

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**PAPEL DE LA SUBUNIDAD ALPHA DE LA PROTEÍNA G  
HETEROTRIMÉRICA EN EL SENSADO DE GLUCOSA  
Y EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DEL HONGO  
DIMÓRFICO *Yarrowia lipolytica***

**Por**

**JOSELINA HUERTA OROS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**Diciembre, 2014**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN**



**PAPEL DE LA SUBUNIDAD ALPHA DE LA PROTEÍNA G  
HETEROTRIMÉRICA EN EL SENSADO DE GLUCOSA  
Y EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR DEL HONGO  
DIMÓRFICO *Yarrowia lipolytica***

**Por**

**JOSELINA HUERTA OROS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN**

**Diciembre, 2014**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por no desampararme, por ponerme pruebas que puedo superar y ayudarme a ser capaz de muchas cosas, por ponerme en el camino en el que estoy y poner a las personas que me han rodeado desde mis inicios, todas son importantes y especiales porque me enseñaron algo que me hacer estar en donde estoy.

Al Dr. Eduardo Campos Góngora por brindarme la oportunidad de trabajar a su lado y confiar en mí al entrar a su laboratorio y ser su estudiante en todos los aspectos, académicos, laborales y personales, por ser paciente y un verdadero mentor en mi vida.

A la Facultad de Salud Pública y Nutrición, que en sus recintos llevé a cabo este proyecto de vida; a la Universidad Autónoma de Nuevo León, que desde la licenciatura ha sido mi *alma mater*.

A los becarios del Laboratorio de Proteómica que poco a poco se fueron convirtiendo en amigos y a los cuales les agradezco tantas anécdotas, momentos felices y tanto trabajo: a Gilberto Amaro Osejo, Josué Armando Cantú Valdéz, Jorge Abraham González Flores, Ariel Charles Ponce, Jennifer Charles Ponce, Karla Martínez Gutiérrez, Homero Villareal Salas, Katia Lucero Cabriales Amador, Alejandra Briones Rodríguez, Armando Vignao Cantú "rompe el suelo", Nora García García, Julieta Melissa López y a Fabiola Fuentes de la Fuente que con sus frases célebres "me hacía el día".

A Evelyn Sifuentes Gaspar, estudiante de la Maestría en Ciencias en Nutrición, compañera de laboratorio, amiga, confidente y consejera.

A Gerardo Ismael Arredondo Mendoza, quien con su "buena actitud" y "positivismo" me inspiraba a "darle para adelante", como olvidar su tan reconocida frase: "pues estoy, que ya es ganancia".

Fernanda Desentis Desentis, quien con tan poco tiempo en el laboratorio me ha enseñado muchas cosas y se ha convertido en una excelente amiga.

A Sergio Torres Silva, persona importantísima en mi vida, que me brindó su paciencia, apoyo moral y físico para poder realizar este pequeño pero significativo logro en mi vida, muchas gracias por todo.

A mis compañeras de la Maestría en Ciencias en Nutrición y amigas: Ninfa Escalante García, Martha Castorena Alba, Debbie Puente Hernández y Nancy Martínez Garza, por su compañerismo, amistad, conocimiento, porras y entusiasmo en esta carrera de la investigación.

A mis maestros y profesores de maestría y de vida; a la Dra. Blanca Edelia González Martínez y al Dr. Zacarías Jiménez Salas, por su guía, sus sabios consejos a lo largo de mi formación y su apoyo en la revisión de este trabajo.

Al personal académico y administrativo de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, por todo el apoyo y sonrisas brindadas.

## DEDICATORIA

Dedico muy especialmente esta tesis a mis Padres Eliseo Huerta Romero y Blanca Julia Oros Gortary, por nunca cortarme las alas, al contrario darme las herramientas para seguir adelante; por ser unos guerreros de la vida, por enseñarme todo lo que soy y heredarme sus mejores genes. Los amo mucho.

A mi padre, por su fortaleza y buen ejemplo, por su empeño en sacarnos adelante y darnos todo lo que estuvo en sus manos y más, por apoyarme y darme la oportunidad de estudiar y respetar mis decisiones, aunque eso significara estar lejos de ellos...

A mi madre, por su valor y su entrega para con sus hijos, por su valentía y buena actitud para superar las adversidades, por siempre darme lo mejor y ser mi mejor amiga y ejemplo de mujer...

A mis hermanos, Eliseo Huerta Oros y Cristina Guadalupe Huerta Oros por ser mis ejemplos a seguir; por aceptar que soy la más lista de los tres, obvio porque ellos me lo enseñaron. Los amo mucho.

A mis sobrinas hermosas, Camilla Crisbel Bogarín Huerta y a Danna Isabella Pereira Huerta, quienes llegaron a iluminar nuestras vidas con su vida.

Muchas gracias a todos.

## TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1    Definición del problema .....	5
2.2    Justificación .....	6
3. HIPÓTESIS.....	7
4. OBJETIVOS.....	7
4.1    Objetivo general.....	7
4.2    Objetivos específicos.....	7
5. ANTECEDENTES.....	8
5.1    Vías de señalización celular .....	10
5.2    MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) .....	11
5.3    PKA (proteína quinasa activada por AMPc).....	12
5.4    Proteína G heterotrimérica.....	14
5.5    La subunidad alpha de la proteína G .....	15
5.6    Papel de la subunidad alpha de la proteína G (G $\alpha$ ) en humanos	17
5.7    Vía PKA en los procesos de diferenciación celular.....	19
5.8    Papel de la glucosa en la diferenciación celular .....	20
5.9    El hongo <i>Yarrowia lipolytica</i> como modelo de estudio .....	21
5.10   Estudios de diferenciación celular en <i>Y. lipolytica</i> .....	24
5.11   Factores que inducen el dimorfismo en <i>Y. lipolytica</i> .....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
6.1    Materiales .....	27
6.1.1  Material biológico.....	28
6.2    Métodos.....	29
6.2.1  Búsqueda y análisis <i>in silico</i> de secuencias GPA y diseño de la estrategia para la delección del gen .....	30
6.2.1.1  Diseño de los oligonucleótidos .....	31
6.2.2  Cultivo de células de <i>Y. lipolytica</i> .....	31
6.2.3  Extracción de DNA genómico de <i>Y. lipolytica</i> .....	32
6.2.4  Amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) ...	33

6.2.5	Electroforesis en geles de agarosa.....	34
6.2.6	Clonación de los fragmentos amplificados.....	35
6.2.7	Transformación de células calcio-competentes de <i>E. coli</i> .....	35
6.2.8	Análisis de las clonas recombinantes de <i>E. coli</i> .....	36
6.2.9	Extracción del DNA plasmídico de bacterias .....	36
6.2.10	Comprobación de la presencia del gen clonado .....	37
6.2.11	Construcción del casete GPA1-URA3 y generación de la mutante $\Delta$ -Y/GPA1 .....	37
6.2.11.1	Amplificación y clonación del gen GPA1.....	37
6.2.11.2	Eliminación del ORF GPA1.....	38
6.2.11.3	Obtención del gen marcador (URA3).....	38
6.2.11.4	Digestión del vector pCR TOPO 4/GPA1 y del producto amplificado URA3 .....	39
6.2.11.5	Purificación de los fragmentos de interés .....	41
6.2.11.6	Ligación del gen marcador URA3 con los extremos del gen GPA1 .....	41
6.2.11.7	Transformación de células de <i>Y. lipolytica</i> por el método de Acetato de Litio .....	42
6.2.11.8	Selección y comprobación de transformantes YI- $\Delta$ GPA1 .....	44
6.2.12	Construcción de los casetes de interrupción GPA2-LEU2 y GPA2-URA3 .....	45
6.2.12.1	Amplificación y clonación de las regiones adyacentes del gen GPA2 .....	46
6.2.12.2	Ligación de regiones adyacentes (P+T) del gen GPA2 .....	46
6.2.12.3	Clonación de la unión de las regiones adyacentes (P+T) del gen GPA2 .....	48
6.2.12.4	Inserción de la secuencia correspondiente al gen marcador entre los extremos adyacentes (P+T) de GPA2.....	48
6.2.12.5	Desfosforilación del vector linearizado P+T con CIAP .....	48
6.2.12.6	Reacción para inactivar a la fosfatasa alcalina (CIAP) .....	49
6.2.12.7	Ligación del vector desfosforilado y el gen marcador URA3.....	49
6.2.12.8	Construcción del casete de interrupción para GPA2, con el gen marcador LEU2.....	51

6.2.13	Transformación de células de <i>Y. lipolytica</i> para obtener mutantes $\Delta$ GPA2.....	52
6.2.13.1	Generación de células litio-competentes .....	52
6.2.13.2	Reacciones de transformación por electroporación.....	53
6.2.13.3	Selección y análisis de las transformantes <i>YI</i> - $\Delta$ GPA2.....	54
6.2.14	Análisis genotípico de las mutantes $\Delta$ GPA1.....	55
6.2.15	Análisis genotípico de las mutantes $\Delta$ GPA2.....	55
6.2.16	Análisis fenotípico de la mutante $\Delta$ GPA1 .....	56
6.2.16.1	Crecimiento de la mutante $\Delta$ GPA1 en diferentes concentraciones de glucosa .....	56
6.2.16.1.1	Tratamiento de las células para eliminar reservas de glucosa	57
6.2.16.1.2	Determinación del inóculo.....	57
6.2.16.1.3	Curvas de crecimiento de la mutante $\Delta$ GPA1.....	58
6.2.16.2	Análisis de la morfología celular .....	58
7.	RESULTADOS .....	59
7.1	Búsqueda <i>in silico</i> de los genes GPA de <i>Y. lipolytica</i> .....	59
7.2	Diseño de oligonucleótidos .....	62
7.3	Construcción del casete GPA1-URA3 y generación de la mutante $\Delta$ - <i>YI</i> GPA1 .....	64
7.4	Caracterización genotípica de la mutante $\Delta$ GPA1 .....	66
7.5	Construcción de los casetes GPA2-LEU2 y GPA2-URA3 y generación de las mutantes $\Delta$ - <i>YI</i> GPA2 .....	68
7.5.1	Clonación de las regiones adyacentes (P y T) del gen GPA2 .....	69
7.5.2	Ligación de las regiones adyacentes (P y T) del gen GPA2.....	70
7.5.3	Inserción del gen marcador URA3 entre los fragmentos P y T ....	71
7.5.4	Construcción del casete de interrupción GPA2-URA3.....	74
7.5.5	Construcción del casete de interrupción GPA2-LEU2 .....	76
7.6	Transformación de las cepas P01A y $\Delta$ GPA1 para obtener mutantes GPA2 y dobles mutantes GPA .....	78
7.7	Análisis genotípico de las posibles mutantes $\Delta$ GPA2.....	80
7.8	Análisis fenotípico de la mutante $\Delta$ GPA1.....	82

7.8.1	Crecimiento de la mutante $\Delta$ GPA1 en medio adicionado con diferentes concentraciones de glucosa.....	82
7.8.2	Morfología de la mutante $\Delta$ GPA1 cultivada en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.....	86
8.	DISCUSIÓN.....	89
9.	CONCLUSIONES .....	97
10.	LITERATURA CITADA .....	98

## LISTA DE TABLAS

1	Reactivos utilizados en este estudio	27
2	Composición de una reacción típica de PCR	33
3	Condiciones de una reacción típica de PCR	34
4	Condiciones de una reacción de digestión con dos enzimas	40
5	Composición de una reacción de ligación típica	42
6	Composición de la reacción de ligación de los extremos (Promotor + Terminador) del gen GPA2	47
7	Composición de la reacción de desfosforilación con la enzima CIAP sobre el vector linearizado TOPO4/P+T del gen GPA2	49
8	Composición de la reacción de digestión con BamHI sobre DNA plasmídico para obtener el gen marcador URA3	50
9	Composición de la reacción de ligación del gen URA3 en el vector linearizado TOPO4/P+T	50
10	Condiciones de electroporación y selección de las transformantes	54
11	Comparación de las secuencias Gpa de <i>Y. lipolytica</i> con secuencias de proteínas Gpa de otras especies	60
12	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR en las diferentes etapas de este trabajo	64
13	Combinaciones de oligonucleótidos para la caracterización de las mutantes $\Delta$ GPA1	67
14	Secuencias de oligonucleótidos de las regiones externas de GPA2	70
15	Combinaciones de oligonucleótidos para comprobación de las mutantes $\Delta$ GPA2	80

## LISTA DE FIGURAS

1	Representación esquemática general de un fenómeno de diferenciación celular	8
2	Vía de señalización celular	10
3	Cascada de señalización producida por un efector en el exterior de la célula	15
4	Estrategia general del trabajo	30
5	Patrón de restricción del gen GPA1 con las enzimas EcoRV y HincII	38
6	Esquema de la obtención del gen marcador URA3	40
7	Esquema de elaboración del casete de disrupción de GPA2	45
8	Esquema donde se muestra el proceso de amplificación, unión y clonación de los extremos del gen GPA2	47
9	Identificación de dominios específicos en presuntas proteínas Gpa1 y Gpa2 de <i>Y. lipolytica</i>	62
10	Representación esquemática de la estrategia para la construcción del casete de disrupción GPA1-URA3	65
11	Representación esquemática del sitio donde se diseñaron los oligonucleótidos para el ensayo de PCR para comprobación de la mutación	66
12	Caracterización genotípica de la mutante $\Delta$ GPA1	68
13	Estrategia para la obtención de las regiones adyacentes del gen GPA2	69
14	Identificación de las clonas que acarrean la ligación de los extremos del gen GPA2	71
15	Obtención del gen marcador URA3 por digestión enzimática	72
16	Electroforesis de los fragmentos de DNA correspondientes al vector desfosforilado P+T y al gen marcador URA3	73

17	Selección de clonas de bacterias transformadas con los productos de la ligación P+URA3+T del gen GPA2	73
18	Identificación por PCR de las clonas de <i>E. coli</i> que acarrean el plásmido con la construcción P+URA3+T del gen GPA2	74
19	Identificación de las clonas de <i>E. coli</i> que acarrean la construcción GPA2-URA3	75
20	Obtención del gen marcador LEU2 por digestión enzimática del plásmido TOPO 4	76
21	Identificación de las clonas de <i>E. coli</i> que acarrean el plásmido con la construcción GPA2-LEU2	77
22	Análisis del patrón de restricción virtual que muestra la orientación del gen LEU2 insertado entre los extremos del gen GPA2	78
23	Crecimiento de las putativas mutantes $\Delta$ GPA2 en medio mínimo YNB adicionado con leucina	79
24	Análisis genotípico de las posibles mutantes $\Delta$ GPA2 producto de la transformación con el casete GPA2-URA3	81
25	Curvas de crecimiento de las cepas P01A y GPA1 de <i>Y. lipolytica</i>	83
26	Crecimiento de la cepa $\Delta$ GPA1 y P01A en medio mínimo YNB+Leu+Ura adicionado con diferentes concentraciones de glucosa	84
27	Comparación del crecimiento de cepas de <i>Y. lipolytica</i> en medio mínimo YNB+Leu+Ura adicionado con diferentes concentraciones de glucosa	86
28	Morfología celular de las cepas de <i>Y. lipolytica</i> cultivadas en medio mínimo YNB con diferentes concentraciones de glucosa	87

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>Nomenclatura</b>	<b>Significado</b>
°C	Grados Celsius
μF	Microfaradio
μg	Microgramo
μl	Microlitro
AMPc	Adenin mono fosfato cíclico
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	DNA genómico
DNAp	DNA plasmídico
E	Energía calculada
Fig.	Figura
GenBank	Base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health de Estados Unidos)
GPA1	Subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica, gen 1
GPA2	Subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica, gen 2
kb	Kilobases
kV	Kilovoltio
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Leu	Leucina
MAPK	Vía de la proteína quinasa activada por mitógeno
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
ms	Milisegundo

nm	Nanómetros
P+T	Promotor más terminador del gen GPA2
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (siglas en inglés)
pH	Potencial de Hidrógeno
PKA	Vía de la proteína quinasa dependiente de AMPc
pmol	Pico moles
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
TA	Temperatura ambiente, (25 °C)
Tm	Temperatura básica de fusión
U	Unidades, utilizado en la concentración de enzimas
Ura	Uracilo
UV	Ultravioleta
Vt	Volumen total
YNB	Medio de cultivo mínimo (Yeast Nitrogen Base) para el cultivo de levaduras
$\Omega$	Ohmio como la resistencia eléctrica que existe entre dos puntos de un conductor

# 1. RESUMEN

Los nutrientes actúan como elementos mediadores de la respuesta celular (crecimiento y diferenciación), activando cascadas de señalización. Una de las vías implicada en estos fenómenos es la vía PKA (proteína quinasa activada por AMPc) en la cual, la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica (GPA) participa en la transmisión de la señal para activar la síntesis de AMPc. *Yarrowia lipolytica*, es un organismo modelo de uso biotecnológico, útil para el análisis del dimorfismo ya que tiene la capacidad de diferenciarse a forma de levadura o de micelio, en respuesta a distintos factores en el ambiente. El objetivo fue determinar la función de GPA en el sensado de glucosa y en la diferenciación celular en el hongo dimórfico *Y. lipolytica*. Por medio de análisis *in silico* (con el programa BLAST) en el genoma de *Y. lipolytica* se identificaron 2 genes (*YIGPA1* y *YIGPA2*) que presuntamente codifican para GPA's, cuyos tamaños de proteínas son de 410 y 442 Aa, respectivamente. Las putativas proteínas codificadas presentan una identidad de 43-47% y 54-60%, respectivamente, con GPA's de otras especies, incluidas GPA's de humanos. Sobre las secuencias identificadas se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieron la amplificación por PCR de ambos genes los cuales se clonaron y a partir de estas secuencias se construyeron casetes de interrupción para GPA1 y GPA2 utilizando como genes marcadores la secuencia de los genes LEU2 y URA3 de *Y. lipolytica*; con los casetes obtenidos se generaron mutantes teniendo como fondo genético a la cepa P01A de *Y. lipolytica*. Dichas mutantes se obtuvieron en base a su capacidad de crecer en medio selectivo. El análisis genotípico de las putativas mutantes obtenidas mostró que solo fueron positivas las mutantes  $\Delta$ -*YIGPA1*. Aunque las cepas consideradas como  $\Delta$ -*YIGPA2*, sí integraron el casete de interrupción, se demostró que el gen GPA2 se mantuvo intacto en su locus y por lo tanto que estas cepas no eran mutantes *YIGPA2*. El análisis fenotípico de la mutante  $\Delta$ -*YIGPA1* mostró que la capacidad de crecimiento de esta cepa es similar a la de la cepa control P01A cuando

ambas se sometieron a condiciones de cultivo en medio mínimo (YNB) adicionado con diferentes concentraciones de glucosa, (27.5, 55 y 110 mM y sin glucosa adicionada). Además, el análisis de microscopía mostró que no hubo cambios en la morfología de las células mutantes sometidas a distintas concentraciones de dicho nutriente; en las condiciones probadas, las células crecieron en forma de levadura y no se observó la presencia de micelio, el mismo fenómeno se observó en la cepa control. La presencia de dos genes GPA en el genoma de *Y. lipolytica*, no es sorprendente ya que numerosas especies tienen dos o más genes que codifican para la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica; sin embargo, la función específica de cada uno de estos genes es diferente entre especies y se les ha atribuido participación en el control del apareamiento (Gpa1) o en la diferenciación celular mediada por vía AMPc-PKA (Gpa2). En *Y. lipolytica*, la delección de GPA1 (mutantes  $\Delta$ -YIGPA1) no altera la capacidad de sensor glucosa ni condiciona la morfología de la célula. Es posible que los productos del gen GPA2, presente en estas células, esté desempeñando una función compensatoria, por lo que es necesaria la construcción y el análisis de mutantes GPA2 y de dobles mutantes  $\Delta$ GPA1/ $\Delta$ GPA2 de *Y. lipolytica*, para analizar la función de cada una de las subunidades alpha de la proteína G heterotrimérica y analizar su papel en una mutante en donde esté suprimida completamente la codificación de la proteína por la delección de los dos genes.

## 2. INTRODUCCIÓN

La nutrición celular se define como el abastecimiento de nutrientes que los organismos necesitan para obtener energía y mantener su estructura y funciones. Este proceso biológico es uno de los más importantes para el óptimo funcionamiento y salud de los organismos tanto unicelulares como multicelulares.

Considerando el proceso de asimilación de nutrientes, en la naturaleza existen 2 tipos de organismos: los organismos autótrofos, cuyas células sintetizan todas las sustancias esenciales para el metabolismo a partir de sustancias inorgánicas, tal es el caso de los organismos del reino vegetal; y las células heterótrofas, que llevan a cabo su nutrición mediante un proceso de formación de moléculas orgánicas a partir de otras, este último es el tipo de nutrición que poseen los organismos del reino animal.

El crecimiento y la diferenciación celular son controlados inicialmente por señales nutricionales, la entrada de estos nutrientes son interpretadas por una variedad de vías de señalización que permiten el crecimiento de la célula en respuesta a las condiciones del medio ambiente y se ha determinado que la disponibilidad de los nutrientes en el medio es el principal factor de control, crecimiento y desarrollo celular.

La regulación del crecimiento celular en respuesta a los nutrientes es crucial para la supervivencia de todos los organismos. Todas las células tienen la capacidad de evocar las respuestas apropiadas que se miden como señales, y estas señales son traducidas en respuestas a los cambios ambientales y a otros elementos externos como son los nutrientes (fuentes de carbono y de nitrógeno), el pH, la temperatura, citrato o suero, atmósfera gaseosa y la presencia de determinados compuestos (factores de crecimiento) en el medio.

En los últimos años, ha habido un enorme progreso en la identificación de las proteínas que regulan la respuesta celular a estas señales en el medio y en la forma en que dichas señales en la superficie celular están vinculadas a posteriores cambios bioquímicos en el citoplasma y núcleo. Una cuestión relacionada con estos estudios es poder determinar los mecanismos por medio de los cuales una vía de señalización individual se integra de manera apropiada con (o al margen de) otras vías para constituir redes más grandes que controlan el comportamiento general de la célula. Lo anterior se refiere a las vías de transducción de señales, una de estas vías son las compuestas por los receptores, las llamadas proteínas G heterotriméricas, la adenilato ciclasa, y una serie de elementos (proteínas) que integran la cascada de señalización de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), cuyos homólogos se pueden encontrar en los organismos multicelulares considerados evolutivamente superiores (mamíferos).

En diferentes especies (tanto procariotas como eucariotas), se ha demostrado la participación de la proteína G heterotrimérica y sus componentes (subunidades alpha, beta y gamma) en el sensado de nutrientes; específicamente, se ha determinado que después que la señal (nutriente) ha sido captado por la proteína receptora en la superficie celular, la subunidad alpha ( $G\alpha$ ), al disociarse del heterodímero  $\beta\gamma$  tiene una estrecha relación con la activación de la enzima adenilato ciclasa, enzima responsable de la síntesis de AMPc, molécula que a su vez es responsable de la activación de enzimas (quinasas) encargadas de fosforilar proteínas. Como respuesta a estas acciones, la célula estará en condiciones de llevar a cabo su metabolismo, traduciéndose esto en crecimiento y proliferación celular. De la misma manera, también se ha demostrado la participación de la proteína G heterotrimérica en algunos otros procesos celulares como la diferenciación celular. En el hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica* que tiene la facultad de diferenciarse en forma de micelio o levadura, a pesar de su importancia en procesos biotecnológicos como la degradación de sustancias hidrofóbicas (alcanos, grasas, aceites, ácidos grasos), la producción de ácidos orgánicos y la secreción de proteínas

heterólogas, aún no está claro el papel que juegan estas proteínas (la proteína G heterotrimérica y sus subunidades) en el sensado tanto de glucosa y en la activación de señales que desencadenan una u otra forma celular, es decir en la diferenciación celular, por lo que en este trabajo se pretende conocer el papel de la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica en el sensado de glucosa y en la diferenciación celular del hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*.

## 2.1 Definición del problema

Los nutrientes, junto con otros factores presentes en el medio son los elementos que determinan la respuesta celular de los organismos por medio de la activación de una serie de cascadas de señalización entre las que se pueden mencionar a la vía PKA. Se ha determinado que la vía PKA es activada por diferentes estímulos presentes en el medio como nutrientes y pH, entre otros. La vía PKA está conservada entre todos los organismos eucariotas conocidos, desde organismos del reino fungi, hasta el reino animal por lo que los componentes involucrados en esta vía son un blanco ideal para establecer estudios que permitan dilucidar el papel que desempeñan los diferentes nutrientes en los procesos de diferenciación celular. Uno de los componentes responsables de la activación de la vía PKA es la proteína G heterotrimérica (formada por 3 subunidades protéicas –alpha, beta y gamma-).

La subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica ( $G\alpha$ ) está altamente conservada en todas las especies estudiadas, lo que es un posible indicador de la importancia de esta proteína en los procesos metabólicos con los cuales los organismos responden a la disponibilidad de nutrientes en el ambiente. Una de las estrategias utilizadas que permiten identificar el papel que juegan los diferentes componentes de una vía metabólica es la delección de los genes que codifican para las proteínas involucradas en dicha vía. En el hongo dimórfico *Y. lipolytica*, no hay estudios acerca de los efectos que la delección del gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica, pueda tener en el

sensado de nutrientes (la activación de la vía PKA) y en la diferenciación celular de este organismo.

## 2.2 Justificación

Dentro de las principales vías de señalización en organismos eucariotas se encuentran la vía de las MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) y la vía PKA (proteína quinasa activada por AMPc).

En esta última vía (PKA) se ha descrito a la proteína G heterotrimérica y a las subunidades que la conforman ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), como una proteína clave en la activación de la vía en respuesta a los nutrientes del medio, específicamente a la presencia de diferentes fuentes de carbono (como por ejemplo glucosa) necesarias para el metabolismo celular.

La proteína G heterotrimérica juega un papel fundamental en la activación de la vía PKA, teniendo como una función clave intermedia en este proceso, la activación de la enzima adenilato ciclasa responsable de la síntesis de AMPc, molécula que tiene una participación preponderante en diferentes procesos metabólicos en los diferentes tipos celulares. La alta conservación de las secuencias de los genes que codifican para la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica ( $G\alpha$ ) sugiere fuertemente la importancia de esta proteína en el proceso y lo hacen un blanco atractivo para dilucidar el papel de esta proteína en el sensado de nutrientes en el medio, en la diferenciación y en la respuesta celular a dichas condiciones, por lo que se pretende, mediante la delección del gen que codifica para la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica, generar mutantes de *Y. lipolytica* que posiblemente serán deficientes en el sensado de glucosa en el medio.

El uso del organismo dimórfico *Y. lipolytica*, y las mutantes creadas permitirán analizar el comportamiento celular, en respuesta a la presencia de glucosa en el medio, al mismo tiempo que permitirá identificar el papel de la vía PKA en el dimorfismo de este organismo.

### 3. HIPÓTESIS

La delección del gen que codifica para la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica ( $G\alpha$ ), es esencial para el sensado de nutrientes a través de la activación de la vía PKA y en la diferenciación celular en el organismo modelo *Yarrowia lipolytica*.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

- Determinar la función de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica, en el sensado de glucosa y en la diferenciación celular del hongo dimórfico *Y. lipolytica*.

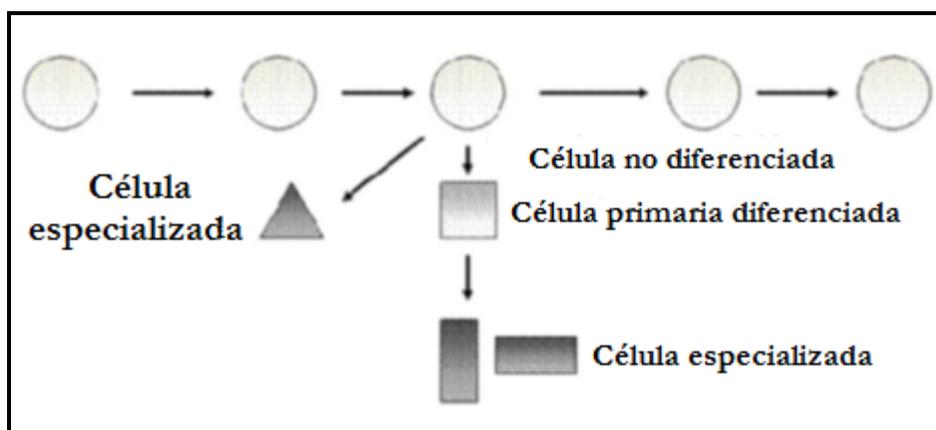
#### 4.2 Objetivos específicos

- Búsqueda *in silico* de la(s) secuencia(s) del (os) gen(es) que codifica(n) para la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica.
- Generación de mutantes de *Y. lipolytica* por delección del(os) gen(es)  $G\alpha$ .
- Caracterización genotípica de las mutantes (células que carecen del gen que codifica a la subunidad  $\alpha$ ).
- Caracterización fenotípica (velocidad de crecimiento y diferenciación) de las mutantes en respuesta a diferentes concentraciones de glucosa.

## 5. ANTECEDENTES

Las condiciones ambientales inducen el crecimiento y la diferenciación celular, estas condiciones son principalmente la disponibilidad de nutrientes (fuentes de carbono o nitrógeno), cambios en la temperatura, pH, entre otros. Se ha dicho que en general, temperaturas bajas, pH ácido o altas concentraciones de glucosa estimulan la producción de formas unicelulares (Karkowska-Kuleta, Rapala-Kozik & Kozik, 2009), pero esto puede cambiar dependiendo de cada especie.

Tomado en términos generales, el fenómeno de diferenciación celular puede dar lugar a células especializadas, ya sea, directamente como ocurre en los hongos, o directa e indirectamente como ocurre en células eucariotas de organismos superiores. En algunos organismos la diferenciación termina con la producción de varios tipos de células que difieren en forma y/o función, sin embargo, en otros organismos, las células madre dan lugar a otras líneas celulares con características diferentes, tal es el caso de organismos superiores como el ser humano.



**Figura 1. Representación esquemática general de un fenómeno de diferenciación celular.** Tomado de Ruíz-Herrera & Campos-Góngora, 2012.

En el análisis de los fenómenos de diferenciación, es importante conocer si existen algunas otras reacciones o componentes que son comunes al proceso

de diferenciación mostrados por los diferentes organismos. En el caso del dimorfismo en hongos hay vías comunes que disparan este proceso. La complejidad de estos fenómenos requiere el entendimiento de ciencias como la física, química, bioquímica, biología molecular, genética, etc. que en un conjunto permiten el abordaje de estos sucesos, y en consecuencia su desciframiento (Ruiz-Herrera & Campos-Góngora, 2012).

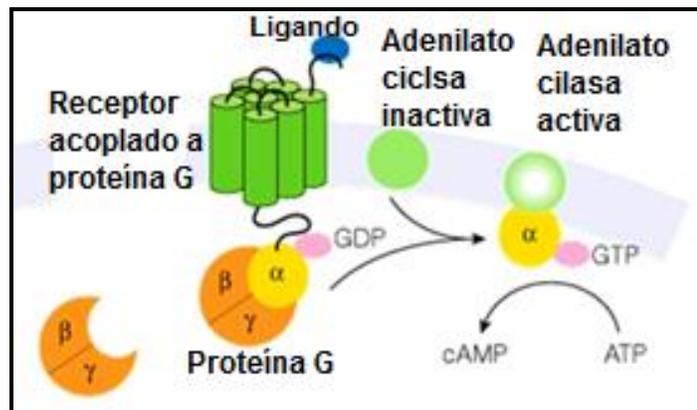
Ruiz-Herrera y Campos-Góngora (2012) proponen que el estudio del fenómeno de diferenciación celular se podría dividir en 4 pasos, como a continuación se presenta:

1. Recepción de estímulos. Los procesos de diferenciación son provocados por diferentes estímulos; estos estímulos son recibidos por receptores que perciben la señal correspondiente.
2. Decodificación de estímulos. Proceso que transforma la información a través de estímulos dentro de un lenguaje que la célula o el organismo comprende. Es necesario que este tipo de reacciones se den en cadena o en cascada, generalmente son conocidas como vías de transducción de señales.
3. Cambio en el programa. A través de su operación, la información recibida va a cambiar la condición establecida en el estado estacionario de la célula u organismo en los niveles transcripcional, traduccional y post-traduccional, dando lugar a la creación de un programa diferente y una nueva condición de estado estacionario.
4. Reacción final. Esta etapa comprende la expresión de los cambios en la fisiología y/o la morfología de una manera cuantitativa y cualitativa. Las alteraciones en la estructura de la célula u organismo dependen de estos procesos, en contraste con los otros fenómenos.

## 5.1 Vías de señalización celular

En la célula, en la primera instancia o recepción del estímulo, juega un papel preponderante los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), éstos constituyen la mayor familia de receptores transmembranales responsables de la transferencia de señales extracelulares al interior de la célula (Meller, 2003; Xue, C., Bahn, Y., Cox, G., & Heitman, J., 2006).

En segunda instancia o segundo paso (decodificación del estímulo), con el fin de llevar la información al núcleo se produce la actividad de las vías de transducción de señales. A pesar de la diversidad de señales que puede desencadenar el fenómeno de transición dimórfica, las vías que transmiten este fenómeno están altamente conservadas en los hongos, ver figura 2.



**Figura 2. Vía de señalización celular.** Esquema donde se muestra la unión del receptor acoplado a Proteína G (GPCR), que se encuentra en la membrana de la célula, y la disociación de la proteína G heterotrimérica, permitiendo la liberación de la subunidad alpha (unida a GTP), la cual activa a la adenilato ciclasa, proteína que se encuentra involucrada en la síntesis de AMPc, segundo mensajero involucrado en cascadas de fosforilación. Tomado de Thevelein y de Winde, 1999.

Existen dos vías de señalización que controlan la morfogénesis en organismos eucariotas como las especies del reino Fungi, estas vías fueron identificadas en la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*; los resultados descritos por Lengeler y colaboradores en el 2000 lo muestran claramente: la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y la vía de transducción de señales, proteína quinasa activada por AMPc (Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.-C., Wang, P., 2000). Estudios recientes han permitido la identificación y caracterización de homólogos de los componentes de estas vías en diferentes especies de hongos y en otras especies incluyendo a los mamíferos, en donde en este tipo de organismos superiores las mutaciones son expresadas como patologías (Huso, Edie, Levine, Schwindinger, Wang & Jüppner, 2011).

## **5.2 MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno)**

La proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), contiene un dominio conservado en el circuito de activación de la quinasa en el que la treonina y la tirosina deben ser fosforiladas para lograr la activación (Palacios, L., Dickinson, R. J., Sacristán-Reviriego, A., Didmon, M. P., Marín, M. J., Martín, H., 2011). Esta vía de transducción de señales, ha demostrado estar involucrada en el dimorfismo, cuenta con un sistema formado por tres proteínas quinasas que actúan en sucesión, normalmente se mantienen juntas a través de su asociación con una proteína de andamiaje, más el receptor de señal y una proteína G heterotrimerica o una pequeña proteína llamada Ras. La señal desencadena una serie de reacciones de fosforilación sucesivas por las proteínas quinasas denominadas en orden: MAPKKK, MAPKK y MAPK que al final, son responsables de la fosforilación de las proteínas que, como ocurre en el caso de la vía PKA, son responsables del fenómeno de diferenciación celular (Ruíz-Herrera & Campos-Góngora, 2012). La operación de ambas vías pueden ser sinérgicas, es decir estar activas al mismo tiempo para el cambio dimórfico; o antagónicas, estar presentes solo una de las dos vías o ambas pero solo una

de ellas estará involucrada en la adquisición de una morfología diferente. Estudios demuestran que en *S. cerevisiae* las vías operan sinérgicamente para la formación de levadura (Gancedo, 2001; Kronstad, J., De Maria, A., Funnell, D., Laidlaw, R., Lee, N., de Sá, M., 1998).

Un fenómeno similar se observó con *Y. lipolytica*, donde el desarrollo de micelio requiere una vía funcional de MAPK (Cervantes-Chávez, Kronberg, Passeron & Ruiz-Herrera, 2009), y en donde el crecimiento como levadura no se produjo cuando se encuentra mutada la subunidad catalítica de la vía de PKA dependiente de AMPc (Cervantes-Chávez & Ruiz-Herrera, 2006).

Cuando ambas vías no son funcionales, el organismo adopta un crecimiento en forma de levadura, lo que sugiere que este es el valor predeterminado morfológicamente del hongo (Cervantes-Chávez, Kronberg, Passeron & Ruiz-Herrera, 2009).

Algunos componentes de la cascada de señalización de MAP kinasas requeridos para la diferenciación en forma de micelio, incluyen el factor de transcripción Ste11, el cual se ha visto que interviene en la expresión de genes que se ven involucrados en la vía de MAP kinasas, condicionando al dimorfismo de la levadura. Los resultados de Cervantes-Chávez y Ruiz-Herrera (2006) demuestran que la vía MAPK es esencial para la diferenciación celular y el apareamiento en *Y. lipolytica* (Cervantes-Chávez & Ruiz-Herrera, 2006).

### **5.3 PKA (proteína quinasa activada por AMPc)**

En la vía PKA, proteína quinasa dependiente de AMPc, la glucosa, como nutriente específico juega un papel determinante (Palacios *et al.*, 2011).

La vía PKA inicia con la acción de la proteína receptora acoplada a proteínas G (GPCR's), las cual se encuentran ancladas en la membrana, y actúan como receptores (en el caso de los estímulos externos, tales como cambios en la calidad y cantidad de nutrientes, pH, luz, temperatura, etc.) y unidas a las

proteínas G, (también llamadas proteínas G heterotriméricas), las cuales están conformadas por tres subunidades: alpha, beta y gamma. En su forma inactiva la proteína G se encuentra unida a GDP y cuando existe la señal extracelular, captada por GPCR, la proteína G sufre una disociación, entonces la subunidad alpha, la cual juega un papel protagónico, se une a GTP adquiriendo así su forma activa e interactúa con la enzima adenilato ciclasa (AC), que es la responsable de la síntesis de AMPc. El AMPc sintetizado por AC actúa como segundo mensajero y tiene la función de activar al complejo PKA, que está formado por cuatro subunidades: dos subunidades catalíticas y dos subunidades reguladoras. Por efecto del AMPc, la PKA se disocia y las subunidades catalíticas son las encargadas de fosforilar proteínas y participar a nivel transcripcional, regulando la expresión de genes responsables del crecimiento, proliferación celular, diferenciación, supervivencia, entre otros (Hardie, 2014).

Cuando el receptor que se encuentra en la membrana de la célula recibe una señal, se desencadena una reacción; ésta es la estimulación a la disociación de la subunidad  $\alpha$  ( $G\alpha$ ), de la proteína G heterotrimérica, del heterodímero  $\beta\gamma$ , es así como la cascada de señalización continúa estimulado o inhibiendo a la adenilato ciclasa, iniciando la transferencia de la señal. Los estudios que confirman el funcionamiento de esta vía en hongos, se han realizado en una variedad de especies. A pesar de la alta conservación de genes que codifican a los componentes de la vía en diferentes especies parece que hay un control diferencial en las diferentes especies de hongos; por ejemplo, la síntesis de AMPc, por medio de la vía PKA activa el crecimiento filamentoso (forma de micelio) en *S. cerevisiae*, mientras que el AMPc juega un papel negativo inhibiendo el crecimiento filamentoso en el hongo *Ustilago maydis* (Lengeler *et al.*, 2000).

Los estudios sobre el fenómeno de transición dimórfica de *Y. lipolytica* sugieren que las vías de MAPK y PKA en este fenómeno juegan papeles opuestos. Los datos confirman que las vías de MAPK y PKA operan en

oposición en el comportamiento dimórfico de *Y. lipolytica*, y de manera sinérgica en el apareamiento. Estos datos resaltan la idea de que en diferentes hongos ambos sistemas de transducción de señales pueden funcionar, o incluso ser antagónicos o sinérgicos en la coordinación de las respuestas celulares a estímulos diferentes en el medio (Cervantes-Chávez *et al.*, 2009).

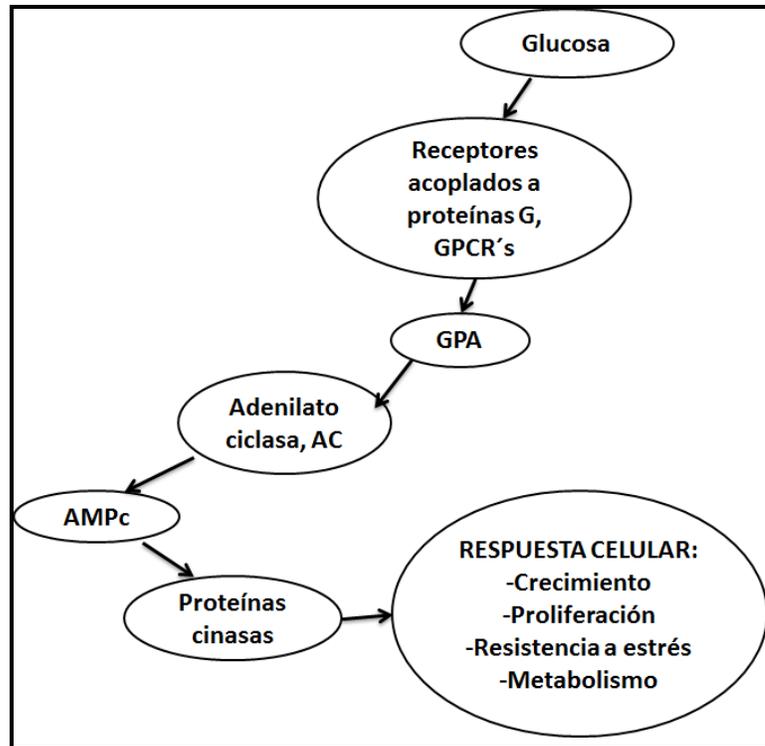
#### **5.4 Proteína G heterotrimérica**

La señalización celular es uno de los procesos requeridos para el crecimiento y desarrollo de la célula; como se mencionó anteriormente este es el proceso básico que ayuda a las células a través de varias señales del medio a sobrevivir. Una de las cascadas de señalización más importantes, la vía PKA, dependiente de AMPc, está conformada por las proteínas de unión a GTP, o simplemente conocidas como proteínas G (Tuteja, 2009).

La proteína G heterotrimérica es la parte intracelular que interactúa con proteínas de 7 dominios transmembranales denominados GPCRs, (receptores acoplados a la proteína G); la proteína G se conforma de tres subunidades:  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ , la cuales están asociadas con la parte intracelular de las GPCRs (García-Rico, Martín & Fierro, 2011; Tuteja, 2009).

El estado inactivo de la proteína G heterotrimérica, está conformado de la unión de GDP a la subunidad  $G\alpha$ ; tras la unión del ligando-receptor, la proteína G adopta una conformación activa y actúa como un factor de intercambio de nucleótidos de guanina hacia la proteína G heterotrimérica, catalizando la sustitución de GDP a GTP en la subunidad  $\alpha$ , (Egger-Adam & Katanaev, 2010) mientras que el heterodímero de  $G\beta$  y  $G\gamma$  se unen fuertemente. Lo anterior es esencial para el funcionamiento acoplado a GPCRs (McCudden, C., Hains, M., Kimple, R., Siderovski, D., & Willard, F., 2005; Mehrabi, R., Ben M'Barek, S., Van Der Lee, T., Walwijk, C., De Wit, P., & Kema, G., 2009).

Después de la activación del receptor y del intercambio GDP y GTP, se forma un monómero  $G\alpha$ -GTP y un heterodímero  $\beta\gamma$  (Egger-Adam & Katanaev, 2010), implicados cada uno de ellos en distintos procesos.



**Figura 3. Cascada de señalización producida por un efector en el exterior de la célula.** En dicha cascada se desencadena una serie de reacciones en cadena lo cual condiciona al organismo a una respuesta, como el metabolismo, el crecimiento y proliferación celular, la resistencia al estrés, entre otros. Modificado de Thevelein y de Winde, 1999.

### 5.5 La subunidad alpha de la proteína G

Como se mencionó anteriormente, la proteína G heterotrimérica está compuesta de 3 subunidades, alpha, beta y gamma, donde beta-gamma forman un complejo (heterodímero  $\beta\gamma$ ) implicado en procesos como el control de los canales de potasio hacia el interior de la célula, y contribuye en las vías inhibitorias de neurotransmisores de señalización (Styler *et al.*, 2010). Parte de la evidencia existente con respecto a organismos superiores como los humanos, afirma que la señalización producida por el complejo  $G\beta\gamma$  ha sido

implicada en la patofisiología de varias enfermedades, lo que sugiere que dicho complejo podría ser un importante objetivo farmacéutico (Dessal, Prades, Giralt & Smrcka, 2011).

Mientras que la subunidad alpha tiene una participación más dinámica a través de su interacción con GDP y GTP, el intercambio de nucleótidos de guanina, uniéndose a la subunidad alpha de la proteína permite la disociación de sus dímeros y convierte a la proteína G en su forma activa,  $G\alpha$  está implicada en numerosos procesos, siendo ésta una proteína clave en la vía PKA, dependiente de AMPc, hay reportes que muestran la estrecha vinculación de la vía PKA con la diferenciación celular (Cervantes-Chávez *et al.*, 2009; Domínguez, Fermiñan & Gaillardin, 2000; Mehrabi *et al.*, 2009) y el sensado de nutrientes (Özcan, Dover & Johnston, 1998; Rolland, Winderickx & Thevelein, 2002; Szabo & Stofanikova, 2002).

En organismos superiores como el ser humano la importancia de  $G\alpha$  está implícita en varios mecanismos, como en la homeostasis celular, alterando su correcto funcionamiento, una función deficiente de la subunidad alpha de la proteína G condiciona a patologías como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, osteodistrófias, enfermedades endócrinas, entre otras, etc. (Huso *et al.*, 2011; Juneja & Casey, 2009; Lania, Mantovani & Spada, 2001).

Estudios de homología de secuencias han demostrado que la subunidad alpha está altamente conservada en diferentes especies representativas de todos los phylum, entre las que se pueden citar *S. cerevisiae*, *Mucor circinelloides*, *Y. lipolytica* (Cervantes-Chávez & Ruiz-Herrera, 2006; Cervantes-Chávez *et al.*, 2009), *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, y otros hongos patógenos de plantas como *Ustilago maydis*, *Magnaporthe grisea*, *Cryphonectria parasitica*, *Colletotrichum*, y especies *Fusarium* y *Erysiphe graminis* (Lengeler *et al.*, 2000; Lee, D'Souza & Kronstad, 2003; Ruíz-Herrera & Campos-Góngora, 2012). Además se ha demostrado su importancia debido a

su alta conservación en homólogos en especies como tiburones, pez espada y el ser humano (Oka, Saraiva, Kwan, & Korsching, 2009).

### **5.6 Papel de la subunidad alpha de la proteína G (G $\alpha$ ) en humanos**

En humanos, existen evidencia que indican que mutaciones en el gen que codifica para la subunidad alpha (G $\alpha$ ) pueden alterar las funciones de la proteína, causando pseudohipoparatiroidismo (Lania, Mantovani & Spada, 2001), las mutaciones de la proteína G pueden causar alguna pérdida o ganancia de su función a través de la activación o inactivación de las vías de transducción de señales, lo cual conduce al fenotipo clínico en el ser humano.

También se vincula a las proteínas G con enfermedades como la Osteodistrofia hereditaria de Albright, (AHO) la cual es típica de signos y síntomas como una baja estatura, braquidactilia y a menudo osificaciones heterotópicas que son por lo común subcutáneas. Estas osificaciones subcutáneas (OCS) provocan una morbilidad considerable en AHO sin un tratamiento eficaz. AHO es causada por mutaciones en los exones del gen G $\alpha$  (Huso *et al.*, 2011).

Además, existen reportes en los que el papel patógeno de las mutaciones ocurren en genes de la proteína G en enfermedades endocrinas, de los cuales se han identificado 2 proteínas G que albergan mutaciones en humanos, Gsa, el activador de la adenilato ciclasa, y Gi2a que está implicado en varias funciones, incluyendo la inhibición de la adenilato ciclasa y la modulación de los canales iónicos. Con lo que respecta a las mutaciones de Gsa, éstas causan pseudohipoparatiroidismo 1<sup>a</sup>, en el que características físicas de la osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO) se asocian con la resistencia a varias hormonas, como, la hormona paratiroidea (PTH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropinas, que activan los receptores acoplados a las proteínas G; en el caso de las mutaciones en el gen Gi2a, éstas se han encontrado en un

subgrupo de cáncer de ovario, tumores suprarrenales y la glándula pituitaria, sin embargo su prevalencia y significancia son objeto de controversia (Lania, Mantovani & Spada, 2001).

Las proteínas G median señales extracelulares desde la membrana celular por medio de los receptores acoplados a la proteína G. Estas proteínas intervienen en la señalización y se han implicado en varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Se han clasificados varias familias de las proteínas G, de las cuales se han identificado un número de efectores directos e indirectos de las subfamilias GA12 y GA13, y se han propuesto para mediar las diversas respuestas celulares que acompañan a la activación de las proteínas G12 en seres humanos. Las vías de señalización celular y los eventos estimulados por proteínas G12, son procesos importantes en la regulación de la migración celular y la invasión, ya que podrían estar involucrados en la fisiopatología de la metástasis del cáncer; tal estudio muestra resultados donde directamente se implican a las proteínas de la subfamilia G12 en la propagación de la enfermedad metastásica, lo que indica la importancia de la inhibición selectiva de señalización G12 como una opción terapéutica potencial para la enfermedad avanzada y localizada del cáncer metastásico (Juneja & Casey; 2009).

La relación que existe entre el polimorfismo T393C del gen que codifica para la subunidad alpha ( $G\alpha$ ) en humanos es un marcador que sirve como pronóstico de cáncer colorectal en las etapas I y II, se ha demostrado que la vía en donde está involucrada la proteína G está vinculada con una señalización proapoptótica, es decir, programación de muerte celular, en las células cancerosas, siendo el factor genético para la progresión de la enfermedad de carcinoma de células transicionales; en un estudio realizado en pacientes con este polimorfismo se puede observar que la supervivencia fue significativamente mayor en los genotipos TT en comparación con CC, lo cual deja al descubierto que tal mutación es condicionante a padecer mayor riesgo a desarrollar cáncer colorectal, el cual es uno de los tipos de cáncer más

frecuentes en la población (Frey, Alakus, Wohlschlaeger, Schmitz, Winde, van Calker & Schmid, 2005).

Otra intervención que se ha encontrado a la proteína G heterotrimérica y su sistema de señalización ha sido su papel en el control de las respuestas celulares a numerosos neurotransmisores hormonales, los cuales están implicados en la homeostasis del sistema cardiovascular. Datos acumulados indican la existencia de proteínas que influyen en la disociación de las subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), afectando el intercambio de nucleótidos de guanina, alterando así las interacciones dentro de las subunidades, e inactivando o activando a la proteína G heterotrimérica; tales proteínas pueden proporcionar una señal adicional de entrada al sistema de señalización de la proteína G, en ausencia de GPCR. La información existente sugiere que las proteínas accesorias de las proteínas G están realmente involucradas en la regulación del sistema de señalización para mantener la homeostasis y las respuestas dinámicas a los retos fisiológicos y patológicos en la célula. La pérdida de la regulación de este sistema, da lugar a la activación inapropiada o inactivación de la señalización de la proteína G, la cual se encuentra fuertemente implicada en diversas enfermedades humanas (Lania, Mantovani & Spada, 2001).

### **5.7 Vía PKA en los procesos de diferenciación celular**

Como se ha mencionado anteriormente en los hongos existen dos vías principales de transducción de señales, que han sido relacionadas con el dimorfismo: la vía MAPK quinasa y la vía PKA dependiente de AMPc (Banuett, 1998).

La participación de la vía de las proteínas quinasas dependientes de AMPc (PKA) es activada cuando la glucosa es añadida a células que consumen esta fuente de carbono, ya que se observa un incremento en el AMPc (Özcan, Dover & Johnston, 1998; Rolland *et al.*, 2000), y esto condiciona a la célula a determinada morfología.

Dentro de los procesos de diferenciación celular se ha encontrado que la mayoría de los mecanismos de sensado existen en los diferentes tipos de células, estos mecanismos activan a otras moléculas de señalización, y éstas a su vez activan una serie de cascadas que cambian la programación del desarrollo de la célula.

Existe evidencia que afirma que la presencia de glucosa en el medio es responsable de la activación de la vía PKA, de la misma manera ocurre cuando se añade glucosa a las células que crecen en un medio no fermentable de carbono o en las células en fase estacionaria (Rolland, Winderickx & Thevelein, 2002).

Se ha observado que en el modelo de estudio *S. cerevisiae*, cuando se le adiciona en el medio una fuente de carbono fermentable para su crecimiento tal como la glucosa, este organismo muestra una gama de fenotipos lo que indica una alta actividad de la vía PKA (Ramachandran & Herman, 2011).

El control de la actividad PKA se da por la presencia de glucosa, ésta puede ser detectada a través de dos procesos: uno intracelular, proceso que implica la detección de las enzimas hexosas y el sistema de detección de la glucosa extracelular que implica a los receptores acoplados a las proteínas G, (GPCRs), sistema, Gpr1-Gpa2 (Rolland, Winderickx & Thevelein, 2002).

## **5.8 Papel de la glucosa en la diferenciación celular**

La participación o efecto que tiene la glucosa como fuente de carbono, no solamente tiene efectos en la regulación del metabolismo, sino que en muchas otras propiedades de las células, como la diferenciación, este mecanismo tiene vinculación con la vía PKA; en donde están involucrados varios sensores y por supuesto vías de señalización, como sensores de glucosa podemos mencionar los Snf3 y Rgt2, los cuales controlan la expresión de muchos transportadores de glucosa, recientemente varios componentes de la vía de inducción de la

glucosa se han identificado como la vía Ras- AMPc, la cual controla procesos como la proliferación celular, ya que la glucosa es un potente activador de la síntesis de AMPc. Como parte de los avances en los últimos años el estudio de la glucosa como nutriente que participa en la detección y señalización en la levadura, como célula eucariota ha avanzado, con lo cual se pretende esclarecer los mecanismos de detección de nutrientes por las células eucariotas (Rolland, Winderickx & Thevelein, 2002; Rolland *et al.*, 2000).

El fenotipo está dado por la expresión del genotipo en respuesta al ambiente, por lo tanto el fenotipo y el genotipo de los individuos está ligado (Kornberg, 1999); generalmente el flujo de la información genética comienza en los genes y termina con la síntesis de proteínas, que dan como resultado el fenotipo de un organismo. En el caso del proceso de diferenciación celular como en la mayoría, el principal punto de regulación de la expresión de los genes se da a nivel de la transcripción.

### **5.9 El hongo *Yarrowia lipolytica* como modelo de estudio**

Actualmente cerca de diez especies del grupo de las llamadas levaduras “no convencionales” han sido estudiadas, con respecto a su fisiología, genética, biología molecular, aplicaciones industriales, aplicaciones biotecnológicas, etc. *Y. lipolytica* es una de las especies de este grupo más estudiadas, utilizada para múltiples aplicaciones. Esta levadura fue nombrada originalmente como *Candida lipolytica*, pero con la observación de que algunas mezclas de las cepas tenían la capacidad para formar ascosporas, es decir, que tiene un ciclo sexual, el hongo fue reclasificado y llamado *Endomycopsis lipolytica*, *lipolytica Saccharomycopsis*, y finalmente *Yarrowia lipolytica* (Jiménez-Bremont, Rodríguez-Hernández & Rodríguez-Kessler, 2012). Esta levadura tiene la capacidad de metabolizar diversos residuos industriales y agroindustriales para la producción de proteínas, aceites, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico y 2-cetoglutámico.

*Y. lipolytica* ha sido clasificada como “GRAS” (Generally Recognized as Safe) por la American Food and Drug Administration (FDA), debido a su incapacidad para crecer en temperaturas superiores a 34 °C se le considera no patógeno en humanos.

*Y. lipolytica* ha sido aislada de diferentes fuentes alimenticias como la leche y sus derivados, queso, yogurt, kéfir, salsa de soya, carne, camarones, embutidos y también de yacimientos petrolíferos. Esta levadura presenta la habilidad de degradar aceites e hidrocarburos (Jiménez-Bremont, Rodríguez-Hernández & Rodríguez-Kessler, 2012).

Algunas ventajas y características de *Y. lipolytica* son:

- ✓ Degradación de hidrocarburos alifáticos y metales pesados.
- ✓ Degradación de aceites y ácidos grasos.
- ✓ Acumulación de ácidos orgánicos.
- ✓ Secreción de proteínas heterólogas.
- ✓ Análisis del dimorfismo en los hongos.
- ✓ Síntesis de enzimas, como lipasas, esterasas, proteasas y fosfatasas.
- ✓ Tratamiento de aguas residuales.

La facilidad de cultivar este tipo de organismo en el laboratorio, además de ser células eucariotes, hacen de los hongos un modelo atractivo en la industria biotecnológica, agrícola, médica y por supuesto en el campo de la salud.

Como se ha mencionado, *Y. lipolytica* ha sido utilizada para la recuperación de ambientes contaminados con agentes dañinos como metales pesados e hidrocarburos, por ejemplo, esta levadura aeróbica se utilizó en la reparación de ambientes marinos y suelos contaminados por productos derivados del petróleo (Zógalá *et al.*, 2005), *Y. lipolytica* tiene la ventaja de que puede sobrevivir en condiciones extremas, en ambientes con altas concentraciones de metales, NaCl, metales pesados y diferentes contaminantes (Kim, Kang, Woo, Lee & Chul, 2007).

Debido a su importancia biológica, la secuencia completa de los seis cromosomas que componen el material genético de *Y. lipolytica* fue obtenida, el genoma tiene un tamaño de 20.5 Mb. Estudios han revelado que esta levadura está lejanamente relacionada con la levadura convencional *S. cerevisiae* cuyo genoma tiene un tamaño de 12.4 Mb dividido en dieciséis cromosomas (Thevenieau, Nicaud & Gaillardin, 2009).

Debido a todas las características antes mencionadas, el estudio del hongo *Y. lipolytica* ha dado lugar a extensas revisiones de sus diferentes características.

El dimorfismo implica grandes cambios en la fisiología celular y la morfología en respuesta a señales externas, la morfología colonial es diversa, se han observado colonias lisas y brillantes hasta opacas y rugosas; factores como la aireación, fuente de nitrógeno, fuente de carbono, pH, entre otros, son los que influyen determinando la morfología colonial, lo que hace a este fenómeno un modelo excelente para el estudio de los procesos de diferenciación que ocurren en los organismos eucariotas (Beckerich, Boisramé-Baudevin & Gaillardin, 1998; Ruíz-Herrera, 2012).

Dimorfismo es la capacidad de los hongos de crecer en forma de levadura como las células que se multiplican a través de gemación, o en forma de hifas o micelio caracterizado por crecimiento apical, dependiendo de las condiciones ambientales o en respuesta a estímulos internos. El dimorfismo y la capacidad de crecer como levaduras unicelulares o formas filamentosas multicelulares, permiten a los hongos adaptarse a diferentes condiciones, o al desarrollo con morfologías distintas, dependiendo de su estado de desarrollo. En la naturaleza, este fenómeno es empleado por los hongos no sólo como una forma de adaptarse a las nuevas condiciones existentes y sobrevivir sino que desarrollan funciones específicas durante su ciclo de vida, y algunos todavía más sorprendente que utilizan esta capacidad para, de cierta forma, asegurar la infección con un huésped, como ocurre con los hongos patógenos de plantas y/o seres humanos (Ruíz-Herrera & Campos-Góngora, 2012).

### **5.10 Estudios de diferenciación celular en *Y. lipolytica***

La diferenciación celular ha sido definida como “la serie de eventos bioquímicos, que cuidadosamente en el tiempo y en el espacio dan lugar a la especialización de la célula sin alterar sus características genéticas” (Ruíz-Herrera & Campos-Góngora, 2012).

La importancia del dimorfismo radica en la posibilidad de estudiar este fenómeno en hongos, ya que estos son excelentes modelos para la comprensión de los procesos de diferenciación celular en organismos eucariontes.

El dimorfismo fúngico en estudios de diferenciación celular es importante ya que al estudiar este fenómeno en este tipo de organismos permite saber el comportamiento que tendrá la célula, esto se reduce a dos formas únicamente, lo cual minimiza la dificultad de interpretar los resultados, en comparación con estudios sobre células madre en las que la diferenciación es múltiple.

Para fines experimentales es necesario hacer uso de la gama que existe de organismos modelo, y para seleccionar alguno, es necesario tener en cuenta ciertos criterios como son: el tiempo de duplicación del organismo, el costo de mantenimiento, la accesibilidad del laboratorio, entre otros.

*Y. lipolytica* no es un hongo patógeno de humanos, por lo que se ha utilizado como un excelente modelo para el estudio del dimorfismo fúngico, ya que puede ser sometido a manipulación y transformación genética (Jiménez-Bremont, Rodríguez-Hernández & Rodríguez-Kessler, 2012), tiene la propiedad de diferenciarse en las formas de levadura o micelio, en función de las condiciones presentes en el medio.

Bajo una variedad de condiciones, *Y. lipolytica* sufre cambios morfológicos lo cual es un indicio de la presencia de diferentes vías de señalización que estimulan la transición dimórfica (levadura-micelio) (Pérez-Campo & Domínguez, 2001), esta variedad de condiciones en el medio se refiere a la

fuente de carbono, fuente de nitrógeno (Szabo & Stofanikova, 2002), al citrato, pH, concentración de gases O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002) como principales efectores responsables de estos cambios en la célula.

### **5.11 Factores que inducen el dimorfismo en *Y. lipolytica***

La presencia de determinados compuestos en el medio, también llamados efectores o factores inducen las características morfológicas en el hongo *Y. lipolytica*; Ruiz-Herrera y Sentandreu (2002) analizaron el fenómeno del dimorfismo, reportando que a un pH de alrededor de 7 (pH neutro), *Y. lipolytica* es capaz de diferenciarse en forma de micelio, mientras que a un pH con valor de 3, el crecimiento de las células fue en forma de levadura.

En el mismo estudio, los autores también demostraron que la adición de AMPc a cultivos celulares de *Y. lipolytica* en condiciones que normalmente inducen el crecimiento en forma de micelio, inhibió el proceso de diferenciación, y el hongo creció mayoritariamente en forma de levadura (Ruiz-Herrera & Sentandreu, 2002).

Rodríguez y Domínguez (1984) hicieron referencia al efecto que provoca la fuente de carbono. En este estudio los autores indicaron que el uso de N-acetilglucosamina (GlcNAc) induce el crecimiento de las células en forma de micelio. De la misma forma se induce el crecimiento en forma de micelio con glucosa como fuente de carbono, o con la adición de suero al medio de cultivo (Pérez-Campo & Domínguez, 2001; Kim, Cheon, Park, Song, & Kim, 2000).

Por otra parte, la mutación del gen que codifica para la subunidad catalítica de PKA (TPK1) permitió evidenciar que la vía PKA es antagonista a la vía MAPK en lo que respecta al dimorfismo celular, ya que las cepas que tenían esta mutación fueron monomórficas y crecieron únicamente en la forma de micelio (Torres-Guzmán & Domínguez, 1997).

El gen STE11, forma parte de la ruta de las MAP cinasas de *Y. lipolytica*, el cual tiene una participación en el proceso de dimorfismo del hongo (Cervantes-Chávez & Ruíz-Herrera, 2006). Torres-Guzmán y Domínguez (1997), observaron que las dobles mutantes para el gen que codifica para el factor de transcripción STE11 y el gen que codifica para la subunidad catalítica de PKA ( $\Delta$ STE11/ $\Delta$ TPK1) crecieron sólo en la forma de levadura.

Los estudios anteriores nos indican que existen varios factores que inducen el dimorfismo en *Y. lipolytica*; las dos vías principales en señalización en hongos, PKA y MAPK, pueden operar en sinergia o contraposición, todo esto depende de que organismo se trate; a su vez existen varias proteínas clave durante el proceso de la señalización que su correcto funcionamiento o presencia/ausencia limita a la célula a una forma únicamente; así como la fuente preferida de carbono, la glucosa, regula el comportamiento morfológico del organismo.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Materiales

Los reactivos utilizados en las diferentes técnicas empleadas, se obtuvieron de las siguientes marcas comerciales (ver tabla 1).

Marca comercial	Reactivos
Bio-Rad	Agarosa, Bromuro de Etidio, NaCl, SDS, Tris, EDTA.
Bioline	Taq DNA Polimerasa, dNTPs, MgCl <sub>2</sub> , buffer 10X, Marcadores de talla molecular Hyperladder IV y V.
Bio Basic Inc.	Etanol, Kit para purificación de DNA Spin Column DNA Gel Extraction B5353.
Alpha DNA	Oligonucleótidos.
Invitrogen	Ligasa Express Link T4, Fosfatasa Alcalina CIAP, Enzimas de restricción BamHI, EcoRI y HincII, Taq DNA Polimerasa de Alta Fidelidad, Vector Topo 4, células de <i>E. coli</i> One Shot cepa Top 10 y kit para extracción de DNA plasmídico PureLink Quick Plasmid MiniPrep K2100-10.
Promega	Enzima de restricción HindIII.
Usbiological	Medio de cultivo LB-agar, medio de cultivo LB, extracto de levadura.
Sigma	Glucosa, sorbitol, leucina, uracilo y acetato de litio.
Dibico	Peptona, agar, medio mínimo YNB: Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate.
JT Baker	Ácido cítrico.
Fluka	Polietilenglicol.
Karal	Sulfato de amonio y citrato de sodio.

### 6.1.1 Material biológico

#### Cepas de *Y. lipolytica*

Se utilizaron las cepas de *Yarrowia lipolytica*: P01A (MAT A: *ura3* -302, *leu2* -270), como control en los experimentos y como fondo genético para la construcción de la mutante  $\Delta$ GPA1 y la cepa YL-4 (*ura3* -302), recientemente aceptada como var. *indica* (Palande *et al*, 2014), para la obtención del gen marcador LEU2.

#### Cepas bacterianas

La cepa utilizada en el desarrollo de la estrategia de interrupción del gen fue: *Escherichia coli* Top 10 genotipo: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str®) *endA1* *nupG*.

#### Plásmidos

Los plásmidos que se utilizaron para los diferentes ensayos fueron: pCR TOPO 4 TA Invitrogen® para clonación de productos amplificados y productos de ligación, plásmido pCR TOPO 2.1 TA Invitrogen® que acarrea el gen nativo URA3 de *Y. lipolytica* y pCR TOPO 4 TA Invitrogen® que acarrea el gen nativo LEU2 de *Y. lipolytica*.

La obtención del gen URA3 se hizo a partir de la cepa de *E. coli* que tiene el plásmido que acarrea el gen *YURA3*. Esta cepa fue amablemente donada por el Laboratorio de Diferenciación de Hongos del Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV. La obtención del gen LEU2 se hizo a partir de la cepa de *E. coli* que tiene el plásmido con el gen *YLEU2*, previamente clonado en el vector pCR TOPO 4 de Invitrogen®.

## **6.2 Métodos**

### **Diseño del estudio**

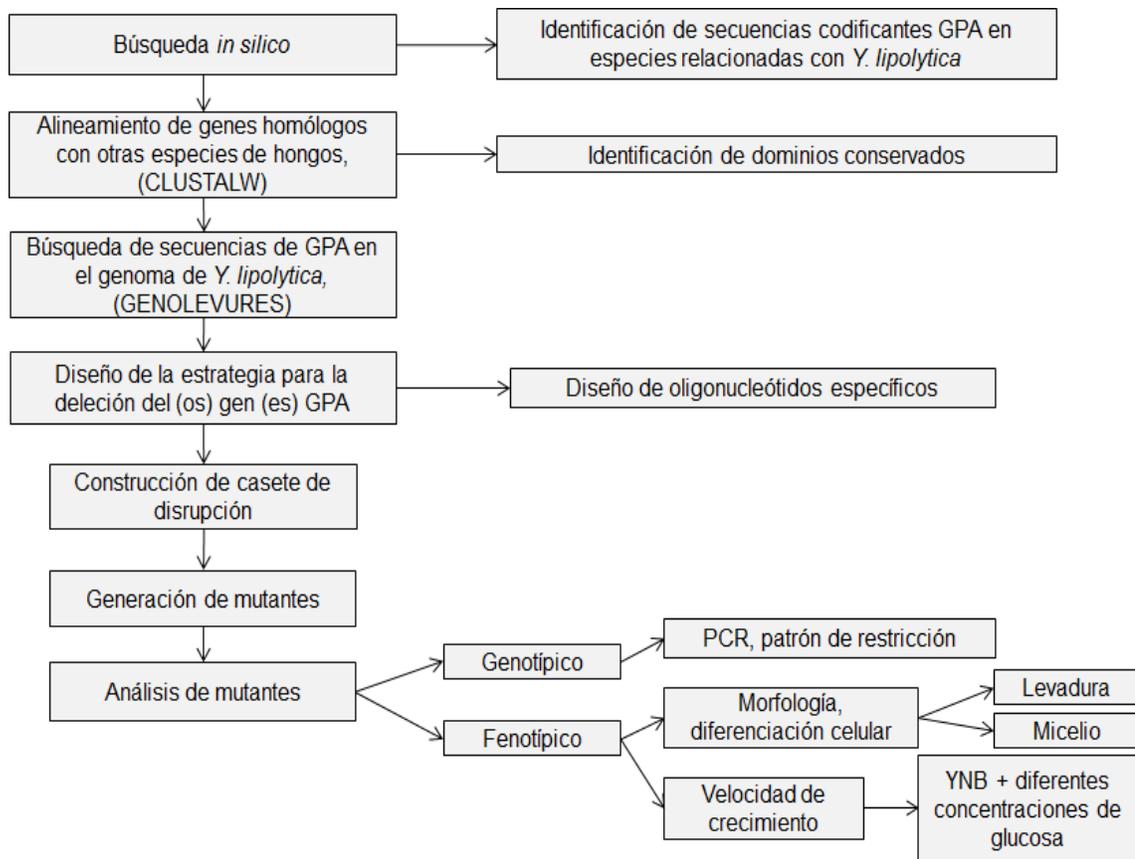
Es un estudio experimental longitudinal, que se realizó de agosto de 2012 a febrero de 2014.

La parte experimental se realizó en los laboratorios de: Proteómica, Genética y Biología Molecular, Bioquímica Nutricional y Laboratorio de Alimentos, del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública (CINSP) de la Facultad de Salud Pública y Nutrición (FaSPyN) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL.

### **Estrategia general de trabajo**

El presente estudio se enfocó en la delección de los genes GPA1 y GPA2 y en el análisis de las mutantes  $\Delta$ GPA1 de *Y. lipolytica*; se realizó en 3 etapas principales:

- I) Búsqueda y análisis *In silico* de secuencias GPA y diseño de la estrategia para la delección del gen.
- II) Construcción de los casetes de interrupción y generación de mutantes.
- III) Análisis de las mutantes.



**Figura 4. Estrategia general del trabajo**

### 6.2.1 Búsqueda y análisis *in silico* de secuencias GPA y diseño de la estrategia para la delección del gen

En la primera etapa de este trabajo se realizó la identificación de secuencias (gen y proteína) GPA de especies relacionadas a *Y. lipolytica* en bancos de datos con ayuda del programa BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2013); posteriormente se buscaron las secuencias homólogas en el genoma de *Y. lipolytica* (Génolevures, 2013).

Una vez identificada la presunta secuencia que codifica para el gen GPA de *Y. lipolytica*, se procedió al diseño de oligonucleótidos específicos para su amplificación por PCR a partir de DNA genómico.

### **6.2.1.1 Diseño de los oligonucleótidos**

Sobre las regiones codificantes y adyacentes previamente identificadas de los presuntos genes que codifican para la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica de *Y. lipolytica* se realizó el diseño de oligonucleótidos específicos para cada fragmento. La especificidad y características generales de los oligonucleótidos se comprobaron con ayuda del programa computacional OligoCalc (Northwestern University, 2013). La identificación y selección de las enzimas se hizo con ayuda del programa bioinformático NEB-Cutter, disponible de manera libre en internet (New England BioLabs, Inc., 2013).

Para construir los casetes de disrupción se utilizaron estrategias diferentes que más adelante se describen; en el caso del gen llamado GPA1 se eliminó el frente de lectura abierta (ORF) con enzimas de restricción, y en el caso del gen GPA2 fue necesario el diseño de oligonucleótidos en los extremos 5' y 3' del gen, región Promotora y Terminadora respectivamente, que permitieran su amplificación y posterior ligación al gen marcador.

Como genes marcadores para la construcción de los casetes de disrupción, se utilizaron los genes URA3 y LEU2 de *Y. lipolytica*.

### **6.2.2 Cultivo de células de *Y. lipolytica***

Para el cultivo de la cepa P01A de *Y. lipolytica* se utilizó el medio YPD líquido (2% de peptona, 2% glucosa, 1% extracto de levadura), o YPD sólido (adicionado con 2% de agar). Los cultivos para el mantenimiento de las cepas se realizaron inoculando una colonia previamente crecida en placa, en el volumen adecuado de YPD y se incubaron a 28 °C, con agitación (200 rpm), durante toda la noche, en una incubadora con sistema de agitación de la marca Shel Lab como lo describen Barth & Gaillardin, 1996.

A conveniencia se inocularon, 10 ml de medio de cultivo en un tubo de polipropileno de fondo cónico Falcon de 50 ml de capacidad o 50 ml de medio de cultivo en matraz Erlenmeyer de 250 ml de capacidad.

### **6.2.3 Extracción de DNA genómico de *Y. lipolytica***

Al día siguiente al inóculo, se procedió a extraer el DNA genómico a partir de las células cultivadas, mediante el método de ruptura de células con perlas de vidrio (Hoffman & Winston, 1987). Este procedimiento consta del rompimiento de la pared celular de las levaduras mediante fraccionamiento mecánico con perlas de vidrio, seguido por una purificación del DNA usando una mezcla de fenol-cloroformo, y posterior precipitación con etanol.

Para la extracción las células (1.5 ml del cultivo) se obtuvieron por centrifugación durante 5 min a 14000 rpm (microcentrífuga marca Eppendorf 5415D), y se resuspendieron en 0.5 ml de agua estéril; se transfirieron a un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml de capacidad, se resuspendieron y homogenizaron con agitación vigorosa (con vortex), e inmediatamente después se añadieron 0.4 ml de solución de lisis (50 mM de Tris HCl, 50 mM EDTA pH 8, 1% de SDS y 50 mM de NaCl), los tubos se colocaron en hielo molido y se agregaron 0.4 ml de fenol-cloroformo y 0.2 g de perlas de vidrio (0.45 - 0.52 mm de diámetro); después los tubos se agitaron con un vortex durante 3-4 min para romper las células. Posteriormente, se centrifugaron por 10 min a 14000 rpm a temperatura de laboratorio (25 °C). La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se añadieron 50 µl de acetato de sodio 3 M y 1 ml de etanol al 100% (frio) para precipitar el DNA. Se mezcló por inversión, y se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm, posteriormente el sobrenadante se eliminó por decantación y las pequeñas gotas que quedaron en el fondo del tubo se eliminaron por aspiración, se lavó el pellet agregando 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó 5 min a 14000 rpm, se decantó y se eliminó el etanol por aspiración con una micropipeta, se dejó secar el DNA con los tubos abiertos a temperatura de laboratorio por 5 min, y después el DNA se resuspendió en

50 µl de agua inyectable estéril (marca PISA®); los tubos se guardaron perfectamente etiquetados a -20 °C para su uso a largo plazo, o a 4 °C para su uso inmediato.

#### 6.2.4 Amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Las amplificaciones por PCR se realizaron en los termocicladores Thermo SPRINT®, AXYGEN modelo Maxygene Gradient®, o un termociclador marca Eppendorf modelo Mastercycler personal®, según se requerían para el tipo de ensayo, usando aproximadamente 100 ng de DNA genómico (DNAg) o 10 ng de DNA plasmídico (DNAp), como DNA molde para las reacciones según el análisis (Sambrook & Russell, 2001).

Los reactivos utilizados para la PCR fueron: 2 µl de oligonucleótidos (1 µM), 5 µl de una mezcla de deoxinucleótidos (dNTP's, 10 mM) más buffer para la enzima Taq polimerasa 10X, 0.5 µl de Cloruro de Magnesio (50 mM), 1 µl de la enzima Taq polimerasa Invitrogen® (5U/µl) y agua hasta tener un volumen final de 25 µl (ver tabla 2).

**Tabla 2. Composición de una reacción típica de PCR**

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
DNA templado (100 ng o 10 ng)	1
dNTP's (10 mM) + Buffer Taq (10 mM)	5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0.5
Oligonucleótido <i>sentido</i> según el caso (1 µM)	2
Oligonucleótido <i>antisentido</i> según el caso (1 µM)	2
DNA Taq polimerasa (5U/µl)	0.5
Agua bidestilada estéril (PISA®)	14
	Total 25

\*Se indican los componentes y cantidades en una reacción típica de PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron en las condiciones que se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Condiciones de una reacción típica de PCR**

<b>Etapas de la PCR</b>		<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Desnaturalización inicial		95	5
30 ciclos	Desnaturalización	95	1
	Alineamiento	58-66	1
	Extensión	72	1-4
Extensión final		72	10
Conservación		4	∞

### **6.2.5 Electroforesis en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de DNA de los ensayos realizados se hizo por medio de electroforesis en geles de agarosa (Sambrook & Russell, 2001), para lo cual se utilizó una cámara de electroforesis (modelo C. B. S. Scientific Co., marca BioRad®) y una fuente de poder Power-pac 300; los geles se prepararon pesando la agarosa (0.7%, 1% y 2%, según se requería) en una balanza de precisión (marca Startorius BL 1500), se agregó Buffer TAE (1X), (40 mM Tris-Acetato y 1 mM EDTA pH 8.0) y en una placa de calentamiento (marca Corning Stirrer/Hot Plate), se agregó 1 µl de Bromuro de Etidio (10 mg/ml), se vació en el molde, se colocó el peine para formar los pozos y se dejó gelificar. Antes de la electroforesis, los productos de la PCR se mezclaron con 2 µl de buffer de carga Orange (6X) y se depositaron en cada uno de los pozos del gel, la electroforesis se realizó bajo una corriente de 80 V durante 45 min, con el fin de lograr la separación de las bandas, éstas se identificaron en base al tamaño (número de nucleótidos) con ayuda de marcadores de peso molecular HyperLadder que se depositaron en los extremos del gel, colocándose 2 µl de marcador. Una vez realizada la separación de las bandas, éstas se visualizaron en el sistema de fotodocumentación GelDoc-It Imaging System (UVP).

### **6.2.6 Clonación de los fragmentos amplificados**

Los productos de PCR obtenidos con las distintas combinaciones de oligonucleótidos que presentaron el tamaño esperado se clonaron en el vector pCR TOPO 4 (TOPO™ TA Cloning® kit, Invitrogen®), siguiendo las especificaciones del fabricante. La clonación consistió en insertar el fragmento de interés en el vector TOPO 4. La reacción se realizó en un tubo de polipropileno con capacidad para 250 µl, para lo cual se colocaron 3 µl de producto de PCR fresco, 1 µl de solución de sales (1.2 M NaCl y 0.06 M MgCl<sub>2</sub>), 1 µl de agua estéril y 1 µl del vector TOPO 4 (10 ng/µL de DNA plasmídico en: 50% de glicerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% Tritón X-100, 100 µg/mL BSA, rojo fenol). La reacción de clonación se mezcló suavemente, se incubó durante 15 min a temperatura de laboratorio (TA 25 °C) e inmediatamente se transfirió a hielo molido (4 °C).

Una vez realizada la clonación, se procedió a la transformación de las células de *E. coli* calcio-competentes One Shot Kit (Invitrogen, 2013).

### **6.2.7 Transformación de células calcio-competentes de *E. coli***

Para la transformación se utilizaron células calcio-competentes de la cepa Top 10 de *E. coli*, como hospedadoras de los plásmidos o vectores que incorporaron los fragmentos de interés. Las células (aproximadamente cada vial contiene 50 µl de células) se descongelaron en hielo molido (para su conservación éstas se almacenan a -80 °C). Para cada reacción al vial de células se le agregaron 2 µl del producto de la reacción de clonación, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 15 min para permitir la incorporación del plásmido a las bacterias se les indujo un choque de calor a 42 °C durante 30 seg, lo cual permitió la desestabilización de la membrana; inmediatamente, el vial que contenía las células se transfirieron a hielo molido, se le agregaron 250 µl de medio S.O.C (2% Triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM de glucosa) y los tubos se incubaron horizontalmente a 37 °C con agitación (200 rpm) durante una hora.

Después de la incubación, 100-150  $\mu$ l del cultivo celular se sembraron en cajas Petri que contenían medio LB adicionadas con ampicilina (100  $\mu$ g/ml), para la dispersión de las células se utilizó un asa bacteriológica y posteriormente las cajas se incubaron a 37 °C durante toda la noche en posición invertida (Sambrook & Russell, 2001).

#### **6.2.8 Análisis de las clonas recombinantes de *E. coli***

Después de la incubación toda la noche a 37 °C, se identificaron las colonias que crecieron en el medio selectivo (placas LB adicionadas con ampicilina). Las colonias que crecieron se recogieron con ayuda de un palillo estéril y se colocaron en tubos Falcon con capacidad de 15 ml que contenían 4 ml de medio LB líquido adicionado con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina; los cultivos se incubaron a 37 °C, con agitación a 200 rpm durante toda la noche.

#### **6.2.9 Extracción del DNA plasmídico de bacterias**

Para la obtención de DNA plasmídico, se utilizó el Kit PureLink Quick Plasmid MiniPrep de la marca Invitrogen®. Del cultivo de toda la noche se cosecharon 3 ml por centrifugación y se resuspendieron agregando 250  $\mu$ l de buffer de resuspensión que contenía RNAsas (20 mg/ml) hasta que el pellet fue homogéneo. Para romper la membrana celular, se agregaron 250  $\mu$ l de buffer de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS), se mezcló suavemente por inversión y se incubó por 5 min a temperatura de laboratorio, después se precipitó agregando 350  $\mu$ l de buffer de precipitación, se centrifugó el sobrenadante del paso anterior y se trasvasó a un tubo equipado con una columna; se centrifugó por 1 min a 12000 rpm, se descartó el flujo y la columna que contuvo el DNA se colocó nuevamente dentro del tubo y se incubó por 1 min a TA; después se centrifugó (1 min a 12000 rpm), se descartó el flujo, se agregaron 700  $\mu$ l de la solución de lavado-etanol a la columna, se centrifugó, se descartó el flujo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para eliminar los restos de

solución de lavado-etanol, después se colocó la columna en un tubo para microcentrífuga, se agregaron 50 µl de buffer de TE en el centro de la columna y se incubó por 1 min a TA. Para recuperar el DNA, el tubo que contenía la columna se centrifugó durante 1 min a 12000 rpm. El tubo con el DNA plasmídico colectado se almacenó a -20 °C hasta su uso (Invitrogen, 2013).

#### **6.2.10 Comprobación de la presencia del gen clonado**

Para comprobar la presencia del plásmido que acarrea el gen de interés, se procedió a analizar el DNA plasmídico obtenido a partir de las clonas recombinantes, dicho análisis se realizó por a) PCR (amplificación con oligonucleótidos específicos) y b) análisis de digestión con enzimas de restricción específicas para cortar y liberar las secuencias de DNA de interés. El análisis de los productos obtenidos se verificó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1%.

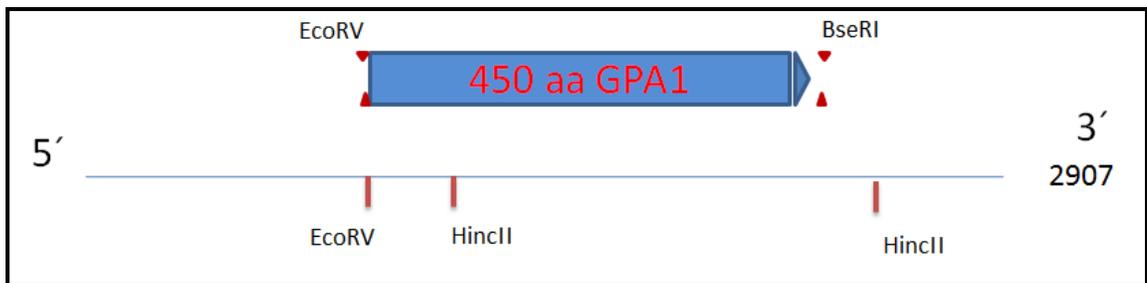
#### **6.2.11 Construcción del casete GPA1-URA3 y generación de la mutante $\Delta$ -Y/GPA1**

##### **6.2.11.1 Amplificación y clonación del gen GPA1**

Para llevar a cabo la construcción del casete de interrupción de GPA1, fue necesario clonar el gen en el plásmido pCR TOPO 4, para ello se amplificó por PCR un fragmento de DNA correspondiente al gen completo (ORF de GAP1) y sus extremos adyacentes con oligonucleótidos específicos GPA1-F (GGAGCAACATGCTCTGTATCTCAAGG) y GPA1-R (GCAGAGTAGTTGGCG GCAGGCTGG), (ver tabla 12, Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de amplificación por PCR del apartado de resultados). El fragmento amplificado por PCR se clonó en el vector TOPO 4 y posteriormente, mediante la digestión con enzimas de restricción se eliminó el ORF de GPA1, el fragmento eliminado se sustituyó por el gen marcador URA3.

### 6.2.11.2 Eliminación del ORF GPA1

Para seleccionar a las enzimas de restricción que pudiesen cortar la secuencia correspondiente al ORF del gen GPA1, se hizo un análisis del patrón de restricción de la secuencia correspondiente al fragmento clonado con ayuda del programa NEB cutter; en el análisis se identificó que la digestión con las enzimas HincII y EcoRV permitía cortar la parte correspondiente al ORF del gen GPA1 (ver figura 5).



**Figura 5. Patrón de restricción del gen GPA1 con las enzimas EcoRV y HincII.** La enzima de restricción EcoRV, hace un corte en la región 5' del ORF, y la enzima HincII realiza dos cortes río abajo, liberando la región codificadora del gen.

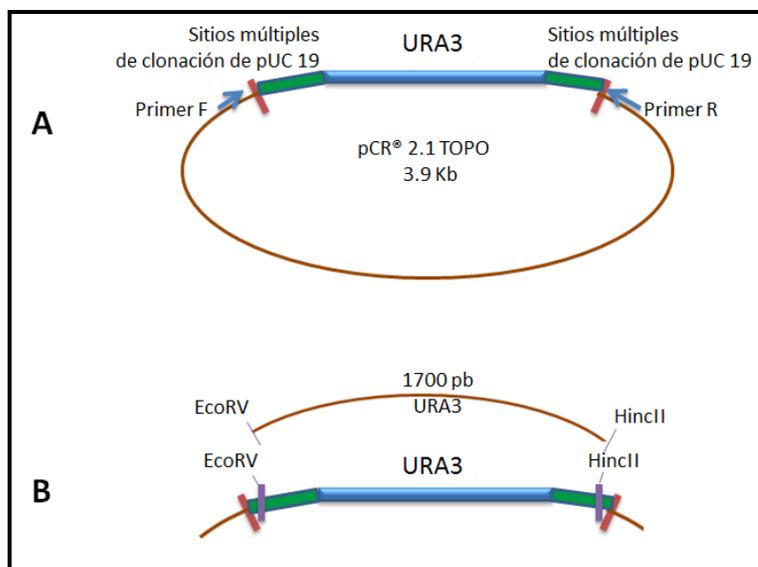
### 6.2.11.3 Obtención del gen marcador (URA3)

El gen marcador URA3 se obtuvo del DNA plasmídico del vector pCR TOPO 2.1/URA3, en el cual había sido clonado previamente. Para ello se realizó una PCR con los oligonucleótidos universales T3 y T7 (kit de clonación TOPO 4 de Invitrogen, 2013); el producto de la reacción de PCR se separó por electroforesis y a partir del gel de agarosa se recuperó el fragmento de interés como se describe a continuación: un fragmento del gel de agarosa que contenía la banda de interés correspondiente al gen URA3 (aprox. 1700 pb) se cortó con ayuda de un bisturí y se colocó en un tubo para microcentrífuga con capacidad de 1.5 ml que contenía una puntilla de capacidad de 1 ml con filtro, cortada; se congeló a -80 °C durante 5 min, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, se eliminó el filtro que retuvo los restos de agarosa y al sobrenadante recuperado se le adicionó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M y 2 veces el volumen

de etanol absoluto frío; el tubo se incubó durante 20 min a -20 °C y después se centrifugó 20 min, a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de etanol al 70%, inmediatamente se centrifugó durante 2 min a 14000 rpm, estos dos últimos pasos se realizaron un par de ocasiones y finalmente el DNA precipitado se resuspendió en 15 µl de agua estéril.

#### **6.2.11.4 Digestión del vector pCR TOPO 4/GPA1 y del producto amplificado URA3**

Haciendo uso de la ventaja de los sitios múltiples de clonación que tiene el gen URA3 en sus extremos (para su clonación en pCR TOPO, el gen URA3 se amplificó a partir del vector pUC19/URA3), el producto de PCR purificado del gel de agarosa se sometió a digestión con las enzimas de restricción EcoRV y HincII (ver figura 6). En paralelo y utilizando las mismas enzimas de restricción (EcoRV y HincII), se realizó la reacción de digestión del vector pCR TOPO 4/GPA1 para eliminar el ORF GPA1, aumentando con ellos la probabilidad de ligación del gen marcador URA3 en el sitio donde fue eliminado el ORF de GPA1.



**Figura 6. Esquema de la obtención del gen marcador URA3.** A) Amplificación con oligonucleótidos universales (T3 y T7) sobre el vector de clonación pCR® TOPO 2.1, el fragmento insertado en el vector cuenta con sitios múltiples de clonación del vector pUC 19. B) Digestión enzimática con EcoRV y HincII para liberar el gen marcador URA3 y sus regiones promotora y terminadora (1700 pb).

Los ensayos de digestión se realizaron de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante de las enzimas (Invitrogen®) en un volumen final de 15  $\mu$ l, bajo las condiciones que se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4. Condiciones de una reacción de digestión con dos enzimas**

REACTIVO	VOLUMEN ( $\mu$ l)
DNA	11.5
Buffer de digestión (10X)	1.5
Enzima EcoRV (10 U/ $\mu$ l)	1
Enzima HincII (10 U/ $\mu$ l)	1
	Total 15

Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 1.5 h; una vez transcurrida la digestión se analizó el resultado por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7% bajo las condiciones descritas anteriormente.

#### **6.2.11.5 Purificación de los fragmentos de interés**

Una vez realizada la digestión del plásmido que acarrean el gen GPA1 y del gen marcador URA3, los productos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa (0.7%). Para recuperar los fragmentos de interés (con el kit Spin Column DNA Gel Extraction Kit B5353, Bio Basic Canada Inc.®) se procedió a cortar el fragmento de DNA del gel de agarosa utilizando un bisturí limpio, se pesó la rebanada del gel y se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, después se agregaron 400 µl de Buffer de unión II, por cada 100 mg de peso del gel, se incubó a 50 °C por aproximadamente 10 min con movimiento ocasional (como lo indica el fabricante) hasta que la agarosa estuvo completamente disuelta; después, esta mezcla se colocó con una micropipeta dentro de una columna EZ-10 colocada dentro de un tubo colector y se dejó reposar a TA (25 °C) por 2 min, se centrifugó a 10000 rpm por 2 min y se descartó el sobrenadante del tubo, inmediatamente después se agregaron 750 µl de solución de lavado, se centrifugó a TA por 1 min, y se descartó la solución filtrada del tubo, el paso anterior se repitió 2 veces y posteriormente se centrifugó durante 1 min a 10000 rpm para remover residuos de la solución de lavado. La columna que contenía el DNA se colocó en un tubo para microcentrífuga limpio de 1.5 ml, se agregaron 30 µl de buffer de elución al centro de la columna y se incubó 2 min a TA, se centrifugó a 10000 rpm por 2 min para eluir el DNA. El DNA recuperado se almacenó a -20 °C, hasta su uso.

#### **6.2.11.6 Ligación del gen marcador URA3 con los extremos del gen GPA1**

El DNA obtenido por la purificación de las bandas se visualizó en un gel de agarosa y se cuantificó la concentración de cada banda tomando como referencia la concentración del marcador de peso molecular HyperLadder V.

Para la reacción de ligación de los fragmentos de interés (vector TOPO + extremos del gen GPA1 y gen marcador URA3) se llevó a cabo la reacción con la enzima T4 DNA ligasa de Invitrogen®, utilizando el DNA purificado en una proporción 3:1 (inserto- plásmido), como se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5. Composición de una reacción de ligación típica**

REACTIVO	VOLUMEN ( $\mu$ L)
DNA Plasmídico (TOPO 4/GPA1)	6
Gen marcador URA3 (inserto)	2
Buffer de ligación (5X)	3
Ligasa T4 expressLink (5U/ $\mu$ l)	1
Agua bidestilada estéril	3
Total	15

La reacción de ligación se incubó a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se tomaron 5  $\mu$ l del producto de la ligación y se usaron para transformar células calcio-competentes de *E. coli*. Las colonias que crecieron en medio selectivo (LB+ampicilina) se analizaron por PCR con los oligonucleótidos GPA1-F (GGAGCAACATGCTCTGTATCTCAAGG) y GPA1-R (GCAGAGTAGTTGGCGGCAGGCTGG). Como resultado de la amplificación se esperaba un producto de 3751 pb, indicativo de la ligación del gen URA3 entre los extremos del gen GPA1, comprobándose así la construcción del plásmido TOPO4/GPA1-URA3.

#### **6.2.11.7 Transformación de células de *Y. lipolytica* por el método de Acetato de Litio**

Para generar las mutantes  $\Delta$ GPA1 de *Y. lipolytica*, el casete de interrupción (5'-GPA1 + URA3 + 3'-GPA1) se obtuvo por digestión del DNA del plásmido TOPO4/GPA1-URA3 con la enzima EcoRI; el producto de la digestión se sometió a electroforesis y la banda correspondiente se purificó a partir del gel de agarosa. Con el DNA obtenido se procedió a la transformación de las células litio-competentes de *Y. lipolytica*.

La generación de células de *Y. lipolytica* litio-competentes se efectuó por el método de acetato de litio, como lo describen Davidow y colaboradores en el año 1985; por este método, el DNA externo (correspondiente al casete de disrupción) entra al núcleo de la célula y por recombinación homóloga se inserta en el locus correspondiente en el genoma de la célula.

Para generar las células de *Y. lipolytica* calcio-competentes, de una placa de cultivo de toda la noche (medio YPD), se tomó una colonia de la cepa P01A de *Y. lipolytica* y se inoculó en 10 ml de medio YPD a pH 4, se incubó durante 18 h aproximadamente con agitación a 28 °C. Posteriormente las células se contaron con ayuda de un hematocitómetro y se tomó el volumen necesario de este cultivo para inocular 3 diferentes concentraciones  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  y  $2 \times 10^5$  células/ml en 3 matraces de 250 ml que contenían 12.5 ml de medio YPD a pH 4 cada uno. Los matraces se incubaron aprox. 14-16 h a 28 °C, con agitación a 200 rpm, al día siguiente las células de los cultivos se contaron y se seleccionó la población del matraz que tuviese una concentración aproximada de  $1 \times 10^8$  células/ml. Dicho cultivo se trasvasó a tubos Falcon de 50 ml, y éstos se centrifugaron durante 10 min a una velocidad de 5000 rpm, las células se lavaron 2 veces con 5 ml de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8) y posteriormente se resuspendieron en un volumen de 1.5 ml de buffer de acetato de litio 0.1 M, pH 6, que permitiera obtener una concentración final de  $5 \times 10^8$  células/ml. Posteriormente, las células se incubaron durante 1 hora, a 28 °C con agitación a 70 rpm; las células se almacenaron durante 14 h a 4 °C y se utilizaron antes de 48 h de haber sido preparadas.

Todo el proceso de la transformación se realizó a 4 °C colocando los tubos con las reacciones en un recipiente con hielo molido. Para cada reacción se colocaron 100 µl de células competentes en un tubo con capacidad de 2 ml; se agregaron aproximadamente 10 µl (500-750 ng) del DNA correspondiente al casete de interrupción purificado como se mencionó anteriormente y 2.5 µl de DNA de esperma de salmón (5 mg/ml) desnaturalizado (5 min a 95 °C); la mezcla se incubó 15 min a 28 °C sin agitación, después se agregaron 700 µl de

polietilenglicol (PEG 4000, CARBOWAX™) al 40%, la mezcla se incubó durante 1 h a 28 °C con agitación ligera (70 rpm). Pasado este tiempo, los tubos que contenían las reacciones se sometieron a un choque térmico incubándolos durante 10 min a 39 °C. Posteriormente, los tubos se colocaron en el recipiente con hielo molido (4 °C) e inmediatamente se agregó 1 ml de buffer TE pH 8.0; se centrifugaron 2 min a 4000 rpm, se eliminó el sobrenadante por decantación y el pellet de células se resuspendió en 230 µl de buffer TE. De esta solución de células, se tomaron alícuotas de 50 y 100 µl y se sembraron en placas de Petri con medio mínimo YNB adicionado con leucina (262 mg/L). Las placas se incubaron en posición invertida, a 28 °C, aprox. 5-7 días, hasta la aparición de colonias.

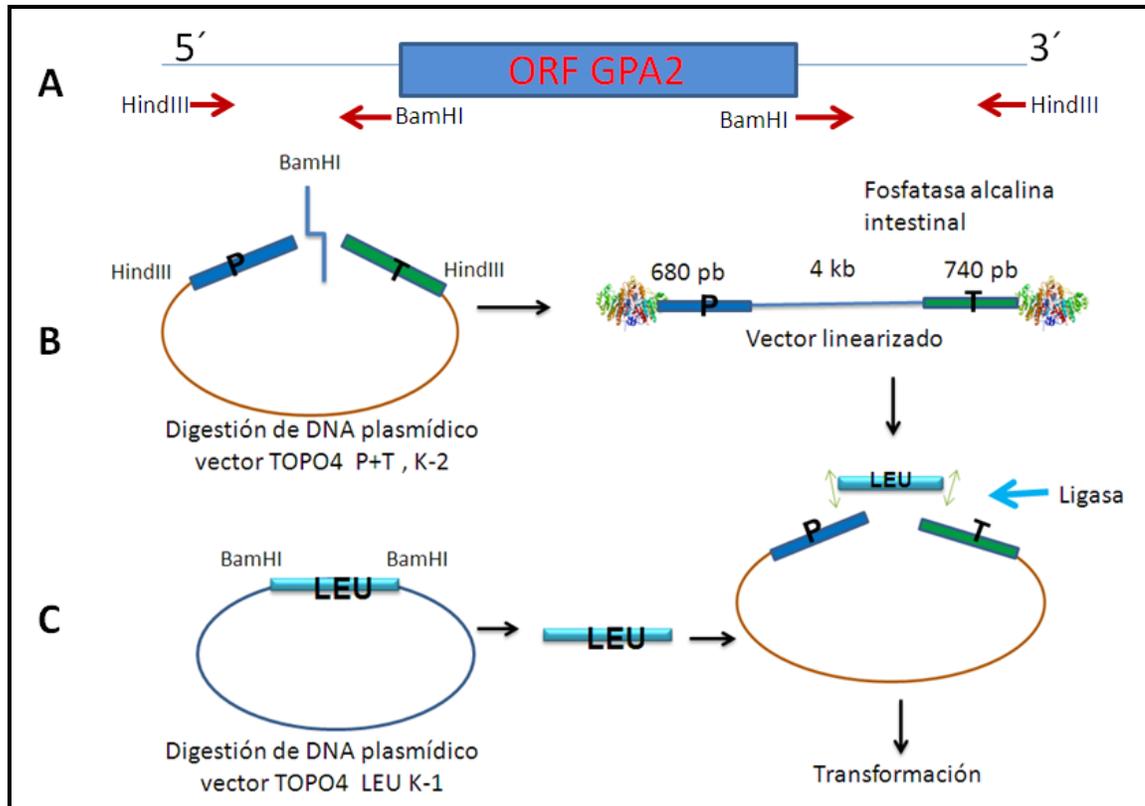
#### **6.2.11.8 Selección y comprobación de transformantes *YI-ΔGPA1***

La selección de las posibles mutantes se realizó considerando la capacidad de éstas para crecer en el medio selectivo YNB adicionado con leucina, ya que al incorporar el casete de interrupción (GPA1-URA3) que contiene la secuencia de DNA correspondiente al gen URA3, las transformantes pudieron sintetizar uracilo y crecer sin la necesidad de que éste fuese adicionado al medio de cultivo.

Para comprobar la delección del gen GPA1 en las colonias que crecieron, se sembraron 8 colonias en tubos Falcon de 50 ml que contenían 10 ml de medio líquido YNB adicionado con leucina; se incubaron durante toda la noche a 28 °C, con agitación (200 rpm) y se realizó la extracción del DNA genómico de las 8 clonas. El DNA obtenido se analizó por PCR con oligonucleótidos específicos diseñados en regiones del genoma que no había sido manipulado durante la construcción e inserción del casete (oligonucleótidos 5´GPA1 y 3´GPA1); además, para comprobar la inserción y correcta integración del gen marcador, se hicieron reacciones de PCR con combinaciones de oligonucleótidos específicos diseñados sobre la secuencia del gen marcador insertado (*YURA3*) y sobre la secuencia del fragmento deletado (ORF-GPA1).

### 6.2.12 Construcción de los casetes de interrupción GPA2-LEU2 y GPA2-URA3

La estrategia elegida para la construcción de los casetes de interrupción del gen GPA2 consistió en clonar las regiones adyacentes de dicho gen y ligarlos con los genes marcadores LEU2 y URA3 (ver figura 7).



**Figura 7. Esquema de elaboración del casete de interrupción de GPA2.** A) Análisis y diseño de los oligonucleótidos con sitios de corte para las enzimas HindIII y BamHI para amplificar las regiones adyacentes (P y T) del gen GPA2. B) Los fragmentos P y T se unieron y se clonaron en un solo vector y éste se linearizó por digestión con la enzima BamHI y previa desfosforilación, este fragmento se unió mediante ligación al gen marcador. C) Se ejemplifica la ligación usando como marcador al gen LEU2.

### **6.2.12.1 Amplificación y clonación de las regiones adyacentes del gen GPA2**

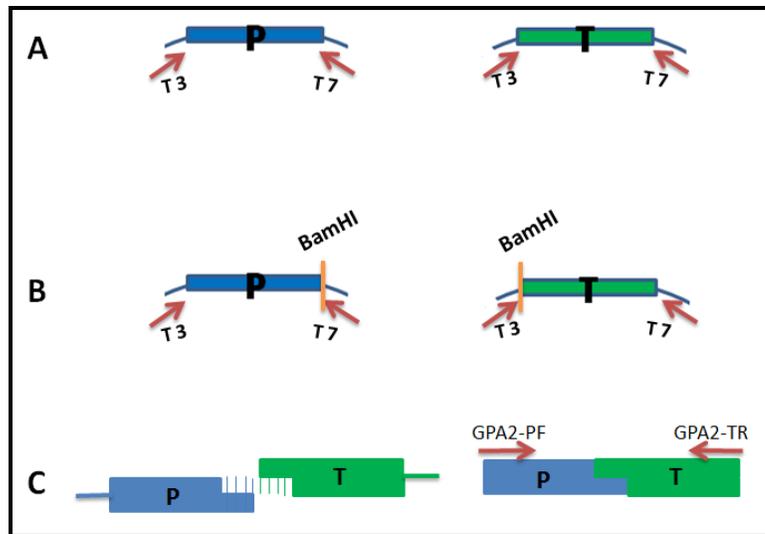
La estrategia completa para la construcción del casete de disrupción tal como se muestra en la figura 4, consistió en el diseño de oligonucleótidos con sitios de corte para las enzimas HindIII y BamHI (secuencias marcadas con letras negritas), tanto para la amplificación de la región adyacente 5´ (región promotora, P) como para la región adyacente 3´ (región terminadora, T) del gen GPA2.

Usando como templado el DNA genómico de *Y. lipolytica*, se amplificaron las regiones adyacentes al ORF del gen GPA2 utilizando los oligonucleótidos GPA2-PF (**AAGCTT**GCGCCGACACGGACCCCGG) y GPA2-PR (**GGATCCG**TCTTGCGTATTAGTGTGCGG) para amplificar la región promotora y GPA2-TF (**GGATCCG**CCAGGTGAACTGGAGG), y GPA2-TR (**AAGCTT**GGTGGGTGCAGGAGTCTCTGG) para la región terminadora. En ambas reacciones de PCR la temperatura de alineamiento fue 66 °C, con 1 min de extensión. Los productos de PCR se clonaron en el vector pCR TOPO 4 y se procedió a la transformación de *E.coli*. La comprobación de clonas positivas se realizó por análisis de restricción con las enzimas HindIII y BamHI y por PCR con los oligonucleótidos mencionados para cada una de las regiones.

### **6.2.12.2 Ligación de regiones adyacentes (P+T) del gen GPA2**

Utilizando como molde el DNA plasmídico correspondiente a cada uno de los extremos del gen GPA2, se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos universales T3 y T7 (0.1 µg/µL) (ver figura 8). La temperatura de alineamiento fue de 60 °C, y 1 min de extensión.

Los productos de PCR se recuperaron por precipitación a partir del fragmento de agarosa y se sometieron a la acción de la enzima BamHI. Incubando a 37 °C durante 1.5 h.



**Figura 8. Esquema donde se muestra el proceso de amplificación, unión y clonación de los extremos del gen GPA2.** A) Amplificación por medio de PCR con oligonucleótidos universales T3 y T7. B) Digestión de los fragmentos P y T con la enzima de restricción BamHI. C) Ligación de P y T en sitios BamHI y amplificación por PCR de los productos ligados (P+T).

Los productos de la digestión con BamHI se sometieron a ligación con la enzima T4 DNA Ligasa Express Link en las condiciones que se muestran en la tabla 6. Se utilizó una proporción 1:1, (P:T); la estimación de las cantidades de cada fragmento se hizo por observación en un gel de agarosa, utilizando como referencia el marcador de peso molecular Hyperladder IV.

**Tabla 6. Composición de la reacción de ligación de los extremos (Promotor + Terminador) del gen GPA2**

REACTIVO	VOLUMEN (µL)
DNA Promotor	5
DNA Terminador	5
Buffer de ligación (5X)	4
Ligasa T4 express Link (5U/µl)	1
Agua bidestilada estéril	5
Total	20

\*La reacción de ligación se llevó a cabo a 4 °C, durante toda la noche.

### **6.2.12.3 Clonación de la unión de las regiones adyacentes (P+T) del gen GPA2**

Para obtener el fragmento correspondiente a la unión de P+T (1420 pb) se realizó una amplificación por PCR con los oligonucleótidos GPA2-PF (**AAGCTT**GCGCCGACACGGACCCCGG) y GPA2-TR (**AAGCTT**GGTGGGTG CAGGAGTCTCTGG), usando como DNA templado 1µl del producto de la reacción de ligación. La presencia de productos de PCR del tamaño esperado se verificó en un gel de agarosa. Estos productos se clonaron en el vector pCR TOPO 4 y se transformaron células calcio-competentes de *E.coli* en las condiciones anteriormente descritas, generándose así el plásmido TOPO4/P+T. La comprobación de clonas positivas se realizó por análisis del patrón de restricción con la enzima HindIII, cuyos sitios de corte flanquean al producto de unión de los fragmentos P+T adyacentes al gen GPA2.

### **6.2.12.4 Inserción de la secuencia correspondiente al gen marcador entre los extremos adyacentes (P+T) de GPA2**

Para continuar con el proceso de construcción del casete de disrupción, el DNA del plásmido TOPO4/P+T se linearizó por digestión con la enzima BamHI y se ligó al gen marcador URA3.

### **6.2.12.5 Desfosforilación del vector linearizado P+T con CIAP**

Una vez que se tuvo el vector linearizado sometido a la acción de la enzima de restricción BamHI, para evitar la religación de los extremos BamHI el DNA se sometió a una reacción de desfosforilación utilizando la enzima fosfatasa alcalina (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase CIAP; Invitrogen, 2013), esta enzima tiene la función de hidrolizar los grupos fosfato de los extremos 5' y 3' de DNA y RNA. Para la reacción de desfosforilación se siguieron las instrucciones del fabricante agregando cada uno de los componentes y en las cantidades que se mencionan en la tabla 7.

**Tabla 7. Composición de la reacción de desfosforilación con la enzima CIAP sobre el vector linearizado TOPO4/P+T del gen GPA2**

REACTIVO	VOLUMEN ( $\mu$ l)
Vector linearizado	15
Enzima CIAP (1 U/ $\mu$ l)	1
Buffer CIAP (10X)	10
Agua bidestilada estéril	74
Total	100

\*La reacción se incubó a 37 °C por 30 min, después se agregó 1  $\mu$ l de enzima CIAP y se incubó a 37 °C otros 30 min. Para inactivar a la enzima CIAP, ésta se removió con fenol-cloroformo.

#### **6.2.12.6 Reacción para inactivar a la fosfatasa alcalina (CIAP)**

Una vez terminada la incubación con la enzima CIAP, para detener la acción de la enzima se agregaron 200  $\mu$ l de agua bidestilada estéril y 100  $\mu$ l de una mezcla de fenol-cloroformo (50:50); se mezcló y se centrifugó por 5 min a 12000 rpm; el sobrenadante se recuperó en un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 ml y se le agregaron 25  $\mu$ l de acetato de amonio (7.5 M), se mezcló con la micropipeta y se agregaron 500  $\mu$ l de etanol absoluto (frío), se incubó a -20 °C por 5 min, y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm, se eliminó el sobrenadante por decantación y se agregaron 500  $\mu$ l de etanol al 70% y se centrifugó durante 2 min a 12000 rpm; se eliminó el etanol, se dejó secar durante 5 min a TA con los tubos abiertos para permitir que se evaporara el etanol remanente. Después, el DNA se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### **6.2.12.7 Ligación del vector desfosforilado y el gen marcador URA3**

El gen marcador URA3 (1700 pb) de *Y. lipolytica* se obtuvo por digestión del plásmido pCR TOPO 2.1/URA3 con la enzima BamHI (ver tabla 8); el DNA correspondiente al gen URA3 se obtuvo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.5.3.

**Tabla 8. Composición de la reacción de digestión con BamHI sobre DNA plasmídico para obtener el gen marcador URA3**

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
DNA plasmídico pCR 2.1/URA3	11.5
Buffer de digestión RE 10X	1.5
Enzima BamHI (10 U/µl)	2
Total	15

\*La reacción se incubó durante 1.5 h a 37 °C.

Los fragmentos de DNA correspondientes al gen marcador y al vector TOPO4/P+T linearizado y desfosforilado, se mezclaron en proporción 3:1 (inserto-plásmido) y se sometieron a una reacción de ligación en las condiciones descritas en la tabla 9.

**Tabla 9. Composición de la reacción de ligación del gen URA3 en el vector linearizado TOPO4/P+T**

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
DNA Vector linearizado P+T (vector)	2
DNA URA3 (inserto)	5
Buffer de ligación 5X	2
Ligasa T <sub>4</sub> ExpressLink (5U/ µl)	1
Total	10

\* Incubación durante toda la noche a 4 °C.

Del producto de la ligación, se agregaron 5 µl a un vial de células calcio-competentes de *E.coli* y se procedió a su transformación en las condiciones previamente descritas. Las colonias que crecieron en el medio selectivo (placas de LB+ampicilina), se sembraron en tubos Falcon de 15 ml que contenían 4 ml de medio líquido LB adicionado con ampicilina y se incubaron durante toda la noche a 28 °C, con agitación (200 rpm). Al día siguiente, se extrajo el DNA plasmídico de los cultivos y para comprobar que

hubiesen incorporado el plásmido con la construcción (P+URA3+T), sobre el DNA plasmídico se hicieron reacciones de digestión con la enzima de restricción BamHI y análisis por PCR con oligonucleótidos específicos; de esta manera también se comprobó la inserción del casete en el locus correcto y correcta dirección del gen marcador URA3.

#### **6.2.12.8 Construcción del casete de disrupción para GPA2, con el gen marcador LEU2**

Con la intención de generar una doble mutante para los genes GPA1 y GPA2, se construyó el casete de disrupción P+LEU+T. Este se construyó utilizando la estrategia descrita para la construcción con el gen marcador URA3.

El gen marcador LEU2 se obtuvo a partir de la cepa YL-4 de *Y. lipolytica* var *indica*, la cual, a diferencia de la cepa P01A, presenta auxotrofia solo a uracilo, manteniendo intacto el gen LEU2, necesario para la síntesis de leucina. A partir del DNA genómico obtenido de cultivos de la cepa YL-4, se amplificó la secuencia correspondiente al gen LEU2 utilizando los oligonucleótidos LEU2-F (**GGATCCGTAATGCCAGCATCGAGG**) y LEU2-R (**GGATCCCCTTACCATA CCTCACTG**) diseñados con secuencias para el corte con la enzima BamHI, con una temperatura de alineamiento de 60 °C y un tiempo de extensión de 2.5 min. Los productos de PCR se clonaron en el vector pCR TOPO 4 (Invitrogen) y a partir del DNA plasmídico se obtuvo, por digestión con BamHI, el DNA correspondiente al gen marcador LEU2 de *Y. lipolytica*.

La construcción de este casete también se comprobó por análisis del patrón de restricción y por PCR con oligonucleótidos específicos diseñados sobre la secuencia del gen GPA2 y en el interior del gen marcador LEU2.

### **6.2.13 Transformación de células de *Y. lipolytica* para obtener mutantes $\Delta$ GPA2**

Una vez que se comprobó la correcta inserción del gen marcador en cada una de las construcciones genéticas (Extremo 5' GPA2 + GEN MARCADOR + extremo 3' GPA2), éstas se amplificaron por PCR y con el DNA obtenido se transformaron las células de *Y. lipolytica*; la integración del casete en el genoma de la célula se hizo por recombinación homóloga, sustituyendo el gen GPA2.

En primera instancia se hicieron intentos para llevar a cabo la transformación de *Y. lipolytica* por el método del acetato de litio (ver apartado 6.2.18) y ante los resultados obtenidos, se decidió implementar el método de transformación por electroporación en células litio-competentes, descrito por Wang, J. y colaboradores (2011), en las condiciones que se describen a continuación.

#### **6.2.13.1 Generación de células litio-competentes**

A partir de los cultivos, en placas de Petri con medio YPD, de las cepas P01A y de la cepa mutante  $\Delta$ GPA1, se tomó una colonia de cada cepa y con éstas se inocularon 10 ml de medio YPD contenidos en tubos cónicos de 50 ml; se incubaron a 28 °C durante toda la noche (16.5 h aproximadamente). Posteriormente se tomaron 10  $\mu$ l de estos cultivos para inocular matraces de 250 ml de capacidad, que contenían 50 ml de medio YPD, se incubó en agitación (200 rpm) a 28 °C, después de 18 horas de incubación se determinó la absorbancia ( $OD_{600nm}$ ) y cuando ésta alcanzó 1.5 unidades, las células se cosecharon por centrifugación y se lavaron dos veces con agua Mili Q estéril y después se resuspendieron en 8 ml de una solución 0.6 M de sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y 150 mM LiAc; inmediatamente las células se incubaron a TA durante 1 h, con agitación ocasional. Después, los cultivos se centrifugaron por 5 min a 3000 rpm y se resuspendieron con 3 ml de sorbitol (1 M) frío, se transfirieron a un tubo de 10 ml de capacidad y las células se contaron para ajustar a una concentración final de  $10 \times 10^{10}$  cel/ml, las células se lavaron con el

volumen de sorbitol (1 M) previamente determinado y se mantuvieron en frío (en hielo molido), hasta su uso.

### **6.2.13.2 Reacciones de transformación por electroporación**

Para las reacciones de transformación se utilizaron células litio-competentes de las cepas P01A y  $\Delta$ GPA1, siguiendo el protocolo descrito por Wang y colaboradores (2011). La cepa P01A se transformó utilizando tanto DNA del casete correspondiente a GPA2-URA3 como al casete GPA2-LEU2 (construidos como se menciona en el apartado 7.5), mientras que para la cepa mutante  $\Delta$ GPA1 (utilizada para construir una doble mutante:  $\Delta$ GPA1/  $\Delta$ GPA2), el proceso de transformación se realizó utilizando el DNA del casete GPA2-LEU2. El DNA correspondiente a estos casetes se cuantificó previamente utilizando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

Para cada reacción (ver tabla 10), se tomaron 100  $\mu$ l de las células litio-competentes y se mezclaron con el volumen necesario de la solución del DNA correspondiente que permitiese tener una concentración final de 350 a 500 ng de DNA. El DNA se colocó con ayuda de una micropipeta en los tubos de 1.5 ml que contenían 100  $\mu$ l de células litio-competentes y se mezcló con agitación suave con la punta de la pipeta. La mezcla se incubó en hielo molido por 5 min y con ayuda de la pipeta se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm (Gene Pulser/Micro Pulser) y utilizando el equipo (Micro pulser de Bio Rad) se aplicó un pulso de 1.5 KV ( $E=12.4$  kv/cm) 200  $\Omega$  y 25  $\mu$ F (que corresponden a una duración del pulso de 4.6 ms aproximadamente). Inmediatamente después de la electroporación, las células se diluyeron adicionando 1 ml de sorbitol (1 M) frío y alícuotas de 100  $\mu$ l fueron sembradas en placas con medio mínimo YNB adicionadas con el aminoácido leucina o con la base nitrogenada uracilo, según se requería para la selección de las mutantes.

**Tabla 10. Condiciones de electroporación y selección de las transformantes**

<b>Células litio-competentes Cepa</b>	<b>DNA Casete (cantidad ng)</b>	<b>Indicadores para selección de transformantes</b>
<b>P01A</b>	GPA2-LEU2 (372)	Uracilo (1.25 mg/ml)
<b>P01A</b>	GPA2-URA3 (430)	Leucina (0.26 mg/ml)
<b>Δ GPA1</b>	GPA2-LEU2 (372)	(-)

### **6.2.13.3 Selección y análisis de las transformantes *YI-ΔGPA2***

La selección se realizó mediante la capacidad de crecimiento de las células transformadas en medio YNB con distintas suplementaciones añadiendo: a) uracilo; b) leucina; c) sin suplementación; (en el caso de posibles dobles mutantes), según la auxotrofia esperada para las transformantes de cada cepa.

Las colonias que crecieron en las placas con el medio selectivo, se tomaron con ayuda de un palillo estéril y se inocularon en tubos Falcon de 50 ml que contenían 10 ml de medio líquido YNB adicionado o no, conforme a los requerimientos de las posibles transformantes (ver tabla 10); los cultivos se incubaron toda la noche, a 28 °C, con agitación. De las clonas de *Y. lipolytica* que crecieron, se extrajo el DNA genómico y éste se analizó por PCR para comprobar la delección del gen GPA2, así como presencia del gen marcador y la inserción del casete de interrupción en el locus y en la orientación correctos.

En todas las reacciones de PCR se usó el DNA genómico de la cepa P01A como control para determinar la presencia o ausencia de los casetes.

#### **6.2.14 Análisis genotípico de las mutantes $\Delta$ GPA1**

Para comprobar la delección del gen GPA1 en las colonias que crecieron en las placa, estas se sembraron en tubos Falcon de 50 ml que contenían 10 ml de medio líquido YNB adicionado con leucina; se incubaron durante toda la noche a 28 °C con agitación (200 rpm) y se realizó la extracción del DNA genómico de las clonas. El DNA obtenido se analizó por PCR con oligonucleótidos específicos diseñados en regiones del genoma que no había sido manipulado durante la construcción e inserción del casete (5'GPA1-F y 3'GPA1-R, cuyas secuencias son GGGTGCCGTTTGTGAGGTGGG y GGCAGCCTTAG CAGTGGCCTGGG, respectivamente); además, para comprobar la inserción y correcta integración del gen marcador, se hicieron reacciones de PCR con combinaciones de oligonucleótidos específicos diseñados sobre la secuencia del gen marcador insertado URA3: URA3 interno-F (GGCCTG CGAGCTGGTGCCGAGG) y URA3 interno-R (CCTCGGCACCAGC TCGCAGGCC); y sobre la secuencia del fragmento deletado ORF-GPA1, con los oligonucleótidos GPA1 sonda-F (CGACTCCGCTATGCCTGACTGGG) y GPA1 sonda-R (GGCCGCCACCAGAAAAGGGG).

#### **6.2.15 Análisis genotípico de las mutantes $\Delta$ GPA2**

Las colonias transformantes que crecieron como producto de la transformación con los casetes GPA2-URA3 y GPA2-LEU2, también se analizaron por PCR con oligonucleótidos correspondientes.

Para comprobar la delección del gen GPA2, se utilizaron los oligonucleótidos específicos GPA2 sonda-F y GPA2 sonda-R cuyas secuencias son GGCCACAGCAACAAGACAGAGG y CCGAGTACGACCAGGTTCTGTG respectivamente. Dichos oligonucleótidos se diseñaron sobre la secuencia correspondiente al ORF GPA2. Además, se realizaron reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia de los genes marcadores URA3 [URA3 interno-F (GGCCTGCGAGCTGGTGCCGAGG) y

URA3 interno-R (CCTCGGCACCAGCTCGCAGGCC)] y LEU2 [LEU2 interno-F (CCAACACCGTATGGACCACTCCC) y LEU2 interno-R (CCTCGTCCGGAGATG ATATCGCC)], así como las combinaciones de éstos con los oligonucleótidos 5'GPA2-F (**GGATCC**GC GTGAGAATTAGTCTGTCTG) y 3'GPA2-R (**GGATCC** CCCTGAAGGAGTAACAAGTAG) que fueron diseñados en las regiones cromosómicas que flanquean al gen GPA2 y sus regiones adyacentes, y que no habían sido manipuladas durante la construcción de los casetes (ver tabla 12); estas últimas reacciones se utilizaron con la finalidad de comprobar la integración del casete de disrupción en el locus correcto y en la orientación correcta, en el genoma de las transformantes.

#### **6.2.16 Análisis fenotípico de la mutante $\Delta$ GPA1**

Con el objetivo de determinar el posible papel que desempeña el gen GPA en el proceso de sensado de glucosa en *Y. lipolytica*, una vez que fue corroborada la delección del gen GPA1 en las mutantes *Y*GPA1, a una de estas mutantes se le analizó su capacidad de crecimiento en medio mínimo YNB en las siguientes condiciones: a) YNB sin glucosa adicionada, b) YNB más 27.5 mM de glucosa, c) YNB más 55 mM de glucosa y d) YNB más 110 mM de glucosa. Los resultados se compararon con respecto a los obtenidos con la cepa parental P01A.

##### **6.2.16.1 Crecimiento de la mutante $\Delta$ GPA1 en diferentes concentraciones de glucosa**

Para determinar si la mutante  $\Delta$ GPA1 tenía alterada la capacidad de sensar la presencia de glucosa, se realizaron curvas de crecimiento en medio de cultivo adicionado con diferentes concentraciones de glucosa, como se mencionó anteriormente.

### 6.2.16.1.1 Tratamiento de las células para eliminar reservas de glucosa

A partir de cultivos en placa de las cepas P01A y  $\Delta$ GPA1 se seleccionó una colonia aislada de cada cepa y se inoculó en un matraz de 250 ml que contenía 50 ml en medio líquido YPD; se incubó durante 18 h a 28 °C con agitación (200 rpm). Al día siguiente, se determinó la densidad óptica (OD 600 nm) de los cultivos con ayuda del espectrofotómetro Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Para eliminar las reservas de glucosa en las células, éstas se lavaron 2 veces con 25 ml de agua estéril, se resuspendieron en 25 ml de agua estéril y se incubaron durante 2 h a 28 °C, con agitación a 200 rpm; pasado este tiempo, los cultivos se centrifugaron una vez más y se eliminó el sobrenadante; las células se resuspendieron en medio YNB sin glucosa.

### 6.2.16.1.2 Determinación del inóculo

Para los cultivos en el medio con las diferentes concentraciones de glucosa, el inóculo inicial se ajustó a una OD (600 nm) de 0.2, según la fórmula que se muestra a continuación:

$$x = \frac{(\text{Volumen final})(\text{OD deseada})}{(\text{OD total del cultivo})}$$

Con el volumen determinado para cada una de las 2 cepas, se inocularon matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio YNB+Leu+Ura en las siguientes condiciones: a) YNB sin glucosa adicionada, b) YNB adicionado con 27.5 mM de glucosa, c) YNB más 55 mM de glucosa y d) YNB más 110 mM de glucosa. La concentración de glucosa para estos análisis se determinó en base a lo que se utiliza habitualmente para preparar medio rico (YPD, 2% de glucosa, equivalente a 110 mM).

### **6.2.16.1.3 Curvas de crecimiento de la mutante $\Delta$ GPA1**

Los matraces se incubaron a 28 °C con agitación a 200 rpm y; a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 30, 48, 60, 72, 84 y 96 h) se tomó 1 ml de cada cultivo para determinar la OD. Los resultados se graficaron en los programas computacionales EXCEL y Prisma®; se calculó el tiempo de duplicación y número de generaciones de cada una de las cepas en las diferentes condiciones y se comparó con los valores obtenidos utilizando la cepa control sometida a las mismas condiciones de cultivo.

### **6.2.16.2 Análisis de la morfología celular**

Para determinar si la falta de la proteína Gpa (codificada por el gen GPA) juega un papel significativo en la diferenciación celular de *Y. lipolytica*, se determinó el porcentaje de diferenciación (crecimiento en forma de levadura o micelio) de los cultivos celulares obtenidos en las distintas condiciones que se probaron (concentraciones de glucosa). Para ello, de cada uno de los cultivos se hicieron preparaciones que se observaron en microscopio trinocular invertido AE2000 marca Motic-AE21, utilizando el objetivo 20X.

Para el análisis comparativo de la morfología celular de la mutante GPA1, y con respecto a la cepa control P01A, se tomaron fotografías de los cultivos a 12 h de incubación en las diferentes condiciones; utilizando el microscopio antes mencionado.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Búsqueda *in silico* de los genes GPA de *Y. lipolytica*

En el genoma del hongo dimórfico *Yarrowia lipolytica*, se analizó la presencia de posibles genes que codifican para la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica. La secuencia completa del genoma de esta especie se encuentra con acceso libre en las bases de datos del consorcio francés Génolevures.

En una primera búsqueda con ayuda del programa BLAST de NCBI y en la página del consorcio Génolevures, se utilizaron como sondas las secuencias de aminoácidos (Aa) descritas para las proteínas Gpa de las especies *C. albicans* y *S. cerevisiae*; posteriormente, se usaron las secuencias de nucleótidos correspondientes a los genes GPA de las mismas especies. Con esta estrategia se identificaron dos genes que tentativamente codifican para subunidades alpha de la proteína G heterotrimérica. Estos genes se denominaron YIGPA1 y YIGPA2 y sus etiquetas de identificación en el genoma de *Y. lipolytica* son YALI0E11627g y YALI0A09592g, respectivamente.

El tentativo gen YIGPA1 se localiza en el cromosoma E de *Y. lipolytica*; tiene un tamaño de 1233 nucleótidos y el marco de lectura presuntamente codifica para la proteína Gpa1, con un tamaño de 410 aminoácidos, mientras que el gen YIGPA2 se encuentra en el cromosoma A, tiene un tamaño de 1326 nucleótidos y codifica para la proteína Gpa2 de 442 aminoácidos.

Las dos putativas proteínas Gpa1 y Gpa2 de *Y. lipolytica* muestran 31 a 55% de identidad con Gpa's de especies como *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *Homo sapiens* (Tabla 11).

**Tabla 11. Comparación de las secuencias Gpa de *Y. lipolytica* con secuencias de proteínas Gpa de otras especies**

<b>Especie (ID)*</b>	<b>Identidad** Y/Gpa1 YALI0E11627p</b>	<b>Identidad** Y/Gpa2 YALI0A09592p</b>
<i>Candida albicans</i> Gpa1 (429 Aa) gb AAA34324.2	188/432 (43%)	138/394 (35%)
<i>Candida albicans</i> Gpa2 (502 Aa) gb EEQ44285.1	127/406 (31%)	208/455 (45%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gpa1 (472 Aa) gb EDV09054.1	130/234 (55%)	149/435 (34%)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gpa2 (449 Aa) sp P10823.2	126/382 (32%)	201/436 (46%)
<i>Homo sapiens</i> Gpa2 (355 Aa) NP_002061.1	152/410 (37%)	151/361 (41%)

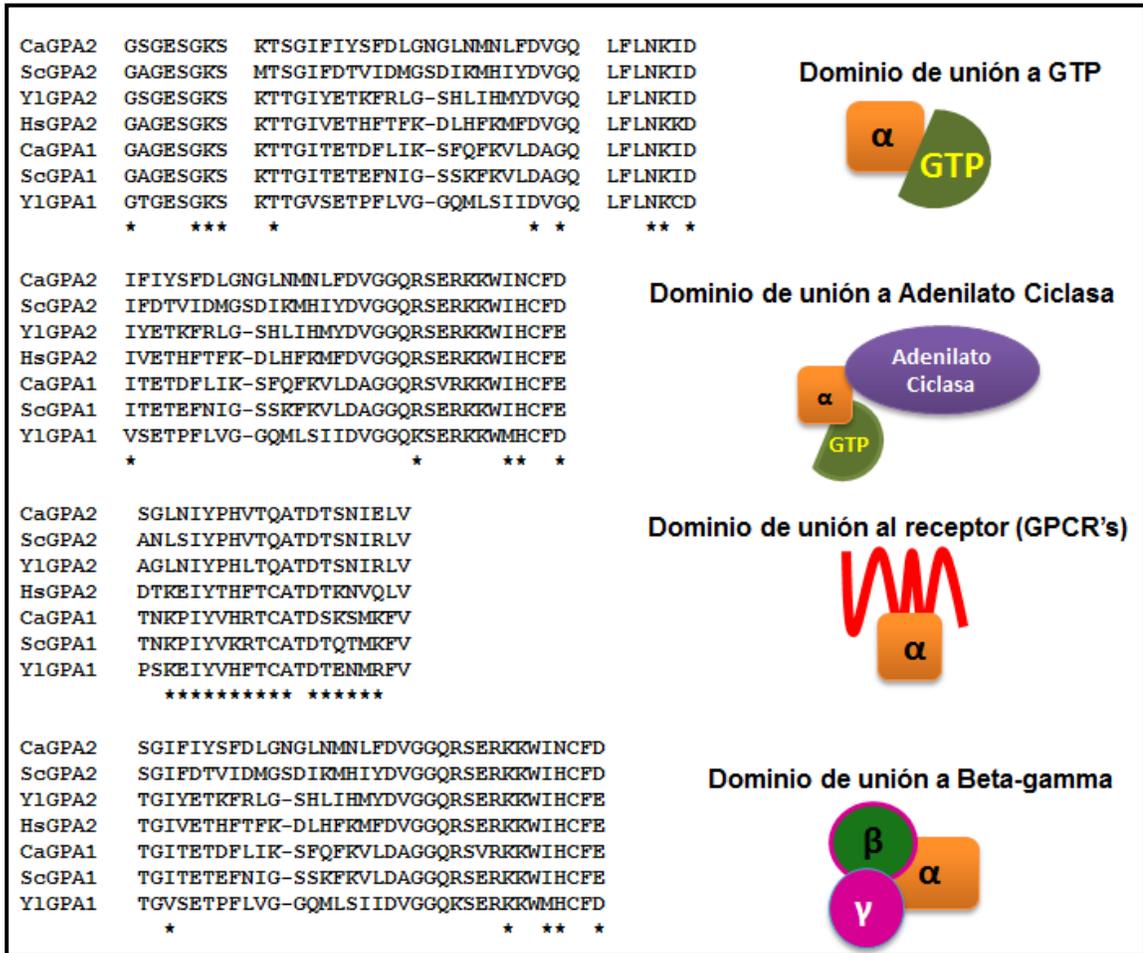
Secuencias obtenidas de NCBI. \*ID = número de identificación en GenBank.

\*\*Porcentaje de identidad de aminoácidos (No. residuos idénticos/ No. Residuos comparados).

La putativa proteína Y/Gpa1 presenta el mayor porcentaje de identidad con la proteína Gpa1 de *S. cerevisiae* (55% de identidad, en una región de 234 Aa comparados) y la menor identidad, con las Gpa2 de *C. albicans* y *S. cerevisiae* (31% y 32% de identidad en regiones de 406 y 382 Aa comparados, respectivamente). Por otra parte, la putativa proteína Y/Gpa2 muestra el mayor porcentaje de identidad con las proteínas Gpa2 de *S. cerevisiae* y *C. albicans* (46 y 45% de identidad). Este mismo análisis muestra que las putativas proteínas Gpa1 y Gpa2 de *Y. lipolytica* presentan una identidad de 37 y 41% con respecto a la proteína Gpa2 de la especie *H. sapiens* (ver tabla 11).

El alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de las Gpa's que se mencionan en la tabla 11, se realizó con el programa CLUSTAL W (Kyoto University Bioinformatics Center, 2013). Mediante la comparación de los resultados obtenidos con la información contenida en las bases de datos de NCBI se identificaron, en las regiones conservadas de las Gpa's de *Y. lipolytica*, los dominios específicos de unión a otros componentes que participan en la

activación de la vía PKA, como son el Dominio de Unión a GTP, el Dominio de Unión a la adenilato ciclasa, el Dominio de Unión a receptores transmembranales (GPCR's) y el Dominio de Unión al dímero formado por las subunidades beta-gamma; este análisis también permitió identificar, tanto en *YIGpa1* como en *YIGpa2*, la presencia de aminoácidos a los que se les atribuye una función esencial para las uniones de los diferentes dominios (ver figura 9).



**Figura 9. Identificación de dominios específicos en presuntas proteínas Gpa1 y Gpa2 de *Y. lipolytica*.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos Gpa's de diferentes especies. Se muestran los dominios identificados como sitios de unión a otros componentes de la vía PKA.

CaGPA2, gen GPA2 del organismo *C. albicans*; ScGPA2, gen GPA2 de *S. cerevisiae*; YlGPA2, gen GPA2 de *Y. lipolytica*; HsGPA2, gen GPA2 de *H. sapiens*; CaGPA1, gen GPA1 de *C. albicans*; ScGPA1, gen GPA1 de *S. cerevisiae*; YlGPA1, gen GPA1 de *Y. lipolytica*.

\*Aminoácidos que participan en la actividad específica de los distintos dominios, CLUSTAL W.

## 7.2 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos específicos necesarios para la delección de los genes GPA1 y GPA2 y posterior generación de las mutantes correspondientes, se llevó a cabo sobre las secuencias de los genes GPA

identificadas. Los oligonucleótidos diseñados para las diferentes etapas de este trabajo se muestran en la tabla 12. Para el análisis de las características físico-químicas (temperatura de fusión, contenido de GC, formación de dímeros y especificidad) de cada uno de ellos se utilizaron programas bioinformáticos con acceso libre en Internet, como Oligo Calc, primer-BLAST, DNA Sequence Reverse and Complement Online Tool (Resources for Molecular and Cell Biologists, 2013).

**Tabla 12. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR en las diferentes etapas de este trabajo**

Nomenclatura	Secuencia 5'→ 3'	T <sub>m</sub> (°C)	Etapas de uso
GPA1-F	GGAGCAACATGCTCTGTATCTCAAGG	62	Amplificación del gen completo GPA1
GPA1-R	GCAGAGTAGTTGGCGGCAGGCTGG		
GPA2-PF	<b>AAGCTT</b> GCGCCGACACGGACCCCGG	66	Amplificación de la región promotora de GPA2
GPA2-PR	<b>GGATCC</b> GTCTTGCGTATTAGTGTGCGG		
GPA2-TF	<b>GGATCC</b> GCCAGGTGAACTGGAGG	66	Amplificación de la región terminadora de GPA2
GPA2-TR	<b>AAGCTT</b> GGTGGGTGCAGGAGTCTCTGG		
LEU2F	<b>GGATCC</b> GTAATGCCAGCATCGAGG	66	Amplificación del gen marcador LEU2
LEU2R	<b>GGATCC</b> CCCTTACCATACCTCACTG		
5'GPA1-F	GGTGCCGTTTGTGAGGTGGG	62	Corroborar la presencia en el locus correcto del casete de interrupción para el gen GPA1
3'GPA1-R	GGCAGCCTTAGCAGTGGCCTGGG		
URA3 interno-F	GGCCTGCGAGCTGGTGCCGAGG	60	Corroborar presencia del gen marcador URA3 en la construcción genética
URA3 interno-R	CCTCGGCACCAGCTCGCAGGCC		

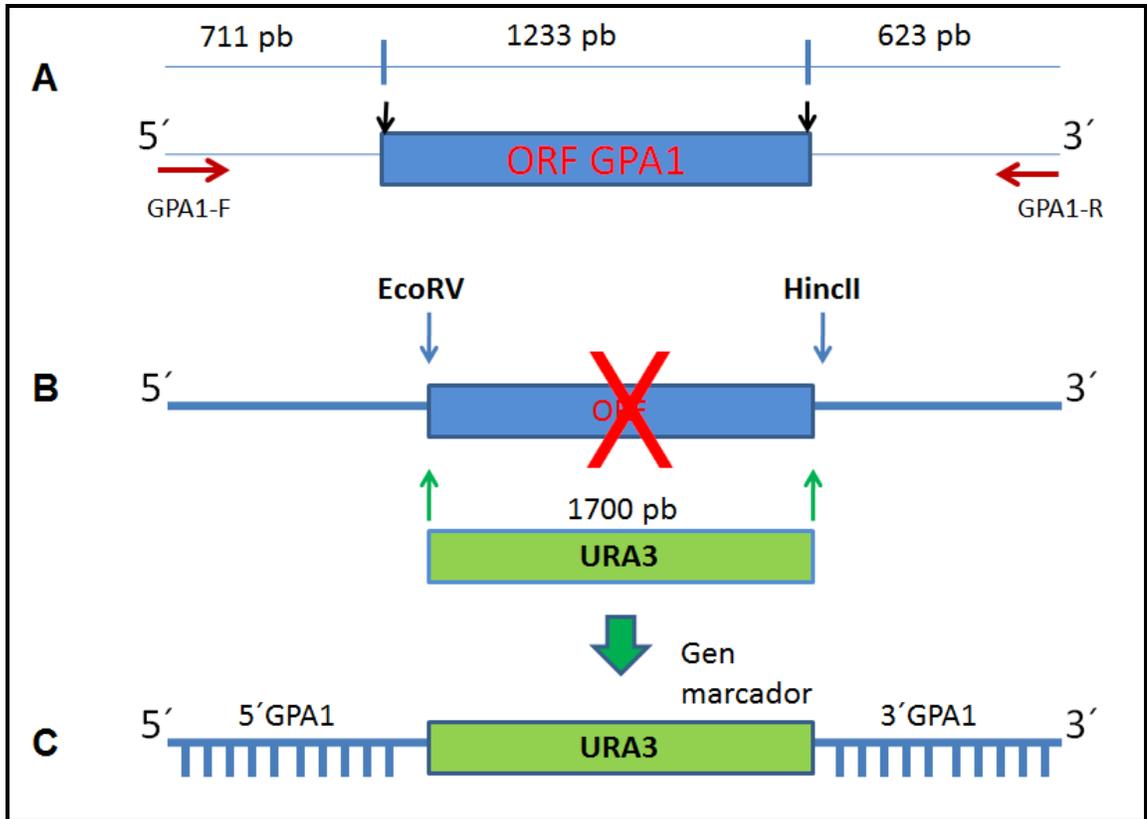
GPA1 sonda-F	CGACTCCGCTATGCCTGACTGGG	62	Corroborar la eliminación del ORF del gen GPA1
GPA1 sonda-R	GGCCGCCACCAGAAAAGGGG		
GPA2 sonda-F	GGCCACAGCAACAAGACAGAGG	60	Corroborar la eliminación del ORF del gen GPA2
GPA2 sonda-R	CCGAGTACGACCAGGTTCTGTTG		
LEU2 interno-F	CCAACACCGTATGGACCACTCCC	66	Corroborar presencia del gen marcador LEU2 en la construcción genética
LEU2 interno-R	CCTCGTCGGAGATGATATCGCC		
5'GPA2-F	<b>GGATCC</b> GCGTGAGAATTAGTCTGTCTG	58	Corroborar la presencia en el locus correcto del casete de interrupción para el gen GPA2
3'GPA2-R	<b>GGATCC</b> CCCTGAAGGAGTAACAAGTAG		

\*En negritas se indica el sitio de restricción adicionado a la secuencia del oligonucleótido: AAGCTT para HindIII, GGATCC para BamHI.

### 7.3 Construcción del casete GPA1-URA3 y generación de la mutante $\Delta$ -Y/GPA1

La mutante  $\Delta$ GPA1 se generó por doble recombinación homóloga sustituyendo el ORF del gen GPA1 por el gen URA3 y sus secuencias promotora y terminadora.

Para la construcción del casete de disrupción GPA1-URA3 (Fig. 10), utilizando los oligonucleótidos GPA1-F (GGAGCAACATGCTCTGTATC TCAAGG) y GPA1-R (GCAGAGTAGTTGGCGGCAGGCTGG) se logró amplificar un fragmento de 2907 pb correspondiente al ORF (1233 nt) y a los extremos 5'(845 nt) y 3'(829 nt) del gen GPA1 (Fig. 10A). El fragmento amplificado se clonó en el vector pCR TOPO 4 (Invitrogen®). Después, por digestión enzimática con las enzimas EcoRV y HincII se eliminó el ORF de GPA1 y en su lugar se ligó el fragmento de 1700 pb correspondiente al gen URA3 y sus regiones promotora y terminadora (fig. 10B y 10C).



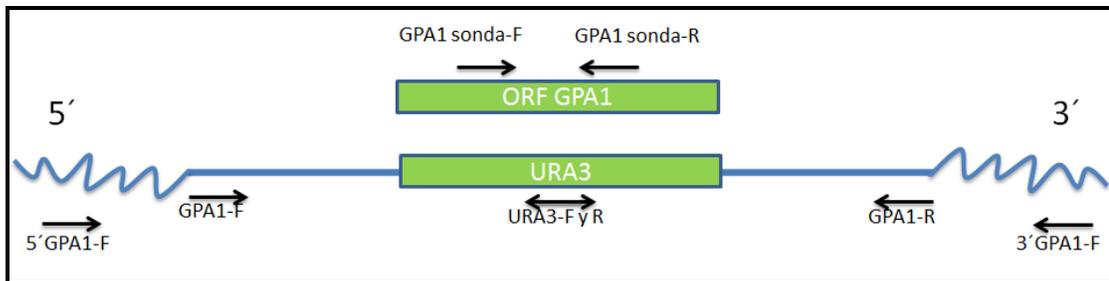
**Figura 10. Representación esquemática de la estrategia para la construcción del casete de disrupción GPA1-URA3.** A) Representación gráfica del producto amplificado por PCR sobre DNA genómico de *Y. lipolytica* correspondiente al ORF y extremos 5' y 3' del gen GPA1. B) Se muestran los sitios de corte con las enzimas de restricción EcoRV y HincII para eliminar el ORF del gen GPA1 y su posterior sustitución con el gen marcador URA3. C) Esquema de la construcción genética esperada (casete de disrupción) donde se muestran las regiones adyacentes 5' y 3' del gen GPA1 y en la parte central, la sustitución del ORF GPA1 por el gen URA3.

Para la obtención de la mutante  $\Delta$ GPA1, las células litio-competentes de la cepa P01A de *Y. lipolytica* se transformaron introduciendo el DNA correspondiente a la construcción genética (3029 pb). Siete días después de la transformación, en las placas selectivas (placas Petri con medio YNB adicionado con leucina) se observó el crecimiento de pequeñas colonias características de *Y. lipolytica*. Se obtuvieron 10 transformantes y se sembraron en tubos que contenían 10 ml de medio líquido YNB+Leu. Se obtuvo el DNA genómico de estas transformantes y, por PCR, se pudo comprobar que solo 6

de ellas habían incorporado el casete en la región esperada (en el locus correcto).

#### 7.4 Caracterización genotípica de la mutante $\Delta$ GPA1

Las 10 colonias que se recuperaron fueron analizadas por PCR para observar la integración del casete de disrupción del gen GPA1; para ello se utilizaron combinaciones de los oligonucleótidos 5'GPA1-F (GGGTGCCGTTTGTGAGGTGGG) y 3'GPA1-R (GGCAGCCTTAGCAGTGGCCTGGG), los cuales fueron diseñados sobre las regiones cromosómicas 5' y 3' del gen GPA1 que no habían sido manipuladas en la construcción e inserción del casete de disrupción (fig. 11). Considerando que se habían eliminado 1573 pb (ORF de GPA1) y se sustituyeron por 1700 pb (gen URA3), la amplificación con estos oligonucleótidos permitió obtener fragmentos de 3.65 kb sobre el DNA de la mutante  $\Delta$ GPA1 y de 3.53 kb sobre el DNA de la cepa control P01A.



**Figura 11. Representación esquemática del sitio donde se diseñaron los oligonucleótidos para el ensayo de PCR para comprobación de la mutación.** Se utilizaron distintas combinaciones de oligonucleótidos para efectuar el ensayo de PCR.

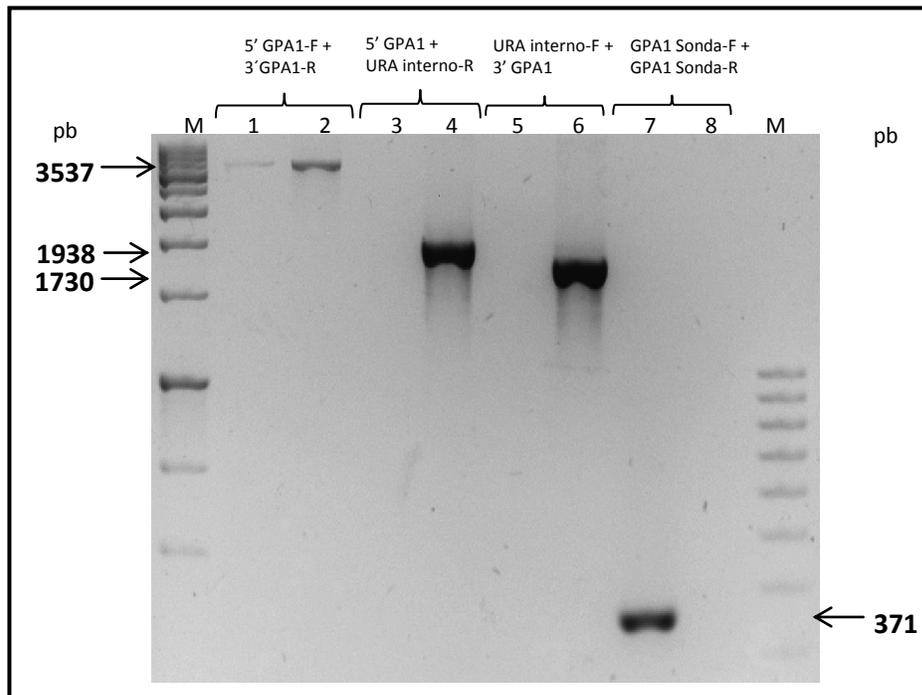
En otra combinación, utilizando los oligonucleótidos GPA1 sonda-F (CGACTCCGCTATGCCTGACTGGG) y GPA1 sonda-R (GGCCGCCCACCAGAAAAGGGG), se amplificó un fragmento de 371 pb sobre la cepa control y considerando que la región del ORF GPA1 había sido sustituida por el gen URA3 y ya no estaba presente en la mutante, no hubo amplificación sobre el DNAg de la mutante. De la misma manera al estar presente el gen URA3 en las

mutantes, cuando se usó la combinación de los oligonucleótidos 5´GPA1-F (GGGTGCCGTTTGTGAGGTGGG) y URA3 interno-R (CCTCGGCACCA GCTCGCAGGCC), se logró amplificar un fragmento de 1.93 kb sobre la mutante mientras que sobre la cepa control no hubo amplificación; con el par URA3 interno-F (GGCCTGCGAGCTGGTGCCGAGG) y 3´GPA1-R (GGCAGCC TTAGCAGTGGCCTGGG) se amplificó un fragmento de 1.73 kb sobre la mutante, mientras que sobre la cepa control no hubo amplificación. Todas estas combinaciones de oligonucleótidos y las condiciones de PCR utilizadas se presentan en la tabla 13.

**Tabla 13. Combinaciones de oligonucleótidos para la caracterización de las mutantes  $\Delta$  GPA1**

Oligonucleótidos	Tm (°C)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	
		Mutante	P01A
5´GPA1-F/ 3´GPA1-R	62	3650	3537
GPA1 sonda-F/ GPA1 sonda-R	62	(-)	371
5´ GPA1-F/ URA interno-R	60	1938	(-)
URA interno-F/ 3´GPA1-R	60	1730	(-)

El análisis mostró que de las 10 colonias analizadas, 6 resultaron positivas, integrando el casete de disrupción en la orientación y locus correcto; las mutantes positivas fueron M1, M2, M3, M5, M6, y M9. En la figura 12 se muestran únicamente los resultados del análisis genotípico de la mutante  $\Delta$ GPA1 M1 con las diferentes combinaciones de oligonucleótidos.



**Figura 12. Caracterización genotípica de la mutante  $\Delta$ GPA1.** Para las reacciones de PCR se utilizaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos (ver texto y tabla 13). En la parte superior de la figura se muestran las combinaciones de oligonucleótidos utilizados para la PCR. Carriles 1, 3, 5 y 7, amplificación sobre DNA correspondiente a la cepa parental P01A; carriles 2, 4, 6 y 8, PCR sobre DNA de la mutante  $\Delta$ GPA1; M marcadores de peso molecular Hyperladder III y IV, respectivamente.

### 7.5 Construcción de los casetes GPA2-LEU2 y GPA2-URA3 y generación de las mutantes $\Delta$ -YIGPA2

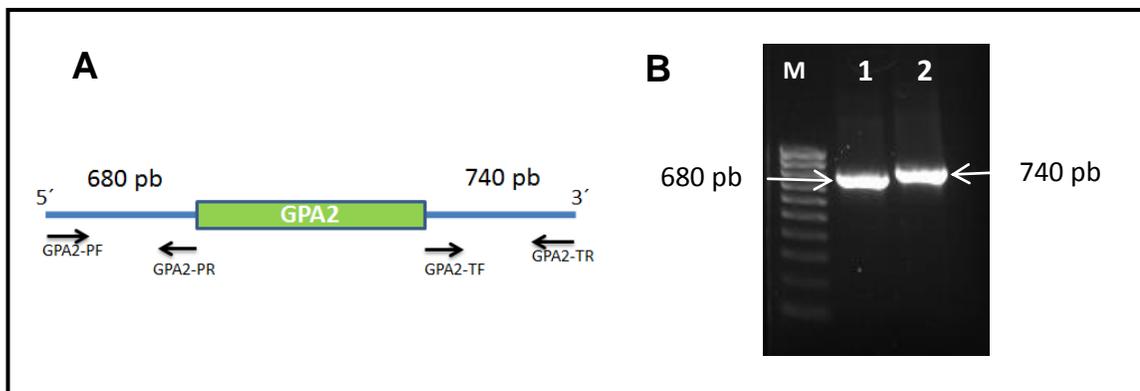
Para la delección del gen GPA2 se construyeron dos casetes de disrupción, uno con el gen marcador URA3 y el otro con el gen LEU2; el casete GPA2-URA3 tiene un tamaño de 3.1 kb y GPA2-LEU2 de 3.7 kb.

Para la construcción de los casetes de disrupción del gen GPA2, la estrategia consistió en clonar las regiones adyacentes de dicho gen y ligarlos con los genes marcadores LEU2 y URA3. La clonación de cada una de las regiones por separado permitió conservar los extremos del gen GPA2 y así

propiciar la integración -por recombinación homóloga- de la construcción genética en el locus adecuado dentro del genoma.

### 7.5.1 Clonación de las regiones adyacentes (P y T) del gen GPA2

Para la clonación de las regiones promotora y terminadora del gen GPA2 se hicieron amplificaciones por PCR sobre DNAg de la cepa P01A con oligonucleótidos diseñados en la secuencia de dichas regiones (fig. 13A, tabla 14).



**Figura 13. Estrategia para la obtención de las regiones adyacentes del gen GPA2.** A) Representación esquemática que muestra los sitios donde fueron diseñados los oligonucleótidos para amplificar las regiones 5' y 3' del gen GPA2. B) Productos amplificados por PCR correspondientes a los extremos del gen GPA2; M, marcador de peso molecular Hyperladder IV.

Las reacciones de PCR, utilizando los oligonucleótidos y condiciones que se mencionan en la tabla 14, permitieron tener los productos del tamaño esperado correspondientes a fragmentos de 680 y 740 pb para las regiones promotora (P) y terminadora (T), respectivamente (fig. 13B).

**Tabla 14. Secuencias de oligonucleótidos de las regiones externas de GPA2**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia 5' → 3'</b>	<b>Sitio de Restricción (T<sub>m</sub>, °C)</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
GPA2-PF	<b>AAGCTT</b> GCGCCGACACGGACCCCGG	HindIII (66)	680
GPA2-PR	<b>GGATCC</b> GTCTTGCGTATTAGTGTGCGG	BamHI (66)	
GPA2-TF	<b>GGATCC</b> GCCAGGTGAACTGGAGG	BamHI (66)	740
GPA2-TR	<b>AAGCTT</b> GGTGGGTGCAGGAGTCTCTGG	HindIII (66)	

Las letras negritas corresponden a los sitios de restricción de las enzimas HindIII (AAGCTT) y BamHI (GGATCC) adicionados a los oligonucleótidos.

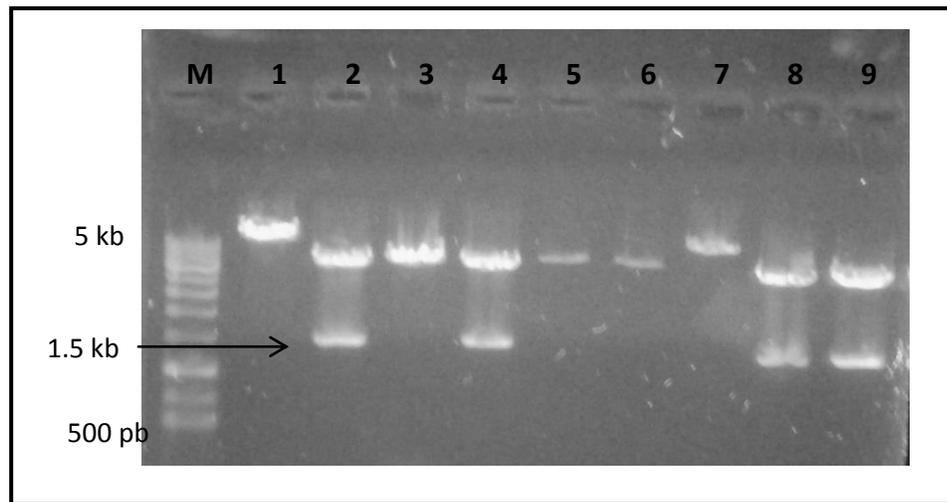
Los productos de PCR (P= 680 y T=740 pb) se clonaron en el vector pCR TOPO 4 y se transformaron células de *E.coli*; las clonas obtenidas se comprobaron como positivas por análisis de restricción y por PCR.

### **7.5.2 Ligación de las regiones adyacentes (P y T) del gen GPA2.**

Las secuencias correspondientes a P y T se obtuvieron amplificando por PCR sobre el DNA plasmídico de cada una de las clonas utilizando los oligonucleótidos universales T3 y T7 (Invitrogen®) diseñados sobre la secuencia del vector pCR TOPO 4.

Los productos de PCR se sometieron a digestión enzimática; aunque P y T están flanqueados por los sitios de restricción para las enzimas HindIII y BamHI, solo se utilizó la enzima BamHI para cortar únicamente uno de los extremos (extremos internos) propiciando de esta manera la ligación de solo uno de los extremos de cada secuencia. Los productos de la digestión se ligaron con la enzima T<sub>4</sub> Ligasa Express de Invitrogen® y con el producto de la ligación se transformaron bacterias de la cepa Top 10 de *E. coli*.

Para corroborar la ligación de los extremos adyacentes del gen GPA2: región promotora (P) y región terminadora (T), el DNA plasmídico obtenido de cada colonia que creció en medio selectivo se analizó por digestión enzimática con la enzima HindIII. En la figura 14 se muestra el resultado de esta digestión; se identificaron 4 clonas positivas (2, 4, 8 y 9) de 9 analizadas. En ellas, el fragmento obtenido de la digestión (1420 pb) corresponde al producto de la unión de los fragmentos P y T (680 + 740 pb).

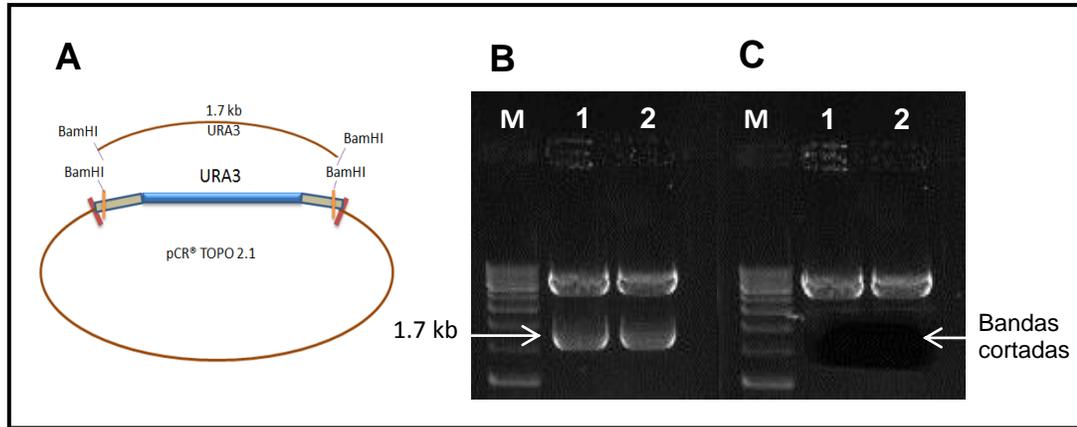


**Figura 14. Identificación de las clonas que acarrean la ligación de los extremos del gen GPA2.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% que muestra los resultados de la digestión del DNA plasmídico de cada una de las clonas con HindIII (carriles 1-9); M marcador de peso molecular Hyperladder III.

### 7.5.3 Inserción del gen marcador URA3 entre los fragmentos P y T

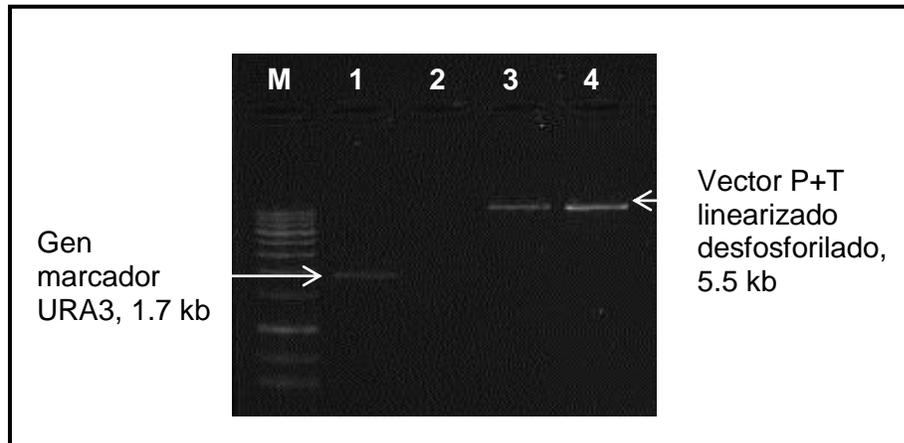
Para insertar el gen marcador entre los fragmentos P y T, el DNA plasmídico correspondiente al vector pCR TOPO/P+T se digirió con la enzima BamHI y se desfosforiló. A la par con este proceso se llevó a cabo la digestión (con la misma enzima) del vector pCR TOPO 2.1/URA3 (vector que acarrea el gen marcador URA3). Los productos obtenidos de la digestión se separaron por electroforesis y las bandas correspondientes al plásmido TOPO/P+T y al gen

URA3 se purificaron a partir de los fragmentos del gel de agarosa al 0.7% (Fig. 15).

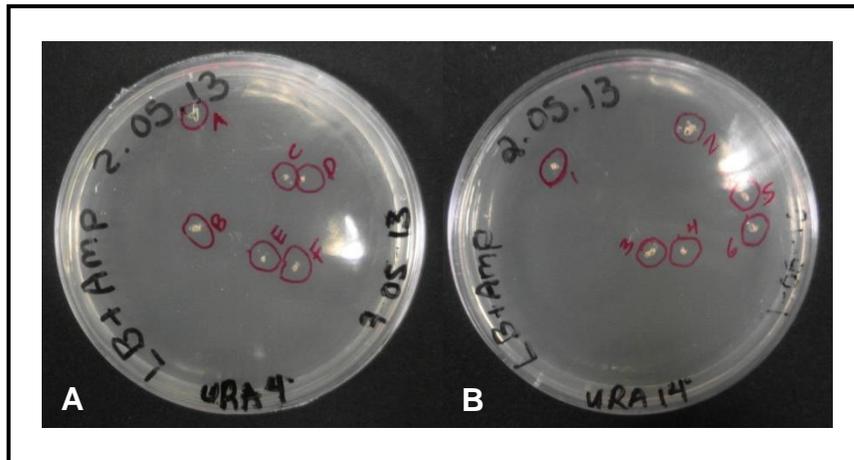


**Figura 15. Obtención del gen marcador URA3 por digestión enzimática.** A) Digestión enzimática del vector pCR TOPO 2.1 que acarrea el gen marcador URA3 con la enzima de restricción BamHI. B) Resultado de la digestión enzimática, fragmento liberado de 1.7 kb, vector digerido (1 y 2); M marcador de peso molecular Hyperladder III. C) Fragmento de interés recuperado del gel de agarosa al 0.7%.

Después de ser purificados los fragmentos obtenidos (gen marcador URA3 y vector P+T desfosforilado) se visualizaron en un gel de agarosa al 0.7% (fig. 16C). Para la reacción de ligación se utilizó una proporción 3:1 (inserto: vector) y la enzima T<sub>4</sub> Ligasa Express, usando 2 condiciones diferentes: en una de ellas la reacción se incubó a 4 °C toda la noche (en el refrigerador) y la otra a 14 °C toda la noche; después de transcurrido el tiempo de incubación, con los productos de la ligación se transformaron células calcio-competentes de *E.coli*. En la fig. 17 se observa el resultado de esta transformación, coincidentemente en cada una de las condiciones se obtuvieron 6 colonias que crecieron en medio selectivo LB+ampicilina.



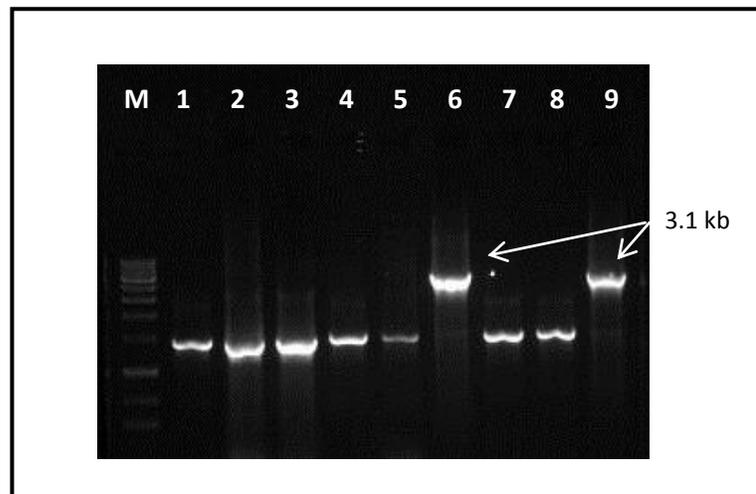
**Figura 16. Electroforesis de los fragmentos de DNA correspondientes al vector desfosforilado P+T y al gen marcador URA3.** Se muestran las proporciones de las digestiones del gen marcador URA3 y el vector desfosforilado P+T. Digestión de URA3 con la enzima BamHI (1) en donde se cargaron 5  $\mu$ l, carril sin muestra (2), digestión y desfosforilación del vector pCR TOPO4/P+T (3 y 4) en donde se cargaron 2  $\mu$ l; M marcador de peso molecular Hyperladder III.



**Figura 17. Selección de clones de bacterias transformadas con los productos de ligación P+URA3+T del gen GPA2.** Células *E. coli* transformadas con el vector pCR TOPO 4 que acarrean la construcción de P+URA3+T de GPA2 creciendo en placas con medio selectivo LB+ampicilina. A) Cuando la reacción de ligación se incubó a una temperatura de 4 °C, toda la noche. B) Cuando la reacción de ligación se realizó a 14 °C, toda la noche.

#### 7.5.4 Construcción del casete de interrupción GPA2-URA3

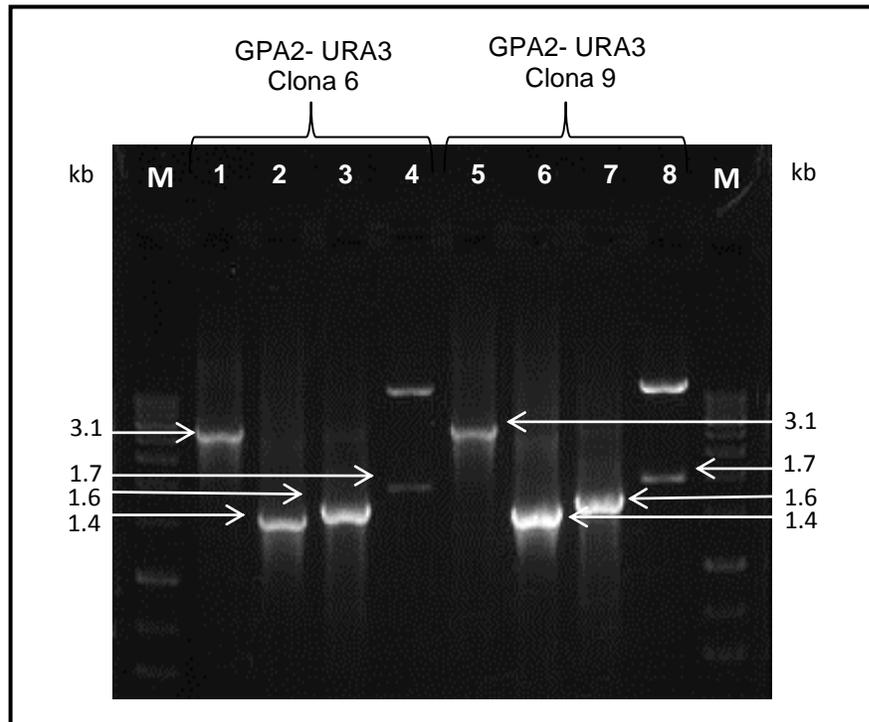
Para corroborar la presencia del producto de la ligación en las clonas se realizó un análisis por PCR utilizando DNA plasmídico de cada una de las colonias. Para la amplificación se utilizaron los oligonucleótidos específicos GPA2-PF (**AAGCTTGCGCCGACACGGACCCCGG**) y GPA2-TR (**AAGCTTGGTGGGTGCAGGAGTCTCTGG**) con una temperatura de alineamiento de 66 °C y un tiempo de extensión de 3.2 min; bajo estas condiciones fue posible amplificar la construcción del casete GPA2-URA3, la cual tiene una longitud de 3.1 kb (fig. 18).



**Figura 18. Identificación por PCR de las clonas de *E. coli* que acarrean el plásmido con la construcción P+URA3+T del gen GPA2.** Comprobación por PCR con oligonucleótidos GPA2-PF y GPA2-TR que amplifican toda la construcción del casete P+URA3+T de GPA2 (1-9); M marcador de peso molecular Hyperladder III. Carriles 1-4, clonas obtenidas con los productos de la ligación a 14 °C; 5-9, clonas obtenidas con los productos de la ligación a 4 °C.

De las 12 colonias que crecieron en medio selectivo, solo 2 (colonias 6 y 9) resultaron positivas a esta reacción de PCR (fig. 18), por lo que se procedió a continuar el análisis con otra serie de oligonucleótidos específicos diseñados sobre el gen marcador y utilizando el DNA plasmídico obtenido de estas clonas. Los oligonucleótidos que se usaron fueron URA interno-F (GGCCTGCGAGCTGGTGCCGAGG) y URA interno-R (CCTCGGCACCAGCTCGCAGGCC) en combinación con los oligonucleótidos diseñados en las regiones

externas del gen GPA2; se utilizó una temperatura de alineamiento de 66 °C y un tiempo de extensión de 2 min; de esta manera se comprobó que el gen marcador estaba presente y que éste se había insertado en la orientación correcta (5'→3'), con respecto a los extremos de GPA2. En la fig. 19 se muestran los resultados de este análisis: los carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a la clona 6 y los carriles 5, 6, 7 y 8 a la clona 9. Además, para corroborar la presencia del gen marcador en la construcción genética, sobre el DNA plasmídico de las mismas clonas se realizó una digestión enzimática con la enzima de restricción BamHI; como producto de esta digestión de cada una de las clonas se liberó un fragmento de 1.7 kb correspondiente al gen marcador URA3 (fig. 19, carriles 4 y 8).

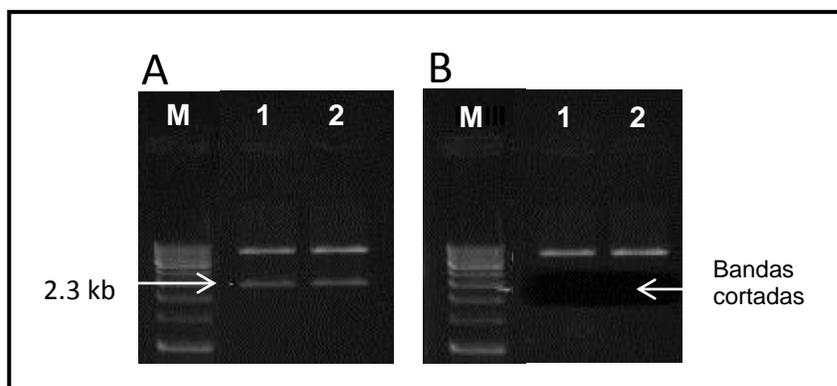


**Figura 19. Identificación de las clonas de *E. coli* que acarrean la construcción GPA2-URA3.** Comprobación por PCR con oligonucleótidos diseñados en los extremos de las regiones adyacentes del gen GPA2 (1 y 5), y con oligonucleótidos internos del gen marcador (2, 3, 6 y 7); en los carriles 4 y 8 se observa la presencia de un fragmento de 1.7 kb correspondiente al gen marcador URA3 liberado del DNA plasmídico por digestión con la enzima BamHI; M, marcador de peso molecular Hyperladder III.

### 7.5.5 Construcción del casete de interrupción GPA2-LEU2

La metodología llevada a cabo para la construcción del casete GPA2-LEU2 fue la misma descrita para la construcción de GPA2-URA3, con la diferencia que el gen marcador se recuperó por digestión enzimática (fig. 20), a partir del vector de clonación pCR TOPO 4, en el cual había sido clonado el gen LEU2 obtenido por PCR sobre el DNA genómico de la cepa YL-4 de *Y. lipolytica*.

La cepa YL-4 es una cepa diferente a P01A; a diferencia de ésta, no presenta auxotrofia por leucina ya que tiene completo el gen LEU2.

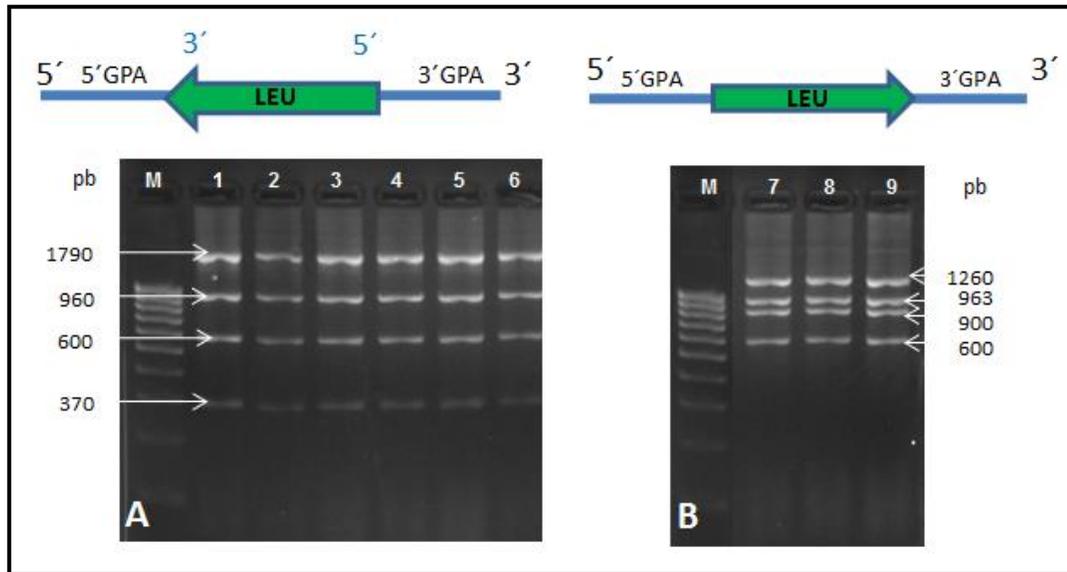


**Figura 20. Obtención del gen marcador LEU2 por digestión enzimática del plásmido TOPO 4.** A) Digestión enzimática del DNA plasmídico, con la enzima de restricción BamHI, la cual libera al gen marcador LEU2, (1 y 2) de 2.3 kb; M marcador de peso molecular Hyperladder III. B) Los fragmentos de interés (2.3 Kb) han sido cortados para su posterior purificación.

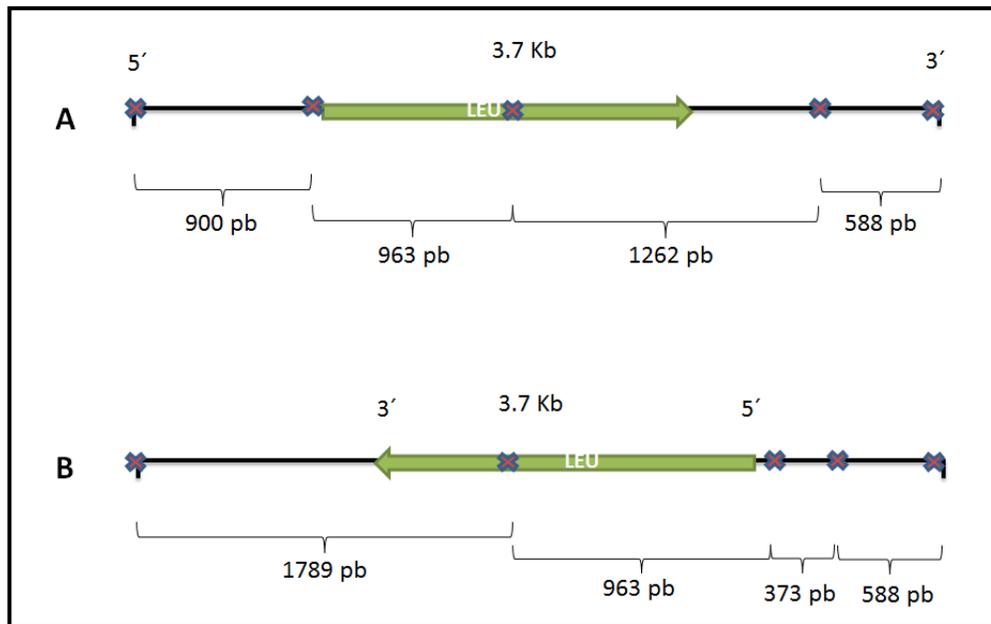
Una vez recuperado, el gen marcador LEU2 se ligó con el vector desfosforilado P+T en los sitios de restricción BamHI y se procedió a transformar células calcio-competentes de la cepa TOP 10 de *E.coli*.

Para corroborar la presencia y la correcta inserción del gen marcador en la construcción GPA2-LEU2 y comprobar que las clonas que crecieron en medio líquido LB+ampicilina fuesen positivas, el DNA plasmídico de éstas se sometió a digestión con la enzima de restricción EcoRI, obteniéndose patrones de restricción diferentes, lo cual mostraba que la inserción del gen marcador había sido en ambos sentidos. En la fig. 21 se muestran los resultados de esta

digestión y se observa que las clonas 1-6 presentan la inserción del gen LEU2 en dirección 3'→5' mientras que en las clonas 7, 8 y 9 la inserción del gen marcador fue en la dirección 5'→3', conforme al patrón de restricción obtenido por análisis virtual de las secuencias correspondientes (fig. 22).



**Figura 21. Identificación de las clonas de *E. coli* que acarrean el plásmido con la construcción GPA2-LEU2.** A) Resultados de la digestión del DNA plasmídico con la enzima EcoRI. Las muestras de los carriles 1-6 corresponden a clonas en las cuales el gen marcador se insertó en dirección 3'→5'. B) Las muestras de los carriles 7, 8 y 9 muestran la inserción del gen LEU2 en dirección 5'→3'; M, marcador de peso molecular IV.



**Figura 22. Análisis del patrón de restricción virtual que muestra la orientación del gen LEU2 insertado entre los extremos del gen GPA2.** A) Patrón de restricción con la enzima EcoRI de la Inserción del gen marcador LEU2 en sentido 5'→3'; B) Inserción del gen marcador LEU2 en sentido 3'→5'. Se muestran con el símbolo de cruz los sitios de corte de la enzima EcoRI y, en pb, el tamaño de los fragmentos esperados como producto de la digestión enzimática.

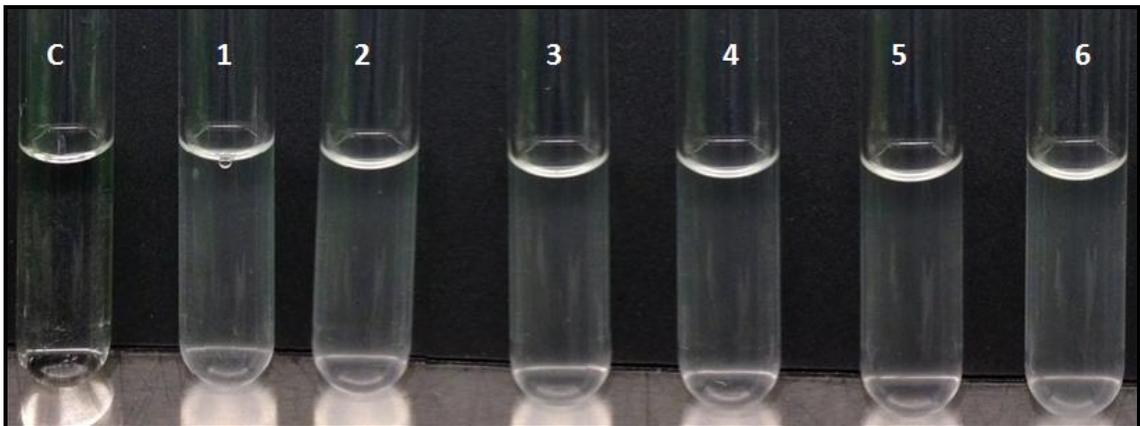
## 7.6 Transformación de las cepas P01A y $\Delta$ GPA1 para obtener mutantes GPA2 y dobles mutantes GPA

Una vez que se obtuvieron los casetes de disrupción GPA2-LEU2 y GPA2-URA3, se procedió a la transformación por electroporación de las cepas P01A y  $\Delta$ GPA1 de *Y. lipolytica* con el objetivo de obtener la mutante  $\Delta$ GPA2 y la doble mutante  $\Delta$ GPA1/ $\Delta$ GPA2, como se describe en métodos.

Se transformaron células de las cepas P01A y  $\Delta$ GPA1 tratadas previamente con sorbitol 1 M. En el caso de la cepa P01A se transformó con los dos casetes de disrupción construidos [GPA2-URA3 (Prom+Ura+Term) y GPA2-LEU2 (Prom+Leu+Term)] y en el caso de las células  $\Delta$ GPA1 con el casete GPA2-LEU2 (Prom+Leu+Term).

Después de la transformación, las células se sembraron en placas con medio mínimo YNB más el aminoácido/nucleótido adicionado correspondiente según la auxotrofia de la cepa.

Como resultado de este experimento, en las placas correspondientes a la transformación con el casete GPA2-LEU2 (cepas P01A y  $\Delta$ GPA1) no se observó el crecimiento de colonias después de 10 días de incubación y solo se obtuvieron colonias producto de la transformación en las placas correspondientes a la cepa P01A tratadas con el casete de disrupción GPA2-URA3. Bajo estas condiciones se obtuvieron 6 colonias transformantes que se recuperaron de las placas con medio selectivo y se sembraron en medio líquido YNB adicionado con leucina; en la fig. 23 se observa el crecimiento de las 6 colonias obtenidas y se compara con la falta de crecimiento de la cepa parental ( $\text{Ura}^-$ ,  $\text{Leu}^-$ ) en medio YNB suplementado solo con leucina.



**Figura 23. Crecimiento de las putativas mutantes  $\Delta$ GPA2 en medio mínimo YNB adicionado con leucina.** Las clonas 1-6 fueron obtenidas como producto de la transformación de la cepa P01A ( $\text{Leu}^-$ ,  $\text{Ura}^-$ ) con el casete de disrupción construido con el gen marcador URA3. Todas las clonas se cultivaron en medio mínimo YNB+leucina, durante 24 h, a 28 °C, con agitación constante de 200 rpm; los tubos contienen 4 ml de estos cultivos. C) Cepa control P01A; 1-6) Clonas de posibles mutantes  $\Delta$ GPA2.

## 7.7 Análisis genotípico de las posibles mutantes $\Delta$ GPA2

Bajo la premisa de que las células transformadas son capaces de crecer en medio líquido selectivo (ver fig. 23), se procedió a realizar el análisis genotípico de las células que se recuperaron mediante reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos.

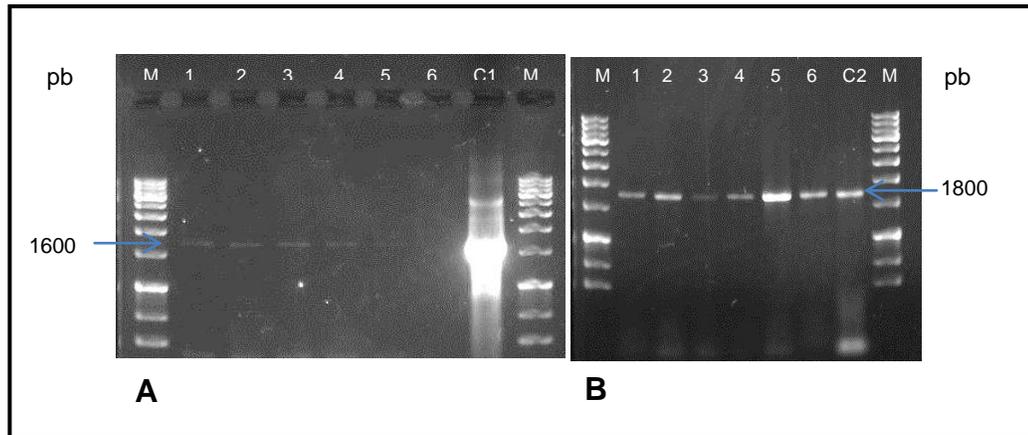
De los cultivos obtenidos en las condiciones descritas se extrajo el DNA genómico que se usó como templado para las reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos y condiciones que se describen en la tabla 15.

**Tabla 15. Combinaciones de oligonucleótidos para comprobación de las mutantes  $\Delta$  GPA2**

Oligonucleótidos	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
GPA2-PF/ GPA2-TR	66	3100
GPA2-PF/ URA interno-R	66	1400
GPA2 sonda-F/ GPA2 sonda-R	60	519 (P01A)
5´GPA2-F / URA3 interno-R	60	1521
URA3 interno-F / 3´GPA2-R	60	2200
5´GPA2-F / GPA2 sonda-R	60	1800 (P01A)
GPA2 sonda-F / 3´GPA2-R	60	2300 (P01A)
URA3 interno-F / GPA2-TR	60	1600 (control + DNA plasmídico GPA2/URA)
5´GPA2- F / 3´GPA2-R	58	3821 3521 (P01A)

Para corroborar la presencia del casete de interrupción en el genoma de las putativas mutantes GPA2 se usaron los oligonucleótidos URA3 interno-F (GGCCTGCGAGCTGGTGCCGAGG) y GPA2-TR (**AAGCTTGGTGGGTGCAG**

GAGTCTCTGG) y para corroborar la inserción del casete en el locus correcto se usaron los oligonucleótidos 5'GPA2-F (GGATCCGCGT GAGAATTAGTCTGTCTG) y GPA2 Sonda-R (CCGAGTACGACCAGGTT CTGTTG); los resultados se muestran en la figura 24.



**Figura 24. Análisis genotípico de las posibles mutantes  $\Delta$ GPA2 producto de la transformación con el casete GPA2-URA3.** Electroforesis en geles de agarosa al 2% de los productos de: A) PCR con oligonucleótidos URA3 interno-F y GPA2-TR. B) PCR con oligonucleótidos 5'GPA2-F y GPA2 Sonda-R. M, marcador de peso molecular Hyperladder III; 1-6, putativas mutantes  $\Delta$ GPA2; C1, control DNA plasmídico del casete pCR TOPO 4 GPA2-URA3; C2, control DNA genómico de la cepa P01A.

Se puede observar que todas las clonas analizadas integraron el casete de disrupción en su genoma, ya que como producto de la PCR se obtuvo un fragmento amplificado de 1600 pb correspondiente a la mitad del gen marcador URA3 más la región correspondiente al extremo T del gen GPA2 (fig. 24A). En la figura 24B se observan los resultados de la amplificación con los oligonucleótidos 5'GPA2-F (diseñado en una región del genoma que no había sido manipulado) y GPA2 Sonda-R (diseñado sobre la secuencia correspondiente al ORF de GPA2). En todas las muestras probadas correspondientes a las posibles mutantes GPA2 y al DNA genómico de P01A se obtuvo un producto de amplificación de un tamaño aprox. de 1800 pb, lo cual es indicativo de la presencia del gen GPA en su locus nativo, significando por lo

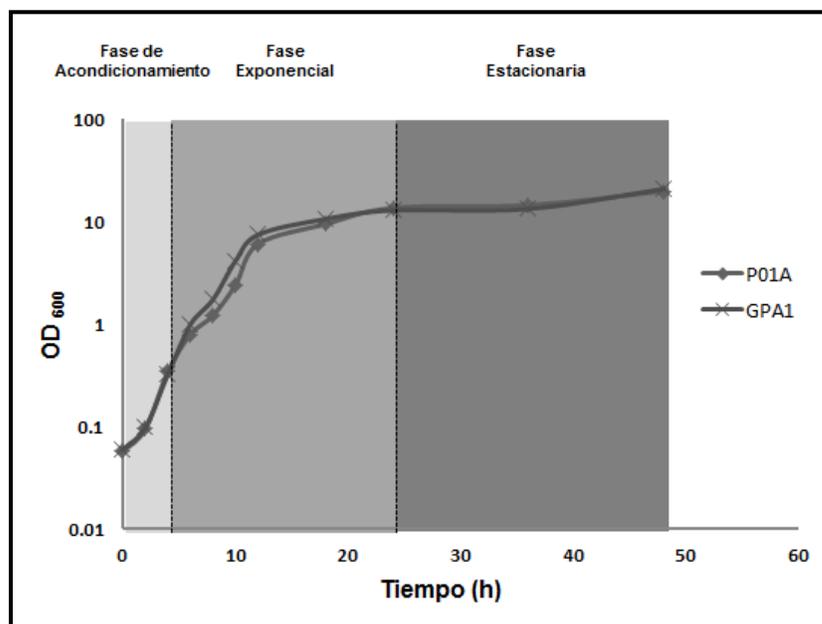
tanto que en estas clonas no hubo eliminación del gen GPA2 por sustitución con el gen marcador URA3.

## **7.8 Análisis fenotípico de la mutante $\Delta$ GPA1**

### **7.8.1 Crecimiento de la mutante $\Delta$ GPA1 en medio adicionado con diferentes concentraciones de glucosa**

Para el análisis fenotípico de la cepa mutante  $\Delta$ GPA1 se consideró incluir la capacidad de sensar la presencia de diferentes concentraciones de glucosa en el medio de cultivo así como la capacidad de diferenciación de la mutante.

En primera instancia, para determinar el patrón de crecimiento de la cepa mutante  $\Delta$ GPA1 se realizaron curvas de crecimiento de la cepa GPA1 y de la cepa control P01A incubadas en medio completo YPD (fig. 25). En ambas cepas se puede observar un crecimiento típico de levaduras y en la curva se identificaron las diferentes etapas del crecimiento celular.

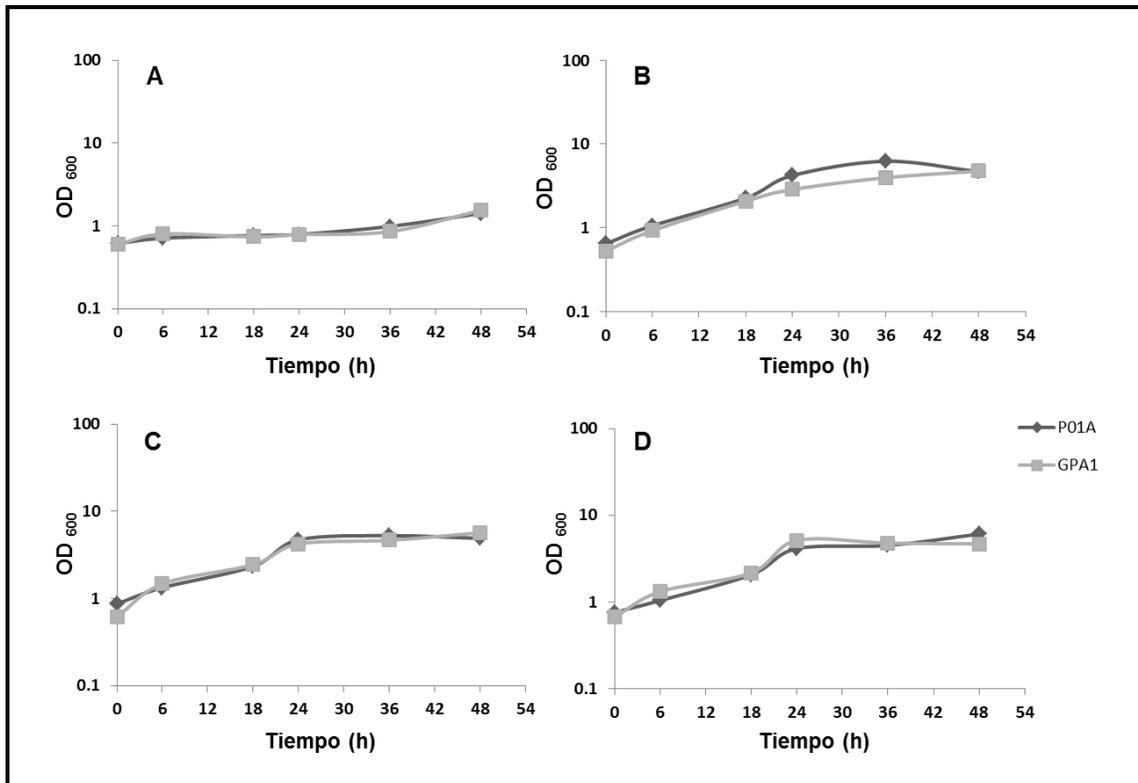


**Figura 25. Curvas de crecimiento de las cepas P01A y GPA1 de *Y. lipolytica*.** Los cultivos de las cepas fueron incubadas en medio YPD a 28 °C y 200 rpm durante 48 h. Los datos son expresados como logaritmo de la OD<sub>600</sub>. El nombre de cada una de las fases de crecimiento celular se muestra en la parte superior de la gráfica.

La capacidad de sensado de glucosa de la cepa mutante  $\Delta$ GPA1 se determinó en base a la capacidad de crecimiento de la cepa en medio mínimo YNB+Leu+Ura adicionado con diferentes concentraciones de glucosa (110, 55 y 27.5 mM); además, se incluyó un cultivo en medio mínimo YNB+Leu+Ura sin glucosa. De cada cultivo se realizaron determinaciones de la densidad óptica ( $A_{600}$  nm) cada 2 horas durante las primeras 10 horas y posteriormente cada 6 y 12 h. Con los resultados obtenidos se calcularon los tiempos de duplicación para cada cepa, en cada tratamiento, y éstos se compararon para establecer posibles diferencias.

Con respecto a los tiempos de duplicación de las cepas P01A y  $\Delta$ GPA1, se observó que los tiempos de ambas cepas cultivadas en medio mínimo YNB+Leu+Ura sin la adición de glucosa son mayores a 40 h, mientras que cuando el medio mínimo YNB se adicionó con 27.5 mM, 55 mM y 110 mM de

glucosa los tiempos de duplicación calculados fueron 8.5, 9.5 y 10 h para la cepa P01A y de 11, 10 y 8 h para la cepa  $\Delta$ GPA1.



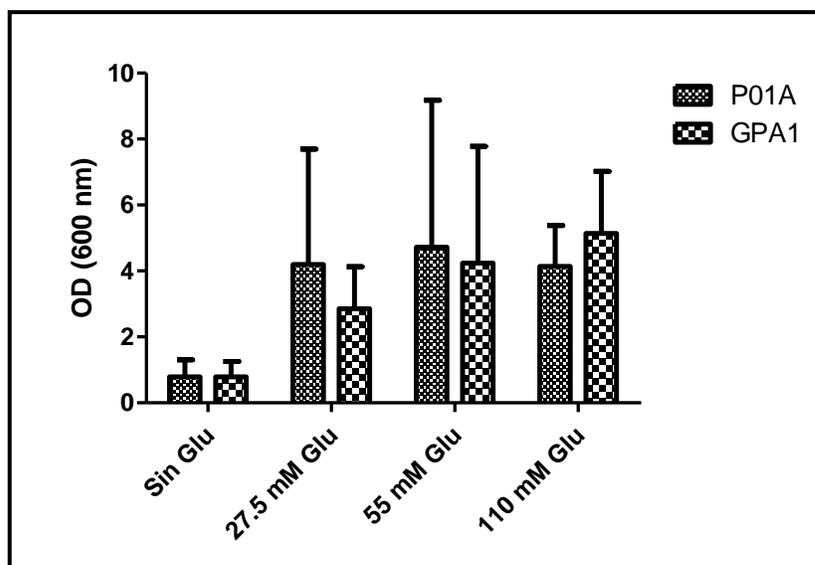
**Figura 26. Crecimiento de la cepa  $\Delta$ GPA1 y P01A en medio mínimo YNB+Leu+Ura adicionado con diferentes concentraciones de glucosa.** A) Medio mínimo YNB+Leu+Ura sin la adición de glucosa. B) Medio mínimo YNB+Leu+Ura más 27.5 mM de glucosa. C) Medio mínimo YNB+Leu+Ura más 55 mM de glucosa. D) Medio mínimo YNB+Leu+Ura más 110 mM de glucosa. Los valores de OD mostrados corresponden al promedio de tres repeticiones.

El patrón de crecimiento de cada cepa sometida a los diferentes tratamientos se puede observar en la fig. 26, donde se nota que en el medio mínimo YNB sin glucosa adicionada, tanto la cepa parental como la mutante  $\Delta$ GPA1 disminuyeron significativamente su crecimiento con respecto a los cultivos en el medio adicionado con 110 mM de glucosa (esta es la concentración de glucosa que de manera rutinaria se agrega al medio YPD que se usa para el cultivo axénico de *Y. lipolytica*). También se observa que las dos cepas presentan una tasa de crecimiento similar cuando el medio es adicionado con 27.5, 55 y

110 mM de glucosa. Además, el análisis estadístico (ANOVA) muestra que en ninguna de las condiciones probadas se observó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el patrón de crecimiento entre la cepa mutante  $\Delta$ GPA1 y la cepa parental P01A.

Adicionalmente se comparó el crecimiento de ambas cepas en cada tratamiento, en un punto determinado de la curva de crecimiento (24 h). En la figura 27 se observa que cuando las células se cultivaron en medio mínimo sin la adición de glucosa, el crecimiento de ambas cepas se redujo drásticamente y cuando se adicionó glucosa, se incrementó el crecimiento de ambas cepas, independientemente de la cantidad de glucosa adicionada. También se puede ver que el crecimiento en los medios adicionados con glucosa fue similar para ambas cepas, lo cual nos lleva a pensar que en las células mutantes  $\Delta$ GPA1 el sensado de glucosa es tan eficiente como en la cepa parental.

De manera interesante se puede ver que la cepa mutante  $\Delta$ GPA1 mostró proporciones de crecimiento mayor en los medios adicionados con cantidades cada vez mayores de glucosa (fig. 27); esto último, con la reserva de haber obtenido desviaciones estándar muy grandes en los experimentos realizados por triplicado.

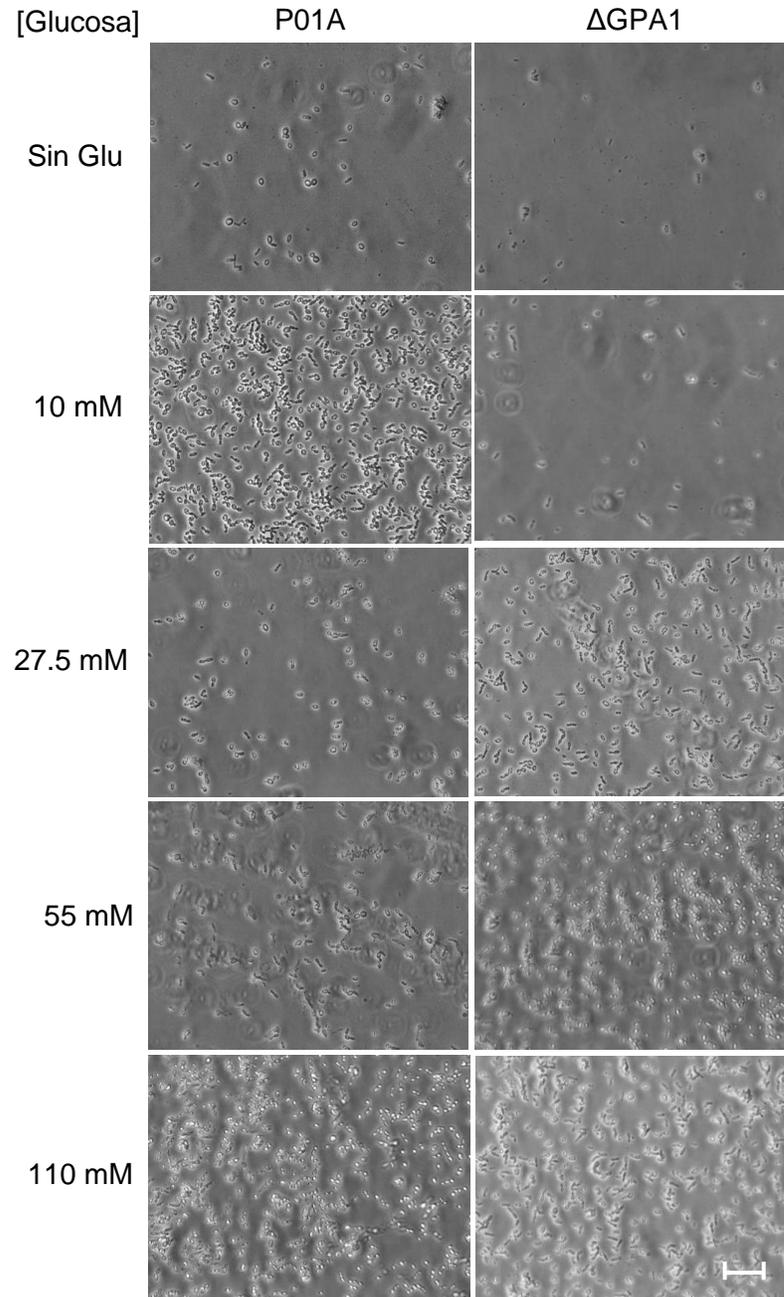


**Figura 27. Comparación del crecimiento de cepas de *Y. lipolytica* en medio mínimo YNB+Leu+Ura adicionado con diferentes concentraciones de glucosa.** Los valores de OD<sub>600</sub> mostrados son los determinados a las 24 h de incubación de las curvas de crecimiento de ambas cepas, en los diferentes tratamientos. P01A (cepa control) y ΔGPA1 (cepa mutante). Los valores mostrados corresponden al promedio de tres repeticiones.

### 7.8.2 Morfología de la mutante ΔGPA1 cultivada en presencia de diferentes concentraciones de glucosa

Para determinar la posible función de Gpa1 en la diferenciación celular mediada por el sensado de glucosa en el medio; las cepas control y mutante ΔGPA1 se cultivaron en medio mínimo YNB suplementado con leucina y uracilo y que contenía diferentes concentraciones de glucosa (110, 55, 27.5 y 10 mM); los cultivos se incubaron a 28 °C, en agitación durante 12 h. Para el análisis microscópico, 15 μl de cada cultivo se colocaron en un portaobjetos, se cubrieron con cubreobjetos y se tomaron las fotografías correspondientes para establecer las comparaciones del crecimiento de la mutante, con respecto a la morfología de la cepa parental. En la figura 28 se puede observar que en todas las condiciones probadas, las células de la mutante ΔGPA1 presentaron una morfología levaduriforme y un tamaño normal (con respecto a la cepa parental P01A cultivada en medio mínimo). La misma morfología se observó para la

cepa parental y en ninguno de los tratamientos se observó crecimiento de las células en forma de micelio.



**Figura 28. Morfología celular de las cepas de *Y. lipolytica* cultivadas en medio mínimo YNB con diferentes concentraciones de glucosa.** Las imágenes corresponden a células de cultivos de 12 h de incubación, de las cepas P01A y  $\Delta$ GPA1. Barra de escala 50  $\mu$ m.

Como ya se había observado en las curvas de crecimiento, en estos cultivos tanto la cepa P01A como la mutante  $\Delta$ GPA1 también presentaron una tasa de crecimiento menor respecto a los demás tratamientos, cuando se cultivaron en medio YNB sin glucosa adicionada.

De manera interesante, se observa que cuando la cepa  $\Delta$ GPA1 se cultivó en medio YNB adicionado con 10 mM de glucosa, se obtuvo un crecimiento menor con respecto a la parental en el mismo medio de cultivo, mientras que en el resto de las concentraciones de glucosa probadas, la proporción de crecimiento fue similar para las 2 cepas. Es importante aclarar que esta observación es el resultado de un solo experimento ya que cuando se realizaron las curvas de crecimiento, esta concentración de glucosa (10 mM) no se incluyó y solo se habían probado las concentraciones 110, 55 y 27.5 mM de glucosa.

## 8. DISCUSIÓN

La nutrición es el proceso mediante el cual la célula absorbe y asimila los nutrientes que se encuentran en el medio. Como principales fuentes de energía tanto de organismos unicelulares como pluricelulares se encuentran el carbono y el nitrógeno, cuya función ha sido estudiada en procesos biológicos y se ha comprobado que no solamente tienen efectos en la regulación del metabolismo, sino también en muchos otros fenómenos celulares, como la diferenciación, la división celular y el crecimiento; además existen otros efectores de estos fenómenos como el pH, la temperatura, el suero, inclusive la atmósfera gaseosa. La glucosa como fuente de carbono, es la preferida por la mayoría de las células eucariotas, además de tener una variedad de efectos sobre el comportamiento de éstas (Özcan, Dover, & Johnston, 1998).

La glucosa es el monosacárido más abundante sobre el planeta tierra y es la primera fuente de energía para organismos eucariontes (Pérez-Campo & Domínguez, 2001); entender cómo estos organismos perciben y responden a la presencia de glucosa en el medio, ha sido tema de estudio desde hace muchos años; hoy se sabe que existen receptores en la membrana de este tipo de organismos que se encargan de mediar la entrada y utilización de la molécula (Tuteja, 2009; García-Rico, Martín & Fierro, 2011). Además existen otro tipo de efectores que regulan el comportamiento de la célula como hormonas, neurotransmisores, inclusive olores (Clement, Dixit & Dohlman, 2013), estos actúan como señales y son detectas por la célula a través de las proteínas GPCR's, éstas a su vez activan a las proteínas G, permitiendo su disociación, lo cual provoca: la producción de segundos mensajeros (AMPc) vía PKA-AMPc, o la activación de la vía MAPK.

Una de las finalidades de comprender como se regula esta vía en los diferentes organismos es entender el papel que juega en patologías humanas, ya que se ha demostrado que los mecanismos de activación de la vía PKA, así como las proteínas que interviene en ella, han sido altamente conservadas a

través de la evolución. Los estudios realizados al respecto han permitido establecer conclusiones acerca de su importancia y funcionamiento en mecanismos similares presentes en los seres humanos. La vía de señalización PKA-AMPC, en la cual se centra este trabajo, está implicada en numerosas respuestas fisiológicas, como su activación a raíz de una falta de energía generando ATP, e inhibición de vías anabólicas, así como de otros procesos que consumen ATP (Hardie, 2014). El metabolismo de la glucosa es regulado por hormonas como el glucagón, el cual se secreta por las células alpha del páncreas en situaciones de hipoglucemia; en la regulación intervienen las proteínas G heterotriméricas y proteínas que actúan como receptores de membrana acopladas a proteínas G (G Protein Coupling Receptors: GPCR's) (Clement, Dixit & Dohlman, 2013).

La vía PKA también está implicada en importantes vías de acción de fármacos en seres humanos; y se ha descrito que algunos activadores de la vía, revierten muchos de los defectos metabólicos asociados a la resistencia a la insulina; hallazgos recientes sugieren que los efectos de la metformina (medicamento utilizado para tratamiento de diabetes mellitus) son mediados por dicha vía (Hardie, 2014; Clement, Dixit & Dohlman, 2013).

Mientras que en organismos eucariontes inferiores se ha determinado que los nutrientes presentes en el ambiente juegan un papel semejante al de las hormonas en la activación de la vía PKA-AMPC, en mamíferos, la actividad de la enzima adenilato ciclasa es regulada principalmente por las proteínas G heterotriméricas y en éstos, las hormonas son algunos de los factores extracelulares que sirven como iniciadores de la vía (Fuller & Rhodes, 2012).

En presencia de glucosa las levaduras presentan cambios en el metabolismo, desde la concentración de metabolitos intracelulares hasta en la estabilidad de proteínas y del RNAm, todo esto, produce cambios en la actividad de enzimas así como de genes a nivel transcripcional; se ha comprobado que se requieren diversas señales para la expresión de los genes encargados de la regulación de la glucosa. Dicha regulación involucra proteínas

que se encuentran en la membrana y que tienen un papel regulador en el transporte de glucosa, como las proteínas Snf3 y Rgt2, (receptores de alta y baja afinidad a la glucosa, respectivamente) (Özcan, Dover, & Johnston, 1998) o la proteína Gpr1 (receptor acoplado a proteínas G) y la enzima Hxk2 responsable de fosforilar a la glucosa (Gancedo, 2008).

En las levaduras, la vía PKA ha sido descrita en especies como *Yarrowia lipolytica*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago maydis* (Cervantes-Chávez, Kronberg, Passeron, & Ruiz-Herrera, 2009).

*Yarrowia lipolytica* es un organismo unicelular eucarionte, cuyas propiedades biotecnológicas y dimórficas lo han hecho foco de muchas investigaciones; estas mismas características lo hacen ser un buen candidato para estudiar fenómenos como la diferenciación celular y el sensado de glucosa. En este último se han realizado estudios a nivel del complejo PKA y se determinó que la delección del gen TPK1 que codifica para la subunidad catalítica de Pka, participa en la transición dimórfica de *Y. lipolytica* observándose que las mutantes nulas  $\Delta$ TPK1 son viables, que crecen constitutivamente en forma de micelio y que no presentan defectos en la velocidad de crecimiento (Cervantes-Chávez, Kronberg, Passeron, & Ruiz-Herrera, 2009); sin embargo, no se ha hecho el análisis del papel que, en este proceso, juegan las proteínas G y las subunidades que la conforman.

Para profundizar en el conocimiento que se tiene sobre el papel que la vía PKA tiene en la diferenciación de *Y. lipolytica* se procedió a realizar el presente trabajo con enfoque en la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica y su papel en el sensado de glucosa y la diferenciación celular en el hongo dimórfico *Y. lipolytica*.

En la primera etapa se llevó a cabo la búsqueda y análisis *in silico* de secuencias GPA (subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica) en el genoma de *Y. lipolytica*; se encontraron 2 secuencias que reúnen

características suficientes para ser considerados putativos genes GPA: YIGPA1 y YIGPA2, los cuales presuntamente codifican para proteínas con un tamaño de 410 y 442 aminoácidos respectivamente.

El análisis de la secuencia de los genes YIGPA1 y YIGPA2 permitió identificar los sitios de interacción de la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica con otras proteínas que participan en la cascada de señalización PKA. Estas evidencias indican que los putativos genes GPA de *Y. lipolytica* corresponden a genes homólogos de secuencias determinadas como GPA's en otros organismos.

En términos generales, *S. cerevisiae* se encuentra entre las especies más estudiadas; los estudios realizados arrojan evidencia de la homología de secuencias que presentan los genes GPA1 y GPA2 de esta especie con aquellos que codifican para proteínas de subunidades alpha en otras levaduras.

La presencia de dos genes GPA en el genoma de *Y. lipolytica* no es sorprendente ya que numerosas especies tienen dos o más genes que codifican para la subunidad alpha y usualmente también tienen 2 genes para el complejo  $\beta\gamma$ . En el caso los mamíferos, se ha determinado que en su genoma se encuentran representados numerosos genes que codifican para la subunidad alpha y que estas proteínas se asocian con varias combinaciones de  $\beta$  y  $\gamma$  dando una extensa variación de combinaciones para activar la vía PKA en respuesta a numerosos estímulos. Por otra parte, en organismos como *S. cerevisiae* se ha descrito la presencia de dos genes GPA: GPA1 y GPA2, este último es homólogo a subunidades alpha de proteínas G heterotriméricas en mamíferos (Fuller & Rhodes, 2012). Otros organismos como *C. albicans*, *Saccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis* también tienen dos genes GPA (Dignard, Andre & Whiteway, 2008) e incluso en algunas otras especies como *Neurospora crassa* existen tres genes (Li & Borkovich, 2006), mientras que en el hongo patógeno del maíz, *Ustilago maydis*, se han descrito cuatro putativos genes que codifican para subunidad alpha, en esta especie la proteína Gpa3 es necesaria para concebirle al hongo la capacidad de invadir al maíz

(Regenfelder, Spellig, Hartmann, Lauenstein, Bölker, & Kahmann, 1997; Krüger, Loubradou, Regenfelder, Hartmann, & Kahmann, 1998).

La construcción de la mutante  $\Delta$ GPA1 de *Y. lipolytica* por delección del gen GPA1, permitió estudiar el fenómeno del dimorfismo condicionado por la presencia de glucosa en el medio.

Para analizar el papel que la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica juega en el metabolismo de *Y. lipolytica*, la cepa mutante  $\Delta$ GPA1 se sometió a estrés nutricional cultivándola en condiciones de medio mínimo YNB adicionado con diferentes concentraciones de glucosa y se comparó la velocidad de crecimiento de esta cepa con la de la cepa parental (P01A).

Como era de esperarse, se observó una disminución muy marcada en la velocidad del crecimiento de las cepas cuando éstas se incubaron en el medio mínimo YNB sin glucosa, con un tiempo de duplicación calculado para ambas cepas de aprox. 40 h. Mientras que cuando el medio mínimo YNB se adicionó con 27.5 mM, 55 mM y 110 mM de glucosa los tiempos de duplicación calculados fueron 8.5, 9.5 y 10 h para la cepa P01A y de 11, 10 y 8 h para la cepa  $\Delta$ GPA1. Entre las cepas mutante y parental no se observó una diferencia significativa en la tasa de crecimiento en ninguna de las concentraciones de glucosa probadas; se sugiere que la concentración de glucosa adicionada de 27.5, 55 y 110 mM es adecuada para el crecimiento óptimo de ambas cepas de estudio, infiriéndose que la concentración mayor (110 mM de glucosa) que de manera rutinaria se usa para la preparación del medio de cultivo (YPD) de estos organismos, representa un exceso de glucosa en el medio.

Cuando se comparó el crecimiento de cultivos de la cepa mutante GPA1 y la cepa parental después de 24 h de incubación, se encontró que la cepa  $\Delta$ GPA1 presenta una tasa de crecimiento similar a la determinada para la cepa parental en los diferentes medios (sin la adición de glucosa, 27.5 mM, 55 mM y 110 mM de glucosa adicionada). Estos resultados sugieren que en el caso de los últimos

tres tratamientos, en donde se adicionaron distintas concentraciones de glucosa, las células mutantes utilizan a la glucosa (sin importar la cantidad en el medio) de manera similar a como lo hacen las células de la cepa parental, posiblemente debido a que la delección del gen GPA1 no es importante para los mecanismos de sensado de la glucosa.

Los estudios realizados en diferentes especies de hongos ponen de manifiesto que los genes GPA y las proteínas codificadas por éstos tienen un papel diferencial en los diversos procesos celulares.

En *S. cerevisiae* Gpa1 tiene una participación preponderante en el control del apareamiento junto con el complejo beta-gama (Harashima & Heitman, 2002), mientras que Gpa2 participa en la regulación de la adenilato ciclasa, controlando los niveles de AMPc (Kübler, Mösch, Rupp & Lisanti, 1997). En *Candida albicans* Li y Borkovich (2006) sugieren que Gpa2 es necesario para el aumento de AMPc, por lo cual se le nombra dependiente de glucosa; por otra parte, la delección de Gpa1 impide el apareamiento, inactiva el arresto celular y es responsable de cambios morfológicos mediados por feromonas, mientras que una sobreproducción de Gpa1, reactiva el curso del ciclo celular (Dignard, Andre & Whiteway, 2008). Además, se ha descrito que en este organismo, GPA2 tiene una participación directa en la regularización del crecimiento en forma de micelio (Lorenz & Heitman, 1997).

En *Schizosaccharomyces pombe* se ha encontrado que Gpa1 actúa en el control del apareamiento y no tiene asociación con el complejo beta-gama durante este fenómeno (Hoffman, 2005), mientras que a Gpa2 se le asocia con la regulación de la enzima adenilato ciclasa y se ha descrito que la mutación de GPA2 daña la señalización celular causada por la limitación de nutrientes (Ivey & Hoffman, 2005).

Otros estudios señalan la presencia de 2 genes que codifican para la proteína Gpa en el hongo *Kluyveromyces lactis* (Dignard, Andre & Whiteway, 2008), especie que en la escala evolutiva se encuentra entre *C. albicans* y *S.*

*cerevisiae*. En esta especie, Gpa1 participa en el apareamiento de las células (Saviñón, Ongay, Valdés & Coria, 2001) mientras que Gpa2 participa en la regulación de la síntesis de AMPc (Coria *et al*, 2006).

En contraste, existen reportes en los que se ha evidenciado un papel distinto para cada una de las proteínas codificadas por los genes GPA. En el hongo patógeno *Cryptococcus neoformans*, cuyo organismo tiene tres genes que codifican para G $\alpha$ , se ha descrito que la proteína Gpa2 y Gpa3, participan en el sensado por feromonas y rigen el apareamiento, comprobándolo cuando la mutante  $\Delta$ GPA2/ $\Delta$ GPA3 no puede aparearse; esto no sucede con las mutantes sencillas de dichos genes; la delección de GPA3 activa la respuesta a feromonas y la filamentación (Hsueh, Xue & Heitman, 2007); un medio limitado de nutrientes induce la expresión de GPA3 y se inhibe el apareamiento, mientras que GPA2 lo promueve; Gpa1 ha mostrado tener una participación importante en la apareamiento y en la virulencia por la regulación del metabolismo de AMPc (Alspaugh, Perfect & Heitman, 2014).

Aunque se ha descrito que las fuentes de carbono y nitrógeno (glucosa y amonio, respectivamente) son inductores de la formación de micelio (Ruiz & Sentandreu, 2002), el análisis morfológico de la mutante GPA1 de *Y. lipolytica* en distintas concentraciones de glucosa mostró que no hubo cambios en la diferenciación de las células de la cepa mutante cuyo comportamiento fue igual al de la cepa parental; en ambas, solo se observaron células con forma de levadura y no hubo presencia de micelio.

Es probable que en la cepa mutante GPA1 la presencia del gen GPA2 esté teniendo un papel compensatorio en el sensado de glucosa, en la activación de la vía PKA y por lo consiguiente, en los fenómenos de crecimiento y diferenciación celular. Otra posibilidad es que, como se ha descrito para otras especies, posiblemente en *Y. lipolytica* la proteína codificada por el gen GPA2 sea la responsable de mediar, a través del sensado de glucosa, la activación de la vía PKA y los fenómenos celulares que de ella dependen.

En el presente trabajo se hicieron intentos para obtener mutantes  $\Delta$ GPA2 y dobles mutantes  $\Delta$ GPA1/ $\Delta$ GPA2 de *Y. lipolytica* que permitieran el análisis más completo del papel que estas proteínas juegan en el sensado de glucosa; sin embargo, el análisis genotípico de las transformantes obtenidas mostró que aunque el casete de interrupción utilizado para la construcción de las mutantes  $\Delta$ GPA2 se integró en el genoma de las células, esta integración fue en un locus diferente al ocupado por el gen GPA2. Para complementar el análisis del papel que la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica juega en el sensado de glucosa y en la diferenciación de *Y. lipolytica*, es necesario continuar con la construcción de las mutantes  $\Delta$ GPA2 y de las dobles mutantes  $\Delta$ GPA1/ $\Delta$ GPA2.

## 9. CONCLUSIONES

El genoma de *Y. lipolytica* tiene dos genes (*YIGPA1* y *YIGPA2*) que codifican para la subunidad alpha de la proteína G heterotrimérica. Las putativas proteínas codificadas por estos genes (410 y 442 aminoácidos) presentan características estructurales que les permiten unirse a otras proteínas de la vía PKA-AMPc.

Utilizando técnicas moleculares, por delección del gen *GPA1* y sustitución con el gen marcador *URA3*, se construyó la mutante  $\Delta$ *GPA1* de *Y. lipolytica* utilizando como fondo genético a la cepa P01A. Además, se obtuvieron los casetes de interrupción que permitirán la construcción de la mutante *GPA2* y de la doble mutante  $\Delta$ *GPA1*/ $\Delta$ *GPA2*.

El análisis fenotípico de la mutante  $\Delta$ *GPA1* mostró que:

- La delección del gen *GPA1* no altera la capacidad de sensar glucosa ni condiciona la morfología celular en *Y. lipolytica*.
- La mutante *GPA1* y la cepa parental P01A se comportan de manera similar, no hay diferencias en la velocidad de crecimiento independientemente de la cantidad de glucosa que tenga el medio.

Es necesaria la construcción y el análisis de la mutante *GPA2* y de la doble mutante  $\Delta$ *GPA1*/ $\Delta$ *GPA2* de *Y. lipolytica* para analizar la función de cada una de las subunidades alpha codificada por estos genes y consecuentemente analizar el papel de la subunidad alpha en una mutante en donde esté suprimida completamente la codificación de la proteína interrumpida por la delección de los dos genes encontrados en este organismo modelo de importancia biotecnológica.

## 10. LITERATURA CITADA

- Alspaugh, J. A., Perfect, J. R., & Heitman, J. (2014). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein  $\alpha$  subunit GPA1 and cAMP. *Genes and Development*, 11, 3206- 3217.
- Banuett, F. (1998). Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 249- 274.
- Barth, G., & Gaillardin, C. (1996). *Yarrowia lipolytica*. In: Wolf K (ed) nonconventional yeasts in biotechnology: a Handbook. *Berlin: Springer*, 313-388.
- Beckerich, J., Boisramé-Baudevin, A., & Gaillardin, C. (1998). *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 1(2), 123-130.
- Cervantes-Chávez, J. A., & Ruiz-Herrera, J. (2006). STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Federation of European Microbiological Societies*, 6, 801- 815.
- Cervantes-Chávez, J. A., & Ruiz-Herrera, J. (2007). The regulatory subunit protein kinase a promotes hyphal growth and plays an essential role in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS*, 7, 929- 940.
- Cervantes-Chávez, J. A., Kronberg, F., Passeron, S., & Ruiz-Herrera, J. (2009). Regulatory role of the PKA pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 390-399.
- Clement, S. T., Dixit, G., & Dohlman, H. G. (2013). Regulation of yeast G protein signaling by the kinases that activate the AMPK homolog Snf1. *Cell Biology*, 6(291), 1-9.
- Coria, R., Kawasaki, L., Torres, Q. F., Ongay, L. L., Sánchez, P. E., Velázquez, Z. N., *et al.* (2006). The pheromone response pathway of *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*, 6(3), 336- 344.

- Davidow, L., Apostolakos, D., O'Donnell, M., Proctor, A., Ogrydziak, D., Wing, R., & Stako, I. D. (1985). Integrative transformation of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Current Genetics*, *10*, 39-48.
- Dessal, A. L., Prades, R., Giralt, E., & Smrcka, A. V. (2011). Rational design of a selective covalent modifier of G protein  $\beta\gamma$  subunits. *Molecular Pharmacology*, *79*(1), 24- 33.
- Dignard, D., Andre, D., & Whiteway, M. (2008). Heterotrimeric G-protein subunit function in *Candida albicans*: both the alpha and beta subunits of the pheromone response G protein are required for mating. *Eukaryotic Cell*, *7*(9), 1591- 1599.
- Domínguez, Á., Fermiñan, E., & Gaillardin, C. (2000). *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analyzing dimorphism in fungi. *Contributions to Microbiology*, *5*, 151- 172.
- Egger-Adam, D., & Katanaev, L. V. (2010). The trimeric G protein  $\alpha$  inflicts a double impact on axin in the Wnt/Frizzled signaling pathway. *Developmental Dynamics*, *239*, 168- 183.
- Frey, U., Alakus, H., Wohlschlaeger, J., Schmitz, K., Winde, G., van Calker, H., Schmid, K. (2005). GNAS1 T393C polymorphism and survival in patients with sporadic colorectal cancer. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(14), 5051- 5057.
- Fuller, K. K., & Rhodes, J. C. (2012). Protein kinase A and fungal virulence. A sinister side to a conserved nutrient sensing pathway. *Virulence*, *3*(2), 109- 121.
- Gancedo, J. M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*, 107-123.
- Gancedo, J. (2008). The early steps of glucose signalling in yeast. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology*, *32*, 673-704.
- García-Rico, R. O., Martín, J. F., & Fierro, F. (2011). Heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genetics and Biology*, *48*, 641–649.

- Génolevures. (2013). *Genomic exploration of the hemiascomycete yeasts*. Recuperado de Genomic exploration of the hemiascomycete yeasts: <http://www.genolevures.org/>
- Harashima, T., & Heitman, J. (2002). The G alpha protein Gpa2 controls yeast differentiation by interacting with kelch repeat proteins that mimic G beta subunits. *Molecular cell*, 10(1), 163- 173.
- Hardie, G. D. (2014). AMP-activated protein kinase: a key regulator of energy balance with many roles in human disease. *Journal of internal medicine*, 276(6), 543-559.
- Hoffman, C. S. (2005). Except in every detail: comparing and contrasting G-protein signaling in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell*, 4(3), 495- 503.
- Hoffman, C., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267- 272.
- Hsueh, Y.-P., Xue, C., & Heitman, J. (2007). G protein signaling governing cell fate decisions involves opposing G a subunits in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 3237- 3249.
- Huso, D. L., Edie, S., Levine, M. A., Schwindinger, W., Wang, Y., Jüppner, H. (2011). Heterotopic ossifications in a mouse model of albright hereditary osteodystrophy. *Plos one*, 6(6), 1- 10.
- Invitrogen. (2013). *Thermo fisher scientific completes acquisition of life technologies*. Recuperado de Thermo fisher scientific completes acquisition of life technologies: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/topota\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf)
- Invitrogen. (2013). *Thermo fisher scientific completes acquisition of life technologies*. Recuperado de thermo fisher scientific completes acquisition of life technologies: [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ciap\\_man.pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ciap_man.pdf)
- Ivey, D. F., & Hoffman, C. S. (2005). Direct activation of fission yeast adenylate cyclase by the Gpa2 G alpha of the glucose signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 102(17), 6108- 6113.
- Jiménez-Bremont, J. F., Rodríguez-Hernández, A. A., & Rodríguez-Kessler, M. (2012). Development and dimorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica*. In

- E. R.-H. José, Dimorphic fungi. *Their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis* (pp. 58- 66). Irapuato Gto.: Bentham E. Books.
- Juneja, J., & Casey, P. J. (2009). Role of G12 proteins in oncogenesis and metastasis. *British Journal of Pharmacology*, 158, 32- 40.
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimistry Polonica*, 56(2), 211-224.
- Kim, J., Cheon, S., Park, S., Song, Y., & Kim, J.-Y. (2000). Serum Induced hypha formation in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiology*, 190, 9-12.
- Kim, J.-T., Kang, S. G., Woo, J.-H., Lee, J.-H., & Chul, J. B. (2007). Screening and its potential application of lipolytic activity from a marine environment: characterization of a novel esterase from *Yarrowia lipolytica* CL180. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 820- 828.
- Kornberg, R. (1999). Eukaryotic transcriptional control. *Trends in Cell Biology*, 9(12), 46-49.
- Kronstad, J., De Maria, A., Funnell, D., Laidlaw, R., Lee, N., de Sá, M. (1998). Signaling via cAMP in fungi: interconnections with mitogen-activated protein kinase pathways. *Arch Microbiology*, 170, 395-404.
- Krüger, J., Loubradou, E., Regenfelder, E., Hartmann, A., & Kahmann, R. (1998). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 2(3), 193-198.
- Kübler, E., Mösch, H., Rupp, S., & Lisanti, M. (1997). Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20321- 20323.
- Kyoto University Bioinformatics Center. (2013). *Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW*. Retrieved from Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW: <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>
- Lania, A., Mantovani, G., & Spada, A. (2001). G protein mutations in endocrine diseases. *European Journal of Endocrinology*, 145, 543- 559.

- Lee, N., D'Souza, C. A., & Kronstad, J. W. (2003). Of smuts, blasts, mildews, and blights: cAMP signaling in phytopathogenic fungi. *Annual Review Phytopathology*, 41, 399-427.
- Lengeler, K. B., Davidson, R. C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.-C., Wang, P. (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 746-785.
- Li, L., & Borkovich, K. A. (2006). GPR-4 is a predicted G-protein-coupled receptor required for carbon source-dependent asexual growth and development in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*, 5(8), 1287- 1300.
- Lorenz, M. C., & Heitman, J. (1997). Yeast pseudohyphal growth is regulated by GPA2, a G protein  $\alpha$  homolog. *The EMBO Journal*, 16(23), 7008-7018.
- McCudden, C., Hains, M., Kimple, R., Siderovski, D., & Willard, F. (2005). G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 52, 551-577.
- Mehrabi, R., Ben M'Barek, S., Van Der Lee, T., Walwijk, C., De Wit, P., & Kema, G. (2009). G alpha and beta proteins regulate the cyclic AMP pathway. That is required for development and pathogenicity of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Eukaryotic Cell*, 8(7), 1001- 1013.
- Meller, J. (2003). Signal transduction. Fishing at the cell surface. *Science*, 300, 594-595.
- Miwa, T., Takaqi, Y., Shinozaki, M., Yun, C., Schell, W., Perfect, J. (2004). Gpr1, a putative G-protein-coupled receptor, regulates morphogenesis and hypha formation in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 3(4), 919-931.
- National Center for Biotechnology Information. (2013). *Basic Local Alignment Search Tool* . Recuperado de <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- New England BioLabs, Inc. (2013). *NEBcutter V2.0*. Recuperado de NEBcutter V2.0: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>
- Northwestern University. (2013). *Oligo calc: oligonucleotide properties calculator*. Recuperado de Oligo calc: oligonucleotide properties calculator: <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>

- Oka, Y., Saraiva, L., Kwan, Y., & Korsching, S. (2009). The fifth class of G alpha proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5), 1484- 1489.
- Özcan, S., Dover, J., & Johnston, M. (1998). Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*, 17(9), 2566- 2573.
- Palacios, L., Dickinson, R. J., Sacristán-Reviriego, A., Didmon, M. P., Marín, M. J., Martín, H. (2011). Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in *Saccharomyces cerevisiae*. *The journal of biological chemistry*, 286(49), 42037- 42050.
- Palande, A. S., Kulkarni, S. V., León-Ramirez, C., Campos-Góngora, E., Ruiz-Herrera, J., & Deshpande, M. V. (2014). Dimorphism and hydrocarbon metabolism in *Yarrowia lipolytica* var. *indica*. *Archives of Microbiology*, 8, 545-556.
- Pérez-Campo, F. M., & Domínguez, A. (2001). Factors affecting the morphogenetic switch in *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 43(6), 429- 433.
- Ramachandran, V., & Herman, P. (2011). Antagonistic interactions between the cAMP-Dependent protein kinase and tor signaling pathways modulate cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics Society of America*, 187, 441-454.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M., & Kahmann, R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO Journal*, 16(8), 1934-192.
- Resources for Molecular and Cell Biologists. (2013). *The Bio-Web*. Recuperado de [http://www.cellbiol.com/scripts/complement/dna\\_sequence\\_reverse\\_complement.php](http://www.cellbiol.com/scripts/complement/dna_sequence_reverse_complement.php)
- Rodriguez, C., & Domínguez, A. (1984). The growth characteristics of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(5), 605- 612.
- Rolland, F., H. de Winde, J., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J. M., & Winderickx, J. (2000). Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose

- detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Molecular Microbiology*, 38(2), 348- 358.
- Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. (2002). Glucose-sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Research*, 2, 183- 201.
- Ruiz-Herrera, J., & Sentandreu, R. (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiology*, 178, 477–483.
- Ruiz-Herrera, J. (2012). Dimorphic fungi: Their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis. Irapuato, Gto.: Bentham Science Publishers.
- Ruiz-Herrera, J., & Campos-Góngora, E. (2012). An introduction to fungal dimorphism. En J. Ruiz- Herrera, & E. Campos- Góngora, *Dimorphic Fungi: Their importance as models for differentiation and fungal pathogenesis*. (p. 143). Irapuato: Bentham Science Publishers.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *A molecular cloning manual* (Tercera edición ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saviñón, T. A., Ongay, L. L., Valdés, R. J., & Coria, R. (2001). The KIGpa1 gene encodes a G-protein alpha subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of bacteriology*, 183(1), 229- 234.
- Styler, A. M., Mirshahi, U. L., Wang, C., Girard, L., Jin, T., Logothetis, D. E. (2010). G protein {beta} {gamma} gating confers volatile anesthetic inhibition to Kir3 channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 41290- 41299.
- Szabo, R., & Stofanikova, V. (2002). Presence of organic sources of nitrogen is critical for filament formation and pH dependent morphogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiological*, 206, 45-50.
- Thevelein, J. M., & de Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 33(5), 904- 918.
- Thevenieau, F., Nicaud, J.-M., & Gaillardin, C. (2009). Applications of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. In G. Kunze, & T. Satyanarayana, *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 589-613). Amsterdam: Elsevier.

- Torres-Guzmán, J., & Domínguez, A. (1997). HOY1, a homeogene required for hyphal formation in *Yarrowia lipolytica*. *Molecular and Cellular Biology*, 17(11), 6283- 6293.
- Tuteja, N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signaling and Behavior*, 4(10), 942- 947.
- Wang, J.-H., Wenpin, H., & Tsai, S.-H. (2011). High efficiency transformation by electroporation of *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of Microbiology*, 49(3), 469-472.
- Xue, C., Bahn, Y., Cox, G., & Heitman, J. (2006). G protein-coupled receptor Gpr4 senses amino acids and activates the cAMP–PKA pathway in *Cryptococcus*. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 667- 679.
- Zógala, B., Robak, M., Rymowicz, W., Wzientek, K., Rusin, M., & Maruszczak, J. (2005). Geoelectrical observation of *Yarrowia lipolytica* bioremediation of petrol-contaminated soil. *Journal of Environmental Studies*, 14(5), 665-669.

## RESUMEN CURRICULAR

Joselina Huerta Oros

Candidato para el Grado de  
Maestría en Ciencias en Nutrición

Tesis: PAPEL DE LA SUBUNIDAD ALPHA DE LA PROTEÍNA G  
HETEROTRIMÉRICA EN EL SENSADO DE GLUCOSA Y  
EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR  
DEL HONGO DIMÓRFICO  
*Yarrowia lipolytica*

Campo de estudio: Ciencia básica

Datos personales: nacida en H. Caborca, Sonora, el 19 de Marzo de 1987, hija del Sr. Eliseo Huerta Romero y la Sra. Blanca Julia Oros Gortary.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciada en Nutrición en el 2005 con un promedio de 90.87.

Contando con una experiencia profesional como se redacta a continuación:

### **Publicaciones:**

Component Analysis and Free Radicals Scavenging Activity of Cicer arietinum L. Husk Pectin. Vania Urias-Orona, Joselina Huerta-Oros, Elizabeth Carvajal-Millán, Jaime Lizardi-Mendoza, Agustin Rascón-Chu and Alfonso A. Gardea. *Molecules*. 2010; 15(10):6948-55. doi: 10.3390/molecules15106948.

### **Participación en congresos:**

“Efecto de la cafeína sobre el crecimiento de *Yarrowia lipolytica*”, Sifuentes-Gaspar Evelyn, Huerta-Oros Joselina, Cabriales-Amador Katya Lucero, Briones-Rodríguez Alejandra, Jiménez-Salas Zacarías y Campos-Góngora Eduardo. En la modalidad de Trabajos Libres de Investigación en cartel con el trabajo, en el XXIX Congreso del AMMFEN “Del hambre a la Obesidad: Magnitud, Trascendencia y Vulnerabilidad”, llevado cabo en la ciudad Boca del Río, Veracruz, mayo 2014.

“Estrés nutritivo en el crecimiento de *Y. lipolytica*: función de Gpa1”, Huerta-Oros Joselina, Sifuentes-Gaspar Evelyn, Briones-Rodríguez Alejandra, Cabriales-Amador Katya Lucero, Jiménez-Salas Zacarías y Campos-Góngora Eduardo. En la modalidad de Trabajos Libres de Investigación en cartel con el trabajo, en el XXIX Congreso del AMMFEN “Del hambre a la Obesidad: Magnitud, Trascendencia y Vulnerabilidad”, llevado cabo en la ciudad Boca del Río, Veracruz, mayo 2014.

“Role of G-protein heterotrimeric  $\alpha$  subunit in glucose sensing and cell differentiation in *Y. lipolytica*”, Huerta-Oros Joselina, Sifuentes-Gaspar Evelyn, Jiménez-Salas Zacarías, Campos-Góngora Eduardo. En la modalidad trabajos libres en el Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos, Oaxaca, Oaxaca, México. 2013.

“Sensado de glucosa en *Y. lipolytica*: papel de la subunidad  $\alpha$  de la proteína-G heterotrimérica”, Huerta-Oros, Joselina; García-García, Nora; Cantú-Valdés, Josué; González-Flores, Jorge; Jiménez-Salas, Zacarías; Campos-Góngora, Eduardo. En la modalidad Trabajos Libres en XXVII Congreso Nacional de Investigación en Medicina “Translational Medicine, From Bench to Bedside”, Monterrey, Nuevo León, México. 2013.

**Experiencia laboral:**

Auxiliar técnico de laboratorio, Centro de Investigación en Nutrición y Salud Pública, Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL, puesto actual, antigüedad 2 años.

Constancia por participación como integrante de la comisión de apoyo logístico en el 1er congreso de nutriología FaSPyN, festejos del 35° aniversario de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, octubre de 2009.

**Docencia:**

Profesor asistente en la carrera de Licenciatura en Nutrición y Salud, de la Universidad Regiomontana. Periodo septiembre-diciembre 2014, materias: Ciencias Ómicas y Alimentos Funcionales.

Profesor asistente de las carreras de Nutrición y Psicología, de la Universidad Tec Milenio. Periodo enero-diciembre 2014, materia: Biología Molecular y Genética. Profesor asistente de la carrera de Nutrición. Periodo enero-junio 2014, materia: Bromatología.

Profesor asistente de la Licenciatura en Nutrición; Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL. Periodo enero-junio 2013, Unidad de Aprendizaje: Nutrigenética y Nutrigenómica; Periodo agosto-diciembre 2013, Unidad de Aprendizaje Genética Humana y Orientación Alimentaria.

Participación en la elaboración del programa académico de Licenciatura en Nutrición de la Unidad de Aprendizaje de Nutrigenética y Nutrigenómica.

**Premios y distinciones:**

Reconocimiento a Sifuentes-Gaspar Evelyn, Huerta-Oros Joselina, Cabriales-Amador Katya Lucero, Briones-Rodríguez Alejandra, Jiménez-Salas Zacarías y Campos-Góngora Eduardo. Por haber obtenido el Tercer Lugar en la categoría de Trabajos Libres de Investigación en cartel con el trabajo: "Efecto de la cafeína sobre el crecimiento de *Yarrowia lipolytica* en el XXIX Congreso

del AMMFEN “Del hambre a la Obesidad: Magnitud, Trascendencia y Vulnerabilidad”, llevado cabo en la ciudad Boca del Río, Veracruz, mayo 2014.

Reconocimiento por haber obtenido el primer lugar de la Maestría en Ciencias en Nutrición de la generación agosto 2011-junio 2013 con un promedio de 95.82, Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL.

Beca de UANL para Estudios de Maestría en Ciencias. Periodo agosto 2011- julio 2013.

Beca de la Academia Mexicana de Ciencias para estancia en el XX Verano de Investigación Científica, 2010. Estancia en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Distrito Federal, México, bajo la asesoría de la Dra. Andrea S. Díaz Villaseñor.

Beca de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, UANL. Academia Mexicana de Ciencias para participar en el XIX Verano de Investigación Científica, 2009. Estancia realizada en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD); Hermosillo Sonora, México, bajo la asesoría de la Dra. Elizabeth Carvajal Millán.

Reconocimiento por participación destacada en las actividades deportivas llevadas a cabo durante su formación como Licenciado en Nutrición (Agosto 2005- Junio 2010).