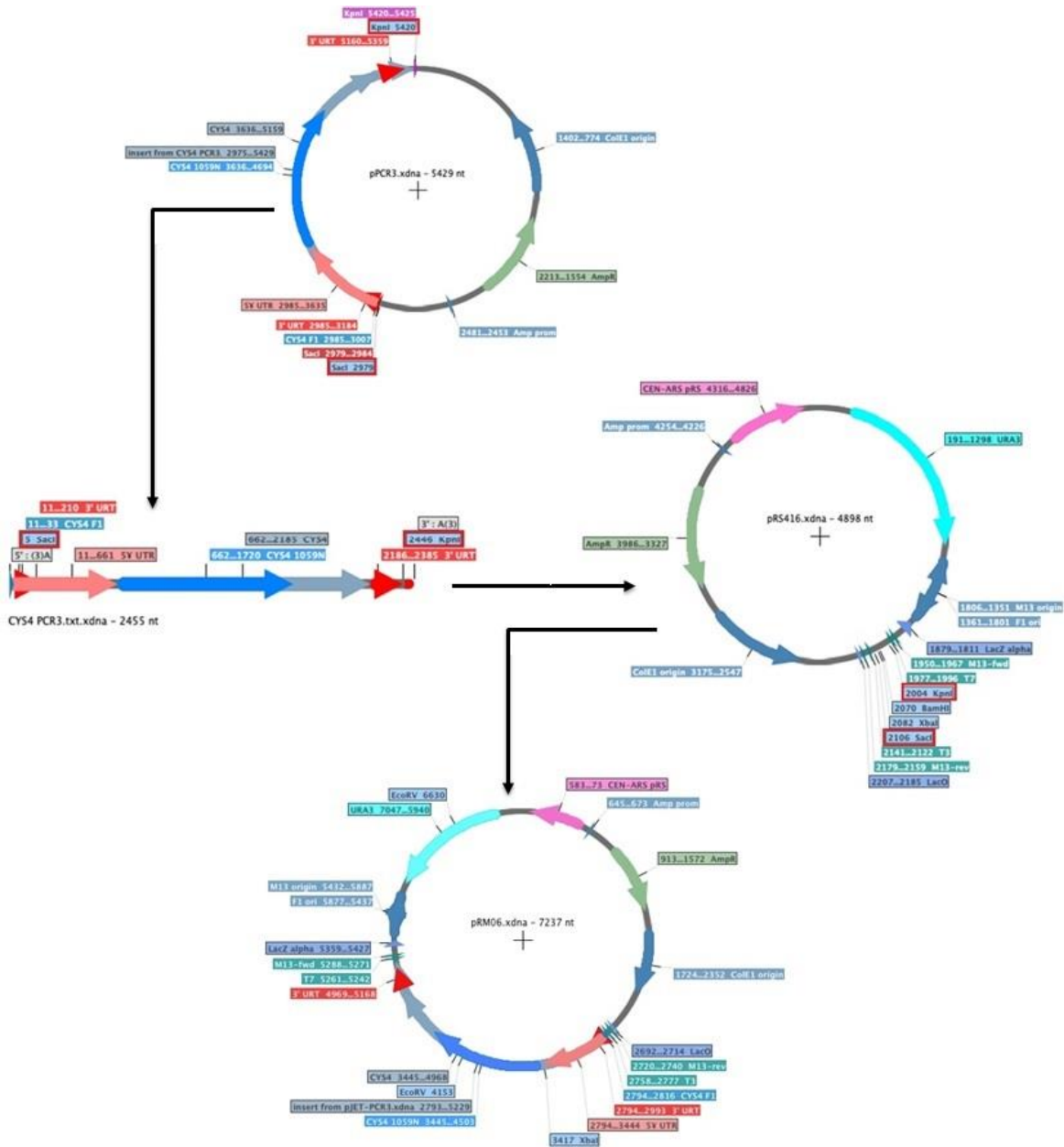


Figura 9.7 Ejemplo de la inserción de un gen a un vector. Subclonación del gen *CYS4* proveniente del plásmido pPCR3 en el vector pRS416, construcción nombrada pRM06.



Esquema de la clonación del gen CLN3 en el vector pJET1.2.

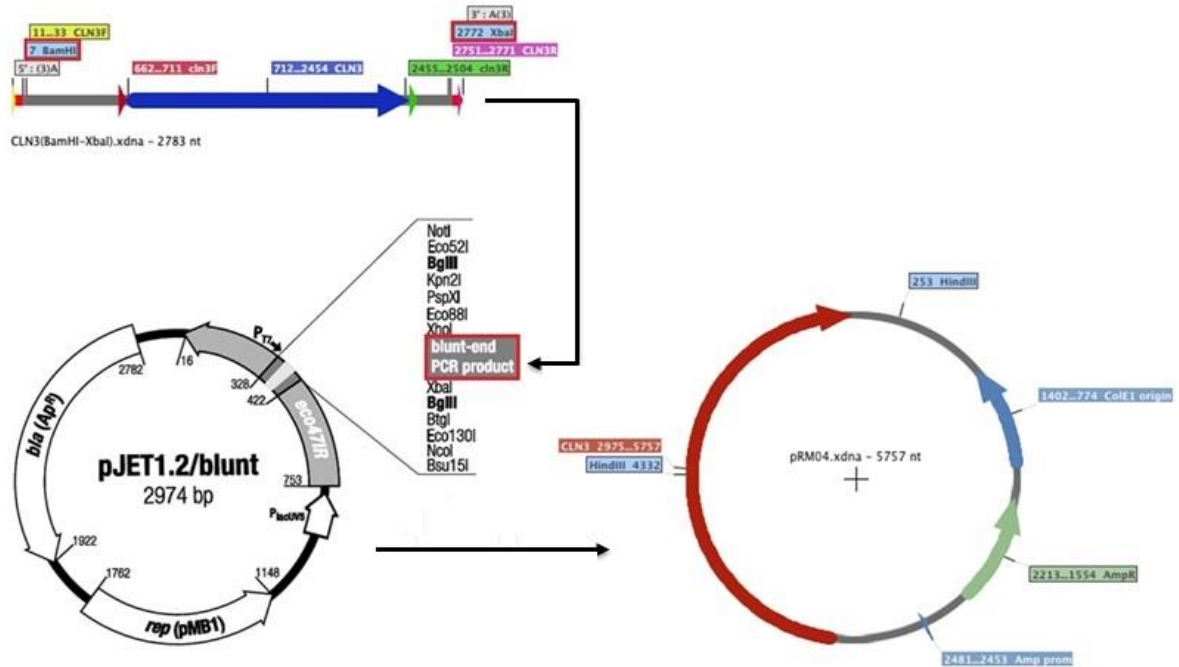


Figura 9.8 Esquema de clonación del gen *CLN3* con sitios de restricción BamHI y XbaI en el vector pJET1.2\*, plásmido nombrado pRM04. (\*Thermo Scientific™. CloneJET PCR Cloning Kit [online]).

Esquema que muestra los fragmentos de ADN utilizados para realizar la subclonación del gen *CLN3*.

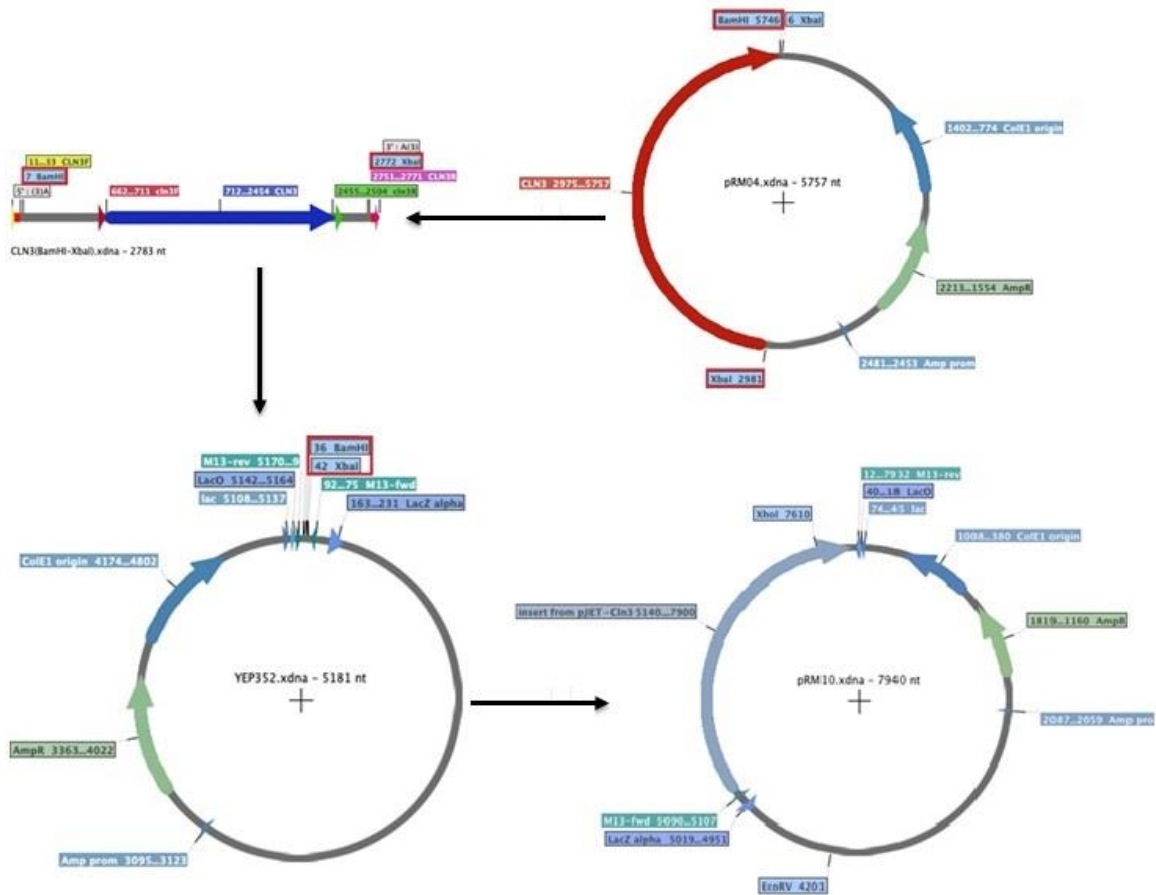


Figura 6.10 Ejemplo de inserción de un gen a un vector. Subclonación del gen *CLN3* proveniente del plásmido pRM04 en el vector YEp352, construcción nombrada pRM10.