
Diseño de una estrategia para la sobre expresión de genes por intercambio de promotores en *S. cerevisiae*

Esteban Bustamante

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño de una estrategia para la sobre expresión de genes por intercambio de promotores en *S. cerevisiae*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Esteban Bustamante para optar al grado académico de Licenciado
en Biotecnología Molecular

Guatemala, 2024

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño de una estrategia para la sobre expresión de genes por intercambio de promotores en *S. cerevisiae*

Trabajo de graduación en modalidad de tesis presentado por
Esteban Bustamante para optar al grado académico de Licenciado
en Biotecnología Molecular

Guatemala, 2024

Vo.Bo.:



(f) _____
PhD. Luis Diego Archila Díaz

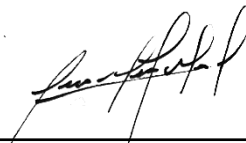
Comité de asesores:



(f) _____
PhD. Luis Diego Archila Díaz



(f) _____
PhD. José Carlos Campero Basaldua



(f) _____
MSc. Jose Miguel Morales Santiago

Fecha de aprobación: Guatemala, 17 de Junio del 2024.

Agradecimientos

A mi casa de estudios Universidad del Valle de Guatemala (UVG), que me ha exigido tanto durante estos últimos años, pero me ha permitido crecer tanto personal como profesionalmente.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que me ha mostrado la realidad de la investigación y el trabajo, es un honor poder decir que realicé mi trabajo de graduación en esa gran universidad.

A la Dra. Alicia González Manjarrez, por abrirme las puertas a tu laboratorio, por todo tu apoyo que me permitió culminar mi proyecto de graduación. Agradezco mucho la amabilidad con la que nos recibiste y todo el acompañamiento que nos diste durante nuestra estancia.

A mi asesor; Dr. Carlos Campero, porque sin ti este proyecto no hubiese sido posible. Te agradezco inmensamente el apoyo que me diste estando en México, los almuerzos que compartimos, las risas y todo tu apoyo tanto moral como intelectual.

A mi asesor; Dr. Diego Archila, por los buenos consejos que me has compartido y por lo aprendido en tus clases. Te agradezco la pasión con la que nos has enseñado, me ayudaste a identificar el camino que quiero seguir.

A la Lic. Sheyla Cruz, por tu apoyo con en la realización de este proyecto de graduación. Te agradezco tu amistad y los bonitos momentos que compartimos. Te deseo lo mejor y mucho éxito en tu nuevo proyecto de maestría.

A mis compañeros del 301-Ote: Nancy, Cecy, Yael, Edgar, Yamile, David y Antonio, por todos los buenos momentos que compartimos.

Dedicatoria

A mis padres; Mónica González y Boris Bustamante; por haberme criado con mucho amor y paciencia. Agradezco inmensamente el esfuerzo que han hecho por darnos la oportunidad de crecer académicamente. Agradezco su guía y enseñanzas para ser una persona con valores, responsable y agradecida.

A mis hermanas; Ximena Bustamante y Natalia Gálvez; porque su presencia en mi vida es una luz, siempre me impulsan a seguir adelante. Agradezco su ayuda durante estos años, por todas las veces que me llevaron comida mientras estudiaba y se preocuparon por mí.

A mi abuelita, Ana María, y a mi tía-abuela, Otilia; porque siempre que me he sentido solo o perdido, sé que en ustedes encuentro paz y compañía. Son un ejemplo para mí sobre lo que es amar incondicionalmente y agradezco inmensamente su amor.

A mi familia; Cecilia, Ana, Julio, Marcos, Marquitos, Ricardo y Sofia; porque ustedes son un pilar muy importante en mi vida. Agradezco el amor que me han dado toda la vida, su acompañamiento, sus enseñanzas y su ejemplo.

A mis amigos; quienes siempre han estado conmigo dándome su consejo y compartiendo su alegría. A todas las personas que han formado una parte en mi vida, han dejado una huella en mí que siempre me acompañará.

Agradecimientos	III
Dedicatoria	IV
Lista de cuadros	VII
Lista de figuras	VIII
Resumen	X
Abstract	XI
1. Introducción	1
2. Justificación	2
3. Objetivos	3
3.1. Objetivo general	3
3.2. Objetivos específicos	3
4. Marco teórico	4
4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	4
4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo para el estudio de la biología mitocondrial	6
4.3. Evento de duplicación genética y la divergencia funcional de genes	6
4.4. Duplicación de genes y evolución de nuevas funciones	7
4.5. Impacto de la duplicación genética en la evolución de las rutas metabólicas	8
4.6. Función <i>Moonlight</i> de Alt1	12
4.7. Reguladores transcripcionales híbridos en <i>S. cerevisiae</i>	13
4.8. Hap 2-3-5-Gln3, el primer regulador híbrido descrito.....	14
4.9. Regulador negativo de los genes reprimidos por glucosa, (<i>Nrg1</i>)	15
4.10. Regulador de la respuesta retrógrada, (<i>Rtg3</i>)	16
4.11. Regulador transcripcional híbrido, (<i>Nrg1-Rtg3</i>)	17
4.12. Análisis de la red genética regulada por el regulador híbrido (<i>Nrg1-Rtg3</i>).....	18
4.13. Cepas mutantes <i>nrg1Δ</i> y <i>rtg3Δ</i> , su relación con el fenómeno petite y perspectivas de trabajo	20
4.14. Estrés oxidativo	20
4.15. Principales orígenes de las especies reactivas del oxígeno	21
4.16. Sistemas de defensa ante estrés oxidativo.....	22
4.17. Daño por estrés oxidativo	23
4.18. Metabolismo del hierro y su relación con el estrés oxidativo	24
4.19. Técnicas para el estudio del daño mitocondrial	25

5. Metodología	26
5.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación	26
5.2. Población y muestra	26
5.3. Variables	27
5.4. Hipótesis	27
5.4.1. Hipótesis nula	27
5.4.2. Hipótesis alternativa	27
5.5. Cepas	27
5.6. Plásmido pCM325	28
5.7. Diseño de oligos para la producción de módulo recombinante a partir del plásmido	29
5.8. Diseño de secuencias de recombinación para integración del módulo recombinante en el genoma de <i>S. cerevisiae</i>	30
5.9. Diseño de oligos para confirmación de la integración del módulo recombinante al genoma de <i>S. cerevisiae</i>	31
5.10. Medio de cultivo para <i>S. cerevisiae</i> y comprobación de fenotipo petite	33
5.11. Medio de cultivo de <i>E. coli</i> para producir plásmido pCM325	33
5.12. Transformación por choque térmico de bacterias calciocompetentes	33
5.13. Purificación de plásmido pCM325	34
5.14. Comprobación de la purificación del plásmido pCM325	34
5.15. Purificación de plásmido pCM325 a partir de banda de gel	34
5.16. Optimización de la producción de módulos de recombinación	35
5.17. Producción de módulos de recombinación para sustitución de promotor endógeno por promotor TetO7	36
5.18. Transformación de levaduras con acetato de litio	36
5.19. Selección de cepas mutantes	37
5.20. Extracción de ADN genómico	37
5.21. PCR para confirmar que el módulo recombinante se integró en el genoma de <i>S. cerevisiae</i>	38
5.22. Extracción de ARN	39
5.23. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	39
5.24. Análisis estadístico qPCR	40
6. Resultados	41
6.1. Diseño de oligonucleótidos para amplificación del módulo recombinante y cambio de promotor	41
6.2. Producción y purificación del plásmido pCM325	45
6.3. Amplificación y purificación del módulo recombinante	47
6.4. Transformación de la cepa silvestre R1158 de <i>S. cerevisiae</i>	49
6.5. Evaluación del fenotipo petite en la cepa mutante <i>tetO7-FRE5</i>	55
6.6. Evaluación del fenotipo petite en la cepa mutante <i>tetO7-FRE5</i>	57
7. Análisis de Resultados	60
8. Conclusiones	64
9. Recomendaciones	65
10. Referencias	66
11. Anexos	72
11.1. Secuencia plásmido pCM325	72
11.2. Secuencia cromosoma XV de <i>S. cerevisiae</i>	74
11.3. Secuencia codificante del gen <i>FRE5</i> de <i>S. cerevisiae</i>	76

Lista de cuadros

5.1. Variables de la investigación.....	27
5.2. Cepas empleadas en el estudio	28
5.3. Oligos diseñados y pareados, utilizados para la comprobación de la cepa sobreexpresada	32
5.4. Oligonucleótidos usados para el cambio de promotor del gen <i>FRE5</i>	32
5.5. Preparación del <i>mix</i> de reacción gradiente de temperatura.....	35
5.6. Condiciones de amplificación en el termociclador.....	35
5.7. Preparación del <i>mix</i> de reacción final	36
5.8. Condiciones de reacción de PCR final	36
5.9. Preparación del <i>mix</i> de reacción	38
5.10. Condiciones de reacción de PCR para confirmación.....	38
5.11. Tamaño del amplicon esperado en la PCR	39
5.12. Condiciones de reacción de qPCR.....	40
5.13. Oligonucleótidos empleados para el análisis de qPCR	40
6.1. Oligonucleótidos para el plásmido pCM325.....	42
6.2. Oligonucleótidos usados para realizar el cambio de promotor del gen <i>FRE5</i>	44

Lista de figuras

4.1. Simplificación del ciclo de vida de <i>S. cerevisiae</i>	5
4.2. Destino de los genes duplicados.....	8
4.3. Compartimentación de genes duplicados de <i>S. cerevisiae</i>	9
4.4. Ocurrencia relativa de genes de una copia	10
4.5. Efecto del dosaje genético.....	10
4.6. Rutas metabólicas involucradas en el metabolismo de alanina en <i>S. cerevisiae</i>	11
4.7. La cepa mutante <i>ALT1</i> muestra daño mitocondrial y disminución en la concentración de ADNmt.....	12
4.8. Función <i>Moonlight</i> de Alt1	13
4.9. Formación del complejo Hap2-3-4-5	14
4.10. Represión por Nrg1 del gen <i>STA1</i>	15
4.11. Regulación de la activación de la ruta retrógrada.....	16
4.12. Análisis northern blot de ARN	17
4.13. Co-inmunoprecipitación del complejo Nrg1-Rtg3	17
4.14. Mapa de calor de los genes involucrados en el transporte de metales de transición ..	18
4.15. Mapa de calor de los genes involucrados en el proceso de óxido – reducción.....	19
4.16. Mapa de calor de los genes involucrados en el metabolismo de ácidos carboxílicos.....	19
4.17. Microscopía electrónica de <i>S. cerevisiae</i>	20
4.18. Química de las especies reactivas de oxígeno.....	21
4.19. La paradoja del oxígeno.....	22
4.20. Mecanismo de lipoperoxidación.....	23
5.1. Mapa del plásmido pCM325.....	29
5.2. Sitios de unión de los oligos para el plásmido pCM325	30
5.3. Estrategia experimental para la sustitución de promotores.....	31
5.4. Sitios de amplificación PCR de confirmación.....	32
5.5. PCR de confirmación.....	38
6.1. Producción de módulo recombinante a partir de plásmido pCM325.....	42
6.2. Amplificación del módulo recombinante.....	43
6.3. PCR para la confirmación de la integración del módulo recombinante en las colonias candidatas.....	44
6.4. Transformación de <i>E. coli</i> con plásmido pCM325.....	45
6.5. Linealización del plásmido pCM325 con la enzima de restricción SalI.....	46
6.6. Purificación del plásmido por banda de gel.....	47
6.7. Gradiente de temperatura.....	48

6.8. Producción del módulo recombinante con los parámetros optimizados.....	48
6.9. Purificación del módulo recombinante por banda de gel.....	49
6.10. Estrategia experimental para la sustitución de promotores.....	50
6.11. Resultados de transformación de <i>S. cerevisiae</i> con 3500 ng de módulo recombinante para obtener la mutante R1158 TetO7- <i>FRE5</i>	51
6.12. Resultados de transformación de <i>S. cerevisiae</i> con 5000 ng de módulo recombinante para obtener la mutante R1158 TetO7- <i>FRE5</i>	52
6.13. Selección de colonias transformantes por resistencia a geneticina (G418).....	53
6.14. Extracción de ADN total colonias candidatas.....	54
6.15. Sitios de amplificación PCR de confirmación.....	54
6.16. PCR para la confirmación de la integración del módulo recombinante en las colonias candidatas.....	55
6.17. Evaluación del fenotipo petite en las mutantes confirmadas.....	56
6.18. Velocidad de crecimiento de la cepa mutante Tet- <i>FRE5</i> vs cepa silvestre R1158 (medio con glucosa).....	56
6.19. Velocidad de crecimiento de la cepa mutante Tet- <i>FRE5</i> vs cepa silvestre R1158 (medio con etanol).....	57
6.20. PCR punto final de la codificante <i>FRE5</i> con ADNc.....	58
6.21. Electroforesis de ARN total.....	58
6.22. Cambio en la expresión media del gen <i>FRE5</i>	59

El modulador híbrido Nrg1-Rtg3 es un complejo que mantiene la integridad mitocondrial. La pérdida de cualquiera de sus componentes causa graves alteraciones como la pérdida de funcionalidad, ADN mitocondrial y estructura nativa del organelo (Campero, 2023). Para entender el mecanismo de estas alteraciones, Carretero (2023) realizó un ensayo transcriptómico, revelando que la ausencia del modulador induce la sobreexpresión de redes genéticas involucradas en procesos de óxido-reducción, metabolismo de ácidos carboxílicos y transporte de metales de transición. Se diseñó una estrategia para la generación de una cepa mutante sobreexpresando el gen *FRE5* usando el promotor TetO7, lo que resultó en un aumento de 37 veces en la expresión del gen *FRE5* respecto a la cepa silvestre. Aunque este incremento no afectó el crecimiento en etanol, se propone que la sobreexpresión simultánea de varios genes puede ser necesaria para replicar el daño mitocondrial observado en mutantes petite. La integración del módulo recombinante y la sobreexpresión del gen *FRE5* fueron verificadas mediante PCR y qPCR, confirmando un aumento significativo en la expresión.

Abstract

The hybrid modulator Nrg1-Rtg3, a complex that maintains mitochondrial integrity. Loss of any of its components causes severe mitochondrial alterations such as loss of functionality, mitochondrial DNA and native structure of the organelle (Campero, 2023). To understand the mechanism of these alterations, Carretero (2023) performed a transcriptomic assay, revealing that the absence of the modulator induces the overexpression of genetic networks involved in oxidation-reduction processes, carboxylic acid metabolism and transition metal transport. A strategy was designed to generate a mutant strain overexpressing the *FRE5* gene using the TetO7 promoter, resulting in a 37-fold increase in *FRE5* gene expression over the wild-type strain. Although this increase did not affect growth in ethanol, it is proposed that simultaneous overexpression of several genes may be necessary to replicate the mitochondrial damage observed in petite mutants. Integration of the recombinant module and overexpression of the *FRE5* gene were verified by PCR and qPCR, confirming a significant increase in expression.

En el laboratorio de la doctora Alicia González, se investigó el modulador híbrido Nrg1-Rtg3, un complejo que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la integridad mitocondrial en *Saccharomyces cerevisiae*. Se ha observado que las cepas mutantes en los genes *NRG1* o *RTG3*, que codifican los componentes de este modulador, presentan alteraciones mitocondriales severas, como la pérdida de funcionalidad, la disminución del ADN mitocondrial y la alteración de la estructura nativa del organelo.

Durante el estudio de las mutantes Nrg1-Rtg3, se determinó que, en ausencia de cualquier elemento del modulador transcripcional híbrido, se vuelven petite. Esto implica que el modulador transcripcional híbrido es clave en el mantenimiento de la integridad del ADN mitocondrial. Esto fue demostrado en el trabajo de Campero-Basaldua *et al.* (2023).

Carretero (2023), demostró que la formación del modulador híbrido Nrg1-Rtg3 es dependiente de la alanina para la formación del complejo, se realizó un análisis por secuenciación de ARN para determinar los genes que se regulan por el complejo híbrido Nrg1-Rtg3. Esta técnica permitió identificar al grupo de genes que constituyen el circuito regulado de manera negativa. El análisis permitió identificar grupos de genes regulados por el complejo, dentro de estos destacan los siguientes

- Procesos de óxido – reducción.
- Metabolismo de ácidos carboxílicos.
- Transporte de metales de transición.

CAPÍTULO 2

El análisis bioinformático reveló que estas categorías de genes son las más relevantes, ya que, dentro de la red genética controlada por el modulador híbrido, son los más representados. En este estudio, se enfoca en los clústeres de genes relacionados con el transporte de metales de transición, utilizando como modelo el gen *FRE5*, que pertenece a dicho clúster. El objetivo es desarrollar una estrategia para generar una cepa mutante que sobreexpresa el gen *FRE5*.

Para lograr este objetivo, se reemplazó el promotor endógeno del gen *FRE5* por el promotor TetO7, un promotor exógeno fuerte y reprimible por tetraciclina. Se utilizó el *Software SnapGene* para el diseño *in silico* de los oligonucleótidos necesarios para generar los módulos recombinantes que permitirían la sustitución del promotor. Esta investigación describe de forma detallada el proceso de diseño de los módulos recombinantes y demuestra su eficacia para obtener una cepa sobreexpresante del gen *FRE5*.

Justificación

Los reguladores híbridos se forman por la unión de dos reguladores transcripcionales diferentes. Estos reguladores tienen la capacidad de controlar redes genéticas complejas y de mantener la integridad de organelos celulares. Su descubrimiento fue un hito en la biología molecular, ya que permitió explorar nuevas formas de interacción entre reguladores y genes. Además, los reguladores híbridos son un ejemplo de la adaptación de los microorganismos, que aprovechan reguladores existentes para responder a nuevas necesidades regulatorias.

Existen diferentes tipos de reguladores híbridos, y uno que actualmente se encuentra en estudio es el complejo formado por Nrg1-Rtg3, que participa en el mantenimiento de la integridad del ADN mitocondrial y con ello en la función de la mitocondria, el organelo responsable de la respiración celular y generación de energía para la célula por excelencia. Se ha demostrado que la ausencia de cualquiera de las subunidades que forman el híbrido impide su función regulatoria, lo que conlleva a la pérdida de funcionalidad, ADN y estructura nativa de la mitocondria. Este caso ilustra el papel crucial que pueden tener los reguladores híbridos en la integridad de los organelos.

Un acercamiento para comprender el mecanismo por el cual se genera el daño mitocondrial asociado a la ausencia del regulador híbrido Nrg1-Rtg3 es la sobreexpresión de los genes pertenecientes al clúster regulado por el híbrido y evaluar si existe un daño mitocondrial semejante. Por lo tanto, es importante identificar una estrategia que permita sobre expresar este conjunto de genes de forma eficiente.

En el presente proyecto de tesis se busca sobreexpresar un gen mediante el intercambio de promotores, el objetivo de esta investigación fue desarrollar una estrategia que permita sustituir un promotor endógeno por un promotor fuerte reprimible por tetraciclina y que permita una fácil selección de cepas mutantes por medio de resistencia a G418 (geneticina). Asimismo, establecer un protocolo para estandarizar la producción de los módulos para facilitar a los investigadores el estudio del efecto de la desregulación de genes en *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1. Objetivo general

Generar una cepa que sobre exprese al gen *FRE5* por medio de la sustitución del promotor endógeno por un promotor exógeno, reprimible por tetraciclina, utilizando módulos de recombinación en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

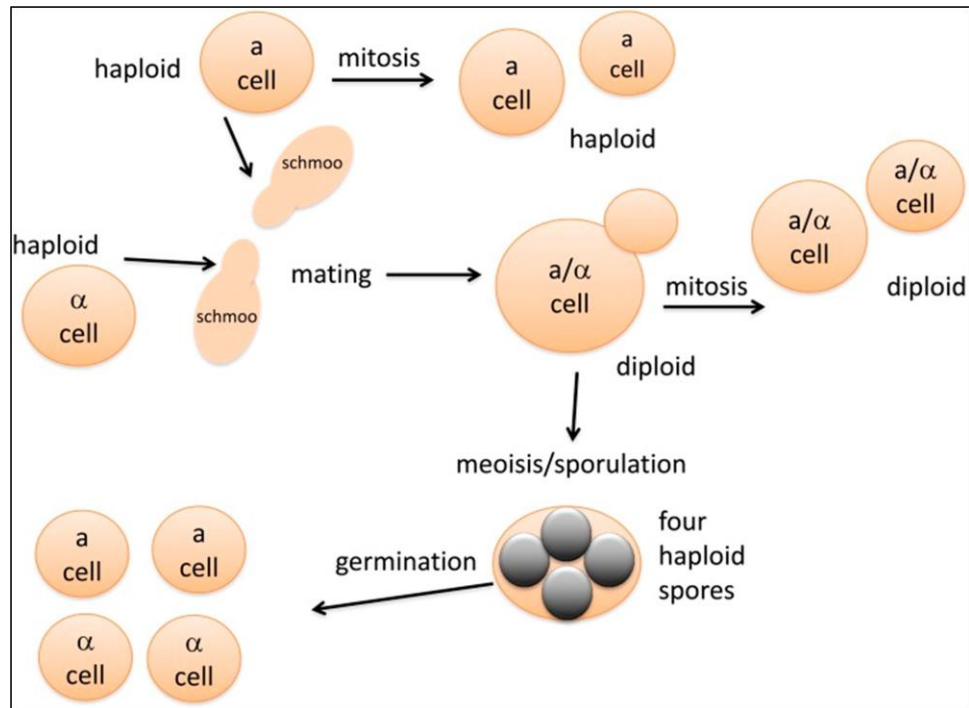
3.2. Objetivos específicos

- Transformar la cepa DH5 α de *E. coli* con el plásmido pCM325 mediante choque térmico y seleccionar las colonias resistentes a ampicilina.
- Optimizar las condiciones de PCR para la amplificación del módulo recombinante.
- Transformar la cepa silvestre R1158 de *S. cerevisiae* y comprobar la integración del módulo recombinante mediante PCR.
- Evaluar el fenotipo de la cepa sobreexpresante de *FRE5*, en glucosa o etanol como única fuente de carbono y amonio como única fuente de nitrógeno.
- Comprobar la sobreexpresión de *FRE5* mediante qPCR y evaluar significancia estadística en el cambio de la expresión del gen *FRE5*, respecto a la cepa silvestre R1158 de *S. cerevisiae*.

4.1. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

El organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* también conocido como levadura común, es clasificada como un hongo o moho. *S. cerevisiae* es un eucariota unicelular, por lo que contiene organelos tales como el núcleo, sistema endomembranal y mitocondria. Las levaduras tienen una rápida división celular, su tiempo de duplicación se encuentra alrededor de los 90 minutos bajo condiciones óptimas. Su proceso de división celular es conocido como gemación, este proceso consiste en la formación de una yema a partir de la membrana de la levadura, al terminarse de separarse da origen a un nuevo organismo genéticamente semejante. Debido a que las levaduras son producto de la gemación son genéticamente semejantes debido a que la gemación es un tipo de reproducción asexual (Murakami C. et al, 2009).

S. cerevisiae posee un mecanismo de reproducción sexual, este proceso depende de dos perfiles de apareamiento: perfil α y el perfil a. Las células haploides α se unen a las células haploides a por medio de una estructura llamada Schmoos, esto genera una célula diploide a/α que puede replicarse de forma asexual indefinidamente, generando yemas diploides genéticamente semejantes. Bajo condiciones pobres en nitrógeno, las células diploides son inducidas a meiosis, lo que genera un ascó que contiene 4 esporas haploides; cuando la espóra germina se liberan 4 células haploides (Figura 4.1) (Duina A. et al, 2014).

Figura 4.1Simplificación del ciclo de vida de *S. cerevisiae*.Nota. Adaptada de Duina *et al*, 2014.

Este organismo levaduriforme ha sido un sello distintivo en la historia de la investigación científica. Ha sido utilizado debido a que no está sujeto a múltiples restricciones éticas asociadas a la experimentación con organismos vivos, además proveen una estructura en la que se pueden desarrollar y optimizar métodos analíticos; y es muy sencillo manipular su ciclo de vida en condiciones controladas en el laboratorio (Altmann *et al*, 2007). Por otra parte, al ser un organismo eucariota se considera representativo de una gran clase de organismos vivos en cuanto al estudio de procesos biológicos altamente conservados (Beck H. *et al*, 2008).

La selección de organismos modelos depende principalmente en la acumulación de experiencia y disponibilidad de técnicas experimentales estandarizadas que no prometan resultados confiables en otras especies. Otro factor determinante es la acumulación de genomas completamente secuenciados y los avances en la genómica comparativa de los mismos (Engel SR, 2014). Esto permite el desarrollo de métodos de biología computacional tales como la comparación de proteínas o el estudio de redes genéticas involucradas en un proceso biológico de interés con el objetivo de establecer algoritmos lo suficientemente efectivos para extrapolar ese comportamiento en el contexto genético de otra especie (Alves R. *et al*, 2008).

4.2. *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo para el estudio de la biología mitocondrial

La levadura *S. cerevisiae* ha demostrado ser un excelente organismo modelo para el estudio de funciones celulares básicas conservadas en las células eucariotas, debido a la facilidad de generar mutantes, alta eficiencia en procesos de ingeniería genética y bajo tiempo de duplicación (Altmann, *et al.*, 2007).

Dentro de todas las proteínas codificadas por el ADN mitocondrial, pocas son esenciales para la viabilidad celular. Dentro de estas se encuentran algunos factores esenciales para la importación y ensamblaje de proteínas nucleares, el clúster de hierro/azufre y genes asociados a la síntesis de mononucleótidos de flavina. El hecho de que se puedan estudiar diferentes funciones mitocondriales en mutantes *KnockDown* viables hace a la levadura un organismo ideal para diseccionar los procesos moleculares requeridos para la biogénesis de una mitocondria competente (Karathia *et al.*, 2011).

El genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* se conforma por alrededor de 80,000 pares de bases y codifica al menos 8 proteínas esenciales para el proceso de fosforilación oxidativa. Estas proteínas son *Cit b*, *Cox1*, *Cox2*, *Cox3*, *Atp6*, *Atp8*, *Atp9* y *Var1*. Dentro de este contexto se encuentran levaduras rho+, que se conocen por tener su genoma mitocondrial intacto, mientras que las rho- son aquellas que tienen ADN mitocondrial defectuoso, pero aún poseen y las rho0 son levaduras que carecen de ADN mitocondrial (Contamine & Picard, 2000).

Las células rho0 son también conocidas como petite. En estas levaduras, al carecer de ADN mitocondrial, no ocurre el proceso de respiración oxidativa; Y por lo tanto su capacidad metabólica es muy reducida. Esto influye en el tamaño de las colonias que forman, por lo que estas tienden a ser pequeñas (Carnevali *et al.* 1968).

4.3. Evento de duplicación genética y la divergencia funcional de genes

Saccharomyces cerevisiae fue el primer organismo eucariota cuyo genoma fue completamente secuenciado. Los subsecuentes análisis genómicos revelaron la presencia de bloques de genes duplicados, indicando que esta levadura procede de un linaje cuyo genoma fue duplicado. Los eventos de duplicación genética son fenómenos frecuentes en la evolución, algunos hongos, plantas y vertebrados son descendientes de ancestros que sufrieron duplicación genética. Estos eventos de duplicación han sido asociados con la adquisición de nuevas características que se reflejan la riqueza de una especie (Van De Peer, 2017).

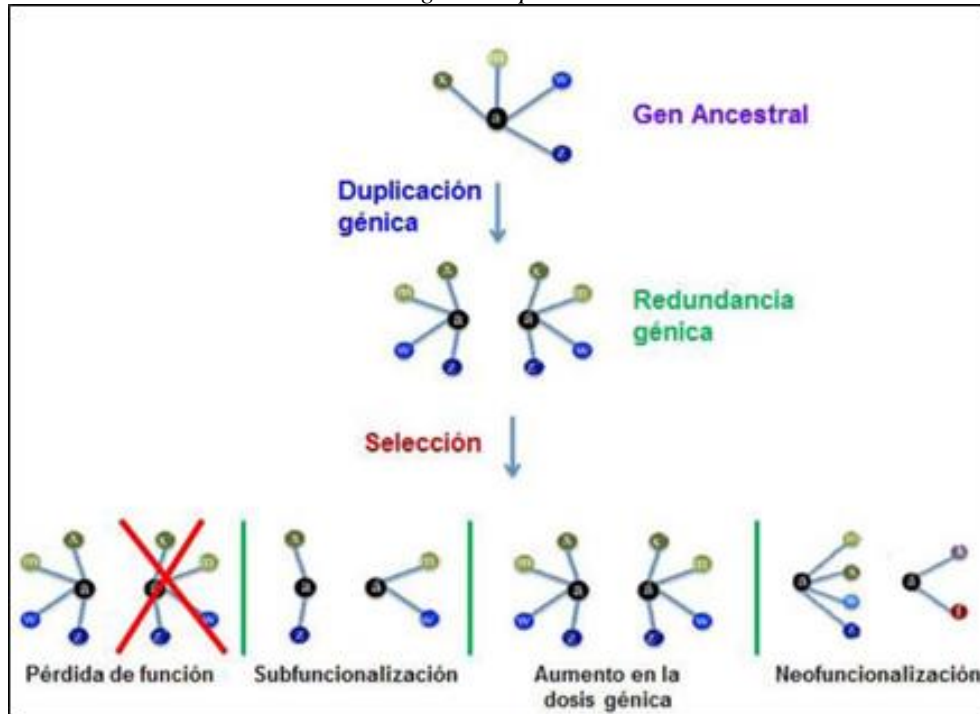
Estudios recientes proponen que la conservación selectiva de genes duplicados en *S. cerevisiae* ha sido esencial para el desarrollo de un metabolismo fermentativo. Para evaluar esta hipótesis, se compararon las duplicaciones del genoma completo con las duplicaciones a pequeña escala, en términos de interacción genética, divergencia en expresión y cambios funcionales (Escalera-Fanjul, 2019). Este análisis permitió determinar genes duplicados del metabolismo central del carbón y transporte de hexosas, que enriquecen el genoma. Este efecto enriquecedor tiende a ser mayor en eventos de duplicación del genoma completo en comparación a duplicaciones de pequeña escala (Kuepfer *et al.*, 2005)

4.4. Duplicación de genes y evolución de nuevas funciones

El proceso de enriquecimiento está asociado principalmente a la subfuncionalización de parejas de genes parálogos, esta diversificación funcional afecta los roles de cada uno de los genes. Uno de los principales ejemplos de este fenómeno son los genes parálogos *ENO1* y *ENO2* codificantes de fosfopiruvato hidratasa que catalizan la conversión reversible de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (Escalera-Fanjul, 2019). En condiciones fermentativas *ENO2* es predominante, mientras que en condiciones respiratorias ambas proteínas se encuentran presentes y contribuyen a la gluconeogénesis. Este estudio evidencia que genes parálogos productos de duplicación genética pueden tener una regulación de expresión diferente; así como cinética, especificidad a sustrato y afinidad únicas (Mcalister & Holland, 1982).

Según Dariel Márquez (2015), los posibles destinos de los genes duplicados pueden ser

- **Pérdida de función:** luego de la redundancia genética una de las dos copias puede perder su función, esto puede ocurrir por la acumulación de mutaciones en la región promotora o en la región codificante. Estas mutaciones pueden generar una proteína con un sitio activo defectuoso, una proteína truncada o pérdida de afinidad a su sustrato.
- **Subfuncionalización:** durante el proceso de evolución de los bloques genéticos duplicados tiende a haber acumulación de mutaciones que eventualmente pueden generar la pérdida o ganancia de funciones. Esto puede generar que las copias de los genes puedan complementarse entre sí para cumplir la función del gen ancestral, de esta forma se conservan las dos copias del gen duplicado.
- **Dosis génica:** se denomina como incremento en la dosis génica cuando dos copias de un gen son retenidas sin acumular mutaciones suficientes para generar pérdida de función o subfuncionalización. Este fenómeno se asocia con el incremento de la robustez genética y el aumento de la expresión del gen.
- **Neofuncionalización:** es el proceso en el que las copias genéticas acumulan mutaciones que resultan en la adquisición de una nueva función, está siendo diferente a la del gen ancestral, lo cual resulta en una ventaja adaptativa.

Figura 4.2*El destino de los genes duplicados*

Nota. La duplicación genética conduce en una primera instancia a una redundancia genética, donde a partir de este se pueden generar distintos escenarios de modificación de la funcionalidad de un elemento genético. Las copias genéticas pueden perder funcionalidad, pueden subfuncionalizarse, incrementar la dosis genética del elemento duplicado y desarrollar nuevas funciones (neofuncionalización). (Márquez, 2019).

4.5. El impacto de la duplicación genética en la evolución de las rutas metabólicas

El genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* codifica a aproximadamente 1500 genes llamados “duplicados” que se presentan en el genoma en múltiples copias (Gu *et al.* 2003). Alrededor de 496 de estos genes con múltiples copias son producto del evento de duplicación genómica ancestral (Kellis *et al.* 2004). Se han realizado diferentes interpretaciones sobre el efecto de estos genes duplicados, una corriente popular es la asociación de los genes duplicados a la robustez de la red genética; se cree que estos genes duplicados pueden tener una función de respaldo cuando el gen principal sufre de alguna mutación que afecte de forma significativa su funcionalidad (Gu *et al.* 2003). La corriente de pensamiento más aceptada es la que sugiere que los genes duplicados adquieren o pierden funciones, este proceso es conocido como subfuncionalización. Este proceso permite regresar a un estado de única copia de gen y cada copia puede adquirir una especialización en función, expresión o localización (Kuepfer *et al.* 2005). Según Wolfe (2004), la duplicación genética incrementa el dosaje genético y sugiere que esto juega un rol central en la adaptación de *S. cerevisiae* a un metabolismo fermentativo que fue altamente seleccionado durante la domesticación de la levadura.

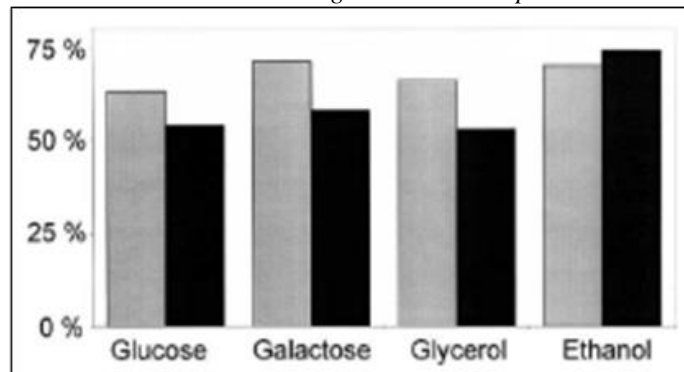
Figura 4.3
Compartimentación de genes duplicados de *S. cerevisiae*.

Duplicate families	ORF	Localization ^a	Growth phenotype ^b	Essential reaction ^c	Duplication event ^d
AAT1	YKL106W	mit	+/+/+/+/+	-/+/+/+/+	
AAT2	YLR027C	cyt	+/+/+/+/+		
ACC1	YNR016C	cyt	- ^o	+/+/+/+/+	Genome duplication
HFA1 (ACC2)	YMR207C	mit	+/+/+/+/+		Genome duplication
ADH1	YOL086C	cyt	+/+/+/+/+	-/-/-/-/+	
ADH2	YMR303C	cyt	+/+/+/+/+		
ADH3	YMR083W	mit	+/+/+/+/+		
ADH4	YGL256W	mit	+/+/+/+/+		Genome duplication
ADH5	YBR145W	cyt	+/+/+/+/+		Genome duplication
ADK1	YDR226W	cyt	+/+/+/+/-	+/+/+/+/+	
ADK2	YER170W	mit	+/+/+/+/+		
ALD4	YOR374W	mit	+/+/+/+/+	-/-/-/-/+	
ALD5	YER073W	mit	+/+/+/+/+		
ALD6	YPL061W	cyt	+/+/+/+/+		
ALT1	YLR089C	mit	+/+/+/+/+	-/-/-/-/-	Genome duplication
ALT2	YDR111C	cyt	+/+/+/+/+		Genome duplication
BAT1	YHR208W	mit	+	+/+/+/+/+	Genome duplication
BAT2	YJR148W	cyt	+/+/+/+/+		Genome duplication
CIT1	YNR001C	mit	+/+/+/+/+	-/+/+/+/+	Genome duplication
CIT2	YCR005C	cyt	+/+/+/+/+		Genome duplication
CIT3	YPR001W	mit	+/+/+/+/+		
DLD1	YDL174C	mit	+/+/+/+/+	-/-/-/-/-	
DLD2	YDL178W	mit	+/+/+/+/+		
DLD3	YEL071W	cyt	+		
GLO2	YDR272W	cyt	+/+/+/+/+	-/-/-/-/-	
GLO4	YOR040W	mit	+/+/+/+/+		
GPD1	YDL022W	cyt	+/+/+/+/+	-/-/-/-/-	Genome duplication
GPD2	YOL059W	cyt/mit	+/+/+/+/+		Genome duplication
IDP1	YDL066W	mit	+/+/+/+/+	-/-/-/-/-	
IDP2	YLR174W	cyt	+/+/+/+/+		Genome duplication
IDP3	YNL009W	cyt	+/+/+/+/+		Genome duplication
LEU4	YNL104	cyt	+/+/+/+/+	-/-/-/-/-	Genome duplication
LEU9	YOR108W	mit	+/+/+/+/+		Genome duplication
MDH1	YKL085W	mit	+/+/+/+/+	-/-/-/-/+	
MDH2	YDL078C	cyt	+/+/+/+/-		
MDH3	YOL126C	cyt	+/+/+/+/+		
IPP1 (PPA1)	YBR011C	cyt	-	+/+/+/+/+	
PPA2	YMR267W	mit	+/+/-/-/-		
PSD1	YNL169C	cyt	+/+/+/+/+	-/-/-/-/-	
PSD2	YGR170W	mit	+/+/+/+/+		
SHM1	YBR263W	mit	+/+/+/+/+	-/-/-/-/-	
SHM2	YLR058C	cyt	+/+/+/+/+		
TRR1	YDR353W	cyt	+	-/-/-/-/-	Genome duplication
TRR2	YHR106W	mit	+/+/+/+/+		Genome duplication

Nota. En la figura se presenta forma en que se compartimentalizan los genes duplicados en el genoma de *S. cerevisiae* (Kuepfer *et al.* 2005)

En el estudio realizado por Kuepfer *et al.* (2005), se buscaba evaluar la hipótesis de que los genes duplicados incrementan la dosis genética y por lo tanto el flujo a través de las rutas metabólicas en las que estos genes duplicados participan. Según los estándares establecidos en el experimento se considera un incremento significativo en el flujo de una ruta metabólica cuando hay un incremento de al menos 5 % de consumo del metabolito inicial. Para esto se analizaron las rutas de carbono, en particular, las enzimas críticas de estas rutas metabólicas para evaluar el porcentaje en que se encuentran genes de una sola copia o genes duplicados, los genes analizados se enlistan en la primera columna de la figura 4.3. Asimismo, se indica si es una proteína con localización mitocondrial o en el citosol. Finalmente, en la última columna se indica si el gen tiene copias generadas en el evento de duplicación genética o si es de copia única. El análisis permitió determinar que las rutas de carbono central en *S. cerevisiae* se encuentran muy enriquecidas por genes duplicados (Figura 4).

Figura 4.4
Ocurrenia relativa de genes de una copia



Nota. Descripción de la ocurrencia relativa de genes de una copia y genes duplicados en las rutas centrales de carbón (Kuepfer *et al.* 2005).

En la (Figura 4.4) se presenta en porcentaje el total de genes esenciales duplicados (barra negra) y genes de una copia (barra gris) en las rutas centrales de carbono, se observa que, para las rutas del metabolismo de glucosa, galactosa y glicerol, aproximadamente el 50 % de los genes se encuentran duplicados. Mientras que, en la ruta del metabolismo de etanol, alrededor del 75 % de los genes se encuentran duplicados.

Asimismo, se cuantificó el número de reacciones realizadas por enzimas provenientes de genes duplicados y que generan un incremento significativo en el flujo de la ruta metabólica.

Figura 4.5
El efecto del dojase genético en reacciones altamente activas.

Medium	High average carbon flux (>5% of substrate uptake rate)
	Reactions encoded by duplicate genes
YPD ^a	22 (35) ^b
Glucose	21 (34)
Galactose	23 (45)
Glycerol	25 (48)
Ethanol	14 (30)

Nota. Adaptado de Kuepfer *et al.* 2005.

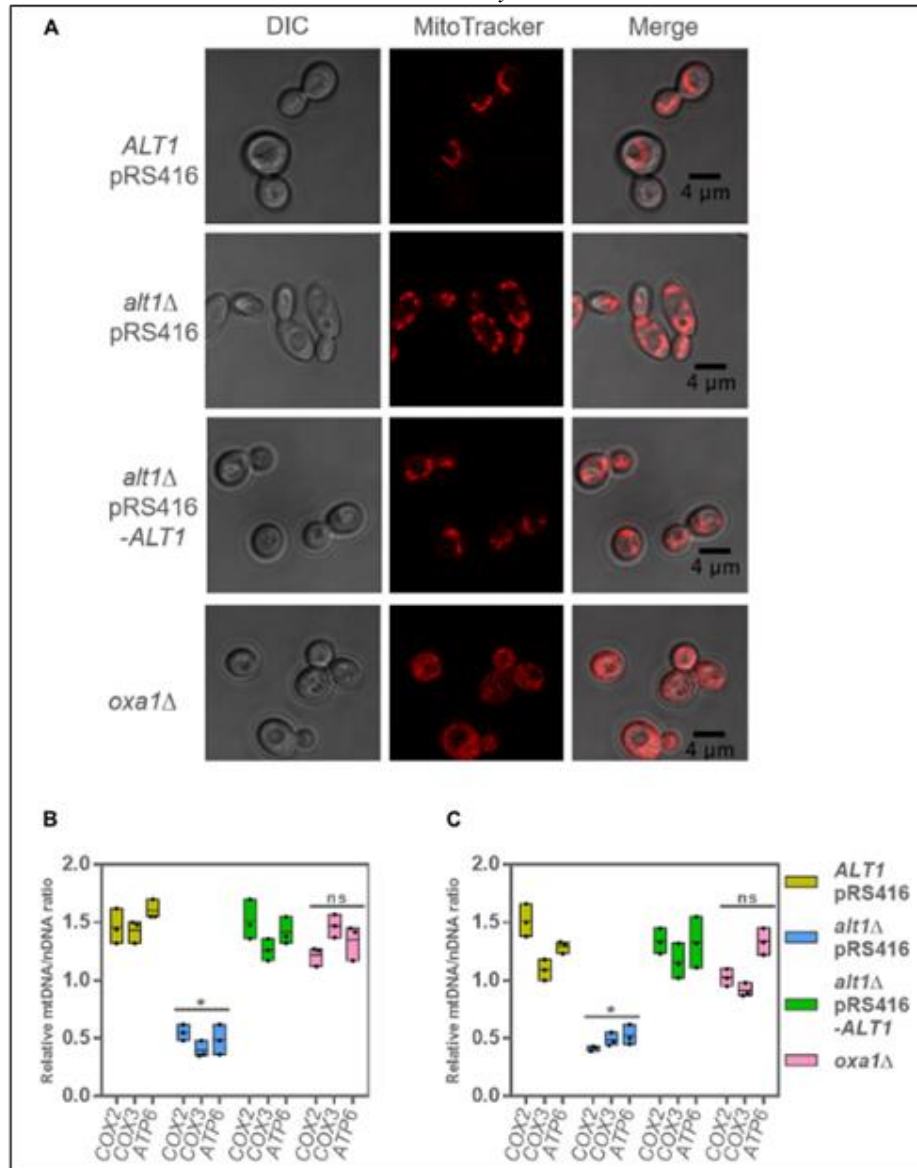
En la figura 4.5 se puede observar que se analizaron las 4 fuentes de carbono principales que utiliza *S. cerevisiae*, se determinó que cuando se utiliza glucosa galactosa, glicerol o etanol como fuente de carbono entre 30 y 48 genes duplicados participan en la ruta y generan un incremento significativo en el flujo de la ruta metabólica.

Estas observaciones han permitido ampliar el entendimiento de la función de los genes duplicados, ahora se sabe que los genes duplicados principalmente tienden a subfuncionalizar tal y como se describió con los ejemplos de las isozimas *ENO1* y *ENO2*. Y pueden afectar el dosaje genético generando que las enzimas críticas de diferentes rutas metabólicas incrementen de forma significativa el flujo neto de la ruta metabólica. Estos diferentes mecanismos ejemplifican el efecto de las duplicaciones genéticas en la evolución de las rutas metabólicas.

Las enzimas aminotransferasas de alanina (ALTs) catalizan la transaminación reversible entre alanina y alfa-cetoglutarato para formar piruvato y glutamato. En *S. cerevisiae* el sistema de isozimas *ALT* es considerado la ruta metabólica principal para la biosíntesis y catabolismo de alanina. Durante

Figura 4.7

La cepa mutante *ALT1* muestra daño mitocondrial y disminución en la concentración de ADNmt.

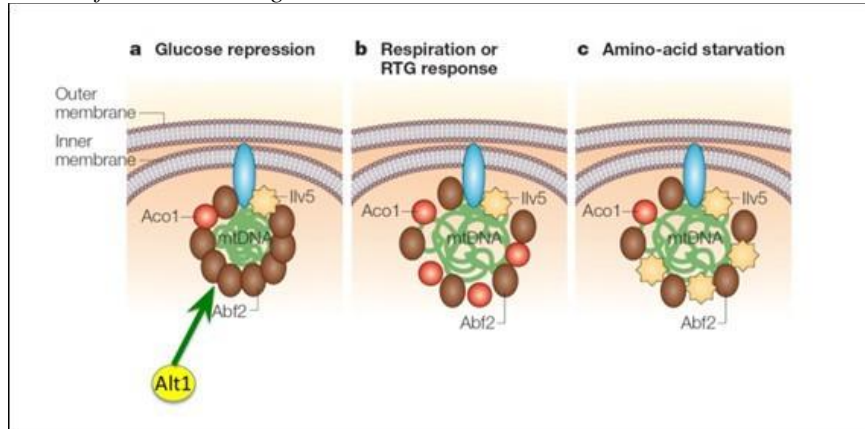


Nota. Adaptado de Márquez Gutiérrez, 2015.

4.6. Función *Moonlight* de Alt1

Según los resultados obtenidos en el laboratorio de la doctora Alicia González, se planteó la hipótesis de que la proteína Alt1 además de ser una enzima que cataliza la transaminación de alanina, esta puede poseer una función alterna de protección del ADN mitocondrial. La aconitasa es un ejemplo de una proteína que forma parte del ciclo de Krebs con y cumple una función *Moonlight* de protección de ADN mitocondrial. En la (Figura 4.8), se presenta un diagrama de función *Moonlight* de la aconitasa y representa la hipótesis que propone que la proteína Alt1 podría formar parte de la estructura de los nucleoides mitocondriales.

Figura 4.8
La función Moonlight de *Alt1*



Nota. Alt1 podría proveer un papel en la remodelación de los nucleoides mitocondriales en *S. cerevisiae*. Figura adaptada de (Chen, 2005).

Una perspectiva producto de la investigación realizada por Marquez *et al.* es demostrar que la proteína Alt1 es parte del complejo de remodelación de los nucleoides mitocondriales, esta hipótesis es congruente con la observación que en la mutante *alt1Δ*, la integridad del ADN mitocondrial se ve comprometida y la mitocondria se fisiona.

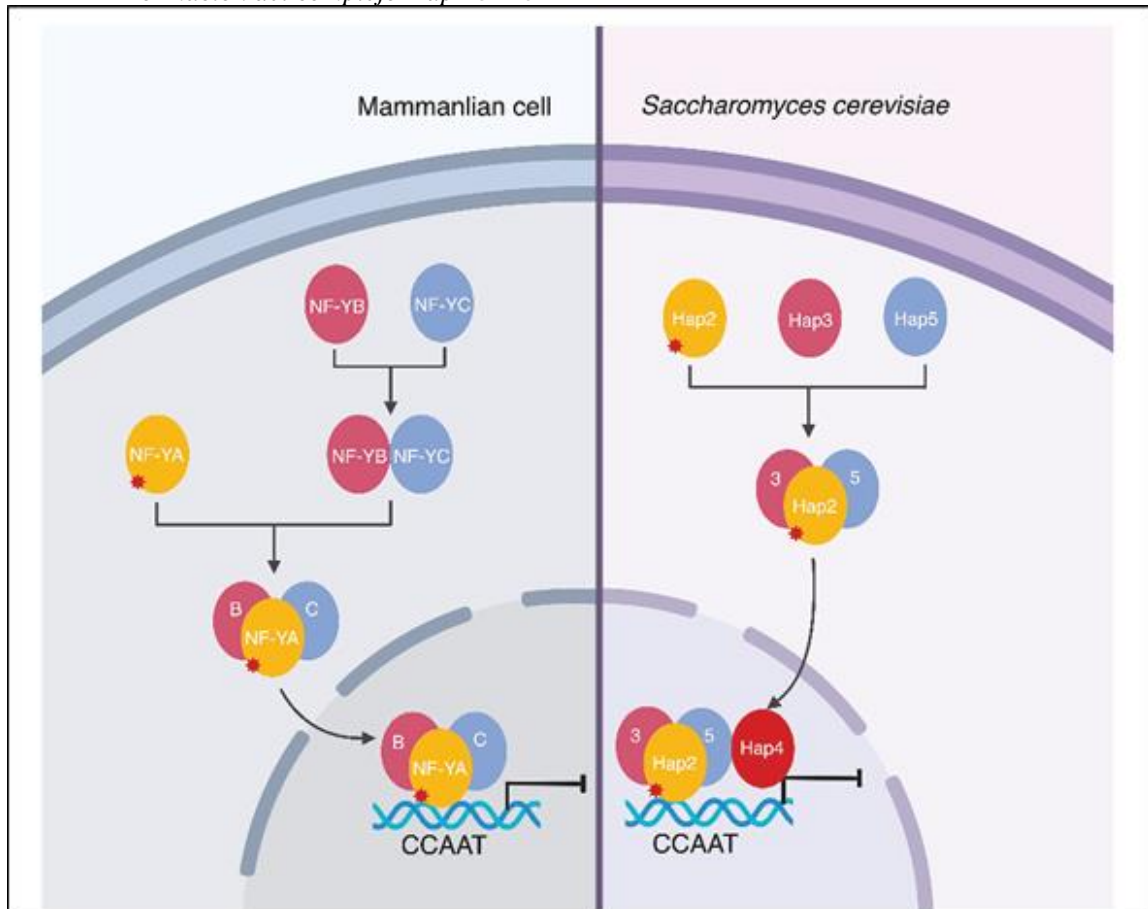
4.7. Reguladores transcripcionales híbridos en *S. cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es un modelo de estudio ampliamente utilizado para la descripción de las regulaciones transcripcionales en respuesta a estímulos como la limitación a nutrientes. Es bien descrito que la limitación a fuentes de nutrientes resulta en complejas adaptaciones fisiológicas en la levadura, las cuales se han descrito como programas transcripcionales (Hernández, *et al.*, 2011).

Los programas transcripcionales consisten en la activación o represión de un conjunto de genes, cuyos productos influyen en el establecimiento de una correcta respuesta fisiológica. Los cambios en el perfil de expresión dependen de factores de transcripción, estos se componen de un dominio de interacción al ADN y el dominio activador. El dominio de interacción al ADN es el que permite a la proteína interactuar con secuencias de ADN consenso (Tong Ihn Lee, *et al.*, 2002).

Uno de los complejos regulatorios más estudiados en *S. cerevisiae* es el complejo Hap. Este se compone de las subunidades *Hap2*, *Hap3* y *Hap5* que al interactuar forman el dominio de interacción con el ADN, mientras que la subunidad *Hap4* es el dominio activador. En conjunto, forman el complejo Hap 2-3-4-5; el cual tiene un rol muy relevante en la regulación de la respiración celular, la producción de especies reactivas de oxígeno y la homeostasis del hierro intracelular (Mao & Chen, 2019). En la figura 4.9 se ejemplifica el proceso de formación del complejo Hap 2-3-4-5 en *S. cerevisiae* y su contraste con el regulador NF-YA-B-C humano.

Figura 4.9
Formación del complejo Hap2-3-4-5



Nota. En la figura se describe el proceso de formación del complejo Hap2-3-4-5 (Mao & Chen, 2019).

Otro factor de transcripción ampliamente estudiado es Gln1-Gln3, este regulador transcripcional es relevante en el estudio de *S. cerevisiae* en fuentes pobres de nitrógeno como prolina. En estas condiciones este complejo participa en la activación de genes codificantes para enzimas involucradas en el catabolismo de las fuentes de nitrógeno pobres. En presencia de fuentes ricas de nitrógeno, la ruta de señalización TOR promueve la asociación de los factores de transcripción *Gln3* y *Gat1* con la proteína citoplasmática *Ure2*, promoviendo su retención en el citoplasma. Además, se ha observado que al transferir las levaduras a un medio pobre en nitrógeno se promueve la disociación de este complejo, esto permite la traslocación de *Gln3* hacia el núcleo para ejercer su rol de activador transcripcional (Hernández et al. 2011).

4.8. Hap 2-3-5-Gln3, el primer regulador híbrido descrito

En el laboratorio de la doctora Alicia González se describió por primera vez el modulador transcripcional híbrido Hap 2-3-5-Gln3. Este se caracteriza por el uso de las subunidades Hap2-3-5 que constituyen el dominio de interacción con el ADN y el dominio de activación Gln3. Asimismo, en el trabajo de Hernández et. al, se describe como este modulador híbrido activa la expresión de los genes *GDH1* y *ASN1* en condiciones pobres de nitrógeno. Además, se demuestra que los moduladores Hap 2-3-4-5 y Gln1-Gln3 por sí mismos no afectan en la expresión de dichos genes (Hernández et al. 2011).

4.9. Regulador negativo de los genes reprimidos por glucosa, *Nrg1*.

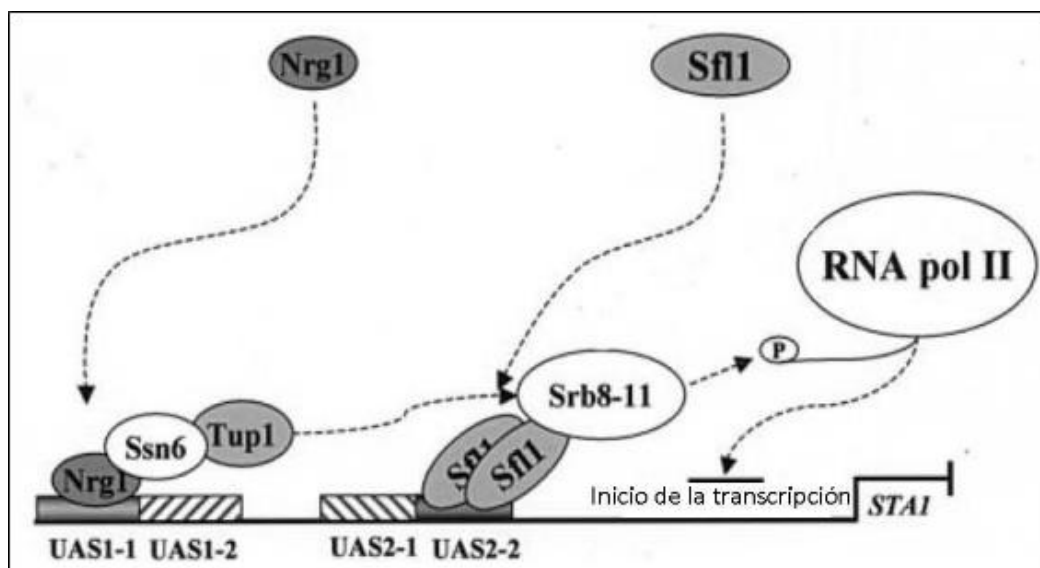
En *S. cerevisiae*, la expresión de un gran conjunto de genes es reprimida durante el crecimiento en glucosa (Gancedo, 1992), este fenómeno se denomina represión catabólica por glucosa (Ronne, 1995). Los genes reprimibles por glucosa pueden ser divididos en tres grupos principales:

1. Genes encargados del metabolismo de otras fuentes de carbono.
2. Genes codificantes a enzimas específicas de la gluconeogénesis
3. Genes involucrados en el ciclo de Krebs y la respiración.

El factor de transcripción *Nrg1* es un represor inducido por glucosa que se caracteriza por tener estructura similar a dedos de zinc que interactúa con secuencias de ADN ricas en GC. Algunos genes regulados por este factor de transcripción son: *GAL1*, *GAL4*, *SUC2*, *MAL*; que participan en el catabolismo de galactosa, sucrosa y maltosa (Park *et al.* 1999).

La actividad de *Nrg1* es regulada por su estado de fosforilación y su localización subcelular. En condiciones altas en glucosa, la proteína *Nrg1* es hipofosforilada lo que le permite reprimir la transcripción. Por el contrario, en condiciones de baja concentración de glucosa, *Nrg1* tiende a fosforilarse y a translocarse hacia el citoplasma. El estado de fosforilación de *Nrg1* depende del complejo quinasa *Snf1/Snf4*, el cual pertenece a la familia altamente conservada de proteínas quinasas *SNF1/AMPK* que son requeridas en los procesos de homeostasis energética y adaptación al uso de fuentes de carbono no preferenciales como el etanol, sucrosa, maltosa y galactosa (Hedbacker, 2008). En la figura 4.10 se observa que *Nrg1* se une a la secuencia del promotor *UAS1-1* (Upstream Activating Sequence), de esta forma es posible reclutar los co-reguladores como *Tup1* (Park *et al.* 1999).

Figura 4.10
Represión por *Nrg1* del gen *STA1*.



Nota. La inhibición del gen *STA1* mediada por *Nrg1* implica el reclutamiento de proteínas remodeladoras como el complejo *Ssn6-Tup1* y de represores como *Sfn1* que en conjunto tienen un efecto destabilizador de la transcripción. (Kim *et al.* 2004).

4.10. Regulador de la respuesta retrógrada, (*Rtg3*).

S. cerevisiae puede monitorear y responder a cambios del estado mitocondrial mediante su inducción en la expresión de genes nucleares. Esta respuesta es mediada por la respuesta retrógrada (Rtg). Esta ruta de señalización tiene un rol homeostático y de respuesta a estrés que permite ajustar rutas biosintéticas y actividades metabólicas, cuando ocurre disfunción mitocondrial (Ruiz, 2012).

Los elementos claves que permiten modular la expresión de genes nucleares son:

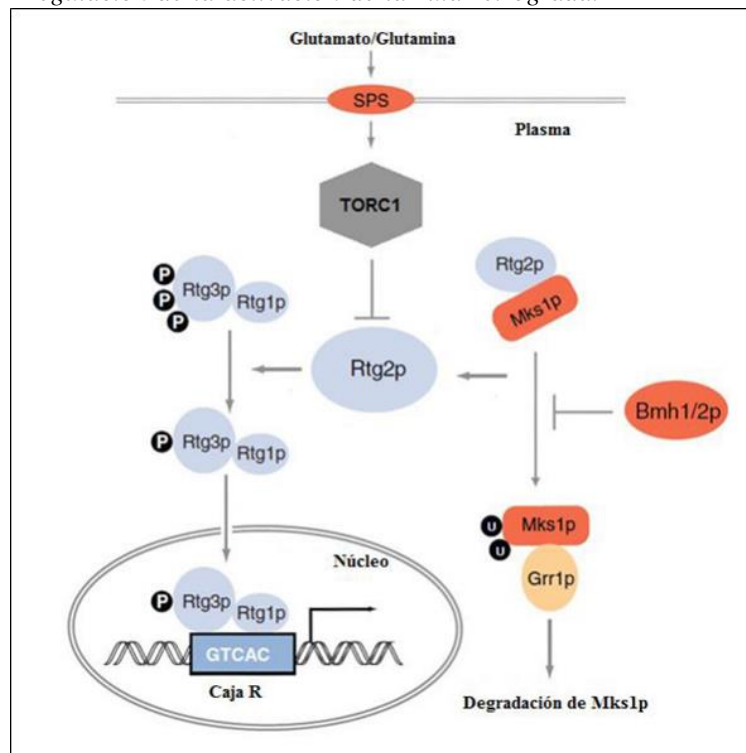
- Rtg1p - Rtg3p: factor de transcripción heterodimérico
- Rtg2p: proteína citoplasmática que funciona en la sensibilidad al nitrógeno y el catabolismo.

Cuando la regulación retrógrada es inducida la proteína Rtg3p es parcialmente desfosforilada, lo que permite que Rtg1p – Rtg3p sea trasladada hacia el núcleo (Rothermel *et al*, 1997).

En células respiratorias competentes, Rtg1 y Rtg3 se encuentra en su forma de factor de transcripción heterodimérico ubicado en el citoplasma. En contraste, las células con disfunción mitocondrial (por ejemplo, células sin ADN mitocondrial), el complejo se encuentra localizado predominantemente en el núcleo (Sekito *et al*, 2000).

Figura 4.11

Regulación de la activación de la ruta retrógrada.



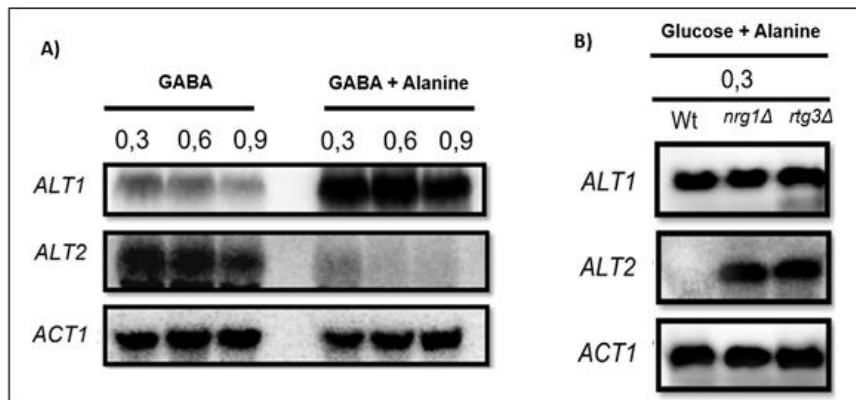
Nota. Este mecanismo de activación depende de las proteínas Mks1, TORC1 y Bmh1/2. Estas regulan de manera negativa ya que impiden que Rtg2 lleve a cabo su función de fosfatasa sobre Rtg3, mientras que la proteína Grr1, regula de manera positiva la ruta, promoviendo la ubiquitinación de Mks1, y por extensión su degradación. (Liu *et al*. 2006).

4.11. Regulador transcripcional híbrido, (Nrg1-Rtg3)

Recientemente en el laboratorio de la doctora Alicia González se evaluó la expresión de los genes *ALT1* y *ALT2* en cepas mutantes *nrg1Δ*, y *rtg3Δ*. Se observó en un medio con fuente pobre de nitrógeno la expresión de *ALT1* no es inducida, pero si la de *ALT2*. Por otra parte, cuando se suministra alanina al medio se induce la expresión de *ALT1* y se reprime la de *ALT2*. Por otra parte, al realizarse el mismo experimento en cepas mutantes *nrg1Δ* y *rtg3Δ*, se observa que no se reprime la expresión de *ALT2* (Márquez Gutiérrez, 2015). Esto sugirió que la expresión de *ALT2* requiere de ambas subunidades, este experimento fue un primer acercamiento para demostrar que Nrg1-Rtg3 forman un modulador híbrido (Figura 4.12).

Figura 4.12

Análisis Northern blot de ARN

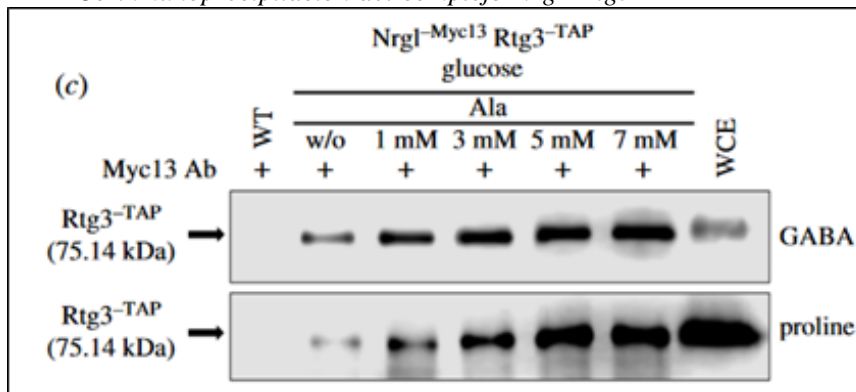


Nota. En la figura se presenta el análisis del ARN obtenido de la cepa silvestre y cepas mutantes (Campero – Basaldua, 2023).

Seguidamente, se demostró que Nrg1-Rtg3 son capaces de formar un complejo por medio de co-inmunoprecipitación. Este experimento se realizó utilizando dos fuentes de nitrógeno pobres y suplementando con diferentes concentraciones de alanina. En la Figura 4.13 se observa que, a mayor concentración de alanina, hay mayor formación de complejo; esto sugiere que la alanina es un coinductor del complejo Nrg1-Rtg3 (Carretero, 2023).

Figura 4.13

Co-inmunoprecipitación del complejo Nrg1-Rtg3



Nota. La condición de crecimiento fue en medio con Prolina y GABA (Figura adaptada de (Campero – Basaldua, 2023))

4.12. Análisis de la red genética regulada por el regulador híbrido Nrg1-Rtg3

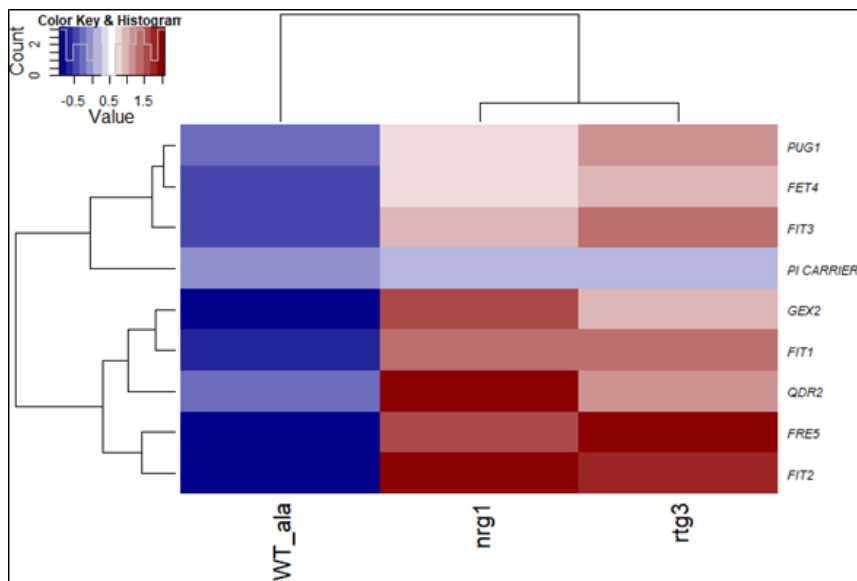
Carretero (2023), demostró que la formación del modulador híbrido Nrg1-Rtg3 y el rol de la alanina en la formación del complejo, se realizó un análisis por secuenciación de ARN para determinar los genes que se regulan por el complejo híbrido Nrg1-Rtg3. Esta técnica permitió identificar al grupo de genes que constituyen el circuito regulado de manera negativa por el complejo El análisis permitió identificar grupos de genes regulados por el complejo, dentro de estos destacan:

- Procesos de óxido – reducción.
- Metabolismo de ácidos carboxílicos.
- Transporte de metales de transición.

El análisis bioinformático reveló que estas categorías de genes son las más relevantes, ya que, dentro de la red de genes controlada por el modulador híbrido, estos son los más representados. En las (Figuras 4.14 – 4.16) se presentan los mapas de calor de los grupos destacados que son regulados por el modulador híbrido.

Figura 4.14

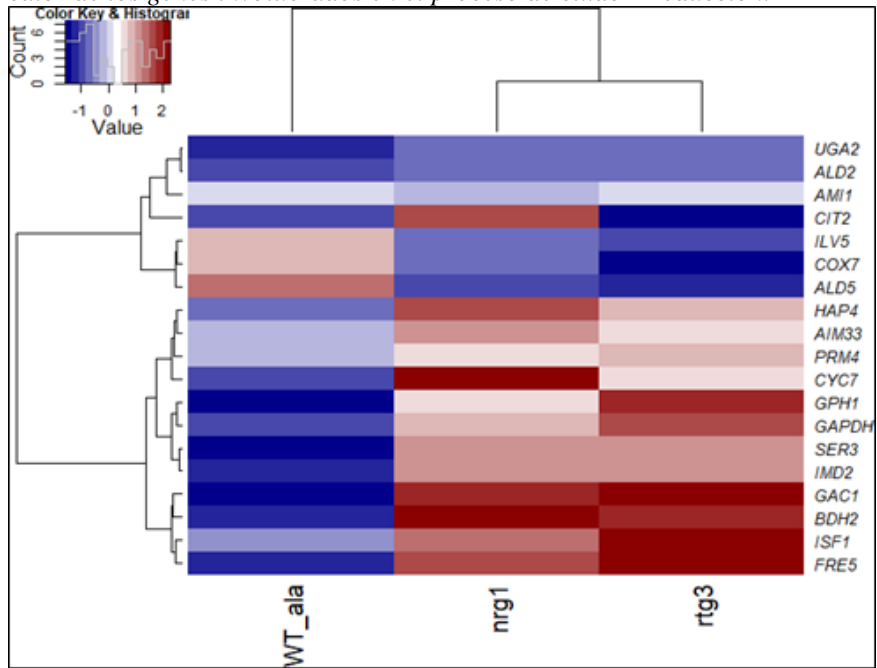
Mapa de calor de los genes involucrados en el transporte de metales de transición



Nota. Adaptado de Carretero, 2023.

Figura 4.15

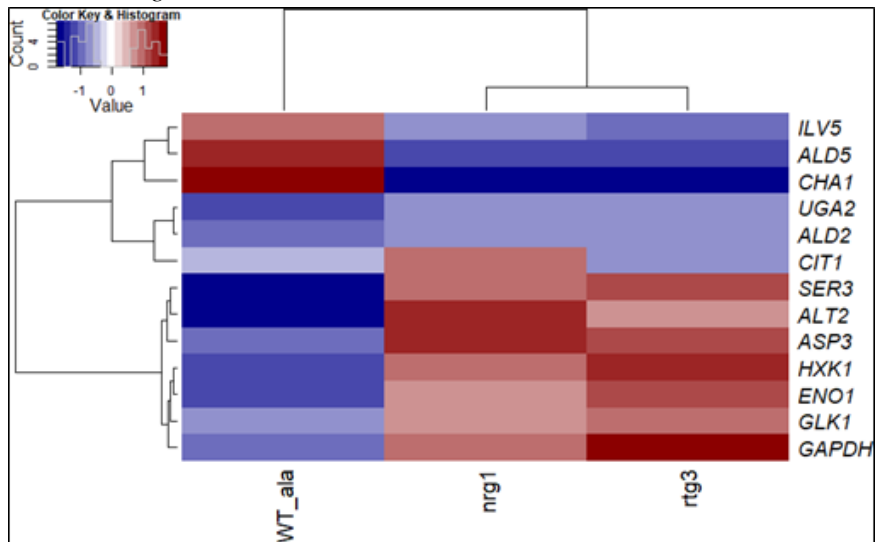
Mapa de calor de los genes involucrados en el proceso de óxido – reducción.



Nota. Adaptado de Carretero, 2023.

Figura 4.16

Mapa de calor de los genes involucrados en el metabolismo de ácidos carboxílicos.

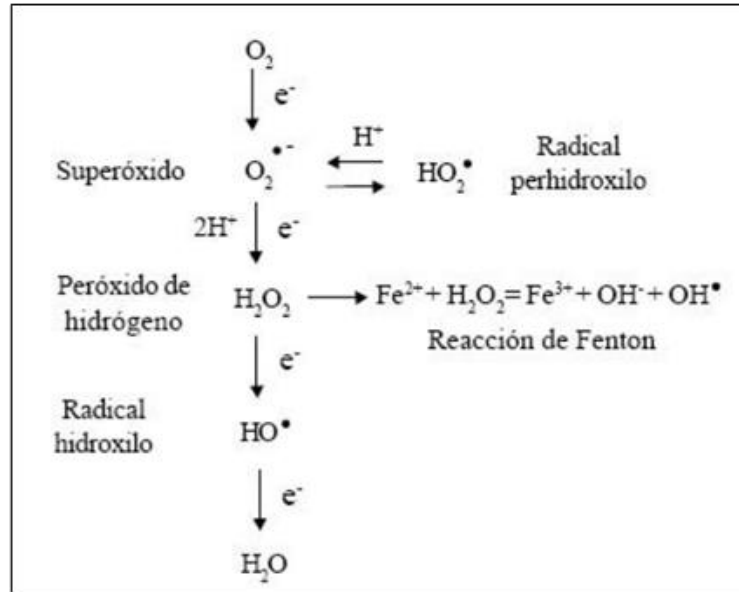


Nota. Adaptado de Carretero, 2023.

reducido se forma el ion superóxido que con la adición de un átomo de hidrógeno tiende a formar el radical perhidroxilo con un gran potencial de reacción. Por otra parte, cuando el radical superóxido reacciona con hidrógeno molecular y se reduce, se forma peróxido de hidrógeno (Pineda *et al.* 2008). El peróxido de hidrógeno puede someterse a la reacción de Fenton con iones ferrosos para formar el radical hidroxilo, este radical es el más reactivo de todas las especies reactivas de oxígeno. Este tiende a generar una serie de reacciones en cadena que incrementa rápidamente el estado oxidativo intracelular (Pineda *et al.* 2008). En la (Figura 4.18) se puede observar la serie de reacciones productoras de especies reactivas del oxígeno.

Figura 4.18

Química de las especies reactivas de oxígeno.

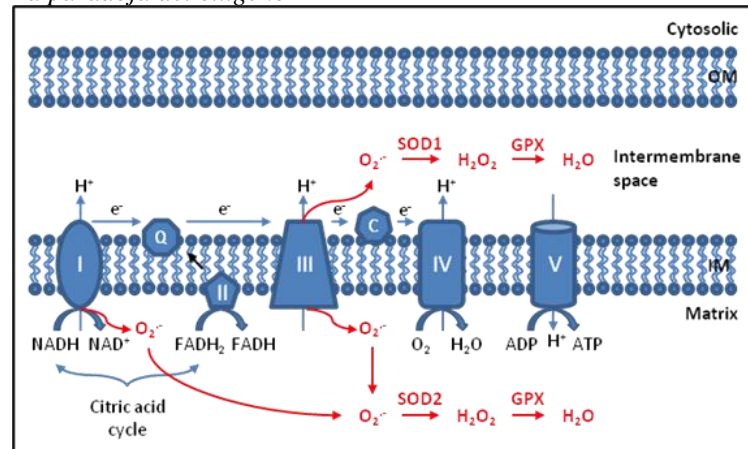


Nota. Adaptado de Desikan *et al.* 2007.

4.15. Principales orígenes de las especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno pueden ser producidas endógenamente por medio de procesos metabólicos, el proceso metabólico que produce la mayor cantidad de ROS es la cadena transportadora de electrones. Este proceso se da principalmente en el complejo I y III de la cadena oxidativa; el complejo I al realizar la oxidación de NADH a NAD⁺ para transportar protones al espacio intermembranal, puede producir radicales superóxidos debido al potencial redox de la reacción. Por otra parte, el complejo III es el otro gran productor de ROS, al participar el citocromo oxidasa se genera un alto potencial redox que produce radicales superóxidos, este proceso se resume en la (Figura 4.19). La identificación de que la cadena transportadora de electrones es uno de los productores endógenos de ROS más importantes, derivó el planteamiento de la paradoja del oxígeno. Esta establece que necesitamos oxígeno para existir, pero durante la serie de reacciones requeridas para la producción de ATP hay una alta probabilidad de liberación de ROS al medio, lo que se asocia con el envejecimiento (Hagen *et al.* 1995).

Figura 4.19
La paradoja del oxígeno



Nota. Adaptado de Mani, 2015.

4.16. Sistemas de defensa ante estrés oxidativo

Las células poseen sistemas de defensa tanto enzimáticos como no enzimáticos para defender los constituyentes celulares y para mantener el estado redox. El principal mecanismo de defensa no enzimático es el glutatión (*GSH*), este es un tripéptido que consiste en tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. Esta molécula actúa como un buscador de radicales, su grupo sulfidril tiene la capacidad de reaccionar con moléculas oxidantes para producir glutatión reducido (Xiangyang *et al.* 2016). El glutatión es la molécula antioxidante más abundante en las células, consecuentemente su rol en el mantenimiento del estado redox es muy importante. En *S. cerevisiae* los genes involucrados en la biosíntesis de *GSH* son: *GSH1* y *GSH2*, se ha observado que en mutantes *KnockDown* de estos genes son deficientes para glutatión y presentan hipersensibilidad a peróxido de hidrógeno (Xiangyang *et al.* 2016).

La principal limitante del mecanismo del glutatión para el control del estrés oxidativo es el NADPH, ya que la reacción de reducción utiliza como cofactor a esta molécula. La producción endógena de NADPH depende principalmente del GABA shunt. El GABA shunt es una ruta alterna al ciclo de Krebs, este mecanismo consiste en la utilización de alfa-cetoglutarato para la producción de GABA. Asimismo, la ruta metabólica convierte el GABA en succinato lo que permite la reintegración al ciclo de Krebs (Peng *et al.* 2016). La reacción que convierte el semialdehído succínico en succinato para la reintegración al ciclo de Krebs es la más relevante en el contexto del estrés oxidativo ya que la enzima semialdehído succínico deshidrogenasa utiliza como cofactor NAD⁺ y produce NADH y succinato. Esto resalta la relevancia del mantenimiento de los procesos mitocondriales, ya que la pérdida de la función mitocondrial indirectamente resulta en la pérdida de mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo (Peng *et al.* 2016).

A nivel mitocondrial un mecanismo de defensa enzimático es la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Sod2p), esta cumple un rol muy importante en la protección de la oxidación del ADN mitocondrial por parte de ROS. Esta enzima cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Esta es una de las reacciones más rápidas catalizadas por una enzima, esto permite una rápida y eficaz respuesta a los cambios en el equilibrio oxidante del ambiente mitocondrial (García *et al.* 1995).

4.17. Daño por estrés oxidativo

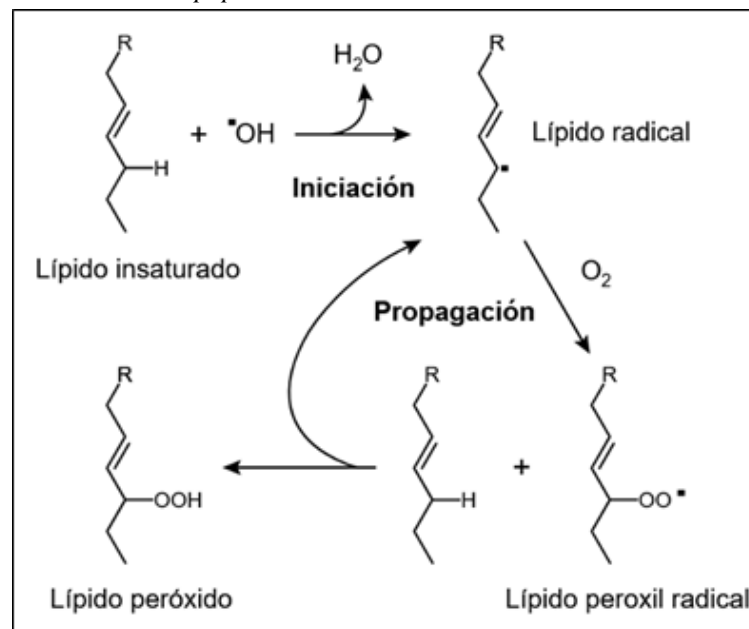
A pesar de que el daño molecular inducido por concentraciones subletales de especies reactivas de oxígeno no ha sido completamente estudiado, se ha determinado que los principales efectos son la oxidación de las proteínas y la peroxidación de lípidos. El incremento en la concentración de peróxido de hidrógeno disminuye la relación *GSH/GSSG*, lo que significa que el mecanismo principal de antioxidantes se ve afectado (Izawa, S. *et al.*, 1995). Esto también genera que los niveles de proteínas con puentes disulfuro y tioles incrementen (Jamieson, D. J. 1998).

Además, el peróxido de hidrógeno oxida los residuos de metionina a metionina sulfóxido, este grupo químico tiende a desestabilizar a las proteínas generando proteólisis. Esto resulta en la liberación de sulfoxidos de metionina libres en el medio, incrementando aún más el estado oxidativo intracelular (Morano, K.A., Grant, C.M., 2012).

El ADN mitocondrial también es objeto de daño oxidativo tras la exposición a peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos generados por la reacción de Fenton. Se ha observado que el incremento leve de ROS mitocondriales tiende a generar mutaciones, la acumulación de estas mutaciones puede generar disfunción mitocondrial. Pero el incremento significativo de ROS en la mitocondria tiende a generar el fenotipo petite que se caracteriza por carencia de ADN mitocondrial (Moradas-Ferreira *et al.*, 2000) (Contamine. *et al.* 2000) (Yazgan, *et al.* 2012).

Finalmente, las ROS también tienen la capacidad de reaccionar con lípidos por medio de la reacción de lipoperoxidación. En este caso, el radical hidroxilo reacciona con los lípidos insaturados de la membrana formando lípido peróxido, la acumulación de lípidos peróxidos en la membrana tiende a disminuir la estabilidad de la membrana, en la figura 4.20 se puede observar la serie de reacciones que conforman la lipoperoxidación. Considerando que este mecanismo, tiende a propagarse; el incremento de ROS intracelulares puede generar una cascada de reacciones que terminen destruyendo la integridad de la membrana celular o en el caso de estrés oxidativo mitocondrial, se puede generar fisión mitocondrial (Robles *et al.*, 2013).

Figura 4.20
Mecanismo de lipoperoxidación



Nota. Adaptado de Marnett, 1999.

4.18. Metabolismo del hierro y su relación con el estrés oxidativo

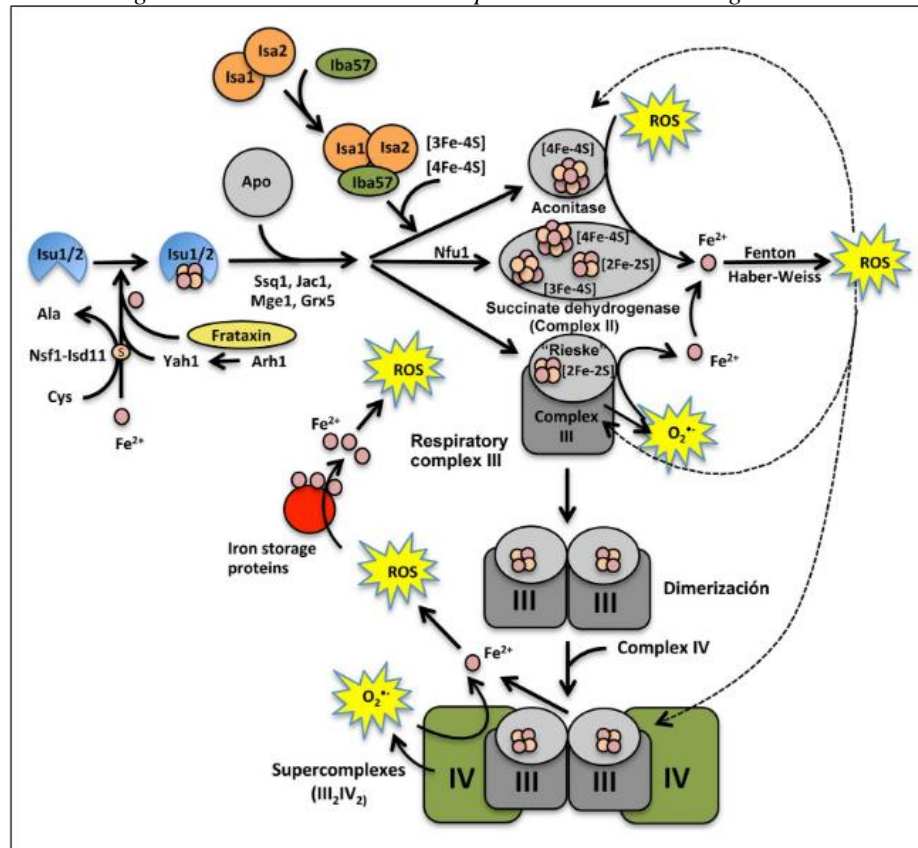
El hierro es una molécula con un gran potencial oxidativo, por lo que a nivel celular existen diferentes mecanismos de transporte, almacenamiento y transformación a formas no reactivas que cumplen un rol fisiológico. Siendo un ejemplo de ello la biogénesis de proteínas con centro Hierro-Azufre en *S. cerevisiae* (Schilke, B. *et al*, 1999). Esta ocurre principalmente en la mitocondria, se encarga de la incorporación del hierro y azufre libres a proteínas como grupos prostéticos. Cuando los átomos de azufre y hierro se encuentran en coordinación con una proteína, reducen su potencial oxidativo hacia las moléculas del medio. Pero está bien descrito que el hierro puede ser liberado de los centros Hierro-azufre por el estrés oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno, lo que puede causar en la acumulación de hierro en las mitocondrias (Gomez *et al*, 2014)

Asimismo, se ha descrito que la funcionalidad del citocromo b se ve afectada debido a que es una enzima con grupo prostético heme y el hierro libre tiende a disrumpir la estabilidad de las proteínas con estos grupos prostético. Adicionalmente, se ha reportado que el superóxido dismutasa mitocondrial puede ser saturada con hierro en vez de manganeso cuando la homeostasis de hierro se ve interrumpida. Por lo que la inactivación del superóxido dismutasa derivada del incremento intramitocondrial de hierro libre puede resultar en un factor importante en la acumulación de ROS (Moradas-Ferreira, *et al*, 2000).

El modelo de generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno dependiente de la concentración de hierro libre intramitocondrial (Figura 4.21) propuesto por Campos-García *et al*. (2014), establece que un incremento en la concentración de iones Fe^{+2} en el interior de la mitocondria, tiende a generar especies reactivas de oxígeno por medio de la reacción de Fenton. Este primer evento genera una cadena de reacciones en las que los ROS reaccionan con proteínas con centros de hierro-azufre y generan la liberación de más iones de Fe^{+2} . Además, estas tienden a afectar la estabilidad del complejo III de la cadena transportadora de electrones, estas tienden a dimerizarse y formar el supercomplejo III/IV. Cuando se forma el supercomplejo, se interrumpe la funcionalidad de la cadena transportadora de electrones y este se convierte en un generador de especies reactivas de oxígeno.

Figura 4.21

Modelo de generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno



Nota. Dependiente de la concentración de hierro libre intramitocondrial (Campos-García, *et al.* 2014).

4.19. Técnicas para el estudio del daño mitocondrial

Una de las estrategias más comunes para el análisis del daño mitocondrial es la secuenciación de ARN, este ensayo permite determinar que genes se están expresando en alguna condición que genere daño mitocondrial o en alguna cepa que presente el daño mitocondrial de forma constitutiva (Lasserre, 2015). Este ensayo tiene la ventaja que permite identificar las redes genéticas asociadas al fenómeno y evaluar si estos genes se están reprimiendo o sobreexpresando en la condición.

La microscopía de fluorescencia es una estrategia muy relevante ya que permite observar la estructura de la mitocondria durante el daño. Generalmente se utiliza el marcador fluorescente *MitoTracker* el cual tiende a acumularse en las mitocondrias activas debido a su potencial de membrana (Garipler, G. 2014). Esta estrategia tiende a utilizarse para comprender cuando el daño mitocondrial generado genera fisión al organelo o cuando se pierde el potencial de membrana mitocondrial debido a la pérdida de la función respiratoria.

La medición de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), para este ensayo se utiliza *MitoSOX* las cuales son sondas fluorescentes que detectan específicamente las especies reactivas de oxígeno dentro de las mitocondrias. Generalmente, el análisis con *MitoSOX* se complementa con la medición de la respiración celular por medio de respirometría de alta resolución (Kener, K. B. 2018). Para esto se utiliza el *Oxygraph*, el cual se utiliza para medir el consumo de oxígeno y evaluar la función mitocondrial.

5.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación

El diseño experimental de la presente investigación es de carácter puro enfocado en el diseño e implementación de un protocolo para la manipulación genética y molecular de células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2. Población y muestra

Las células con las que se trabajó el presente proyecto corresponden a células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se mantienen crío conservadas a -70°C en el laboratorio 301-Ote de la Doctora Alicia González Manjarrez del Instituto de Fisiología Celular UNAM. Los plásmidos manipulados se mantuvieron en el área común de “Banco de plásmidos” del laboratorio y los oligos se solicitaron a la Unidad de Biología Molecular (UBM) del mismo instituto.

5.3. Variables

Tabla 5.1
Variables de la investigación

Variables	Definición	Tipo	Unidades de medición
Producto de PCR punto final	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuyo principal objetivo es enriquecer copias de algún gen específico a partir de un ADN <i>in vitro</i> .	Cuantitativa y Cualitativa	ng / μ L
Medio de cultivo	Conjunto de nutrientes necesarios para fomentar el crecimiento y desarrollo de microorganismos	Cuantitativa y Cualitativa	OD600 _{nm}
Expresión	Emisión de fluorescencia, observada mediante un termociclador en tiempo real, resultado de la excitación de un fluoróforo contenido en una reacción de PCR	Cuantitativa	Veces de cambio expresado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$

5.4. Hipótesis

5.4.1. Hipótesis nula

La sustitución del promotor endógeno del gen *FRE5* por el promotor fuerte bacteriano TetO7 por medio de recombinación homóloga, permitirá la sobreexpresión del gen *FRE5* en *S. cerevisiae*.

5.4.2. Hipótesis alternativa

La sustitución del promotor endógeno del gen *FRE5* por el promotor fuerte bacteriano TetO7 por medio de recombinación homóloga, no permitirá la sobreexpresión del gen *FRE5* en *S. cerevisiae*.

5.5. Cepas

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas para la generación de una mutante sobreexpresante del gen *FRE5* y la cepa de *Escherichia coli* utilizada para la generación del plásmido pCM325 se listan en la tabla 5.2.

Tabla 5.2
Cepas empleadas en el estudio

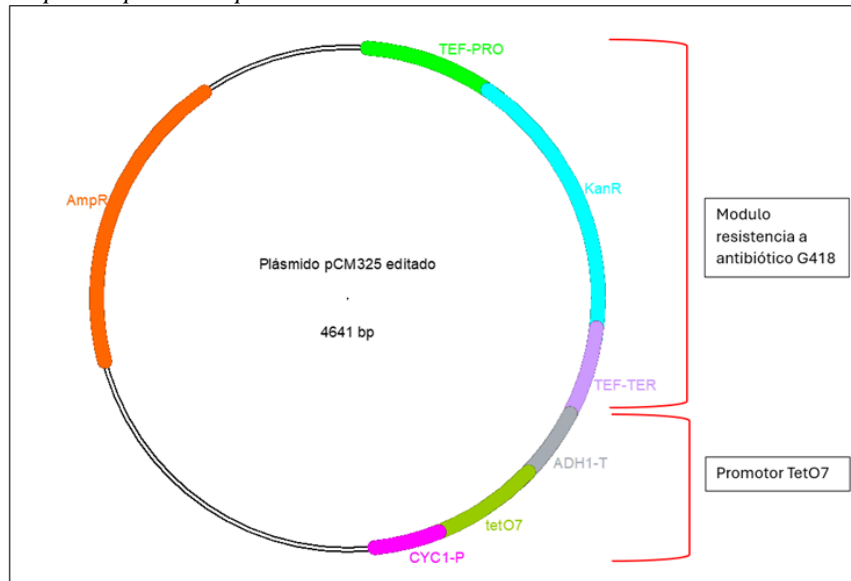
Cepa	Genotipo	Fuente
R1158 Silvestre (WT)	R1158 <i>ura3-</i> , <i>leu2-</i> , <i>met15-</i> R1158 (CTM -URA3 TA-Tet07)	Peñalosa <i>et. al.</i> 2012
P_{Tet07}FRE5	R1158 <i>ura3-</i> , <i>leu2-</i> , <i>met15-</i> , P _{Tet07} FRE5, (CTM -URA3 TA-Tet07).	Este estudio
DH5α	θ 80lacZ δ M15 δ (lacZYA-argF) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk-</i> , <i>mk+)</i> <i>gal- phoA supE44 λ- thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Thermo Scientific, 2020

La cepa R1158, es un fondo de *Saccharomyces cerevisiae* cuya principal característica es que tiene integrado en su genoma por medio de recombinación homóloga, la secuencia que contiene el gen de *URA3*, con su respectivo promotor-terminador y la secuencia del trans activador de Tet07, mismo que será usado como blanco para modular la expresión con tetraciclina. La cepa DH5 α es un fondo de *Escherichia coli* que se caracteriza por tener el marcador λ 80dlacZ δ M15 que proporciona α -complementación del gen β -galactosidasa a partir de pUC o vectores similares para permitir la detección de colonias azules/blancas en placas de agar bacteriano que contengan Bluo-Gal o X- Gall.

5.6. Plásmido pCM325

El plásmido pCM325 se caracteriza por tener un origen de replicación bacteriano, así como un gen de resistencia a ampicilina, estos elementos permiten que este plásmido pueda ser transformado a una cepa bacteriana como *E. coli* DH5 α para replicar el plásmido. Además, posee un origen de replicación eucariota y un gen de resistencia al antibiótico G418 (Geneticina). Como se presenta en la (Figura 5.1), el gen de resistencia a G418 se encuentra adyacente al promotor fuerte TetO7, por lo que el módulo de recombinación debe contener tanto al promotor fuerte TetO7 como al gen de resistencia KanR, para poder seleccionar las cepas transformantes luego de la recombinación.

Figura 5.1
Mapa del plásmido pCM325



Nota. Elaboración propia

5.7. Diseño de oligos para producción de módulo recombinante a partir del plásmido pCM325

La estrategia de transformación fue diseñada utilizando el *Software* ApE (Davis, 2022). Consiste en la sustitución del promotor endógeno del gen *FRE5* por un promotor fuerte-inducible TetO7 es inducible por tetraciclina que se encuentra en el plásmido pCM325 (Figura 5.1, Anexo 3), esta sustitución, permitirá que se sobreexpresen el gen endógeno de interés.

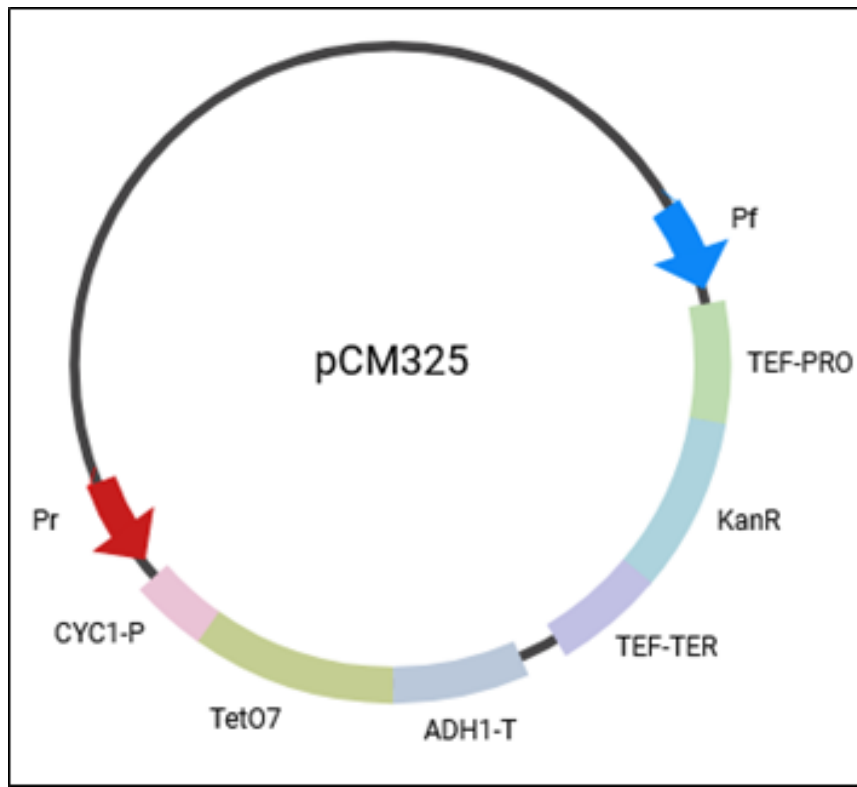
El módulo de recombinación que contiene al promotor fuerte TetO7 y el gen de resistencia a Geneticina, se encuentra en el plásmido pCM325. Por lo que a partir de la secuencia del plásmido (Anexo No. 1) se seleccionaron 20 pares de bases río arriba al módulo de interés como Primer Forward y 20 pares de bases río abajo para el Primer Reverse. Se utilizó el *Software OligoAnalyzer* (Owczarzt *et. al.*, 2008) para evaluar el potencial de formación de estructuras secundarias, así como la temperatura de anillamiento y %GC. Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del módulo de recombinación se presentan en la tabla 5.3, los sitios de unión de los primers se representan en la figura 5.2.

Tabla 5.3
Variables de la investigación

Nombre	Secuencia 5'3'
Primer forward (módulo de recombinación)	CGTACGCTGCAGGTCGACGG
Primer reverse (módulo de recombinación)	CATAGGCCACTAGTGGATCTG

Figura 5.2

Esquema ilustrativo que muestra los sitios de unión de los oligos para plásmido pCM325



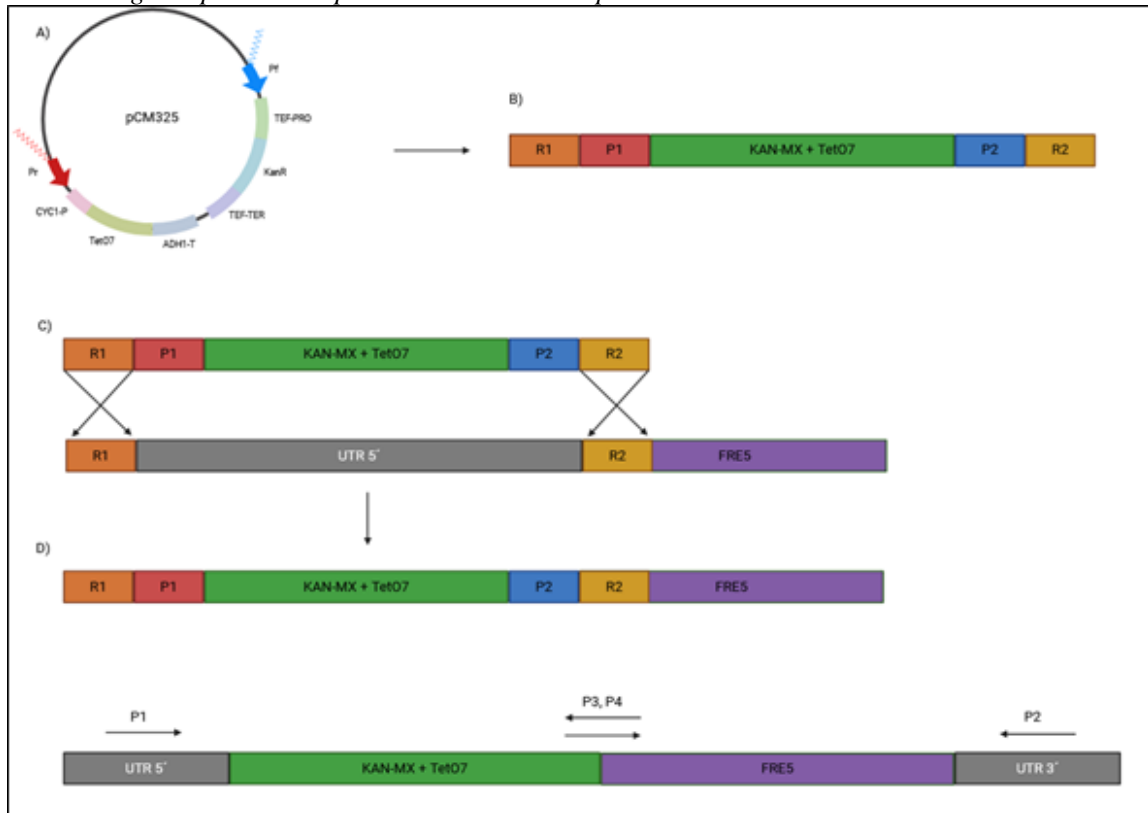
Nota. Elaboración propia

5.8. Diseño de secuencias de recombinación para integración del módulo recombinante en el genoma de *S. cerevisiae*

Para identificar en qué cromosoma se encontraba la secuencia codificante del gen *FRE5* se consultó *YeastGenome.org*; esta base de datos recopila toda la información de genoma secuenciado de *S. cerevisiae*. Luego de identificar el cromosoma que contiene el gen de interés, de NCBI, se obtuvo la secuencia codificante del gen *FRE5* con código de referencia: NC_001147.6 y se identificó la secuencia promotora del gen *FRE5* de *S. cerevisiae* a partir de la secuencia del cromosoma XV con código de referencia: NC_001147.6.

Se identificó la secuencia codificante del siguiente gen en el cromosoma utilizando el visualizador de secuencias de NCBI, se determinó que el gen río arriba al gen *FRE5* se encuentra separado por al menos 509 pares de bases. Por lo que la secuencia de recombinación que anida con la región no codificante 5' del gen *FRE5* debe encontrarse a no más de 450 pares de bases del gen *FRE5*.

Para el diseño de las secuencias de recombinación se utilizaron 50 pares de bases de la secuencia codificante del gen de interés como oligo reverso y 50 pares de bases de la región no codificante (UTR5') del gen *FRE5* UTR5'. Los oligos utilizados para producción de los módulos de recombinación son el resultado de la unión de los oligos de la tabla 5.5 que están dirigidos al plásmido pCM325 con las secuencias de recombinación. Se utilizó el *Software OligoAnalyzer* (Owczarzt *et. al.*, 2008) para evaluar el potencial de formación de estructuras secundarias, así como la temperatura de anillamiento y %GC. En la (Figura 5.3). se presenta la estrategia experimental para la sustitución de promotores.

Figura 5.3*Estrategia experimental para la sustitución de promotores*

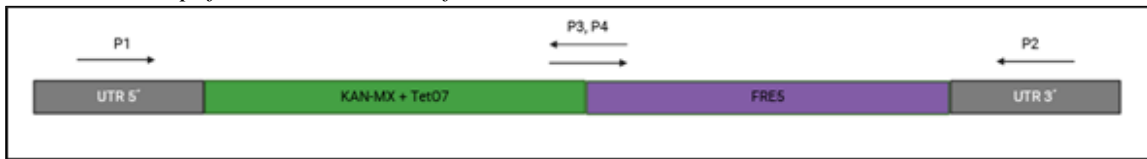
Nota. A) Se observa el plásmido pCM325, el oligo Pf que corresponde a Fw Ptet-*FRE5* y el Pr corresponde a Rv Ptet-*FRE5*, la secuencia de estos se presenta en la tabla 5.5. B) Representación gráfica del módulo de recombinación producto de la reacción de PCR representada en el inciso A). C) Diagrama de los sitios de recombinación homóloga entre el genoma de *S. cerevisiae* y el módulo de recombinación. D) Integración del módulo de recombinación al genoma de *S. cerevisiae*.

5.9. Diseño de oligos para confirmación de la integración del módulo recombinante al genoma de *S. cerevisiae*.

Se diseñaron 4 oligos para la confirmación de la integración del cassette de sobreexpresión. Para esto se seleccionaron 20 pares en el UTR 5' como oligo Fw., 20 pares de bases en el UTR 3' como oligo Rv., y 20 pares bases en sentido Fw y el mismo en sentido Rv sobre la intersección entre el módulo de recombinación y la región codificante del gen *FRE5*. Los oligonucleótidos diseñados para la producción del módulo, recombinación del módulo y confirmación de la transformación se presentan en la tabla 5.5. En la (Figura 5.4). se presenta una representación gráfica del diseño de los oligos y sus sitios de recombinación y en la (Tabla 5.4) se muestra el tamaño esperado de la banda.

Figura 5.4

Sitios de amplificación PCR de confirmación.



Nota. P1, P2, P3 Y P4, representan el oligo en la posición donde alineara al momento de comprobar la cepa sobre expresada. Los oligos utilizados en esta reacción se presentan en la table 5.5; P1 corresponde a Fw UTR 5' FRE5, P2 a Rv UTR 3' FRE5, P3 a Fw OPtet-FRE5 y P4 a Rv OPtet- FRE5.

Tabla 5.4

Oligos diseñados y pareados que se usarán en la comprobación de la cepa sobre expresada.

Oligos	Nombre de banda	Tamaño esperado
Fw UTR 5' FRE5 - Rv UTR 3' FRE5	5'-3' mutante	4806
Fw UTR 5' FRE5 - Rv UTR 3' FRE5	5'- 3' WT	2804
Fw UTR 5' FRE5 - Rv OPtet-FRE5	5'- KanConf Rv	441
Fw OP _{Tet07} -FRE5 - Rv UTR 3' FRE5	KanConf Fw - 3'	3842

Tabla 5.5

Oligonucleótidos usados para realizar el cambio de promotor del gen FRE5.

Nombre	Secuencia	Tm °C	%GC
Fw P _{Tet07} - FRE5	TTCCTTCACATACATCAAAAAATATGGGATAGCGGGGTGCGGAACAAACA CGTACGCTGCAGGTGCGACGG	87.7	50
Rv P _{Tet07} - FRE5	GAACCTGGTGCCAAATACACCAACAGCAGCACTAATCTAGCGAAAAGCAT CATAGGCCACTAGTGGATCTG	87.0	48
Fw UTR 5' FRE5	CAGATAGAACCAAAGCGGAAG	59.5	48
Rv UTR 3' FRE5	TAACAGTAAGGGTGAGGTGT	56.4	45
Fw OP _{Tet07} - FRE5	GTGGCCTATGATGCTTTTCG	58.4	50
Rv OP _{Tet07} - FRE5	CGAAAAGCATCATAGGCCAC	58.4	50

5.10. Medio de cultivo para *S. cerevisiae* y comprobación de fenotipo petite

Para el estudio del fenotipo de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio, se partió de un pre-inóculo en medio rico con extracto de levadura 1 %, peptona de caseína 2 % y glucosa 2 % (YPD). Posteriormente, las cepas fueron cultivadas en medio mínimo (MM) el cual contiene sales 1X, trazas 1X y vitaminas 1X, como fuente de carbono se utilizó glucosa al 2 % o etanol al 2 % (el etanol se agregó al medio previo a inocular con la cepa para reducir el efecto de evaporación de la fuente de carbono) y como fuente de nitrógeno se utilizó sulfato de amonio 40mM. Para compensar las auxotrofías de la cepa R1158 se utilizó histidina 100 mg/L, metionina 100 mg/L y leucina 100 mg/L. Para el caso de la cepa cuya transformación genera una resistencia a Geneticina, se prepararon los medios selectivos con geneticina G418 a una concentración final de 200 mg/L.

Para realizar una evaluación rápida y cualitativa del fenotipo de las cepas, se realiza inoculación por goteo de las cepas a evaluar en placas con medio mínimo con etanol con una incubación de 48 horas. Mientras que para la obtención de la cinética de crecimiento se inocularon tres réplicas biológicas en medio mínimo con fuente de carbono dextrosa o etanol. La densidad óptica inicial de las curvas de crecimiento fue de OD_{600nm} de 0.05 en todos los casos; se evaluó el cambio en la densidad óptica del cultivo a OD_{600nm} cada 2 horas cuando la fuente de carbono fue dextrosa y cada 3 horas omitiendo las primeras 16 horas cuando la fuente de carbono fue etanol. Se tomaron lecturas hasta la fase estacionaria, utilizando los puntos se determinó la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación de las cepas.

5.11. Medio de cultivo de *E. coli* para producir plásmido pCM325

Para el cultivo de *E. coli* DH5 α se utilizó medio LB. Para preparar un litro de medio se requiere: 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 10 g de NaCl, y 12 g de agar. Estos componentes son homogenizados y aforados en 1 L de agua destilada. Y colocados en la autoclave para su esterilización. En el caso de la preparación de medio selectivo para *E. coli* se utilizó la misma receta de medio LB y se suplementó con 1 mL de Ampicilina para tener una concentración final de antibiótico de 100 mg/L. El medio de cultivo de *E. coli* DH5 α se utilizó para el crecimiento de la cepa transformada con el plásmido pCM325 para la posterior extracción del plásmido.

5.12. Transformación por choque térmico de bacterias calciocompetentes

La transformación de las bacterias calciocompetentes se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos usados en el laboratorio. Se utilizó un stock de bacterias calciocompetentes DH5 α previamente preparadas para hacerlas químicamente competentes y 500 ng del plásmido pCM325. Se colocó 500 ng del plásmido en el stock de células calciocompetentes a transformar y se homogenizó mediante pipeteo. La mezcla fue incubada en hielo durante 30 minutos, después fueron sometidos a un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos y reposada en hielo durante al menos 2 minutos. Seguidamente, se agregó 800 μ L de medio LB para promover la recuperación celular y se incubaron a 37 °C por 2 horas a 300 rpm. Transcurrido el tiempo, se recuperaron las células por centrifugación a temperatura ambiente por 1 minuto a 3500 rpm, el sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en el remanente del tubo.

Como control negativo de no resistencia al antibiótico se plaqueó las células calciocompetentes DH5 α sin plásmido en placa LB con ampicilina. Como control positivo de viabilidad se plaqueó

células calciocompetentes DH5 α sin plásmido en placa LB sin ampicilina. Finalmente, se plaqueo las bacterias en las concentraciones: 10⁰ y 10⁻¹; en medio selectivo LB con ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas y se realizó un re-cultivo de las colonias aisladas, para purificar las cepas transformantes.

5.13. Purificación de plásmido pCM325

Con el objetivo de obtener una solución pura del plásmido pCM325 para utilizarse como molde en las reacciones de PCR para la producción del módulo recombinante. La purificación del plásmido pCM325 se realizó de acuerdo con el protocolo de *QIAprep Miniprep Handbook* (2005). Se inoculó 10 mL de medio LB y Ampicilina con bacterias calciocompetentes DH5 α seleccionadas por su resistencia a ampicilina y se incubaron durante 16 horas a 37 °C y con 250 rpm de agitación. Las bacterias fueron recolectadas mediante centrifugación a 8000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se resuspendió el paquete celular de bacterias utilizando 250 μ L de *buffer* P1 y fue transferido a un tubo de microcentrífuga. Se agregó 250 μ L del *buffer* P2 y se mezcló el contenido del tubo por inversión. Luego, se agregó 350 μ L del *buffer* N3 y se mezcló el contenido por inversión. La mezcla fue centrifugada por 10 minutos a 13,000 rpm a temperatura ambiente, 800 μ L del sobrenadante fue transferido a una columna y se centrifugó a 13,000 rpm, el remanente fue descartado.

La columna fue sometida a dos lavados independientes utilizando el *buffer* PE y *buffer* PB. Se agregó 500 μ L de cada *buffer*, se dejó incubar durante 1 minuto y se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto. El residual nuevamente fue descartado y la columna fue sometida a una centrifugación final a 13,000 rpm durante 1 minuto. Para la elusión del ADN, se adicionó 50 μ L de agua a 30 °C, se incubó durante 5 minutos para garantizar el mayor rendimiento y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto.

5.14. Comprobación de la purificación del plásmido pCM325

Con el objetivo de comprobar si el plásmido purificado mediante el protocolo de purificación es pCM325 Se comprobó la identidad del plásmido por medio de su linealización utilizando la enzima de restricción Sall según el protocolo de *Thermo Scientific* (2012). Se utilizó suficiente volumen de ADN para que la concentración de ADN fuera de 1 μ g/ μ L en un volumen final de 20 μ L. Se agregó 2 μ L de *Buffer* O 10X, 1 μ L de Sall y se aforó a 20 μ L con agua libre de nucleasas. Se homogenizó la mezcla mediante agitación y se incubó a 37 °C por 30 minutos.

Se visualizó el producto digerido por medio de electroforesis de ADN y por el peso de la banda se determinó que el peso del plásmido purificado correspondía al plásmido pCM325. Se cuantificó el plásmido purificado utilizando el equipo *NanoDrop*.

5.15. Purificación de plásmido pCM325 a partir de banda de gel.

Utilizando una navaja se cortó la banda de ADN de interés del gel de agarosa, se pesó el trozo de gel y por cada 100 mg de gel se adicionaron 100 μ L de *buffer* QG en un tubo eppendorf de 2 mL. El tubo fue incubado a 50 °C durante 10 minutos, hasta observar que el gel estuviera completamente disuelto en el *buffer*. Seguidamente, se agregó el mismo volumen de isopropanol que de *buffer* QG. La solución fue trasladada a una columna *QIAquick* y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto, el remanente fue descartado. Para lavar la columna, se añadió 0.75 mL de *buffer* PE a la columna

QIAquick y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto. Se descartó el remanente y se centrifugó nuevamente la columna a 13,000 rpm durante 1 minuto. Para eluir el ADN, se colocó la columna en un eppendorf de 2 mL nuevo y se añadió 50 mL de *buffer* EB, la muestra fue centrifugada a 13,000 rpm durante 1 minuto. La concentración de ADN se determinó utilizando el equipo *NanoDrop*.

5.16. Optimización de la producción de módulos de recombinación

La reacción de PCR para la amplificación de la región de interés del plásmido pCM325 fue realizada adaptando el protocolo de (PCRBiosystems, 2018). Para la desnaturalización inicial se utilizó la temperatura y tiempo estándar. Para optimizar las condiciones de la reacción en los ciclos de amplificación se realizó un gradiente de temperatura variando la temperatura de alineamiento en saltos de 0.5 °C. Para la elongación se utilizó la temperatura estándar y 3 minutos de duración dado que la velocidad de síntesis de la polimerasa es 1000 pb/min y el producto de la reacción es de 2332 pb. Se utilizó las muestras de plásmido pCM325 purificado como molde para las reacciones de PCR, los oligonucleótidos empleados en la reacción se encuentran en el cuadro No. 5. El *Mix* de reacción utilizado fue el que se describe en la (Tabla 5.6) y en la (Tabla 5.7) se describen los parámetros de la reacción.

Tabla 5.6

Preparación del mix de reacción gradiente de temperatura

Reactivo	50 μ L reacción	Concentración final
5x PCRBIO <i>buffer</i>	10.0 μ L	1x
Primer forward (10 μ M)	2.0 μ L	400 nM
Primer reverse (10 μ M)	2.0 μ L	400 nM
DNA pCM325	x μ L	Variable
PCRBIO HiFi Pol (2u/ μ L)	0.5 μ L	
H ₂ O grado PCR	Aforar a 50 μ L	

Tabla 5.7

Condiciones de amplificación en el termociclador.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
1	95 °C	1 minutos	Desnaturalización inicial
30	95 °C	30 segundos	Desnaturalización
30	60.0 °C – 76.0°C (8 pasos)	1 minuto	Alineamiento
30	72 °C	3 minutos	Elongación
1	72 °C	3 minutos	Elongación final

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis de ADN y se confirmó el producto por el peso de la banda. El módulo de recombinación tiene una longitud de 2332 pb, mediante la comparación de la banda con la escalera molecular 1kb plus de Invitrogen, se confirmó la identidad del producto.

5.17. Producción de módulos de recombinación para sustitución de promotor endógeno por promotor TetO7

Para la producción final del módulo de recombinación se utilizó el protocolo optimizado. Se utilizaron las muestras de plásmido pCM325 purificado como molde para las reacciones de PCR, los oligonucleótidos empleados en las reacciones se encuentran en la tabla 5.5. El *mix* de reacción utilizado se describe en la (Tabla 5.8) y las condiciones de amplificación en la (Tabla 5.9.)

Tabla 5.8
Preparación del mix de reacción final

Reactivo	50 μ L reacción	Concentración final
5x PCRBIO <i>buffer</i>	10.0 μ L	1x
Primer Forward (10 μ M)	2.0 μ L	400 nM
Primer Reverse (10 μ M)	2.0 μ L	400 nM
DNA pCM325	x μ L	Variable
PCRBIO HiFi Pol (2u/ μ L)	0.5 μ L	
H ₂ O grado PCR	Aforar a 50 μ L	

Tabla 5.9
Condiciones de reacción de PCR final.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
1	95 °C	1 minutos	Desnaturalización inicial
30	95 °C	30 segundos	Desnaturalización
30	63.2°C (8 pasos)	1 minuto	Alineamiento
30	72 °C	3 minutos	Elongación
1	72 °C	3 minutos	Elongación final

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis de ADN y se confirmó el producto por el peso de la banda. El módulo de recombinación tiene una longitud de 2332 pb, mediante la comparación de la banda con la escalera molecular 1 kb plus de Invitrogen, es posible confirmar la identidad del producto. El módulo producido fue cuantificado utilizando el equipo *NanoDrop*.

5.18. Transformación de levaduras con acetato de litio

La transformación de la cepa R1158 se llevó a cabo adaptando el método descrito (Hernández *et al.*, 2011). Para la generación de la cepa PTET-*FRE5*; se utilizaron los módulos de recombinación respectivos para la sustitución de cada promotor endógeno.

Se preparó un cultivo *overnight* de la cepa R1158, las células fueron concentradas por centrifugación a 3,000 rpm. La pastilla celular se inoculó en medio YPD y se incubó hasta alcanzar un OD_{600nm} de 0.5. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 3000 rpm y tratadas con soluciones recién preparadas de TE/LioAC y PGE/TE/LioAC.

Se prepararon los siguientes tratamientos:

- Tubo 1: 100 μL de células
- Tubo 2: 100 μL de células + 10 μL de DNA acarreador
- Tubo 3: 100 μL de células + 10 μL de DNA acarreador + los microlitros necesarios del módulo de recombinación para tener 5 μg de módulo total.

Se plateó en cajas Petri:

- Control positivo de viabilidad: 100 μL del tratamiento del Tubo 1 en medio mínimo.
- Control negativo de resistencia a geneticina: 100 μL del tratamiento del Tubo 2 en medio mínimo + geneticina.
- Concentrado: 100 μL del tratamiento del Tubo 3 en medio mínimo + geneticina.
- Dilución 1:10 del tratamiento 3: 100 μL de la dilución en medio mínimo + geneticina.
- Dilución 1:100 del tratamiento 3: 100 μL de la dilución en medio mínimo + geneticina.

Se utilizó placas con Medio mínimo y geneticina para seleccionar las transformantes ya que el módulo de recombinación obtenido del plásmido pCM325 confieren resistencia al antibiótico geneticina (G418).

5.19. Selección de cepas mutantes

Para la selección de cepas mutantes se utilizó medio mínimo + geneticina 200 mg/mL. Las placas fueron inoculadas a partir de una colonia aislada y fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas. Este proceso fue realizado 2 veces para asegurar la pureza de la colonia de interés.

5.20. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de levadura se llevó a cabo adaptando el método descrito y montado en el laboratorio de la Dra. González, desarrollado de la siguiente manera: se preparó un cultivo de una colonia de la cepa silvestre (WT) y de un par de colonias candidata PTET-*FRE5* en 10 mL de medio YPD líquido y se μL incubó durante 16 horas a 30 °C, se colectaron las células por centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 0.5 mL de agua bidestilada estéril y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. Seguidamente, se centrifugó la suspensión a 14,000 rpm por 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. A la pastilla celular se le adicionó 200 μL de una solución de lisis que contenía 2 % Tritón X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 y 1 mM Na-EDTA; adicionalmente 200 μL de TE a pH 8.0 y 200 μL de una solución fenol:cloroformo:alcoholisoamílico (25:24:1) (FCA) fría y recién preparada. Finalmente se agregó 0.3 g de perlas de vidrio y se sometió a vortex la mezcla durante 4 minutos para lisar las células. El lisado fue centrifugado a 14,000 rpm durante 5 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf limpio. A la fase acuosa se le agregó 400 μL de FCA y se homogenizó la mezcla con vortex durante 15 segundos, y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y se transfirió la fase acuosa a un tubo Eppendorf limpio, este proceso se realizó dos veces para incrementar la pureza del ADN.

Después de los dos pasos de extracción con FCA, a la fase acuosa se agregó 1 mL de etanol al 100 % + 10 μ L de acetato de amonio 4 M y se homogenizó mediante inversión suave 6 veces. Se centrifugó la mezcla a 14,000 rpm por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla que resultó de la centrifugación fue resuspendido en 400 μ L de TE + 10 μ L de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó a 37 °C por 30 minutos.

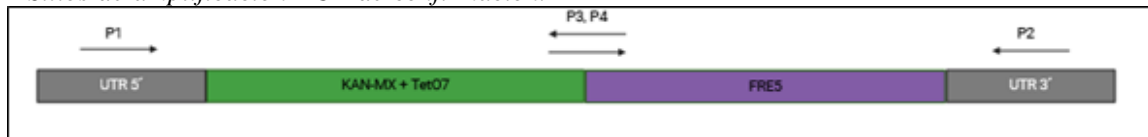
Tras la incubación se agregó 10 μ L de acetato de amonio 4 M + 1 mL de etanol al 100 % y se homogenizó mediante inversión suave 6 veces. Se centrifugó la mezcla a 14,000 rpm por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla mediante secado a temperatura ambiente y se resuspendió el pellet en 100 μ L de agua destilada. Se cuantificó el ADN utilizando el equipo *NanoDrop*. Además, se visualizó el ADN extraído para evaluar su integridad, por medio de electroforesis de ADN en gel de agarosa 1 %.

5.21. PCR para confirmar que el módulo recombinante se integró en el genoma de *S. cerevisiae*.

Las PCR de confirmación fueron realizadas adaptando el protocolo de (PCRBiosystems, 2018). Se utilizó las muestras de ADN extraídas como molde para las reacciones de PCR, los oligonucleótidos empleados en las reacciones se encuentran en la (Tabla 5.5) respectivamente y la reacción se realizó según el siguiente esquema:

Figura 5.5

Sitios de amplificación PCR de confirmación.



Nota. Los oligos utilizados en esta reacción se presentan en la (Tabla 5.3); P1 corresponde a Fw UTR 5' *FRE5*, P2 a Rv UTR 3' *FRE5*, P3 a Fw OP_{TetO7} *FRE5* y P4 a Rv OP_{TetO7} *FRE5*. Elaboración propia.

Tabla 5.10

Preparación del mix de reacción

Reactivo	50 μ L reacción	Concentración final
5x PCRBIO <i>buffer</i>	10.0 μ L	1x
Primer Forward (10 μ M)	2.0 μ L	400 nM
Primer Reverse (10 μ M)	2.0 μ L	400 nM
DNA	x μ L	100ng
PCRBIO HiFi Pol (2u/ μ L)	0.5 μ L	
H2O grado PCR	Aforar a 50 μ L	

Nota. Elaboración propia.

Tabla 5.11

Condiciones de reacción de PCR para confirmación.

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
1	95 °C	1 minutos	Desnaturalización inicial
30	95 °C	30 segundos	Desnaturalización
30	T _m	1 minuto	Alineamiento
30	72 °C	3 minutos	Elongación
1	72 °C	3 minutos	Elongación final

La temperatura de alineamiento de la reacción de PCR se determinó promediando las T_m individuales de los dos primers de cada reacción, la T_m para cada reacción se presenta en la (Tabla 5.12). Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis de ADN y se confirmó el producto por el peso de la banda. Las bandas esperadas son:

Tabla 5.12
Tamaño del amplicon esperado en la PCR

Nombre de banda	Tamaño esperado	T_m °C
5'-3' mutante	4806	46.5
5'-3' WT	2804	46.5
5'- KanConf Rv	441	49.0
KanConf Fw. - 3'	3842	47.5

Nota. Elaboración propia.

5.22. Extracción de ARN

El ARN total se extrajo siguiendo el método de Struhl *et al.*, 1981. El RNA de levadura total se preparó a partir de células cultivadas en 100 mL de medio mínimo suplementado con los requerimientos de aminoácidos necesarios de cada cepa y genética para el caso de la cepa sobre expresada a una OD_{600nm} de 0.3 (Fase exponencial). Una vez alcanzado el OD_{600nm} indicado, se recolectaron las células por centrifugación a 3000 rpm por 5 minutos y lavadas con dietilpirocarbonato (DEPC) al

0.1 % v/v. La extracción se hizo siguiendo el protocolo de Trizol Reagent, siguiendo las indicaciones del proveedor comercial.

El ARN total extraído se trató con DNAsa (5 μ g de RNA) por Kit RQ1 de Promega y se convirtió en ADNc por el kit *Thermo Scientific*: RevertAid H Minus First Strand cDNA Syntesis Kit, cat: K1631. Protocolo enlistado en la sección de anexos. La integridad del ADNc fue evaluada por medio de electroforesis de ADN y por una reacción de PCR de punto final para el gen ACT1.

Se extrajo el ARN de las cepas:

- P_{TetO7}FRE5 (3 réplicas biológicas)
- R1158 silvestre (3 réplicas biológicas)

5.23. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Los oligonucleótidos para el análisis de qPCR se diseñaron utilizando *Primer3Plus* (Untergasser *et al.*, 2007) y fueron analizados con los programas *DINAMelt* (Markham *et al.*, 2005) y *Mfold* (Zuker, M. 2003). Los oligonucleótidos utilizados se enumeran en la (Tabla 5.14).

El análisis de qPCR se realizó utilizando el equipo *Corbett life Science Rotor Gene 6000*. Se utilizó el colorante de detección *SYBR Green* (2 x *KAPA SYBR FAST qBioline* y *Platinum SYBR Green de Invitrogen*). Se preparó 3 réplicas experimentales de cada muestra biológica, la reacción de PCR en tiempo real se realizó utilizando el programa y las condiciones descritas en la (Tabla 5.13).

Tabla 5.13*Condiciones de reacción de qPCR.*

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Paso
1	98 °C	1 minutos	Desnaturalización inicial
30	98 °C	30 segundos	Desnaturalización
30	58°C	20 segundos	Alineamiento
30	72 °C	30 segundos	Elongación
1	72 °C	1 minuto	Elongación final

Nota. Elaboración propia.

Tabla 5.14*Oligonucleótidos empleados para el análisis de qPCR*

Gen	Secuencia 5'3'
<i>FRE5</i>	Fw. CGGTAAAAACAGCACAAATGA
Control 18S	Rv. GTATGCATGGTAGGTGTATC

Nota. Elaboración propia

5.24. Análisis estadístico qPCR

Utilizando los datos de Ct's (ciclo de threshold) de la qPCR recolectados con el equipo Corbett life Science Rotor Gene 6000 de las 3 réplicas experimentales de: PTet-*FRE5* (3 réplicas biológicas) y R1158 cepas silvestre (3 réplicas biológicas); se realizó un análisis de doble delta Ct (Kenneth *et al.*, 2001) utilizando el *Software* GraphPad Prisma. Se realizó una prueba t de student para evaluar si la media de la expresión de la cepa sobreexpresante del gen *FRE5* es estadísticamente significativa a la expresión de la cepa R1158 silvestre.

6.1. Diseño de oligonucleótidos para amplificación del módulo recombinante y cambio de promotor

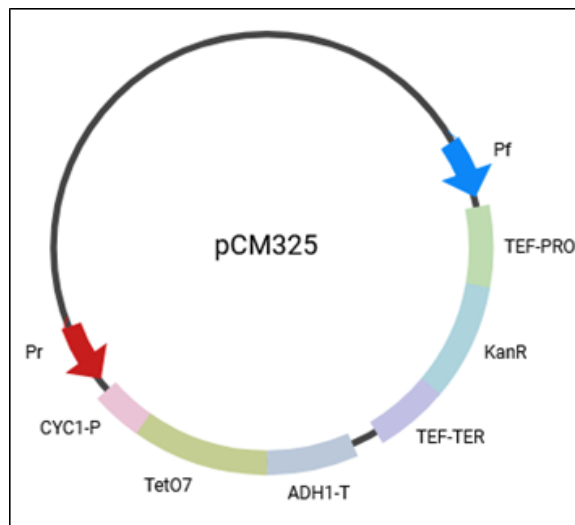
Con el objetivo de generar una cepa sobreexpresante del gen *FRE5* por medio de la sustitución del promotor endógeno por un promotor inducible por tetraciclina en la cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* R1158, se decidió utilizar el plásmido pCM325. Este plásmido fue seleccionado debido a que posee un origen de replicación bacteriano, así como un gen de resistencia a ampicilina que le permite ser transformado a la cepa bacteriana *E. coli* DH5 α para replicar el plásmido. Por otra parte, el plásmido posee un origen de replicación eucariota, un gen de resistencia al antibiótico G418 (Geneticina) y el promotor fuerte bacteriano inducible por tetraciclina TetO7. Se diseñaron oligos que flanquean al módulo de resistencia al antibiótico G418 y al promotor TetO7, permitiendo así la amplificación específica de las regiones que permitirán la sobreexpresión del gen *FRE5* y la selección de las mutantes. La cepa R1158 se caracteriza por tener integrado en su genoma la secuencia que codifica al trans activador de TetO7, por lo que esta estrategia de sobreexpresión es específica para esta cepa de *S. cerevisiae*. En la tabla 6.1, se presentan las secuencias de los oligonucleótidos para la producción del módulo recombinante a partir del plásmido pCM325 y en la figura 6.1 se muestran los sitios de unión de los oligos sobre el plásmido pCM325. Utilizando el *Software* OligoAnalyzer (Owczarzt *et. al.*, 2008), se evaluó el potencial de formación de estructuras secundarias, se determinó la temperatura de anillamiento y %GC; estos parámetros fueron comprobados para minimizar la formación de estructuras secundarias, seleccionar oligos con un %GC adecuado para lograr una buena hibridación y determinar la temperatura de fusión para configurar el programa de PCR.

Tabla 6.1.
Oligonucleótidos para el plásmido pCM325.

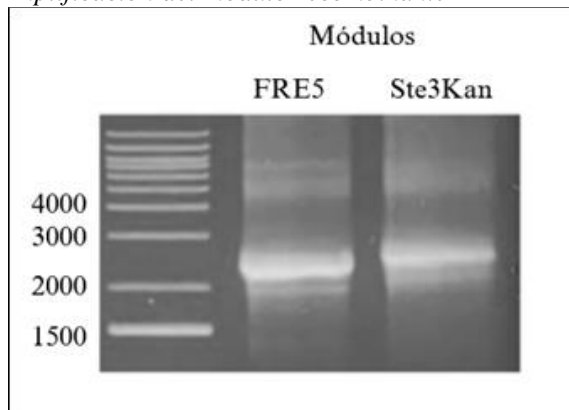
Nombre	Secuencia
Primer Forward módulo de recombinación	TTCCTTCACATACATCAAAAAATATGGGATAGCGGGGTGCGGAACAAACA CGTACGCTGCAGGTGACGG
Primer Reverse módulo de recombinación	GAACCTGGTGCCAAATACACCAACAGCAGCACTAATCTAGCGAAAAGCAT CATAGGCCACTAGTGGATCTG

Nota. En la tabla se presentan los oligos diseñados para la amplificación del módulo recombinantes a partir del plásmido pCM325. Elaboración propia.

Figura 6.1
Producción de módulo recombinante a partir de plásmido pCM325.



Nota. En la figura se presenta la región del plásmido pCM325 que será amplificada utilizando los oligos de la tabla 6.1, el producto de amplificación contiene el promotor TetO7 y el gen de resistencia a Geneticina con su respectivo promotor y terminador. Elaboración propia.

Figura 6.2*Amplificación del módulo recombinante*

Nota. En la figura se presenta el gel de electroforesis de la amplificación del módulo recombinante para la sustitución del promotor de *FRE5*. Se utilizó la escalera molecular de 1 kb de Jena Bioscience (México). Elaboración propia.

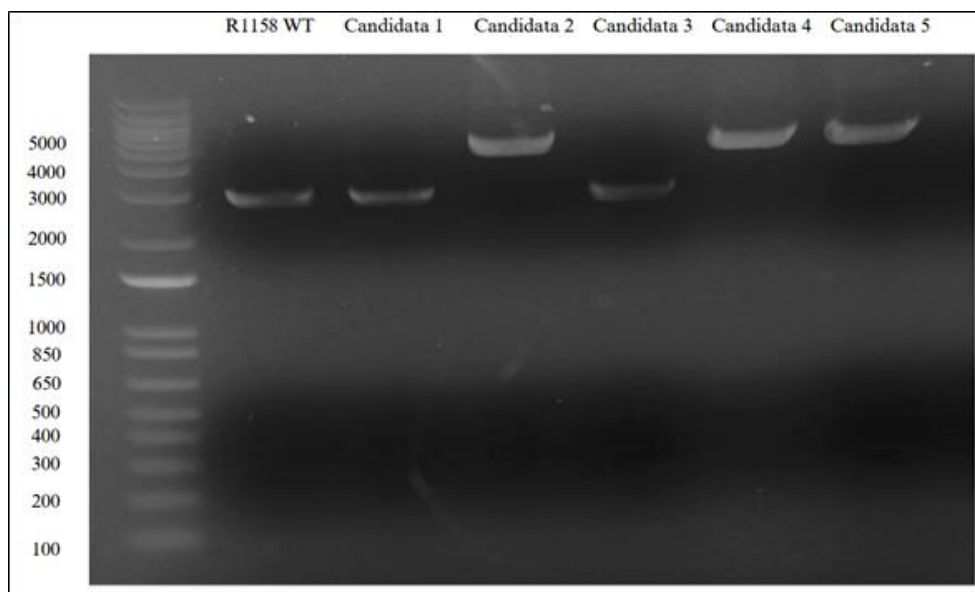
En la (Figura 6.2) se observa la producción del módulo recombinante a partir del plásmido pCM325, el producto *FRE5* corresponde a la reacción esquematizada en la figura 6.1, se observa que la implementación de los oligos diseñados es efectiva para producción del módulo recombinante. Para el diseño de las secuencias de recombinación que permitirán la integración del módulo que contiene el módulo de resistencia al antibiótico G418 y al promotor TetO7; en el genoma de *S. cerevisiae*, sobre el promotor endógeno del gen *FRE5* del cromosoma XV. Se emplearon secuencias de recombinación que consisten en 50 pares de bases de la secuencia codificante del gen *FRE5* y 50 pares de bases de la región no codificante (UTR 5') del gen *FRE5*. Para que el módulo de recombinación tenga la capacidad de integrarse al genoma en el sitio objetivo, las secuencias de recombinación deben encontrarse en los extremos del módulo, en la figura 5.3 se presenta un diagrama donde se describe la integración del módulo recombinante en el sitio de interés. Para esto se unieron las secuencias que anidan en el plásmido pCM325 con las secuencias que anidan en el promotor endógeno del gen *FRE5* del cromosoma XV. Estos oligos se presentan en la (Tabla 6.2) y se nombran como: Fw Ptet-*FRE5* y Rv Ptet-*FRE5*.

Cuando se realizan modificaciones a nivel genómico de algún organismo, se debe corroborar mediante PCR que la integración del módulo se dio de forma apropiada y en el sitio de interés. Para esto se deben diseñar oligos que flanqueen todo el constructo que se modificó y oligos que únicamente puedan anidar si el módulo de integró en la orientación deseada. Se diseñaron oligos que anidan en la región UTR 5', UTR 3' y sobre la intersección entre el módulo de recombinación y la región codificante del gen *FRE5*. Todos los oligos diseñados fueron analizados utilizando el *Software Oligo- Analyzer* (Owczarzt *et. al.*, 2008), se evaluó el potencial de formación de estructuras secundarias, se determinó la temperatura de anillamiento y %GC; los oligos de confirmación se presentan la tabla 6.2 y se nombran como: Fw UTR 5' *FRE5*, Rv UTR 3' *FRE5*, Fw OPtet-*FRE5* y Rv OPtet-*FRE5*. En la (Figura 6.3) se observa la amplificación de la región codificante del gen *FRE5* y su respectivo promotor, para las cepas mutantes se espera una banda con una longitud de 4806 pares de bases mientras que en la cepa silvestre se espera una banda con una longitud de 2804 pares de bases. Se observa que los oligos diseñados fueron efectivos para la amplificación de la región de interés.

Tabla 6.2*Oligonucleótidos usados para realizar el cambio de promotor del gen FRE5.*

Nombre	Secuencia	Tm °C	%GC
Fw P _{TetO7} ⁻ FRE5	TTCCTTCACATACATCAAAAAATATGGGATAGCGGGGTGCGGAACAAACA CGTACGCTGCAGGTCGACGG	87.7	50
Rv P _{TetO7} ⁻ FRE5	GAACCTGGTGCCAAATACACCAACAGCAGCACTAATCTAGCGAAAAGCAT CATAGGCCACTAGTGGATCTG	87.0	48
Fw UTR 5' FRE5	CAGATAGAACCAAAGCGGAAG	59.5	48
Rv UTR 3' FRE5	TAACAGTAAGGGTGAGGTGT	56.4	45
Fw OP _{TetO7} ⁻ FRE5	GTGGCCTATGATGCTTTTCG	58.4	50
Rv OP _{TetO7} ⁻ FRE5	CGAAAAGCATCATAGGCCAC	58.4	50

Nota. Elaboración propia

Figura 6.3*PCR para la confirmación de la integración del módulo recombinante en las colonias candidatas.*

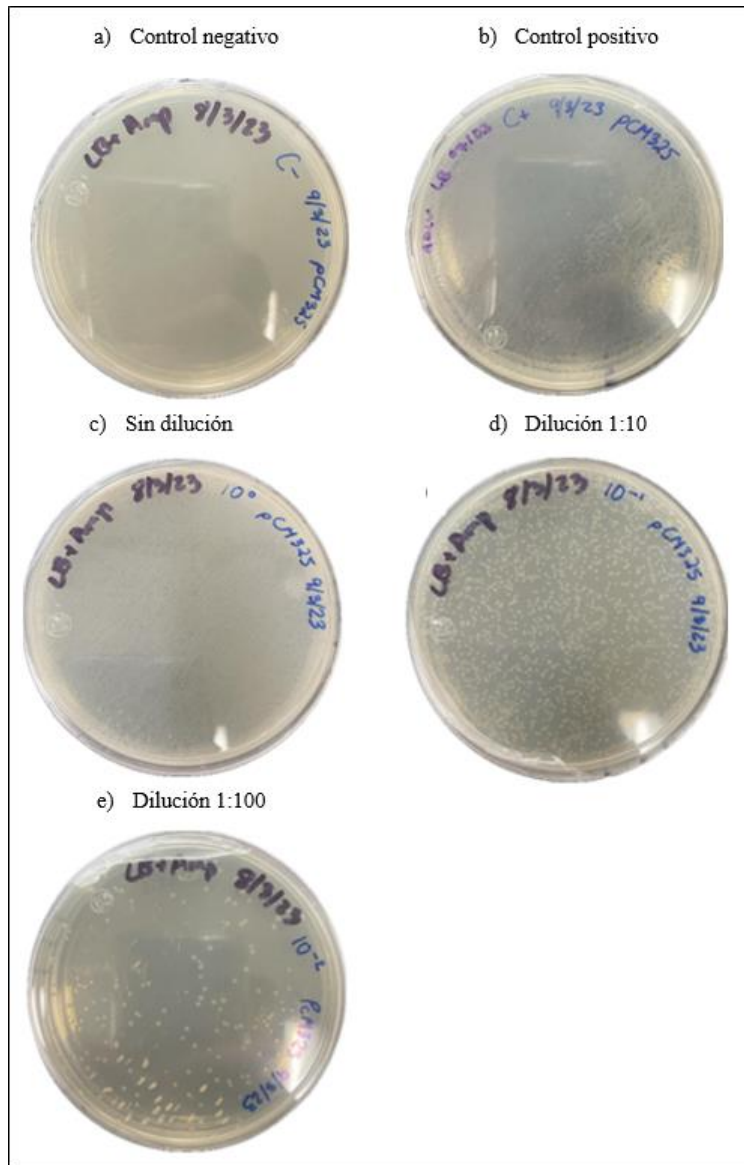
Nota. En la figura se presenta el gel de electroforesis de ADN de la reacción de PCR realizada para confirmar la integración del módulo recombinante. Para las cepas mutantes se espera una banda de 4806 pares de bases, mientras que para cepas silvestres se espera una banda de 2804 pares de bases. Elaboración propia.

6.2. Producción y purificación del plásmido pCM325

Con el propósito de producir plásmido pCM325 para obtener un stock de trabajo del plásmido, se realizó la transformación por choque térmico de las bacterias calcicompetentes *E. coli* DH5 α , utilizando 500 ng del plásmido pCM325. En la (Figura 6.4) se puede observar los resultados de la transformación.

Figura 6.4

Transformación de *E. coli* con plásmido pCM325.

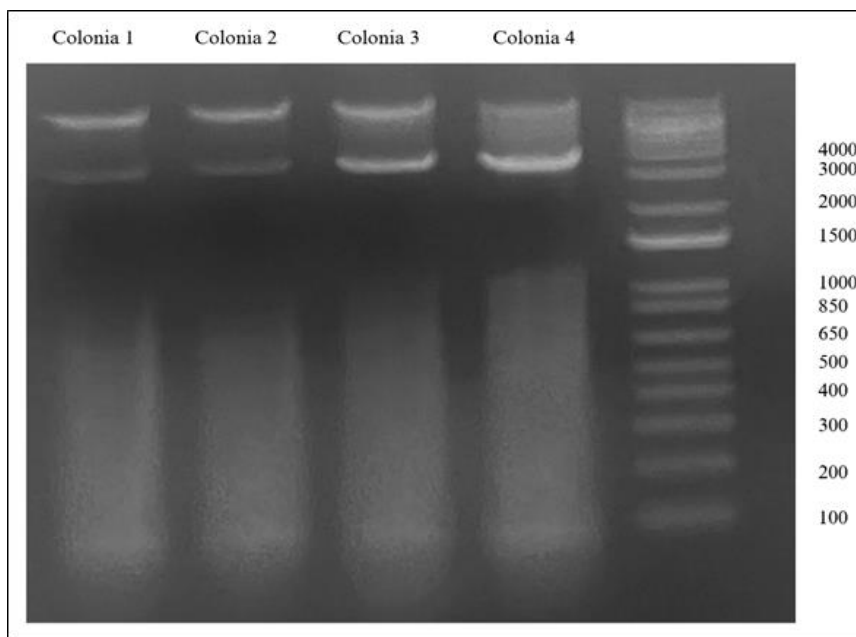


Nota. En el inciso a) se puede observar el control negativo de la transformación, este consistió en la inoculación de las bacterias calcicompetentes *E. coli* DH5 α sin el plásmido pCM325 en una placa con medio LB con ampicilina, no se observó crecimiento en la placa comprobando así que nativamente las bacterias *E. coli* DH5 α no tienen resistencia al antibiótico ampicilina. En b) se puede observar el control de viabilidad, se plaqueó bacterias *E. coli* DH5 α en placa con medio LB sin ampicilina y se observa que hay un crecimiento normal. En los incisos c – e, se observa el crecimiento de las bacterias *E. coli* DH5 α , en diluciones 1:10 y 1:100, transformadas con el plásmido pCM325 en placas con medio LB con ampicilina. Elaboración propia.

El crecimiento en placas suministradas con el antibiótico indica que la transformación fue exitosa. A partir de la placa inoculada con la dilución 1:100 de las bacterias transformadas, se realizó un re-cultivo de las colonias aisladas para purificar las cepas transformantes. A partir de cuatro colonias aisladas del re-cultivo de las bacterias transformadas con el plásmido pCM325, se realizó la purificación del plásmido utilizando un kit de *MiniPrep* basado en columnas de purificación de plásmidos y se utilizó un cultivo líquido de cada colonia transformante. La comprobación del plásmido purificado se realizó utilizando la enzima de restricción *Sall*, esta enzima de restricción tiene un sitio único de corte en todo el plásmido, lo que genera la linealización del plásmido. Este proceso fue realizado con el propósito de comprobar la identidad del plásmido purificado por el peso de la banda en una electroforesis de ADN.

Figura 6.5

Linealización del plásmido pCM325 con la enzima de restricción Sall

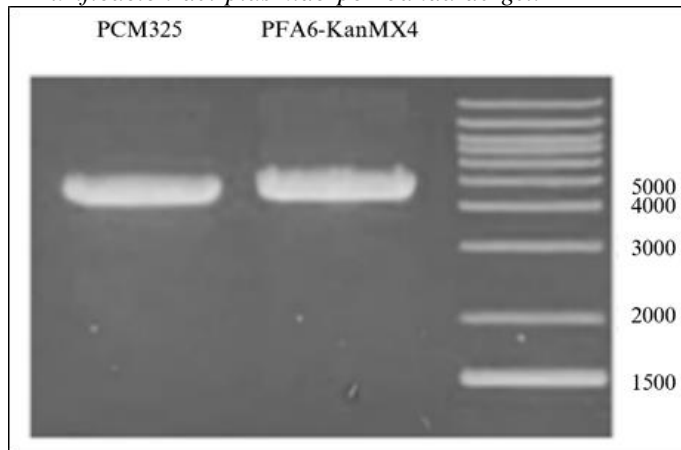


Nota. Elaboración propia.

En la (Figura 6.5) se presenta la visualización del producto digerido por medio de una electroforesis de ADN. En el último carril se visualiza la escalera molecular de 1kb de Jena Bioscience (México). En los 4 carriles restantes se visualiza el producto digerido de las cuatro colonias aisladas de la transformación de *E. coli* con el plásmido pCM325. En estos carriles se pueden observar dos bandas bien definidas, una banda superior y otra banda inferior que se encuentra entre los 4000 y 5000 pares de bases. La banda inferior corresponde al plásmido pCM325 linealizado, el cual se compone por 4641 pares de bases. Mientras que la banda superior corresponde al remanente del plásmido no linealizado que se encuentra en su conformación de superenrollamiento. Esta electroforesis de ADN permitió comprobar que el plásmido pCM325 fue purificado a partir de las colonias transformadas.

Con el propósito de preparar un stock de trabajo del plásmido pCM325 linealizado, se purificó la banda inferior del gel utilizando una escisión del gel delimitando la banda con peso de 4661 pares de bases. De esta forma se logró obtener una solución únicamente con el plásmido linealizado, en contraste con el obtenido a partir de las colonias, que también contiene remanentes de plásmido no linealizado. Este proceso se realiza para facilitar las reacciones de PCR que se deben realizar sobre el plásmido, ya que la eficiencia de la reacción disminuye de forma significativa cuando el plásmido se encuentra en forma circular. Esto se debe a que cuando el plásmido se encuentra en su conformación de enrollamiento parcial o superenrollamiento, los oligos no pueden anidar y la polimerasa no puede sintetizar el fragmento de ADN; impidiendo así la reacción.

Figura 6.6
Purificación del plásmido por banda de gel.



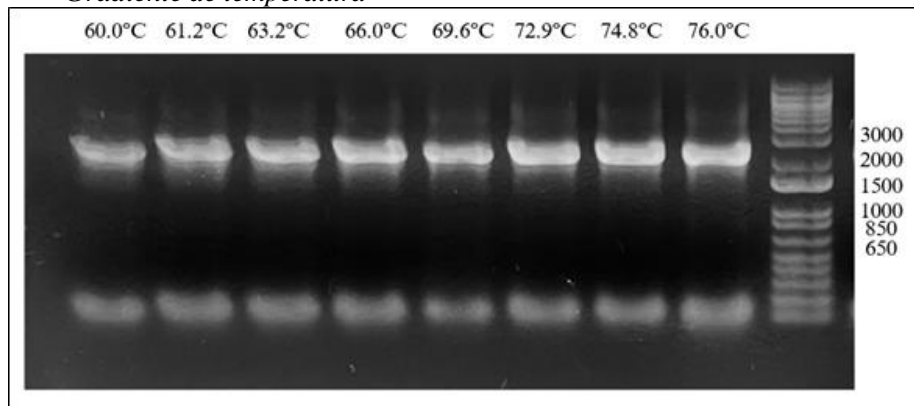
Nota. Se utilizó el producto de la purificación del plásmido por banda de gel. En el último carril se visualiza la escalera molecular de 1kb de Jena Bioscience (México). Elaboración propia.

En la (Figura 6.6) En el carril pCM325, se visualiza el producto de la purificación realizada, se observa que en este caso ya no hay una banda de muy alto peso molecular que correspondía al plásmido superenrollado. Esto nos indica que la solución de trabajo obtenida se compone únicamente del plásmido pCM325 linealizado. El carril pFA6-KanMX4 es un control, se cargó un plásmido previamente linealizado y comprobado en el laboratorio de la Doctora Alicia González.

6.3. Amplificación y purificación del módulo recombinante

Utilizando el plásmido pCM325 linealizado como molde, se optimizó la producción del módulo de recombinación que contiene el gen de resistencia al antibiótico G418 (Geneticina) y el promotor fuerte TetO7. Para optimizar las condiciones para la producción del módulo, se realizó un gradiente de temperatura de 8 pasos entre 60.0 °C – 76.0°C, se utilizaron cambios de temperatura de 0.5 °C para abarcar todo el rango de temperatura. Para la elongación se utilizó la temperatura estándar y 3 minutos de duración dado que el producto de la reacción es de 2332 pb. En la figura 6.7 se observa el gel de electroforesis de ADN donde se visualizan las bandas correspondientes al módulo de recombinación de 2332 pares de bases. Se determinó que la temperatura óptima para la producción del módulo es de 63.2 °C ya que es la temperatura a la que mayor concentración de ADN fue detectada por el equipo *NanoDrop*.

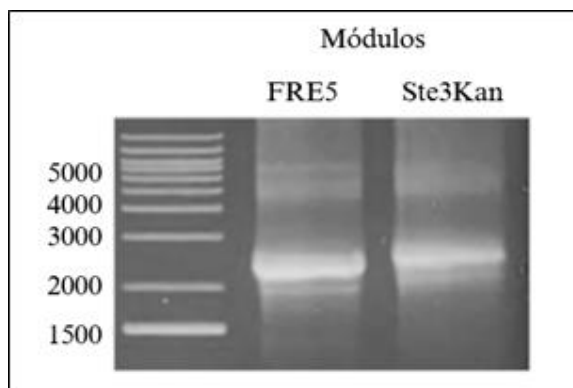
Figura 6.7
Gradiente de temperatura



Nota. En la figura se presentan los productos de PCR obtenidos en las diferentes temperaturas de alineamiento utilizadas en el gradiente. Elaboración propia.

Utilizando las condiciones de PCR optimizadas se realizó la producción final del módulo de recombinación. Nuevamente, se utilizó las muestras linealizadas del plásmido pCM325 purificado como molde para las reacciones de PCR.

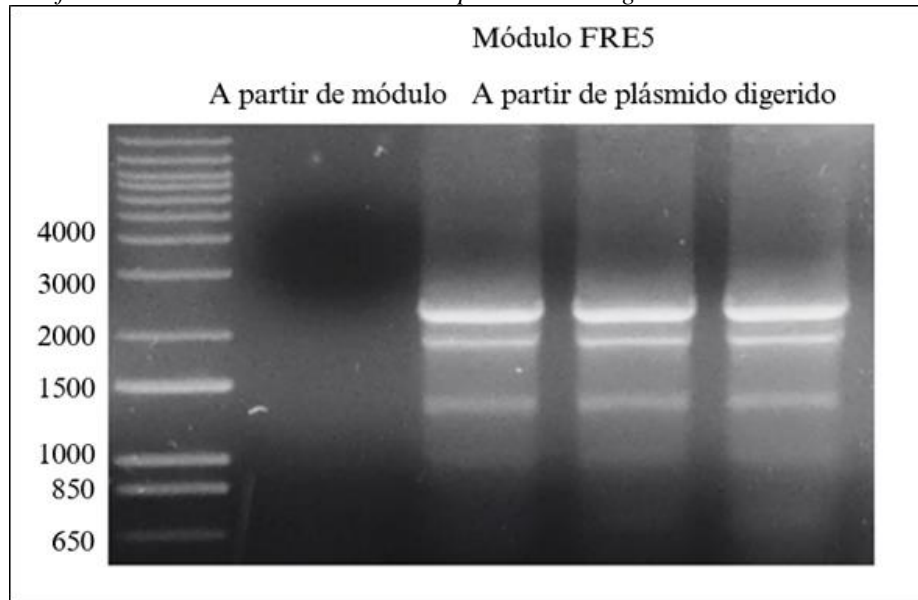
Figura 6.8
Producción del módulo recombinante con los parámetros optimizados



Nota. Elaboración propia.

En la (Figura 6.8) se presenta el gel de electroforesis de ADN donde se visualiza el producto final de la producción del módulo de recombinación. En el carril MP se observa la escalera molecular 1Kb de Jenna Bioscience (México), en el carril *FRE5* se observa el módulo de recombinación con un peso de 2332 pares de bases y en el carril *Ste3Kan* se visualiza un control que corresponde a un producto de PCR previamente obtenido en el laboratorio de la Doctora Alicia González. Se determinó que la producción del módulo de recombinación fue exitosa ya que se generó más de 1000 ng/uL de módulo en una reacción de PCR. A pesar de que la producción del módulo fue alta, se observa la presencia de productos no deseados en el gel. En el carril *FRE5* debajo de la banda principal se observa una banda secundaria de menor tamaño; Además, se observan dos bandas de alto peso molecular en el gel. Considerando la presencia de productos secundarios que potencialmente pueden interferir en el proceso de recombinación al genoma de *S. cerevisiae*, se decidió purificar por banda de gel el módulo de recombinación.

Figura 6.9
Purificación del módulo recombinante por banda de gel

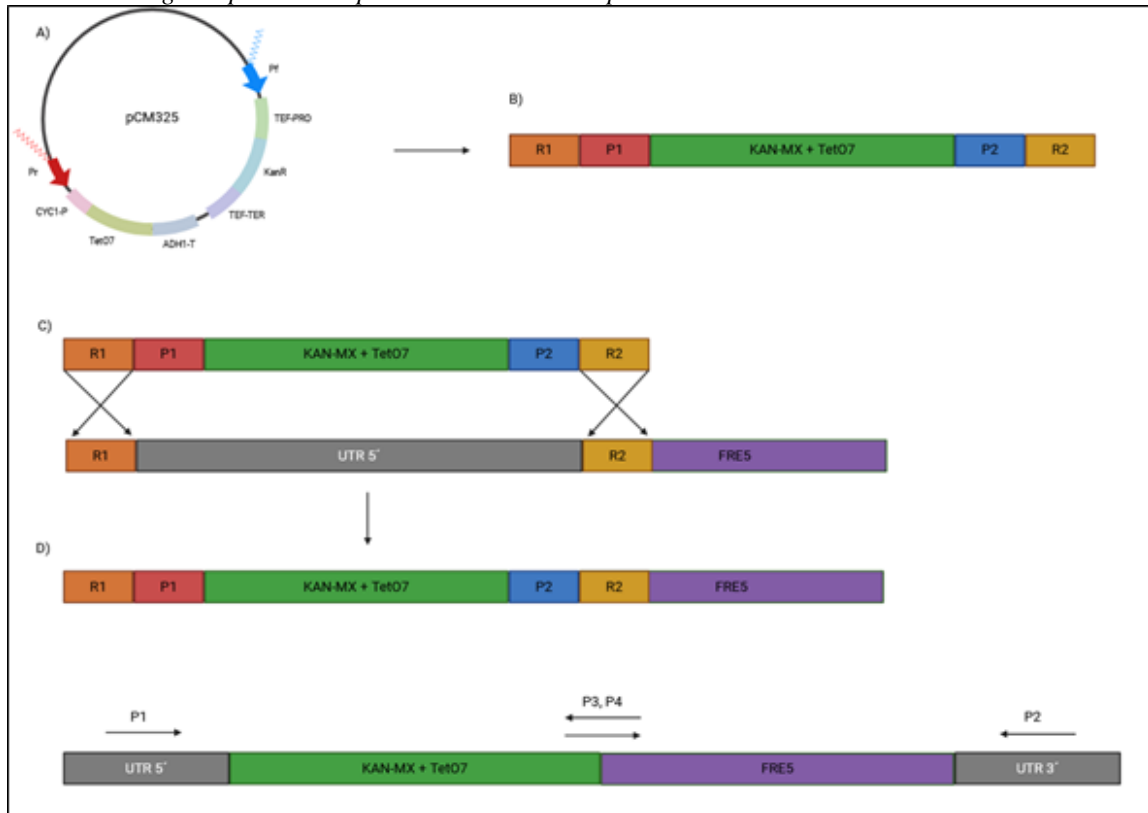


Nota. Elaboración propia.

Se repitió la producción del módulo de recombinación utilizando los parámetros optimizados para la reacción de PCR. En la (Figura 6.9) se presenta el gel que fue utilizado para la purificación del módulo recombinante por banda de gel. En el carril MP se observa la escalera molecular de 1 kb de Jenna Bioscience (México), en el segundo carril se presenta la producción del módulo utilizando el módulo de recombinación previamente producido como molde y en los últimos 3 carriles se observa el producto de PCR para la producción del módulo utilizando como molde el plásmido digerido. Dado que en este gel se observa una clara separación de la banda principal y las bandas de los productos secundarios, fue posible cortar la sección de interés del gel y realizar la purificación final del módulo.

6.4. Transformación de la cepa silvestre R1158 de *S. cerevisiae*

Utilizando el módulo recombinante, se realizó la transformación de *S. cerevisiae* R1158 con acetato de litio. Se utilizó placas con medio YPD y geneticina para seleccionar a las levaduras transformantes ya que el módulo recombinante confiere resistencia al antibiótico. En la figura 6.10 se muestra la recombinación homóloga realizada en el proceso de transformación por acetato de litio, el esquema refleja la integración del módulo recombinante con el promotor TetO7 y cassette de resistencia a Geneticina; sobre el promotor endógeno del gen *FRE5*.

Figura 6.10*Estrategia experimental para la sustitución de promotores.*

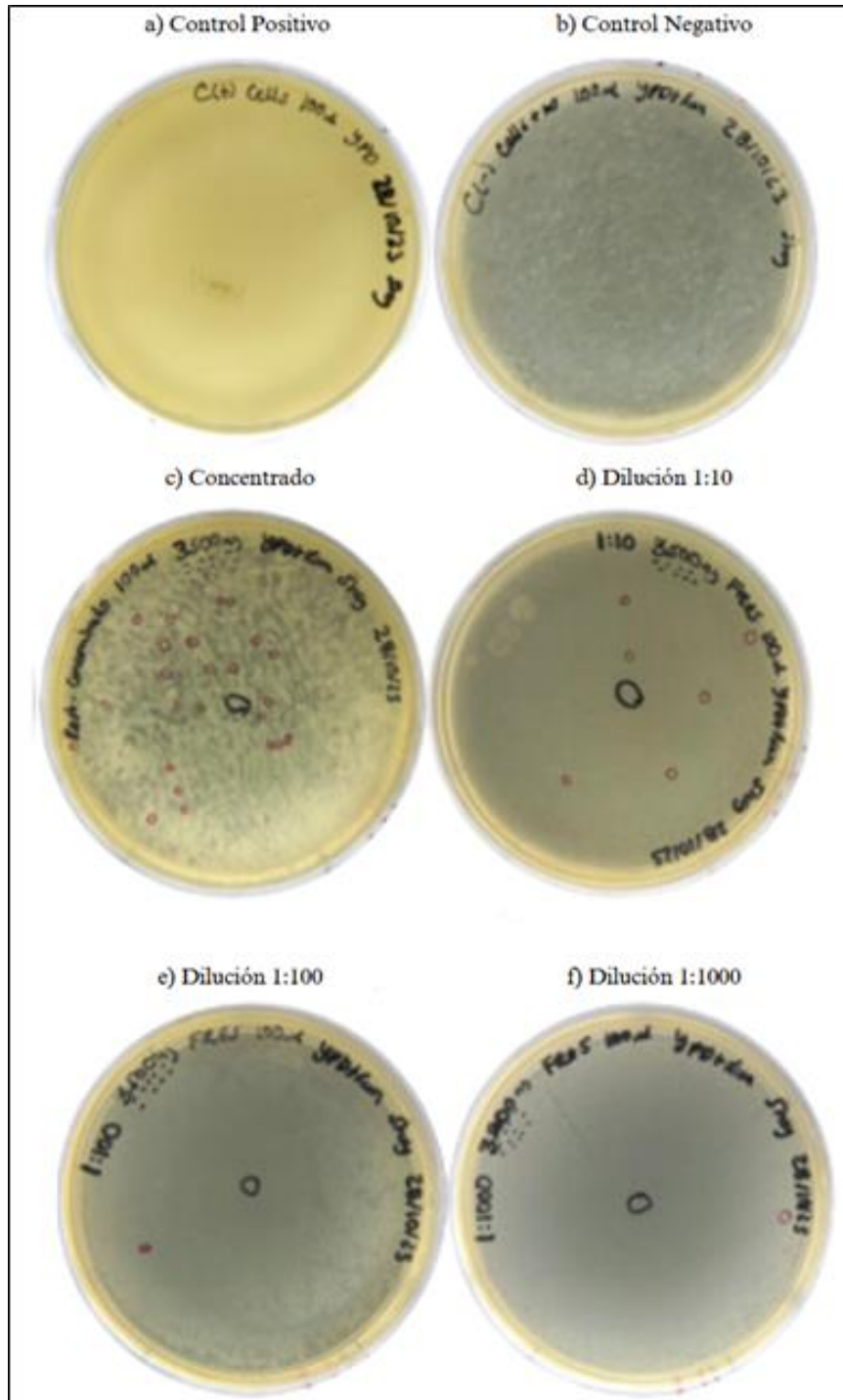
Nota. A) Se observa el plásmido pCM325, el oligo Pf que corresponde a Fw Ptet-FRES y el Pr corresponde a Rv Ptet-FRES, la secuencia de estos se presenta en la tabla 5.5. B) Representación gráfica del módulo de recombinación producto de la reacción de PCR representada en el inciso A).

C) Diagrama de los sitios de recombinación homóloga entre el genoma de *S. cerevisiae* y el módulo de recombinación. D) Integración del módulo de recombinación al genoma de *S. cerevisiae*. Elaboración propia

En las (Figuras 6.11 y 6.12) se presentan los resultados de la transformación de la cepa R1158 de *S. cerevisiae*. En la primera fila se observan los controles de la transformación, la placa con medio YPD se utilizó como control positivo (viabilidad) y se observa un abundante crecimiento debido a la ausencia del antibiótico kanamicina. Mientras que la placa con medio YPD y Kanamicina fue el control negativo, no se observa el crecimiento de la cepa R1158 sin el módulo recombinante. La transformación se realizó variando la cantidad de ADN recombinante utilizado, se realizó un tratamiento con 3,500 ng de ADN y otro con 5000 ng de ADN. Para cada tratamiento se inoculó en placas con medio YPD + Kanamicina, un concentrado de células transformantes y las diluciones: 1:10, 1:100 y 1:1000. Para ambas transformaciones se observó el crecimiento de colonias aisladas en las tres diluciones trabajadas, estas colonias son candidatas de una transformación exitosa.

Figura 6.11

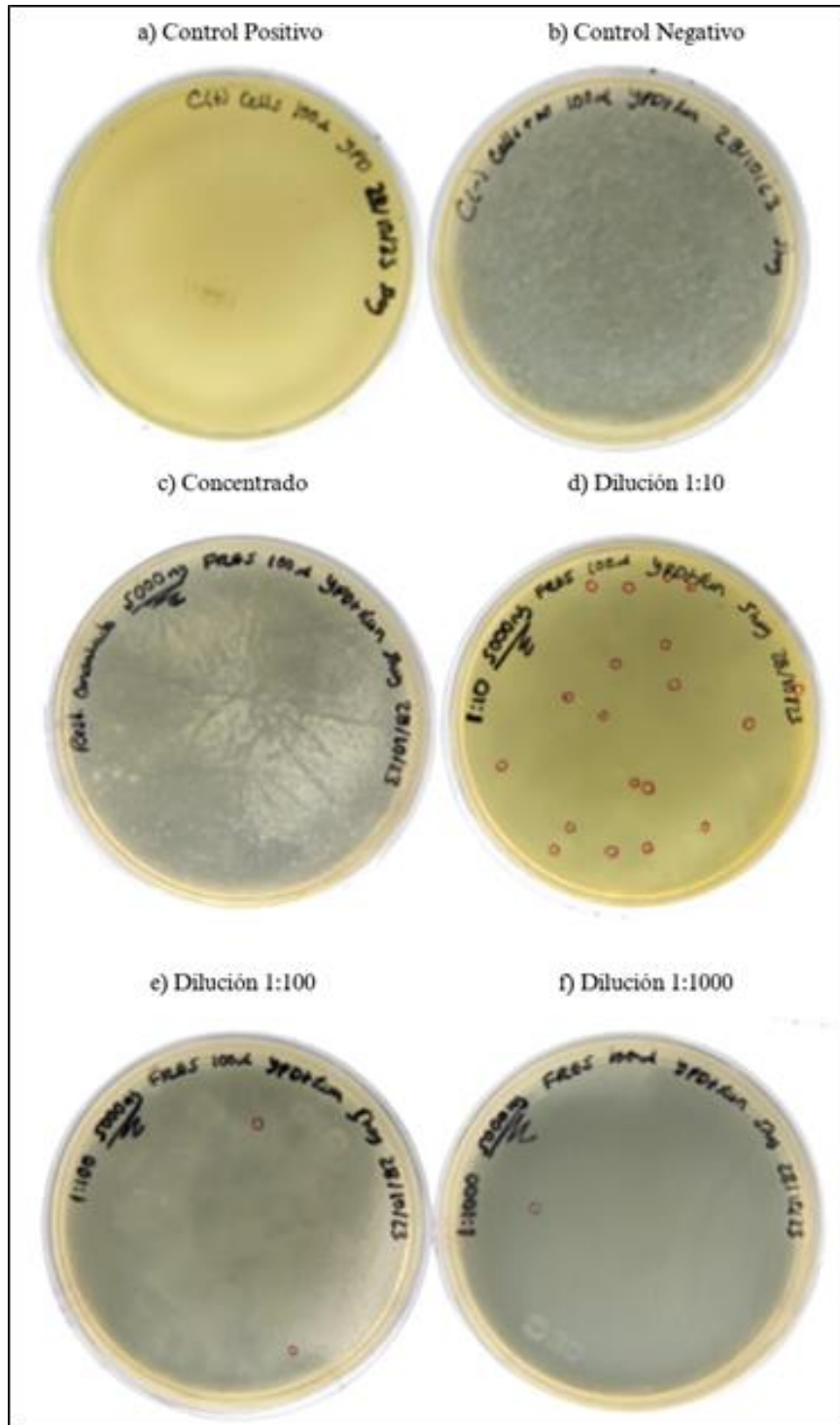
Resultados transformación de *S. cerevisiae* con 3500 ng de módulo recombinante para obtener la mutante R1158 TetO7-FRE5.



Nota. a) Control positivo de la cepa R1158 en medio LB sin ampicilina. b) Control negativo de crecimiento de la cepa R1158 en medio LB con ampicilina. c) Inóculo sin dilución de la cepa transformada en medio LB con ampicilina. d) Inóculo con dilución 1:10 de la cepa transformada en medio LB con ampicilina. e) Inóculo con dilución 1:100 de la cepa transformada en medio LB con ampicilina. f) Inóculo con dilución 1:1000 de la cepa transformada en medio LB con ampicilina. Elaboración propia.

Figura 6.12

Resultados transformación de *S. cerevisiae* con 5000 ng de módulo recombinante para obtener la mutante R1158 TetO7-FRE5.

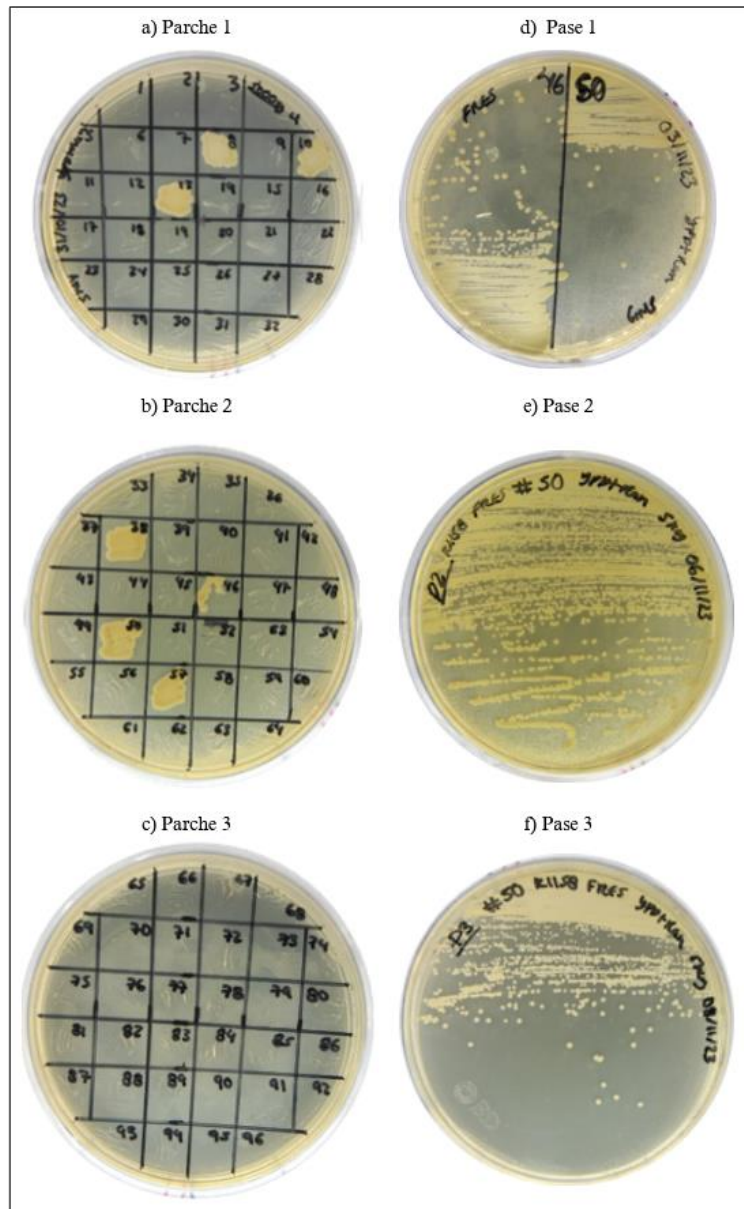


Nota. a) Control positivo de la cepa R1158 en medio LB sin ampicilina. b) Control negativo de crecimiento de la cepa R1158 en medio LB con ampicilina. c) Inóculo sin dilución de la cepa transformada en medio LB con ampicilina. d) Inóculo con dilución 1:10 de la cepa transformada en medio LB con ampicilina. e) Inóculo con dilución 1:100 de la cepa transformada en medio LB con ampicilina. f) Inóculo con dilución 1:1000 de la cepa transformada en medio LB con ampicilina. Elaboración propia.

Con el objetivo de purificar las colonias transformantes, se elaboraron tres parches donde se inoculó en cada cuadrante una colonia aislada. Los cuadrantes que presentaron crecimiento en el parche fueron re-cultivados en placas con medio YPD + kanamicina. Tras 3 pases (re-cultivos) se determinó que la colonia del cuadrante 50 del segundo parche es la mejor candidata. En la (Figura 6.13) se observan los parches y los re-cultivos realizados con las colonias candidatas de la transformación con acetato de litio. Se puede observar que del parche 1 los cuadrantes: 8, 10 y 13; presentan crecimiento. Mientras que del parche 2 los cuadrantes: 38, 46, 50 y 57; presentan crecimiento. En el parche 3 no se observó crecimiento en ningún cuadrante. Además, se observa el re-cultivo de las colonias de los cuadrantes 46 y 50 del parche 2 y los 2 pases adicionales de la colonia 50.

Figura 6.13

Selección de colonias transformantes por resistencia a Geneticina (G418).

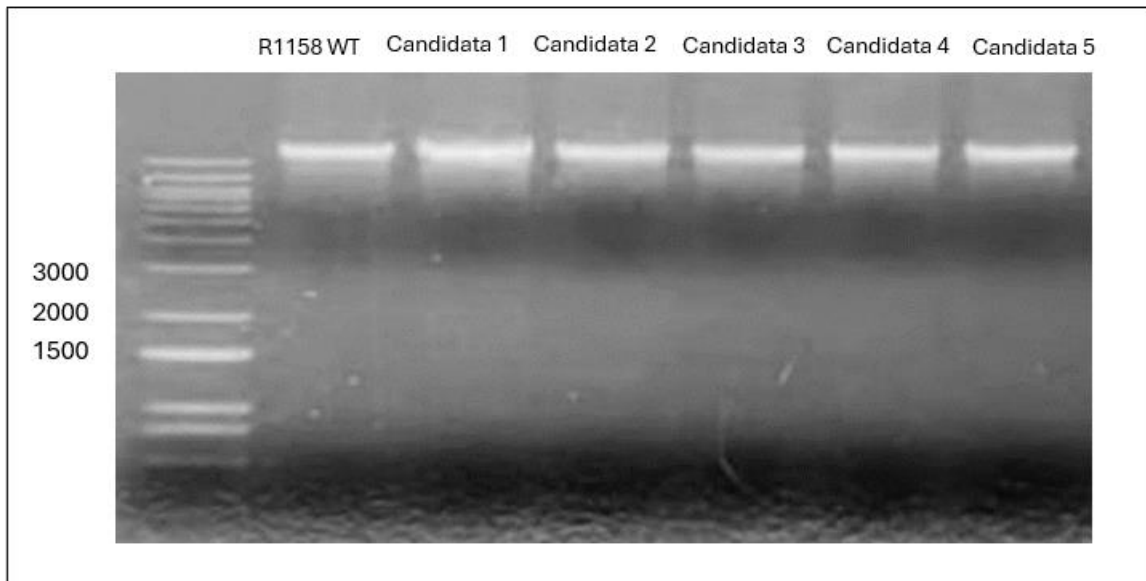


Nota. a - c) Se presentan los parches elaborados con las colonias aisladas obtenidas de la transformación de *S. cerevisiae* con 3500 ng y 5000 ng de módulo recombinante. d - f) Se presentan los 3 pases realizados para la purificación de la colonia candidata 50. Elaboración propia.

Con el objetivo de comprobar genéticamente la integración del módulo recombinante en el sitio de interés y en la dirección deseada, se realizó la extracción de ADN genómico de 5 colonias candidatas y de la cepa silvestre R1158, para esto se realizó un proceso de extracción de ADN basado en lisis mecánica y química. En la figura 6.14 se presenta el gel de electroforesis de ADN, en el primer carril se visualiza la escalera molecular de 1Kb de Jenna Bioscience (México). En los demás carriles se observa una banda de alto peso molecular definida y sin degradación, esto indica que la extracción de ADN fue exitosa y cada extracto se encuentra íntegro.

Figura 6.14

Extracción de ADN total colonias candidatas.



Nota. Elaboración propia

Los extractos de ADN genómico de las colonias candidatas y de la cepa silvestre R1158 fueron utilizados para las reacciones de PCR de confirmación de la integración del módulo y la confirmación de la orientación del constructo. En la figura 6.15 se muestran los sitios de amplificación de la reacción de PCR para la confirmación de la integración del módulo recombinante sobre el promotor endógeno de *FRE5*.

Figura 6.15:

Sitios de amplificación PCR de confirmación.

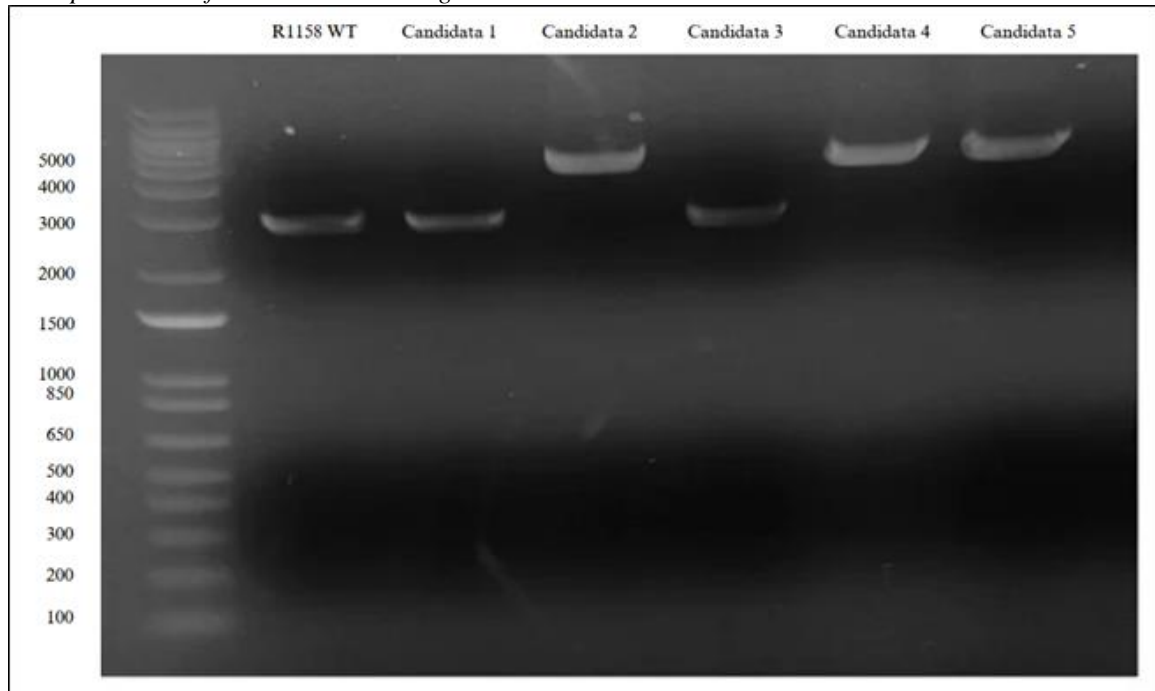


Nota. P1 y P2, representan el oligo en la posición donde alineara al momento de comprobar la cepa sobre expresada. Los oligos utilizados en esta reacción se presentan en la tabla 5.5; P1 corresponde a Fw UTR 5' *FRE5* y P2 a Rv UTR 3' *FRE5*. Elaboración propia.

En la (Figura 6.16 se puede observar los productos de la reacción de PCR en la que se utilizaron los oligos Fw UTR 5' *FRE5* y Rv UTR 3' *FRE5* (P1 y P2 de la Figura 6.15). En esta reacción se flanquea la secuencia del promotor y la región codificante del gen *FRE5*, para las cepas mutantes se espera una banda con una longitud de 4806 pares de bases mientras que en la cepa silvestre se espera una banda con una longitud de 2804 pares de bases.

Figura 6.16

PCR para la confirmación de la integración del módulo recombinante en las colonias candidatas.



Nota. Elaboración propia.

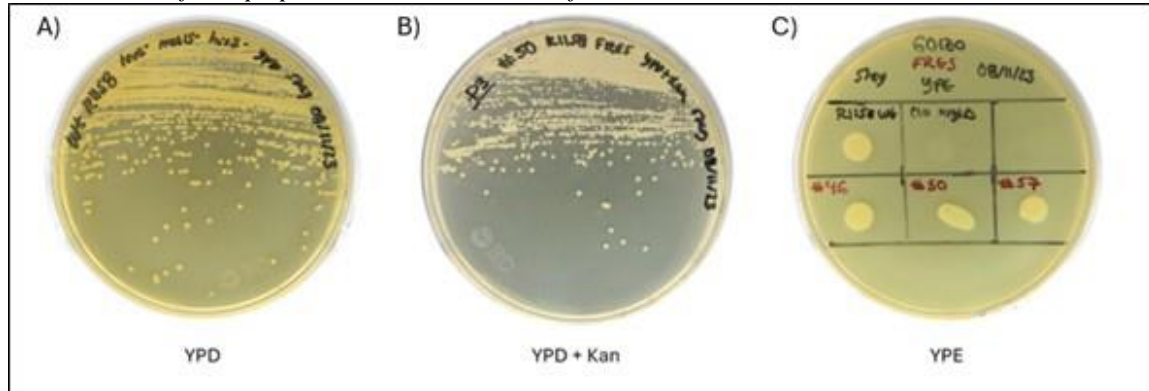
En el carril R1158 WT se observa una banda de 2804 pares de bases, confirmando la longitud del producto de PCR esperado en una cepa donde el constructo no se integró. En los carriles de las candidatas 1 y 3, se observa una banda de 2804 pares de bases indicando que el constructo no se integró en la posición deseada. Mientras que los carriles de las candidatas 2, 4 y 5; se observa una banda de 4806 pares de bases, la cual corresponde a la secuencia codificante del gen *FRE5* y al constructo de 2332 pares de bases.

6.5. Evaluación del fenotipo petite en la cepa mutante *TetO7-FRE5*

Con el objetivo de determinar si la cepa mutante presenta un fenotipo petite, se evaluó su capacidad de crecimiento en medio donde la única fuente de carbono era etanol (YPE). Para esto se utilizó como control la cepa silvestre R1158 de *S. cerevisiae*, la cepa *nrg1* Δ de *S. cerevisiae* y la cepa mutante R1158 *TetO7-FRE5*. Se inocularon las cepas por goteo en las placas con medio YPE y estas fueron incubadas por 48 horas a 37 °C, tras la incubación se comprobó el crecimiento de la cepa mutante comparándola con el crecimiento de la cepa silvestre. En la (Figura 6.17) se presentan los resultados cualitativos de la evaluación del crecimiento de la cepa mutante en medio con etanol. En el inciso A) se observa el crecimiento normal de la cepa silvestre R1158 en medio YPD, y en el inciso B) se observa el crecimiento normal de la cepa mutante R1158 *TetO7-FRE5* en medio YPD y kanamicina y en el inciso C) se presenta el crecimiento de las colonias en medio YPE. El control positivo del experimento fue la cepa silvestre R1158 la cual tiene un crecimiento normal en medio YPE, el control negativo fue la mutante CLA *nrg1* Δ la cual no crece en medio YPE y las muestras experimentales fueron colonias aisladas de la cepa mutante R1158 *TetO7-FRE5*. Se observó crecimiento en todos los goteos de la cepa mutante, lo que sugiere que esta cepa no pierde su capacidad de llevar a cabo respiración celular como consecuencia de la sobreexpresión del gen *FRE5*.

Figura 6.17

Evaluación del fenotipo petite en las mutantes confirmadas.

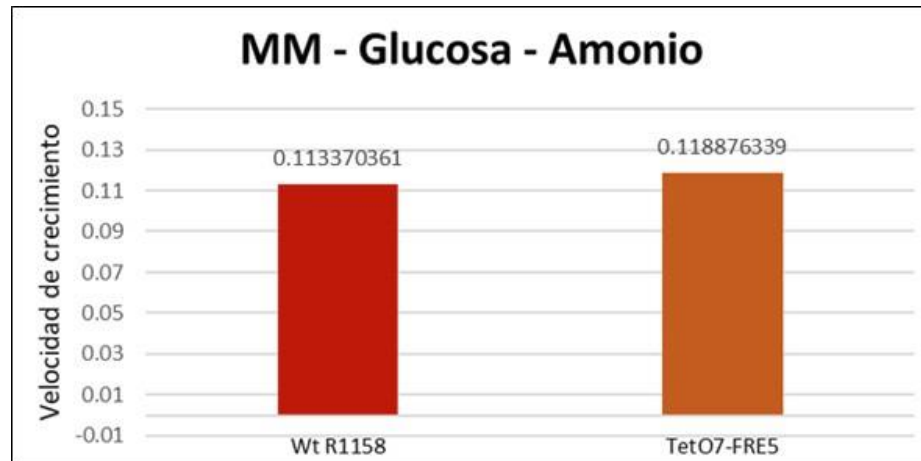


Nota. A) Se presenta el control de crecimiento de la cepa silvestre R1158 en medio YPD. B) Se presenta el crecimiento de la cepa mutante R1158 TetO7-FRE5 en medio YPD con Geneticina. C) Evaluación del crecimiento de colonias aisladas de la cepa mutante R1158 TetO7-FRE5. Se utilizó como control positivo la cepa silvestre R1158 de *S. cerevisiae* que presenta un crecimiento normal con etanol como fuente de carbono. Como control negativo de crecimiento se utilizó la cepa Cla nrg1Δ. Elaboración propia.

Seguidamente, se evaluó cuantitativamente el fenotipo mediante la determinación de la cinética de crecimiento de la cepa silvestre R1158 de *S. cerevisiae* y la cepa mutante R1158_{TetO7-FRE5}. En la figura 6.18 se puede observar el cálculo de la velocidad de crecimiento promedio de las cepas estudiadas en medio mínimo con glucosa y amonio. Se determinó que la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre R1158 es de 0.11337 y de la cepa mutante R1158_{TetO7-FRE5} es de 0.11887, lo que sugiere que la sobreexpresión del gen *FRE5* no afecta la cinética de crecimiento en medio con glucosa como fuente de carbono.

Figura 6.17

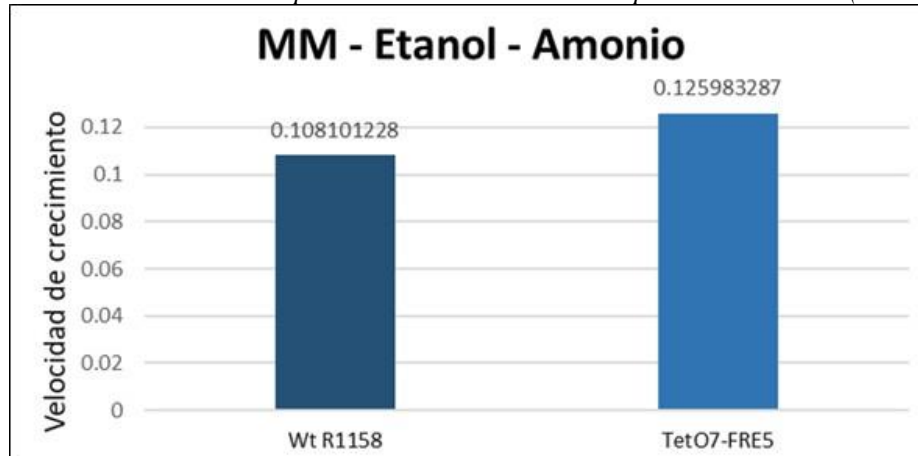
Velocidad de crecimiento de la cepa mutante TetO7-FRE5 vs cepa silvestre R1158 (Medios con glucosa).



Nota. El mismo experimento fue realizado con las cepas en medio mínimo con etanol y amonio. Se determinó que la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre es de 0.10810 y de la cepa mutante R1158_{TetO7-FRE5} es de 0.12598, lo que sugiere que la expresión del gen *FRE5* tampoco afecta el crecimiento en medio con etanol como fuente de carbono (Figura 6.19). Elaboración propia.

Figura 6.17

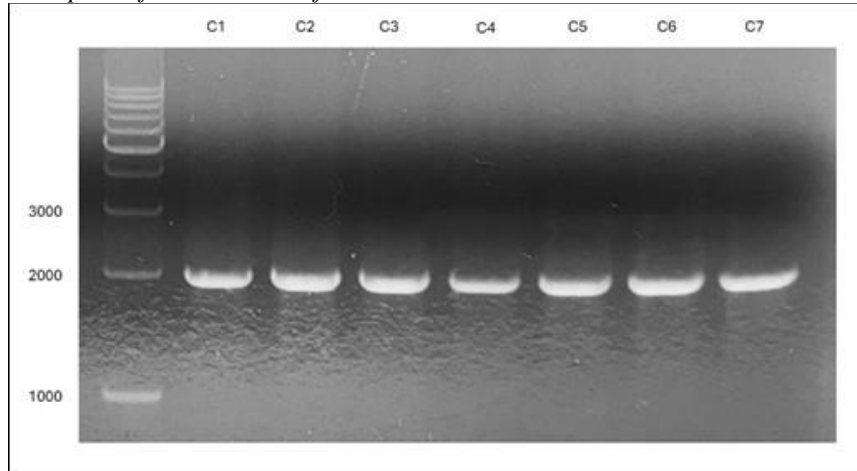
Velocidad de crecimiento de la cepa mutante *TetO7-FRE5* vs cepa silvestre *R1158* (Medios con etanol).



Nota. Elaboración propia.

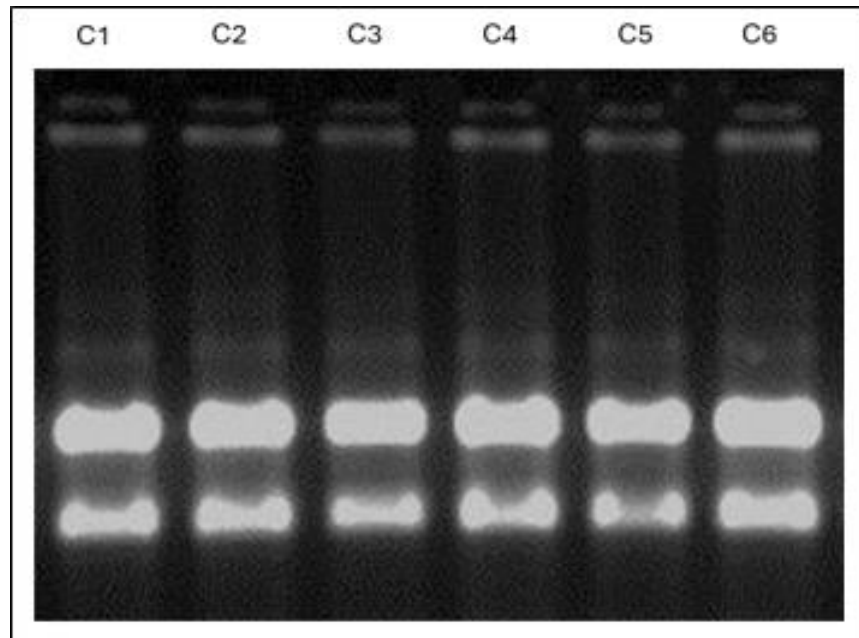
6.6. Evaluación del fenotipo petite en la cepa mutante *TetO7-FRE5*.

Con el objetivo de comprobar que la integración del módulo recombinante genera la sobreexpresión del gen *FRE5*, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se realizó la extracción total de ARN la cepa silvestre *R1158* y de la cepa mutante *Tet-FRE5*, la integridad de la extracción se evaluó mediante electroforesis de ADN del producto de PCR de la secuencia codificante del gen *FRE5*, utilizando el ADNc generado a partir del ARN como molde. En la (Figura 6.20) se observan los productos de PCR del gen *FRE5*, en el primer carril se visualiza la escalera molecular de 1 kb de Jenna Bioscience (México), en el carril C2 se observa una banda correspondiente a la codificante de *FRE5* a partir de un extracto total de ADN de la cepa silvestre *R1158*, en el carril C3 se observa una banda correspondiente a la codificante de *FRE5* a partir del ADNc de la cepa silvestre *R1158*, en los carriles C4 – C7 se observa la banda correspondiente a la codificante de *FRE5* a partir del ADNc de las cepas sobreexpresantes. Considerando que en todos los carriles se observa la banda del gen *FRE5* de 2085 pares de bases, se concluye que la extracción fue exitosa y el ADNc se encuentra íntegro.

Figura 6.20*PCR punto final de la codificante FRE5 con ADNc.*

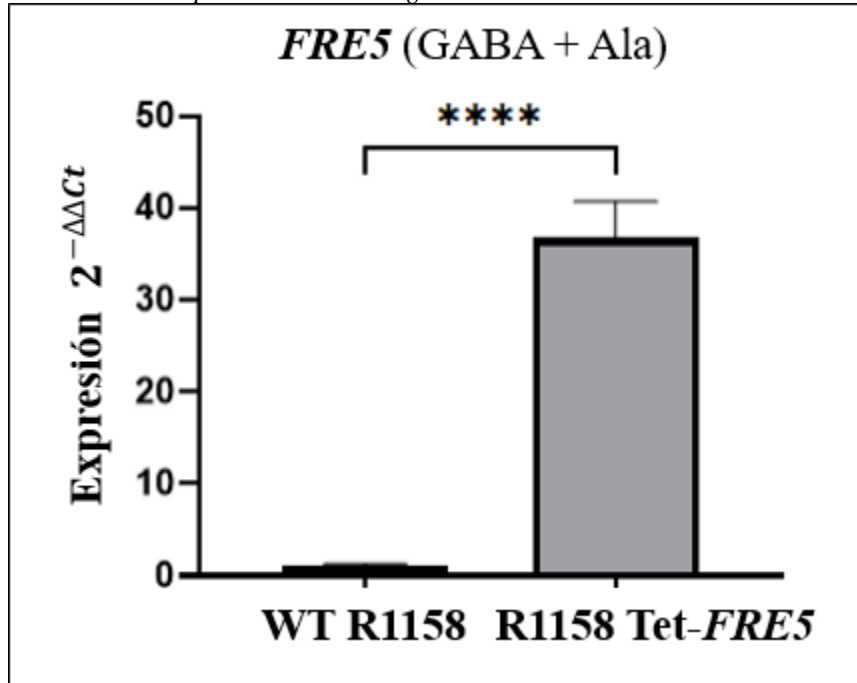
Nota. Elaboración propia.

La comprobación de la integridad del ARN se complementó con una electroforesis de ARN, este experimento únicamente fue realizado con un triplicado biológico de la cepa silvestre R1158 y de la cepa mutante P_{Tet} -*FRE5*. En la figura 6.21 se observa el gel de electroforesis de ARN, en los carriles C1-C3 se observa el ARN íntegro de la cepa silvestre R1158 y en los carriles C4-C6 el ARN de la cepa mutante P_{Tet} -*FRE5*.

Figura 6.21*Electroforesis de ARN total*

Nota. Elaboración propia.

Se utilizaron 3 muestras biológicas de ARN de la cepa silvestre R1158 y de la cepa mutante P_{Tet} -*FRE5*; para llevar a cabo la reacción de PCR en tiempo real del gen *FRE5*. Utilizando el análisis de doble delta Ct y la prueba t de Student, se determinó que la media de la expresión del gen *FRE5* en la cepa mutante P_{Tet} -*FRE5* incrementa significativamente respecto a la cepa silvestre R1158 (Figura 6.22).

Figura 6.22*Cambio en la expresión media del gen FRE5*

Nota. Elaboración propia.

Análisis de Resultados

En el laboratorio de la doctora Alicia González, se investigó al modulador híbrido Nrg1-Rtg3, el cual es un complejo que, participa en el mantenimiento de la integridad mitocondrial. Recientemente, se describió que la pérdida de alguno de los componentes del modulador genera alteraciones mitocondriales severas, tales como la pérdida de funcionalidad, pérdida de ADN mitocondrial y alteración de la estructura nativa del organelo (Campero, 2023). Actualmente, se intenta comprender el mecanismo por el cual se generan estas alteraciones mitocondriales. Con este propósito se realizó un ensayo transcriptómico que permitió identificar que la ausencia del modulador híbrido provoca una sobreexpresión de múltiples redes genéticas, dentro de las cuales se destacan: procesos de óxido-reducción, metabolismo de ácidos carboxílicos y transporte de metales de transición. En el estudio realizado por Vivanco *et al.* (2022), se realizó un ensayo de secuenciación de ARN para la identificación de genes relacionados con fallos en el lóbulo temporal. A partir de la identificación de clusters genéticos asociados a la patología, se estudió cada gen para concluir el posible mecanismo molecular involucrado en la afección. Para describir el mecanismo por el cual se general las alteraciones mitocondriales asociadas a la pérdida del modulador híbrido Nrg1-Rtg3, se plantea generar mutantes donde que sobreexpresaran los genes del cluster para comprender el mecanismo por el que se genera daño mitocondrial. Para lograr este objetivo, se diseñó una estrategia que consiste en el reemplazo del promotor endógeno del gen objetivo por el promotor exógeno fuerte TetO7.

Se observó que la implementación de la estrategia para la sustitución del promotor endógeno del gen *FRE5* incrementó la expresión 37 veces, respecto a la cepa silvestre R1158. Este cambio en la expresión es mayor al observado en las mutantes caracterizadas por Carreteros (2023). Pero, considerando que se buscaba evaluar si la desregulación genera un daño mitocondrial, el excedente en la expresión no afectará en la interpretación del fenómeno. Además, al ser un promotor reprimible por tetraciclina, es posible agregar el antibiótico al medio para reducir el nivel de expresión.

Los oligonucleótidos utilizados pudieron generar el módulo recombinante. Para garantizar su utilidad se realizó un análisis *in silico* de los oligos, en el que se utilizó como referencia los criterios de selección de primers definidos por Riaño, (2015). Estos criterios establecen que una pareja de primers debe tener temperaturas de alineamiento muy cercanas para maximizar el rendimiento, lo cual se relaciona con un contenido de GC similar. Además, no deben formarse estructuras secundarias y se debe comprobar que la secuencia complementaria sea única. Al considerar estas características durante el diseño de la estrategia experimental, se minimizó la probabilidad de que los primers no fueran efectivos para la producción del módulo recombinante.

En la transformación de *E. coli* con el plásmido pCM325, se observó un crecimiento abundante de colonias aisladas en medio LB con ampicilina. Esto nos indica que el protocolo de transformación empleado permitió la introducción del plásmido a la cepa silvestre y dado que el plásmido contiene la secuencia del gen AmpR que codifica a la beta-lactamasa de *Klebsiella aerogenes*, las mutantes *E. coli* exitosas adquieren la capacidad de producir la enzima que inactiva los antibióticos beta-lactámicos por medio de la hidrólisis del anillo beta-lactámico de los mismos (PAHO, 2020). Por lo que la transformación del plásmido pCM325, confiere a las bacterias transformantes resistencia a la ampicilina. Y a partir de estas colonias, fue posible establecer cultivos puros de la cepa transformante. Para optimizar la producción de plásmido a partir de un cultivo de *E. coli* se recomienda utilizar un marcador de selección basado en auxotrofia, esto se debe a que generalmente la producción de la enzima que confiere resistencia a algún antibiótico representa un gran gasto energético, lo que reduce la producción total del plásmido (Domach, *et al.* 2009) Se purificó el plásmido pCM325 a partir de las colonias aisladas del cultivo puro de la cepa transformante. Se verificó su identidad mediante su linealización con la enzima de restricción corte único Sall y se purificó el plásmido linealizado por banda de gel. Esto permitió obtener una solución de trabajo del plásmido puro.

Con el objetivo de optimizar las condiciones de PCR para la producción de los módulos de recombinación y obtener una solución pura del módulo recombinante, se llevó a cabo un PCR con gradiente de temperatura en 8 pasos entre 60.0 °C y 76.0 °C. Uno de los factores más relevantes en la optimización de una reacción de PCR es la temperatura de anillamiento (T_a), cuando la temperatura es muy baja, pueden formarse productos no específicos; mientras que si la temperatura es muy alta, la cantidad de producto de interés formado se reduce. En el trabajo de Rychlik, *et al.*, la optimización de la temperatura de anillamiento de una PCR en la que la temperatura de fusión de los primers es muy diferente, se realiza por medio de un gradiente de temperatura de al menos 5 pasos en un rango que abarca las temperaturas de fusión individuales de los primers. En el presente trabajo se seleccionó el rango del gradiente en función a la temperatura de fusión del primer forward y el primer reverse: 71 °C y 64.4 °C, respectivamente. Se extendió el rango de temperaturas en 5 °C, lo que permitió realizar una serie de 8 reacciones, abarcando las temperaturas de fusión individuales, para determinar la temperatura de alineamiento que producía la mayor cantidad de producto. Se concluyó que la temperatura óptima para la reacción es de 63.2 °C, ya que en esta temperatura se obtuvo la mayor producción del módulo (ver figura 6.7). A pesar de haber optimizado la temperatura de alineamiento y verificado que los primers tienen complementariedad única en el sitio de interés, en la figura 6.9 se observan bandas secundarias. La banda principal de 2332 pares de bases corresponde al módulo recombinante, mientras que las dos bandas secundarias de menor tamaño (aproximadamente 1900 pb y 1300 pb) corresponden a productos secundarios no deseados. Estos productos no deseados podrían ser resultado de que los primers tenían complementariedad parcial en otros sitios del plásmido o que las estructuras secundarias de baja probabilidad determinadas con el *Software* OligoAnalyzer hayan interferido en la reacción (Ekman, 1999). Por lo que se concluye que el objetivo de optimizar la reacción de PCR para la producción del módulo recombinante se cumplió de forma parcial; se recomienda identificar potenciales primers que tengan una menor cantidad de posibles estructuras secundarias. Dado que el producto de PCR contenía productos secundarios que podrían disminuir la efectividad de la transformación al genoma de *S. cerevisiae*, fue necesario realizar una purificación por banda de gel para obtener una solución de trabajo pura del módulo recombinante. Este paso adicional de purificación resuelve la problemática de que la reacción de PCR no produce de forma pura el módulo recombinante.

Posteriormente, se transformó la cepa silvestre R1158 de *S. cerevisiae* utilizando el módulo recombinante purificado en dos concentraciones de ADN diferentes para evaluar la eficiencia de transformación. Se determinó que no existe una diferencia en el crecimiento de colonias aisladas entre el tratamiento con 3,500 ng de ADN y 5,000 ng de ADN, ya que la cantidad de colonias aisladas en las diluciones 1:100 y 1:1000 de ambos tratamientos es la misma. A pesar de que *S. cerevisiae* es considerado como uno de los pocos eucariotas con alta eficiencia de recombinación homóloga (Takita *et al.* 1997), la baja eficiencia de transformación observada en el experimento puede ser asociada a diferentes factores. Uno de los más relevantes es que *S. cerevisiae* también tiene una alta eficiencia en reparación de ADN por la unión de extremos no homólogos (NHEJ) (Van Dyck *et al.* 1999). Por

lo que es muy probable que se de la reparación del ADN sin la integración del módulo recombinante en el sitio de interés, causando así que el gen KanR no se integre al ADN de *S. cerevisiae*. La competencia entre los mecanismos de reparación HR y NHEJ, representa un potencial factor reductor de la eficiencia de transformación (Dudáš & Chovanec 2004). Otro factor que puede afectar la eficiencia de transformación es la longitud de la secuencia recombinante, se recomienda incrementar el número de pares de bases complementarias al genoma de *S. cerevisiae* a al menos 200 pares de bases por extremo.

A partir de todas las colonias aisladas obtenidas en ambas transformaciones, se elaboró un parche donde en cada cuadrante se inoculó una colonia aislada, con el objetivo de purificar la cepa transformante. El parche #50 se purificó realizando 3 re-cultivos de colonias aisladas para garantizar la pureza de la cepa transformante. Luego, se extrajo el ADN total de 5 colonias candidatas y se verificó que la extracción de ADN fue exitosa, ya que no se observó degradación del ADN. Utilizando el ADN de las colonias candidatas, se realizó la reacción de PCR UTR 5' *FRE5* - UTR 3' *FRE5* para comprobar la integración del módulo recombinante. En la figura 6.16, se puede observar que la banda de la cepa silvestre es de menor peso, con 2804 pares de bases, mientras que la banda de la cepa mutante es de 4806 pares de bases. Esta diferencia en el número de pares de bases se debe a que el módulo recombinante contiene tanto la secuencia del promotor fuerte TetO7 y el gen de resistencia a Kanamicina, que en conjunto suman 2332 pares de bases. Por lo que se espera que la banda de la cepa mutante tenga un peso mayor que la banda de la cepa silvestre. Se determinó que las colonias candidatas 2, 4 y 5 son mutantes, ya que se observa la presencia de la banda de 4806 pares de bases.

En el contexto del trabajo realizado en el laboratorio de la doctora Alicia González, se busca comprender el fenómeno de fallo mitocondrial asociado a las mutantes Nrg1 y Rtg3. En el trabajo realizado por Carreteros (2023), se determinó que los genes: *PUG1*, *FET4*, *FIT1* y *FRE5*; tienden a sobre expresarse en ausencia de algún componente del regulador híbrido y estos genes participan en la internalización del hierro a la mitocondria. En estudios como el realizado por Campos-García, *et al.* 2014, se ha descrito que el incremento de la concentración de iones de hierro a nivel mitocondrial conlleva a un fallo mitocondrial semejante al observado en el fenómeno petite descrito en el laboratorio de la doctora Alicia González. En las mutantes Nrg1 y Rtg3 se demostró que el fallo mitocondrial se asocia con la pérdida de la capacidad de usar etanol como única fuente de carbono, por lo que para evaluar si hay daño mitocondrial se determina el fenotipo de crecimiento de las mutantes en etanol.

Con el objetivo de evaluar el fenotipo de crecimiento en etanol de la cepa mutante R1158_{TetO7-FRE5}, se realizó una evaluación de fenotipo petite mediante crecimiento en placa de agar YPE por goteo, comparando su crecimiento con la cepa silvestre R1158. Esta evaluación cualitativa permitió determinar que la sobreexpresión del gen *FRE5* no afecta el crecimiento en etanol, ya que se observa un crecimiento semejante al observado en la cepa silvestre R1158. Para complementar la evaluación del fenotipo, se realizó una curva de crecimiento en medio mínimo etanol – amonio y medio mínimo glucosa – amonio para evaluar si hay un cambio en la cinética de crecimiento. Se determinó que en medio mínimo glucosa – amonio, la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre R1158 es de 0.11337, mientras que la de la cepa mutante R1158_{TetO7-FRE5} es de 0.11887. De manera similar, en medio mínimo con etanol – amonio, la velocidad de crecimiento de la cepa silvestre es de 0.10810, y la de la cepa mutante R1158_{TetO7-FRE5} es de 0.12598. Este fenotipo es el esperado en cepas donde la función mitocondrial se encuentra intacta, en el trabajo de Campero (2023), se describe el crecimiento de las mutantes petite y se demostró que, en fuentes con etanol como única fuente de carbono, estas no crecen. Por lo tanto, se concluye que la sobreexpresión de *FRE5* no afecta la cinética de crecimiento en ambas condiciones, este resultado puede ser interpretado de diferente manera. Una de las perspectivas es que la sobreexpresión del gen *FRE5* no genera la suficiente internalización de iones de hierro para generar el daño mitocondrial observado en las mutantes petite. Otra perspectiva, es que para replicar el daño mitocondrial se requiere de la sobreexpresión de todos los genes de forma conjunta, para lo que se requeriría implementar esta estrategia variando los marcadores de selección para así poder sobre expresar en una sola cepa todos los genes determinados por Carreteros (2023).

Finalmente, con el objetivo de comprobar que la integración del módulo recombinante con el promotor TetO7 sobreexpresa el gen *FRE5*, se realizó una qPCR de la región codificante de *FRE5* en un triplicado biológico y un triplicado experimental de la cepa mutante R1158_{TetO7-FRE5} y de la cepa silvestre R1158. Se verificó la integridad del ARN extraído mediante electroforesis (ver figura 6.21), y se observó que el ARN se concentra en una sola banda sin evidencia de degradación, lo que indica que el extracto no estaba degradado. El ARN se convirtió a ADNc, y mediante PCR de punto final de la región codificante del gen *FRE5*, se confirmó que en todos los productos de PCR se observa la banda de 2085 pares de bases, correspondiente a la región codificante del gen. Se concluye que el ADNc se encuentra íntegro y es utilizable para la reacción de qPCR. El análisis estadístico de los datos de Ct's (ciclo de threshold) mediante la prueba t de Student confirmó que la media de la expresión del gen *FRE5* en la cepa mutante R1158_{TetO7-FRE5} es significativamente mayor que la observada en la cepa silvestre R1158. Los datos de qPCR fueron normalizados para ajustar los niveles de expresión génica para reducir las diferencias en la expresión causadas por la cantidad o calidad de la muestra. La normalización fue realizada utilizando el gen de actina por ser un gen constitutivo (Roussel, 2015), en este enfoque se utiliza la expresión del gen de actina ya que se expresa a niveles constantes.

Se concluyó que la estrategia diseñada para la generación de mutantes sobreexpresantes del gen *FRE5* incrementó 37 veces la expresión medio del gen y se determinó que este cambio es significativo. A pesar de que la sobre expresión del gen *FRE5* no generó evidencia para concluir que la desregulación de los genes asociados al transporte de metales de transición fue posible desarrollar un método para el subsecuente estudio de los genes propuestos por Carreteros (2023). El presente trabajo aporta con una estrategia que puede ser adaptada para el estudio de la red genética controlada por el regulador híbrido Nrg1-Rtg3 y es una herramienta que puede facilitar la descripción del mecanismo por el cual se genera la pérdida de ADN mitocondrial, fisión mitocondrial y pérdida de la función respiratoria.

Conclusiones

- Se transformó con alta eficiencia la cepa DH5 α de *E. coli* con el plásmido pCM325, permitiendo obtener y purificar el plásmido pCM325 a partir del cultivo puro de la cepa que expresa el plásmido.
- Derivado de los datos obtenidos en la optimización de la PCR para amplificar el módulo de PtetO7-KAN, se decidió que la temperatura óptima era de 63.2 °C.
- Se transformó la cepa silvestre R1158 de *S. cerevisiae* y se comprobó el intercambio de la región promotora del gen *FRE5* por el de TetO7 mediante PCR de punto final.
- La expresión del gen *FRE5* de la cepa $TetO7-FRE5$ incrementó 37 veces respecto a la cepa silvestre R1158.
- Se evaluó el fenotipo de la cepa mutante R1158 $TetO7-FRE5$ en medio mínimo con glucosa o etanol como única fuente de carbono y sulfato de amonio como fuente de nitrógeno. Los resultados sugieren que la sobreexpresión de *FRE5*, no interfiere con la velocidad de crecimiento en comparación con la cepa silvestre.

Recomendaciones

El punto de mejora principal para incrementar la integración del módulo recombinante es el uso de secuencias de recombinación de mayor longitud. Se recomienda utilizar secuencias de recombinación de al menos 200 pares de bases para incrementar la especificidad del sitio de integración, así como incrementar la probabilidad de integración.

Se recomienda implementar la estrategia experimental para generar mutantes sobreexpresantes de todos los genes que se desregulan en ausencia de los componentes del regulador híbrido Nrg1-Rtg3.

Se recomienda evaluar si la desregulación del clúster de genes asociados al transporte de metales de transición es lo que genera el daño mitocondrial o si la desregulación es una consecuencia de la pérdida de integridad mitocondrial.

Altmann, K., Dürr, M., & Westermann, B. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism to study mitochondrial biology: general considerations and basic procedures. *Mitochondria: Practical Protocols*, 81-90.

Alves R, Vilaprinyo E, Sorribas A (2008) Integrating bioinformatics and computational biology: Perspectives and possibilities for *in silico* network reconstruction in molecular systems biology. *Current Bioinformatics* 3: 98–129.

Andalis, A., Storchova, Z., Styles, C., Galitski, T., Pellman, D., & Fink, G. R. (2004). Defects arising from whole-genome duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 167(3), 1109-1121.

Ayer, A., Gourlay, C. W., & Dawes, I. W. (2014). Cellular redox homeostasis, reactive oxygen species and replicative ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 14(1), 60-72.

Beck H, Dobritzsch D, Piskur J (2008) *Saccharomyces kluyveri* as a model organism to study pyrimidine degradation. *FEMS Yeast Res* 8: 1209–1213.

Botstein, D., Chervitz, S. A., & Cherry, M. (1997). Yeast as a model organism. *Science*, 277 (5330), 1259-1260.

Bruckert G, Vivien D, Docagne F, Roussel BD. Normalization of Reverse Transcription Quantitative PCR Data During Ageing in Distinct Cerebral Structures. *Mol Neurobiol*. 2016 Apr;53(3):1540-1550. doi: [10.1007/s12035-015-9114-5](https://doi.org/10.1007/s12035-015-9114-5).

Carnevali, F., Morpurgo, G., & Tecce, G. (1968). Density Changes of Cytoplasmic DNA from Petite Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and a Hypothesis on the Mechanism of the Mutation. *Giornale Botanico Italiano*, 102(4), 231–237. doi:[10.1080/11263506809426457](https://doi.org/10.1080/11263506809426457)

Carretero C. (2023). El complejo represor híbrido Nrg1-Rtg3-Ala: Identificación de su organización y del circuito genético bajo su control. [Tesis de maestría], UNAM.

Chen, X., Butow, R. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet* 6, 815–825 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrg1708>

Cliften, P. F., Fulton, R. S., Wilson, R. K., & Johnston, M. (2006). After the duplication: gene loss and adaptation in *Saccharomyces* genomes. *Genetics*, 172 (2), 863-872.

Cohen, R. *et al.* (1987) Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene ENO1 is mediated by positive and negative cis-acting regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.*

Contamine, V., & Picard, M. (2000). Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (2), 281-315.

Costa, V., & Moradas-Ferreira, P. (2001). Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular aspects of medicine*, 22 (4- 5), 217-246.

Cunningham, D.S., Koepsel, R.R., Ataai, M.M. *et al.* Factors affecting plasmid production in *Escherichia coli* from a resource allocation standpoint. *Microb Cell Fact* 8, 27 (2009). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-27>

Davis, M.W. and Jorgensen, E.M. (2022) ‘Ape, a plasmid editor: A freely available DNA manipulation and visualization program’, *Frontiers in Bioinformatics*, 2. [doi:10.3389/fbinf.2022.818619](https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.818619).

Desikan, R., Hancock, J., & Neill, S. (2007). Reactive Oxygen Species as Signalling Molecules. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, 169–196. [doi:10.1002/9780470988565.ch7](https://doi.org/10.1002/9780470988565.ch7)

Dudáš A, Chovanec M (2004) DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Mutat Res Rev Mutat Res* 566(2):131–167

Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1), 33-48.

Ekman, S. (1999). Pcr Optimization and Troubleshooting, with Special Reference to the Amplification of Ribosomal DNA in Lichenized Fungi. *The Lichenologist*, 31(05), 517–531. [doi:10.1006/lich.1999.0226](https://doi.org/10.1006/lich.1999.0226)

Engel SR, Dietrich FS, Fisk DG, Binkley G, Balakrishnan R, Costanzo MC, Dwight SS, Hitz BC, Karra K, Nash RS, Weng S, Wong ED, Lloyd P, Skrzypek MS, Miyasato SR, Simison M, Cherry JM. The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: then and now. *G3* (Bethesda). 2014 Mar 20;4(3):389-98. [doi: 10.1534/g3.113.008995](https://doi.org/10.1534/g3.113.008995).

Escalera-Fanjul, X. *et al.* (2019) “Whole-genome duplication and yeast’s fruitful way of life,” *Trends in Genetics*, 35(1), pp. 42–54. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.09.008>.

Gancedo JM (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur J Biochem* 206(2); 297313

García Triana, Bárbara, García Morales, Onel, Clapes Hernández, Sonia, Rodes Fernández, Lorenzo, & García Piñeiro, José Carlos. (1995). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 14 (1) Recuperado en 02 de abril de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403001995000100001&lng=es&tlng=es.

Garipler G., Mutlu N., Lack N. A. and Dunn C. D. (2014). Deletion of conserved protein phosphatases reverses defects associated with mitochondrial DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Gaxiola-Robles, *et al.* Peroxidación de lípidos y la respuesta del sistema de defensa antioxidante en el diabético tipo 2 obeso en comparación al diabético tipo 2 sin obesidad. *Nutrición Hospitalaria*, 28 (6), 1905-1911. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6946>

GmbH, J.B. (no date) *1 KB DNA ladder, 1 kb DNA Ladder, Log Scale DNA Ladders - Jena Bioscience*. Available at: <https://www.jenabioscience.com/molecular-biology/pcr-classics/dna-ladders/log-scale-dna-ladders/m-217-1-kb-dna-ladder> (Accessed: 11 March 2024).

Gomez, M., Perez-Gallardo, R. V., Sanchez, L. A., Diaz-Perez, A. L., Cortes-Rojo, C., Meza Carmen, V., ... & Campos-Garcia, J. (2014). Malfunctioning of the iron–sulfur cluster assembly machinery in *Saccharomyces cerevisiae* produces oxidative stress via an iron-dependent mechanism, causing dysfunction in respiratory complexes. *PLoS One*, 9(10), e111585.

Gu, Z., Steinmetz, L.M., Gu, X., Scharfe, C., Davis, R.W., and Li, W.H. 2003. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 421: 63–66.

Guan, Y., Dunham, M. J., & Troyanskaya, O. G. (2007). Functional analysis of gene duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 175 (2), 933-943.

Hashim, Z., Mukai, Y., Bamba, T., & Fukusaki, E. (2014). Metabolic profiling of retrograde pathway transcription factors *rtg1* and *rtg3* knockout yeast. *Metabolites*, 4 (3), 580-598.

Hedbacker K, Carlson M. SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:2408-20. doi: [10.2741/2854](https://doi.org/10.2741/2854).

Hernández, H. *et al.* (2011) “Hap2-3-5-gln3 determine transcriptional activation of GDH1 and ASN1 under repressive nitrogen conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *Microbiology*, 157(3), pp. 879–889. Available at: <https://doi.org/10.1099/mic.0.044974-0>.

Izawa, S., Inoue, Y., & Kimura, A. (1995). Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 368 (1), 73-76.

Jamieson, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14 (16), 1511-1527.

Karathia, H., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PLoS one*, 6 (2), e16015.

Kellis, M., Birren, B.W., and Lander, E.S. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428: 617–624.

Kener, K. B., Munk, D. J., Hancock, C. R., & Tessem, J. S. (2018). High-resolution Respirometry to Measure Mitochondrial Function of Intact Beta Cells in the Presence of Natural Compounds. *Journal of Visualized Experiments*, (131). doi:10.3791/57053

Kenneth J. Livak; Thomas D. Schmittgen (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2CT Method. , 25(4), 0–408. doi:10.1006/meth.2001.1262

Kuepfer, L. *et al.* (2005) Metabolic functions of duplicate genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome* 15, 1421–1430

Lasserre JP, Dautant A, Aiyar RS, Kucharczyk R, Glatigny A, Tribouillard-Tanvier D, Rytka J, Blondel M, Skoczen N, Reynier P, Pitayu L, Rötig A, Delahodde A, Steinmetz LM, Dujardin G, Procaccio V, di Rago JP. Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech*. 2015 Jun;8(6):509-26. doi: [10.1242/dmm.020438](https://doi.org/10.1242/dmm.020438)

Li, Z., Yu, J., Peng, Y., and Huang, B. (2016). Metabolic pathways regulated by γ -aminobutyric acid (GABA) contributing to heat tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). *Sci. Rep.* 6:30338. doi: 10.1038/srep30338

Lindahl, P. A. (2019). A comprehensive mechanistic model of iron metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metallomics*, 11(11), 1779-1799.

Lindahl, P.A. (2019) "A comprehensive mechanistic model of iron metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*," *Metallomics*, 11(11), pp. 1779–1799. Available at: <https://doi.org/10.1039/c9mt00199a>.

López Ortiz, Geovani. (2015). "Hetero-oligomerización de monómeros codificados por genes duplicados : LEU4 y LEU9 un caso específico". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/101561>

Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., & Grant, C. M. (1998). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Molecular biology of the cell*, 9(5), 1081-1091.

Mani, S. (2015). Production of Reactive Oxygen Species and Its Implication in Human Diseases. In: Rani, V., Yadav, U. (eds) *Free Radicals in Human Health and Disease*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_1

Mao, Y., & Chen, C. (2019). The Hap Complex in Yeasts: Structure, Assembly Mode, and Gene Regulation. *Frontiers in Microbiology*, 10.

Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res.* 1999 Mar 8;424(1-2):83-95. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00010-x.

Márquez Gutiérrez, Dariel. (2015). "Divergencia regulatoria de los genes parálogos alt1 y alt2 en *Saccharomyces cerevisiae*". (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/429346>

Márquez, D. *et al.* (2021) "Alanine represses γ -aminobutyric acid utilization and induces alanine transaminase required for mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*," *Frontiers in Microbiology*, 12. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.695382>.

McAlister, L. and Holland, M.J. (1982) "Targeted deletion of a yeast enolase structural gene. identification and isolation of yeast enolase isozymes.," *Journal of Biological Chemistry*, 257(12), pp. 7181–7188. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)34554-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)34554-x).

Moradas-Ferreira, P. and Costa, V. (2000) "Adaptive response of the yeast *saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: Defences, damage and death," *Redox Report*, 5(5), pp. 277–285. Available at: <https://doi.org/10.1179/135100000101535816>.

Moradas-Ferreira, P., & Costa, V. (2000). Adaptive response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damage and death. *Redox Report*, 5(5), 277-285.

Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157-1195.

Murakami C, Kaeberlein M (2009) Quantifying yeast chronological life span by outgrowth of aged cells. *J Vis Exp*.

Outten, C. E., & Albetel, A.-N. (2013). Iron sensing and regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: Ironing out the mechanistic details. *Current Opinion in Microbiology*, 16(6), 662–668. doi:10.1016/j.mib.2013.07.020

- Owczarzy R, (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W163-9. doi: [10.1093/nar/gkn198](https://doi.org/10.1093/nar/gkn198).
- Owczarzy R, (2008) IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W163-9. doi: [10.1093/nar/gkn198](https://doi.org/10.1093/nar/gkn198).
- Pan American Health Organization (2020) *Beta-Lactamasas*. Available at: <https://www3.paho.org/spanish/ad/thse/ev/02.pdf>
- Park SH1, Koh SS, Chun JH, Hwang HJ and Kang HS. (1999) Nrg1 Is a Transcriptional Repressor for Glucose Repression of STA1 Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol.* 19(3):2044-50.
- Park, S. H., Koh, S. S., Chun, J. H., Hwang, H. J., & Kang, H. S. (1999). Nrg1 is a transcriptional repressor for glucose repression of STA1 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 2044-2050.
- Peñalosa-Ruiz, G. *et al.* (2012) “Paralogous Alt1 and Alt2 retention and diversification have generated catalytically active and inactive aminotransferases in *Saccharomyces cerevisiae*,” *PLoS ONE*, 7(9). Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045702>.
- Riaño, D. 2015. Diseño de oligonucleótidos iniciadores (primers). Universidad Nacional de Colombia.
- Ronne H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11(1):12-7.
- Rothermel BA, Thornton JL, Butow RA. Rtg3p, a basic helix-loop-helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains. *J Biol Chem.* 1997;272:19801–19807.
- Ruiz, A. and Arino Joaquin (2007) “Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* endosymbiont sodium ATPase system,” *Eukaryotic Cell*, 6(12), pp. 2175–2183. Available at: <https://doi.org/10.1128/ec.00337-07>.
- Ruiz-Roig, C., Noriega, N., Duch, A., Posas, F., & de Nadal, E. (2012). The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Molecular Biology of the Cell*, 23(21), 4286–4296. doi:[10.1091/mbc.e12-04-0289](https://doi.org/10.1091/mbc.e12-04-0289)
- Rychlik, W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro; *Nucleic Acids Research*, 18(21), 6409–6412. doi:[10.1093/nar/18.21.6409](https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409)
- Schilke, B., Voisine, C., Beinert, H., & Craig, E. (1999). Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 10206-10211.
- Sekito T, Thornton J, Butow RA. Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol Biol Cell.* 2000;11:2103–2115
- Takita Y, Takahara M, Nogami S, Anraku Y, Ohya Y (1997) Applications of the long and accurate polymerase chain reaction method in yeast molecular biology: direct sequencing of the amplified DNA and its introduction into yeast. *Yeast* 13(8):763–768

Thermo Scientific (2020), Células Competentes dh5; Alta Eficiencia, Fisher Scientific - part of Thermo Fisher Scientific. Available at: <https://www.fishersci.es/shop/products/dh5-competent-cells-high-efficiency/16512160>

Tong Ihn Lee *et al.* (2010) Transcriptional Regulatory Networks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* DOI:[10.1126/science.1075090](https://doi.org/10.1126/science.1075090)

Van De Peer, Y. *et al.* (2017) The evolutionary significance of polyploidy. *Nat. Rev. Genet.* 18, 411–424

Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999) Binding of double-strand breaks in DNA by human RAD52 protein. *Nature* 398(6729): 728–731

Van Heusden, G. P. H., & Steensma, H. Y. (2001). 14-3-3 Proteins are essential for regulation of RTG3-dependent transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 18 (16), 1479-1491.

Vyas, V. K., Berkey, C. D., Miyao, T., & Carlson, M. (2005). Repressors Nrg1 and Nrg2 regulate a set of stress-responsive genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 4(11), 1882-1891.

Wolfe, K. 2004. Evolutionary genomics: Yeasts accelerate beyond BLAST. *Curr. Biol.* 14: R392–R394.

Yazgan, O., & Krebs, J. E. (2012). Mitochondrial and nuclear genomic integrity after oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Biosci*, 17, 1079-1093.

Zhou, H., & Winston, F. (2001). NRG1 is required for glucose repression of the SUC2 and GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bmc Genetics*, 2 (1), 1-9.x|

11.1. Secuencia plásmido pCM325

Secuencia plásmido pCM325 con un tamaño de 4641 pares de bases. En base en esta secuencia se determinó el tamaño de la banda esperada para cada reacción de PCR a partir del plásmido pCM325.

```

GAACGCGPeGCCGCCAGCTGAAGCTTCGTACGCTGCAGGTCGACGGATCCCCGGGTTAATTAAGGC
GCGCCAGATCTGTTTAGCTTGCCCTTGTCCTCCCGCCGGGTCACCCGGCCAGCGACATGGAGGCCAG
ATACCCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGCATGATGTGACTGTGCGCCGTFACATTT
AGCCCATACATCCCCATGTATAATCATTTCATCCATACATTTTGATGGCCGCACGGCGCGAAGCA
AAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCCACAGACGCGTTGAATT
GTCCCCACGCCGCGCCCCCTGTAGAGAAATATAAAAAGGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTT
ATATACTTCCTTTTAAAAATCTTGCTAGGATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAAACAACCAT
GGGTAAGGAAAAAGACTCACGTTTCGAGGCCGCGATTAAATTC AACATGGATGCTGATTATATGG
GTATAAATGGGCTCGCGATAATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCC
CGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAATGATGTTACAGATGAGAT
GGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCC
TGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGCAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATA
TCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCCTGCGCCGGTTGCATTCCGATTC
TGTTTGTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCCAATCACGAATGAA
TAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGTATTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCGTGTTGAACAAGTCTG
GAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCATTCTACCCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTGATTCTCACT
TGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGTATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGC
AGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAA
ACGGCTTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTCAGTTTTCAATTTGATGCT
CGATGAGTTTTTCTAATCAGTACTGACAATAAAAAGATTCTTGTGTTTCAAGAACTTGTCAATTTGTA
TAGTTTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTTAATCAAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTCGC
CTCGACATCATCTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATG
TGAATGCTGGTTCGCTATACTGCTGTCGATTTCGATACTAACGCCGCCATCCAGTGTGAAAACGAGC
TCGAATTCGAGTAATTCGCGCCACTTCTAAATAAGCGAATTTCTTATGATTTATGATTTTTATTA
TTAAATAAGTTATAAAAAAATAAGTGTATACAAATTTTAAAGTACTCTTAGGTTTTTAAAACGAA
AATTCCTGTCTTGTAGTAACTCTTTCCTGTAGGTCAGGTTGCTTTCTCAGGTATAGCATGAGGTCG
CTCTTATTGACCACACCTCTACCGGCAGATCAATTCCTCGATCGAGTTTACCCTCCCTATCAGTG
TAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCCTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTT

```

ACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGA
AAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACT
CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTG
AAAGTCGAGCTCGGTACCTATGGCATGCATGTGCTCTGTATGTATATAAAACTCTTGTTTTCTTC
TTTTCTCTAAATATCTTTCCCTTATACATTAGGTCCTTTGTAGCATAAATTACTATACTTCTATAG
ACACGCAAACACAAATACACACACTAAATTACCGGATCAATTCGGGGGATCCGTTTATCAGATCCA
CTAGTGGCCTATGCGGGCCGCGATCTGCCGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGATAAGC
CAGGTTAACCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCT
TCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC
TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAA
GGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCC
CCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGA
TACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCCTGTTCCGACCCGCGCTTACCGGA
TACCTGTCGCTTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTATCTC
AGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGC
TGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCA
GCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGG
TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACC
TTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT
GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
GGGCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
ATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGT
TCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
CCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAG
CCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAT
TGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCA
AGGGGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTT
GTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTACT
GTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAG
TGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGA
ACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTG
TTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACC
AGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGG
AAATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTC
ATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCC
CGAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGT
ATCACGAGGCCCTTTCTGCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTC
CCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCA
GCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAACCTATGCCGATCAGAGCAGATGTACTGAGAGTG
CACCATATGGACATATTGTGCTTAGAACGCGGCTACAATTAATACATAACCTTATGTATCATACAC
ATACGATTTAGGTGACACTATA

11.2. Secuencia cromosoma XV de *S. cerevisiae*

Secuencia cromosoma XV de *S. cerevisiae* +/- 1kb al gen *FRE5* 4083 pares de bases. La secuencia fue obtenida con el código de referencia: NC_001147.6 de NCBI. Esta secuencia fue utilizada para el diseño de las secuencias de recombinación.

```

AGCTGGTAGAAGTACTACTTGGAGACCAGGTGTTGCTGCTGCC TTCACCAGTCCAGACAAAAGTAG
CATCTTGGGTTGACAGTCTTAGTGTAGACGTGACCGTTCTTGGTGGCAGTGATAGTGGTAGTGATAC
TAGAACCAGAACCTTCATCAGCAGAAGAAGTCTCAGCAGCAGAAGAAGTCTCAGCAGCAGAAGTGG
TAGCGGCAGCAGAAGTGGTAGCGGCAGCAGAGGTTTCGGCGGCAGAAGTTTCGGCGGCAGAAGATT
CAGCGGCAGAAGTGCTGCTGGCGTAAGAGTCTTACCACCCCAAACAAAAGTAGCATCTTGGGTGA
CAGTCTTAGTGTAGACATGACCGTTCTTGGTGGCAGTGATGGTGGTGGTGATACTCTCAGCAAGAG
CAGTAGCGGCAACAGCAGATAGAACCAAAGCGGAAGAGAATTCATTTTAGGGATTATTGTTATTA
GTTATTTTTAAGCGAGTGGAAAGTACTTGTGTTGTATCTGTTTCGAACATTCATATTACCTCCTAATAC
TTCAAATAGTCTTGGCTTAAATACCCATAAATCAACTTTTACAAAAAATAAACAATCTC
GAACGATAATTGAACCCCATTTTTTGCACCCCTTCTCCTAGAATGGCGGAACCTGGCTCTTGAGCCC
TTAGATTGCTTTCCTCACATACATCAAAAAATATGGGATAGCGGGGTGCGGAACAAACAGGGTGC
AAAAAAAATCTAGGACATAGGTAGGACTAAGAAGACTGTGGCATTACTACACAGCAATCATATTT
TACCGCTTCTCGTTAATTTGGATTTTTACTTTTACATTACATTAGCGATCATTAAAAAAGGAGCGT
CAATTTTTTACTTGGCAAATGTGTAATGTAGCGTTTTCGGTATGTCACATCACCAATTTTGTGCA
GTTAATTTAATTCACCCAGATTTTGAATGCTTTTCGCTAGATTAGTGTGCTGTTGGTGTATTGG
CACCAGGTTCTTTAGCAAAACCAGCATCAACTAAGAAAAGAACGCAATGGGACCAGATAGCAATTG
ATGCTTGTGCTAAAGAATTGGAATCACACAAATTTGACACGGATGTGAAGGGTCGGCACGCTACTC
TTTGCACTTATGAACCAGCACTAGGGTCTTGGTTACATTGCGCGAAGGATGTTCTCGACAGTAGGA
AGAAAAGTAAAAAATATTCGAAAAAACGTTTAGCAAAATTAATCAGTATTGCCACGATTATCACA
AAGATGAGGTCGTCAGCAATGAGGAGTATTATCGAATTTTTGCCAATGCATCCCTTTTCATCCGGC
CTCTTGATGAGGTAAGGAAAACATACGATATCCCGTCACTCCCAATAAAGCCTCTCTAGATAGGT
GGGTATGGGCTTATTTTTGGGCCCTGGATAATATAGACAAAGGAAATGTTTATGGAGTGACGATTT
GCTTATACTGGATAGGAGTCTGTTTATTGCAGCTGTATATCACTTCTTGAACTTTTCTCGACTTA
AACAACCGGTGTTCAAAAAACAAGGTGTCTGCTTCTTAAGAGGCCACTATGTTCTTCCAGCGCTTG
TTCATAACCATGCTATGTCAGTGGGAAGGTTGTTTTTCATCGGTCGGTCCCTACCAGGTTAGAGA
CCCTTGTCTTATCGGTTACGTTTTGTGTCACGGGTTCTTGTGAGTAGTACAATTTTGACCATA
ATGAGTTGCTCAGTGATCGCAGAAGCCAAGTGCTTATCTTCTTCCGACAGGGCAGGGATCCTGG
CATTTCGCACATTTTCTTTGATAGTTCTCTTTGGCGGTAAAAACAGCACAATGACTTGGCTCACAG
GTATAAGATATACCGCATTACTTACTTACCACAAATGGTTAGGAAGATTCATGTTAGTAGACTGTA
CGATCCATGCAATAGGATACACCTACCATGCATACATAGAAAATTAAGGAAATACGTGAAGTATA
GTGATCTATGGACATCCGGAAGACATGCCATGATCATTGTTGGAATACTTGTGTTTTTTTCGTTCT
TCTTCTTAGACGACATTATTACGAATTGTTTGTATTACGCACATTATCTTAGCAATAGGATTTT
TCCATGCGTGTGGAAACATTGCTATAAATTTGGATGGGGTGAATGGATAATGGCGTGTGCACIGT
TTTTGGATTGCTGACCGTATCTGCGGCTAATAAAGATTGCAATTTTTGGAATGCCATGGGCTAAAT
TGAAACTGTGTGGCGAGTCCATGATAGAAGTGAGAATCTCAAAAAGCTCCAAATGGTGGAAAGCAG
AACCTGGCCAATATATATATCTGTACTTCTTAAGACCAAAAATATTCTGGCAATCACATCCATTCA
CGGTCATGGATTCTTTGGTTGAGGATGGTGTAGTTGGTAGTTGTGATAACAGTGAAAAATGGGCTAA
CCAAAAAATTACAGGAATACCTTTTAGAGAGCGAAGGGTACACGGAAATGCGAGTACTAGCAGAAG
GACCTTATGGACAAAGCACGCGAACACATTTGTTTCGAAAGCCTCCTGTTTATTGCCGGAGGGGCGG
GTGTTCTTGACCTCTGTGATGGCAATAAAGGCAGGTGCGCAGGTCAAAAAGCAACGATTCTCATC
AAATGATCAAATTTGTGTGGAGTGTACGTAACCTTGATCTCTTAGAAGTGTATCGCAAAGAGATAA
TGGTGCTAAAAGAGTTGAACATAGACACAAAAATTACTTACAGGAGAGCGAAAAGATGAATCGA
ACACGGAGGAGGGAGCAATTGCTAATATGAGCACGGAAGGCAGACTGCTGACGACATCGAAATCAG
CGGAAATGATTACTGATTTTGGACGACCAATATCGATGAGATAATTGAAGAAGCAGTAAGTGGTG
CAAAATCTTTGTGGTCACTTGTGCGGGTCAGAGGGCTTTGTAGACAAGACACGAGAGTTGACGG
CAAAAAGAGTTCTTGAACACGGTGACAAATGGATAGAATACGTGGAGGAATTCCAGAATTGGTAGC
ATTTCAATCCGCCCTATCAATGCTAACCTGTTACGAATACCAAAACCACAAAAACACGGACCTTGT
TTAATTACTGTATGAAATAACTGTACTCCATTAATATCAATGCATTTAGTCCTTAAAAATCAGCG

```

GGAATCTAATAAGCCGGCGAAGGTA
ACTACACCTCACCCCTACTGTTATTT
AAAAATCCTATTTGTG
GGGATTTGCAATTAGTTTTTCATCG
CCAAATAACAATCCTTCACTGCACAC
CCTACTTAAAAAAG
GGTACATTGCTAACATTCTTGGTAT
GAAAAATTGCAGTCATTTAGATTGAG
TTGGCAAAAATACAA
ATTTAACGCATGAGTATAAAAATCG
CTATTCGCTTTATTATTATTTCTCC
CTGATTAATAAATATC
GAAGGGTAATCAGGGTTACGGGAAC
AGTACTTATCGGAGGAATAATAAGC
AGCACCCCTTTAGAATG
TGGATCGTTTCAATACAGTCGCATCT
GACATATACAGCGCCACTGTCGTAAG
TTGTCAATCACGAG
AACATAATCTTGAAACACGGATGGCT
ACATAGAGTTACCTTTTTTCATCAT
GATATGAATTGATACT
TTAGGCATGATAGAAAACAAAAGTT
TTGCATTACATCAGGGTATCCAATT
GAAAATGTTCTAGCTA
TTCATTTACCTTCCCGAAAAGCATT
CTTCGAAGCTGCAGTTCTTTCTGCC
ATTTCATCTCAGAACTG
TCTTCGTTGCAGAGTCAAAGTTGCC
ACTTTTCTTCATTTATTTGATATAG
AAAATGCGCAATATAC
AATCTCTCATTGCAGGATTGATATC
ATTTTTCCGAGGGAGCGATATTCA
ACCAGGTTTTGCCAGTC
AACGGTGAAGGGTAATACATCAGGT
AGGTTGAAAATTAGGCGAGTGAAT
TAAGAACTTTCTTCCTT
TATTACTCTCATTCAATGCCAGTTC
GATGAAAATTAGCGGGCAACGATA
CGCAAATGTCTCGTAA
TACTTACGT

11.3. Secuencia codificante del gen *FRE5* de *S. cerevisiae*

Secuencia codificante del gen *FRE5* de *S. cerevisiae*, 2085 pares de bases. La secuencia fue obtenida del código de referencia: NC_001147.6. Esta secuencia fue utilizada para determinar el tamaño de la banda de las PCR de confirmación de la integración del módulo recombinante.

```

ATGCTTTTCGCTAGATTAGTGTGCTGCTGTTGGTGTATTTGGCACCAGGTTCTTTAGCAAAAACCAGCA
TCAACTAAGAAAAGAACGCAATGGGACCAGATAGCAATTGATGCTTGTGCTAAAGAATTGGAATCA
CACAAATTTGACACGGATGTGAAGGGTCGGCACGCTACTCTTTGCACTTATGAACCAGCACTAGGG
TCTTGGTTACATTGCGCGAAGGATGTTCTCGACAGTAGGAAGAAAAGTAAAAAATATTCGAAAAA
ACGTTTAGCAAAATTAATCAGTATTGCCACGATTATCACAAAGATGAGGTCGTAGCAATGAGGAG
TATTATCGAATTTTTGCCAATGCATCCCTTTTCATCCGGCCTTTGATGAGGTAAAGGAAAACATA
CGATATCCCGTCACTCCCAATAAAGCCCTCTAGATAGGTGGGTATGGGCTTATTTGGGCCCTG
GATAATATAGACAAAAGGAAATGTTATGGAGTGACGATTTGCTTATACTGGATAGGAGTTCTGTTT
ATTGCAGCTGTATATCACTTCTTGAACTTTCTCGACTTAAACAAACGGTGTTCAAAAACAAGGTG
TCTGCTTTCTTAAGAGGCCACTATGTTCTTCCAGCGCTTGTTCATAACCATGCTATGTCAGTGGGA
AGGTGGTTTTTCATCGGTCGGTCCCTACCAGGTTAGAGACCCTTGTCTTATTCGGTTACGTTTTG
TTGCACGGTTCTTGTGTGAGTAGTACAATTTTGACCATAATGAGTTGCTCAGTGATCCGAGAAGC
CAAGTGCTTATCTTCCTTTCCGACAGGGCAGGGATCCTGGCATTTCGCACATTTTCCTTTGATAGTT
CTCTTTGGCGTAAAAACAGCACAATGACTTGGCTCACAGGTATAAGATATACCGCATTCACTACT
TACCACAAATGGTTAGGAAGATTCATGTTAGTAGACTGTACGATCCATGCAATAGGATACACCTAC
CATGCATACATAGAAAATTACTGGAATACGTGAAGTATAGTGATCTATGGACATCCGGAAGACAT
GCCATGATCATTGTTGGAATACTTGTGTTTTTTTCGTTCTTCTTTAGACGACATTATTACGAA
TTGTTTGTATTACGCACATTATCTTAGCAATAGGATTTTTCCATGCGTGCTGGAAACATTGCTAT
AAACTTGGATGGGGTGAATGGATAATGGCGTGTGCACTGTTTTGGATTGCTGACCGTATTCGCGG
CTAATAAAGATTGCAATTTTTGGAATGCCATGGGCTAAATTGAAACTGTGTGGCGAGTCCATGATA
GAAGTGAGAATCTCAAAAAGCTCCAAATGGTGGAAAGCAGAACCTGGCCAATATATATATCTGTAC
TTCTTAAGACCAAAAATATTCTGGCAATCACATCCATTCACGGTCATGGATTCTTTGGTTGAGGAT
GGTGAGTTGGTAGTTGTGATAACAGTGAAAAATGGGCTAACCAAAAAATTACAGGAATACCTTTTA
GAGAGCGAAGGGTACACGGAAATGCGAGTACTAGCAGAAGGACCTTATGGACAAAGCACGCGAACA
CATTTGTTGAAAGCCTCCTGTTTATTTGCCGGAGGGGCGGGTGTCTTGGACCTCTGTGATGGCA
ATAAAGGCAGGTCGCCAGGTCAAAAAGCAACGATTCTCATCAAATGATCAAATTTGTGTGGAGTGTA
CGTAACCTTGATCTCTTAGAAGTGTATCGCAAAGAGATAATGGTGCTAAAAGAGTTGAACATAGAC
ACAAAAATTTACTTCACAGGAGAGCGAAAAGATGAATCGAACACGGAGGAGGGAGCAATTGCTAAT
ATGAGCACGGAAGGCAGACTGCTGACGACATCGAAATCAGCGGAAATGATTACTGATTTTGGACGA
CCAAATATCGATGAGATAATTGAAGAAGCAGTAAGTGGTGCAAAATCTTTGTTGGTCACTTGTTC
GGGTCAGAGGGCTTTGTAGACAAGACACGAGAGTTGACGGCAAAAAGAGTTCTTGAACACGGTGAC
AAATGGATAGAATACGTGGAGGAATTCAGAATTGGTAG

```