

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



## Construcción de herramientas moleculares para transformar dos especies de levadura: *Debaryomyces hansenii* y *Sacharomyces kluyveri*

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

**GEHENNA LOBO GUERRERO SERRANO**

Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 10 de Diciembre de 2009



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Anne Santerre Lucas.- Sinodal Titular  
Dra. Laura Guzmán Dávalos.- Sinodal Titular  
Dra. Luz Patricia Castro Félix.- Sinodal Titular  
M. C. Nidia Janett Carrillo González.- Sinodal Suplente

PRESENTE.-

Por medio de la presente comunicamos a usted que ha sido designado como SINODAL, para el trabajo de titulación: "Construcción de herramientas moleculares para transformar dos especies de levaduras: *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces kluyveri*..." elaborado por la alumna Gehenna Lobo Guerrero Serrano con la modalidad: Tesis e Informes opción: Tesis.

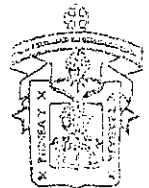
Recuerde que como sinodal le corresponde a usted evaluar y en su caso aprobar el presente proyecto, para lo cual le suplicamos no exceder de 8 días hábiles.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 30 de abril de 2008

DR FCO. MARTIN HUERTA MARTINEZ  
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

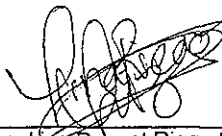
2 A.   
M.C. GLORIA PARADA BARRERA  
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dra. Georgina Adriana Quiroz Rocha  
 Presidente del Comité de Titulación.  
 Licenciatura en Biología.  
 CUCBA.  
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e Informes, opción tesis con el título: "Construcción de un módulo de interrupción génica para transformar dos especies de levadura: *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii*" que realizó la pasante Gehenna Lobo Guerrero Serrano con número de código B03009319 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

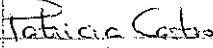

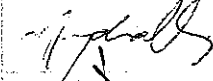

Atentamente  
 Zapopan, Jalisco 19-11-2009



Dra. Lina Raquel Riego Ruíz  
 Directora del trabajo




Dra. Alma Villalobos Arambula  
 Asesora

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Patricia Castro Felix Dra. Anne Santerre Lucas	 	25-11-2009 25 Nov 09
M. en C. Nidia Jannette Carrillo González		25 Nov 09
Supl. Dr. Alfonso Enrique Islas Rodríguez		25 Nov/09

COMITE D.  
 TITULACION



  
 26/11/09

## DEDICATORIAS

*A mis padres por su amor y confianza, a mi hermana Adelina lobo por todo su cariño y apoyo incondicional, a mis amigos que son mi alegría y mi motivación.*

"Un sueño sólo puede triunfar sobre la realidad si se le da la oportunidad. "

Stanislaw Lem

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi padre y madre por todo su amor a pesar de las dificultades, por inculcarnos el amor por la ciencia y la filosofía.

A mis hermanos Azdrubal, Sophia y Jordy y especialmente quiero agradecer a mi hermana Adelina Lobo que siempre me impulso, guio y apoyo con infinito amor y desinterés.

A mis amigos que me acompañaron en esta travesía, que siempre estuvieron a mi lado brindándome cariño y protección y a los que respeto valoro y amo; Jovana Olvera, Ana Avalos, Gabriela Corona, Yazmín González, Alejandro Nieto, Ricardo Romero y Alicia Arellano, Leodegario Camacho y Juan Pablo Organista.

A mis profesores por abrir esa ventana que me hizo descubrir el mundo maravilloso de la ciencia.

A mi directora de tesis la Dra. Lina Raquel Riego Ruíz por darme la oportunidad trabajar con ella, por sus enseñanzas y paciencia. A mi asesora Alma Rosa Villalobos por toda su ayuda y comentarios

Quiero agradecer especialmente a mis compañeros de laboratorio y amigos Claudia Peresson y Javier Montalvo por todo el apoyo que recibí de ellos durante el desarrollo de la tesis,

Al Técnico Omar Arollo ya que su asesoría fue punto clave para culminación de este trabajo.

A mis sinodales por sus valiosos comentarios, la Dra. Anne Santerre, la Dra. Patricia Castro, la M. en C. Nidia Carillo y el Dr. Alfonso Islas.

## CONTENIDO

Carátula.....	1
Carta aceptación tema tesis.....	2
Constancia de aprobación de tesis.....	3
Dedicatorias.....	4
Agradecimientos.....	5
Introducción.....	6
Antecedentes.....	17
Planteamiento del Problema.....	20
Justificación.....	21
Hipótesis .....	22
Objetivos.....	22
Materiales y Métodos.....	23
Resultados.....	47
Discusión .....	69
Perspectivas .....	72
Referencias.....	74

## I. INTRODUCCIÓN

Comprender cómo se lleva a cabo el funcionamiento celular ha sido una interrogante desde hace décadas. En los últimos años se ha utilizado a la levadura del pan *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio para conocer más acerca del funcionamiento de las células eucariotas. La levadura tiene una gran cantidad de aspectos benéficos, para su manejo y uso en el laboratorio. Uno de los más importantes es su ciclo corto de vida ya que se duplica cada 2 horas, lo cual nos permite tener una gran cantidad de descendientes en poco tiempo. Esto significa que podemos cultivar miles de colonias de levadura en tan solo dos días, a diferencia de las células de mamíferos que se duplican de 16 a 24 horas **(Valenzuela y Gonzalez, 2001)**, por lo que nos tomaría semanas obtener un cultivo con células suficientes para la experimentación.

Otro de los aspectos útiles de este modelo de estudio es que su genoma es bastante pequeño, sólo 2.8 veces más grande que el de *Escherichia coli* y 200 veces más pequeño que el humano, lo cual ha facilitado su secuenciación, así como su análisis genético y molecular **(Watson, 1992)**. Por ejemplo, una biblioteca genómica completa de levadura puede quedar contenida en unos cuantos miles de plásmidos o fagos, en tanto que para contener una biblioteca completa de células de mamífero se requerirían cerca de un millón de partículas. De tal manera que resulta más fácil y sencillo trabajar con células de levadura.

El uso de la levadura para la experimentación no es exclusiva de la biología molecular, de hecho *S. cerevisiae* ha sido ampliamente estudiada desde hace décadas en disciplinas como la bioquímica y la fisiología celular. Tan es así que la primer ruta metabólica descrita fue a partir del estudio del uso de glucosa en esta levadura, y la metodología empleada para lograrlo, fue la base para el estudio posterior de otras vías que constituyen el metabolismo de nuestras células (Sherman, 2002).

En el ámbito de la biología molecular, uno de los métodos más utilizados para caracterizar la función de un gen es la obtención de mutantes y en levadura, este proceso es sumamente sencillo. La obtención de mutantes en las que el gen de nuestro interés ha sido interrumpido con una secuencia foránea es de gran utilidad, ya que la interrupción de un gen, puede permitir determinar su función (Luque, 2001).

El procedimiento más utilizado para la elaboración de mutantes, es introducir dentro de la célula un fragmento de DNA que contenga un marcador genético, flanqueado por secuencias del gen que deseamos interrumpir. Estos extremos son altamente recombinogénicos y debido a que en *S. cerevisiae* la frecuencia de recombinación homóloga es muy alta, el fragmento lineal de DNA se inserta en el *locus* del gen de estudio resultando en la interrupción de éste y, por ende, en la inactivación del mismo (Figura 1). Utilizando esta estrategia se ha determinado la función de un gran número de genes en *S. cerevisiae* (Luque, 2001).



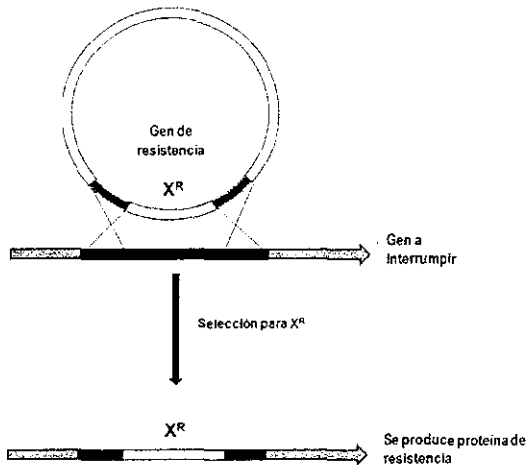


Figura 1. Sustitución génica por doble recombinación homóloga.

A pesar del conocimiento que se tiene sobre la levadura del pan, en los últimos años ha surgido un interés global por conocer y emplear otras especies de levaduras para estudios de expresión génica y de secreción de proteínas recombinantes (Hinnen et al., 1978; Garcia et al., 1985; Ricaurte y Govind, 1999; Wang et al., 2001, Moller y Langkiaer, 2004; Dmytruk et al., 2006), ya que *S. cerevisiae* no cuenta con algunas vías metabólicas de interés médico ó industrial como lo son las vías de degradación de alcanos, lactosa, metanol o xilosa, ni para la secreción de aminoácidos, enzimas amilolíticas, ácido cítrico o pigmentos. En cuanto a la producción de proteínas heterólogas, *S. cerevisiae* produce en ocasiones proteínas hiperglicosiladas (Wang et al, 2001) lo cual suele afectar las características de algunas proteínas; sin embargo, la mayor desventaja son los bajos niveles

de expresión de proteínas foráneas además de un ineficiente aparato de secreción de éstas **(Romanos y Scorer 1992)**.

Por lo expuesto anteriormente es de particular interés estudiar otras especies de levaduras con ventajas sobre *S. cerevisiae*. Para lograrlo es fundamental la construcción de herramientas moleculares que nos permitan su manejo.

### 1.1 *Debaryomyces hansenii*

*D. hansenii* es un hongo ascomiceto que ha sido aislado del agua de mar y de alimentos con altas concentraciones de azúcar y de sal. Es la especie de levadura más común encontrada en el queso, llevando a cabo procesos enzimáticos durante la maduración de éste. Esta levadura marina sobrevive en presencia de metales pesados y de hidrocarburos aromáticos, es parásita de los peces y patógena oportunista de los humanos **(Ramos, 2005)**. Es una levadura tolerante a la salinidad ya que puede contener altas concentraciones de Na<sup>+</sup> interno tanto en citoplasma como en la vacuola, reteniendo más Na<sup>+</sup> que *S. cerevisiae* **(Vera y Ramos 2006)**. Además es una levadura crio y osmotolerante, características que tienen un rol muy importante en la industria de la producción de alimentos.

Debido al creciente interés que se tiene en torno a esta levadura el consorcio Génolevures eligió a *D. hansenii* para secuenciar y anotar su genoma facilitando en gran medida su manejo y estudio **(Génolevures, 2004)**.

## 1.2 *Saccharomyces kluyveri*

El hábitat de *S. kluyveri* no ha sido tan extensamente especificado como en el caso de *S. cerevisiae*; sin embargo, se han descrito cerca de 30 aislados. Al parecer esta especie tiene una amplia distribución en el ambiente y ha sido aislada de especies de *Drosophila* provenientes de Europa y América. También existe un reporte de la presencia *S. kluyveri* en el tejido de pacientes con VIH (Pyryka y Wnuk 1998).

*S. kluyveri* tiene algunas diferencias fundamentales respecto a *S. cerevisiae* y provee de un modelo contrastante para una de las características únicas de *S. cerevisiae* ya que *S. kluyveri* recurre a la fermentación (degradar el azúcar en presencia de oxígeno) sólo cuando el oxígeno es limitado en el medio, a diferencia de *S. cerevisiae* que prefiere llevar a cabo la fermentación aún y cuando el oxígeno se encuentra disponible (Møller y Christensen, 2001). *S. kluyveri* tiene una organización del genoma más simple que *S. cerevisiae*, al parecer es una especie de levadura que se originó antes de la duplicación del genoma ocurrida en el linaje de *Saccharomyces*, de tal manera que *S. kluyveri* cuenta con menos genes duplicados facilitando su análisis funcional (Fitzpatrick et al., 2006). Esta levadura está empezando a ser más ampliamente utilizada como organismo modelo para la investigación básica y para aplicaciones industriales, como lo es la producción de proteínas, ya que su rendimiento en biomasa es mayor que el de *S. cerevisiae*, debido a su más eficiente uso de la glucosa (Møller y Langkjaer, 2004).

Al ser *S. kluyveri* un organismo idóneo para la producción de proteínas recombinantes, es indispensable contar con herramientas y técnicas moleculares que nos permitan el uso y manejo de este organismo.

### **1.3 Métodos de transformación en levaduras**

La transformación es un proceso por medio del cual introducimos moléculas de ADN desnudo dentro de una célula resultando la adquisición de este DNA en un cambio heredable. Esta técnica nos permite saltar del análisis *in vitro* al análisis *in vivo* del ADN.

La primera transformación llevada a cabo en levaduras fue reportada por **Hinnen y Hicks en 1978**, utilizando el método que ahora se conoce como esferoplastos, que consiste en degradar por completo la pared celular de las levaduras, mediante enzimas y permeabilizar la membrana para así permitir la entrada del material genético foráneo. Posteriormente, **Ito y Murata en 1984** llevaron a cabo un método de transformación de levaduras tratando a las células con iones alcalinos, con la finalidad de crear poros suficientemente grandes en la membrana celular para así introducir el material genético de estudio. La electroporación como método para transformar levaduras fue desarrollada por **Delorme en 1989**, al aplicar descargas eléctricas en forma de pulsos breves a altos voltajes, consiguiendo la apertura de poros transitorios en la membrana. Otro método fue el desarrollado por **Costanzo y Fox en 1980**; ellos mezclaron células de levadura y microesferas de vidrio y sometieron la mezcla a agitación durante periodos cortos de tiempo, para de esta manera crear poros en su membrana por los cuales introducían el ADN.

Una transformación confiable es el primer requerimiento para la elaboración de levaduras mutantes y en la literatura se ha reportado la transformación de algunas levaduras no-*Saccharomyces*, (García y Martínez, 1985; Wartman, 2002; Yu y Hamari 2004; Dmytruk y Voronovsky, 2006) entre ellas *Debaryomyces hansenii* (Ricaurte y Govind, 1999; Minhas, 2008).

#### 1.4 Marcadores genéticos

Los marcadores genéticos son aquellos que permiten conocer si una célula ha adquirido el material nucleotídico de la transformación al manifestar una característica de fácil monitoreo. Tradicionalmente se han empleado genes de resistencia a antibióticos, al resultar sumamente sencillo la selección de las mutantes, ya que se interrumpe el gen de estudio con un fragmento de ADN o casete que codifica para una enzima capaz de degradar un antibiótico determinado. Así pues sólo aquellas células transformadas tendrán la capacidad de crecer en un medio suplementado con el antibiótico (Sherman, 2002). Existe otro tipo de marcador genético que se basa en la capacidad de sintetizar algún compuesto. Al interrumpir genes biosintéticos se puede crear la auxotrofia para algún aminoácido, de tal manera que las mutantes auxotróficas son incapaces de crecer en un medio sin dicho aminoácido. Por ejemplo, al interrumpir en las células el gen *URA3*, el cual es el gen que codifica para la oritidina-5' fosfato descarboxilasa, una enzima requerida para la biosíntesis de uracilo, las mutantes en dicho gen son incapaces de crecer en un medio carente de uracilo (Watson, 1992). Sin embargo, al transformar nuestras cepas con un plásmido que contenga el gen

*URA3* éstas recuperan la función perdida y lo que seleccionamos son aquellas células que tengan la capacidad de crecer en un medio sin uracilo.

### 1.5 Genes comúnmente utilizados como marcadores de selección.

Los genes comúnmente utilizados para interrumpir son los que codifican para la síntesis de algún aminoácido o base nitrogenada, ya que nos permiten detectar a las cepas mutantes como aquellas que carecen de la capacidad de crecer en ausencia de dicho compuesto (Watson, 1992). A continuación se enlistan algunos de los genes más utilizados en *S. cerevisiae* como marcadores de selección (Cuadro I).

Cuadro I. Genes de *S. cerevisiae* utilizados comúnmente como marcadores de auxotrofia.

GEN	ACTIVIDAD
<i>ADE2</i>	Fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, cataliza un paso en la biosíntesis de novo de los nucleótidos de purina
<i>HIS3</i>	Imidazolglicerol-fosfato dehidratasa, cataliza el sexto paso de la biosíntesis de histidina
<i>LEU2</i>	Beta-isopropilmalato deshidrogenasa, cataliza el tercer paso de la biosíntesis de leucina
<i>LYS2</i>	Alfa aminoadipato reductasa cataliza el 5° paso de la biosíntesis de lisina
<i>TRP1</i>	Fosforibosilanthranilato isomerasa, cataliza el tercer paso de la biosíntesis de triptofano
<i>URA3</i>	Orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, cataliza el sexto paso en la biosíntesis de novo de las pirimidinas

## 1.6 Elaboración de mutantes.

La construcción de mutantes se lleva a cabo mediante la incorporación de un fragmento de ADN. Una de las maneras de efectuar la caracterización funcional de un producto génico, es la delección completa de dicho gen en el cromosoma (mutante nula). Para dicho fin comúnmente se utiliza el método de reemplazo génico en donde los fragmentos de ADN que flanquean el gen de interés que se reemplazará en el cromosoma son clonados a la derecha e izquierda en el marcador genético de selección. Después de la transformación con esta construcción dentro de la levadura, la recombinación homóloga entre las regiones flanqueantes resulta en la delección del gen y la simultánea integración del marcador genético (Guldener y Hecks, 1996). Debido a que *S. cerevisiae* tiene un mecanismo muy eficiente para la recombinación homóloga, ha sido posible reducir las regiones flanqueantes de ADN a 30-45pb, permitiendo la construcción de casetes para la disrupción génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La delección de genes vía doble recombinación homóloga en hongos que no son *S. cerevisiae* requiere de regiones flanqueantes relativamente grandes, mayores a 0.5 Kb (Yu et al., 2001). Por esta razón la construcción de módulos de interrupción génica se acompaña de numerosos pasos de clonación, tediosos y tardados. Una eficiente caracterización de genes funcionales en *S. kluyveri* y *D. hansenii* requieren de un método simple y rápido para la caracterización génica.

## 1.7 PCR en tres Pasos

El PCR en tres pasos es una técnica que nos permite la construcción de un módulo de sustitución génica evitando numerosos procesos previos de clonación, ya que el producto de cada una de las reacciones de PCR es el que se utiliza para llevar a cabo la interrupción (Figura 2). Como se muestra en la figura 2, en esta técnica las regiones flanqueantes del gen blanco son amplificadas usando los oligonucleótidos 1 al 4 y el módulo que contiene el marcador de selección (que incluye secuencias promotora y terminadora) es amplificado usando los oligonucleótidos 5 y 6, que tienen regiones complementarias a los oligonucleótidos 2 y 3, respectivamente. Los productos de PCR son purificados del gel y mezclados a igual molaridad. Durante la PCR final la sobreposición de las secciones permite a los fragmentos actuar como oligonucleótidos, y todo el módulo es amplificado usando el oligonucleótido 1 y 4 (Figura 2) (Yu y Hamari, 2004; Kuwayama y Obara, 2002; Erdeniz y Mortensen, 2007).

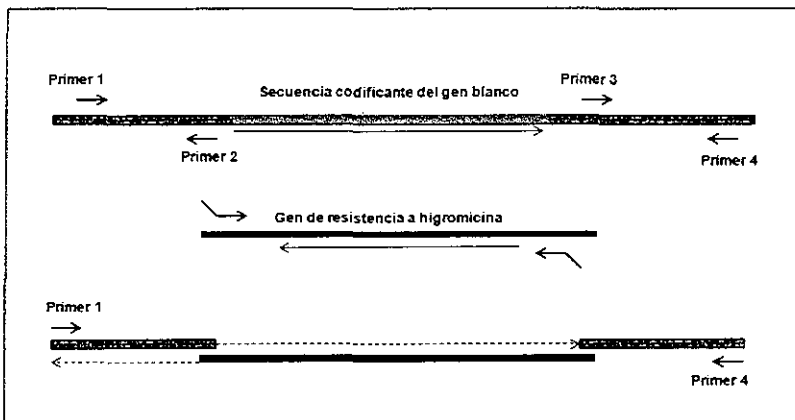


Figura 2. Construcción de un módulo para la sustitución génica mediante PCR en tres pasos.



## II. ANTECEDENTES

Las levaduras han sido empleadas como sistemas para responder preguntas básicas de la biología de los eucariotas como son la expresión y regulación génica además de ser utilizadas para la expresión de proteínas heterólogas. A pesar de que la mayoría de los estudios se han centrado en *S. cerevisiae*, esta levadura produce proteínas recombinantes con algunas desventajas; debido a esto, la ingeniería genética de levaduras que no son *S. cerevisiae* ha venido en aumento tanto para fines de investigación académica como de aplicación industrial (**Wang et al, 2001**).

Tal es el caso de *S. kluyveri* que cuenta con una alta tasa de rendimiento en cuanto a la producción de proteínas recombinantes. El grupo de Møller, (**Møller y Tidemand, 2001**) transformó a *S. kluyveri* mediante la inserción de un plásmido multi copia que contiene el gen *PEP4* que codifica para la proteinasa A de *S. cerevisiae* con el fin de evaluar la capacidad de *S. kluyveri* para la producción de proteínas heterólogas. En el estudio determinaron que *S. kluyveri* tiene un rendimiento 50% mayor que *S. cerevisiae* durante el crecimiento en glucosa. Se ha sugerido que esta capacidad se deba quizá a diferencias en el metabolismo ya que *S. kluyveri* respira mayoritariamente a diferencia de *S. cerevisiae* que tiene una fuerte tendencia a fermentar la glucosa a etanol aún bajo condiciones aeróbicas (**Møller y Langkjaer 2004**).

Por su parte *D. hansenii* al ser un organismo catalogado como halotolerante, más aun catalogado como amante de la sal, ha recibido especial atención de numerosos grupos de investigación los cuales han demostrado que el sodio no es tóxico para esta levadura. **Catarina Prista et al (1997)** reportaron que al incrementar las concentraciones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$  en *S. cerevisiae* y *D. hansenii*, se inhibía el crecimiento de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* por ambos iones; sin embargo, para *D. hansenii* se inhibía su crecimiento únicamente por  $\text{Li}^+$  y no por  $\text{Na}^+$ . A pesar de las diferencias de los grupos de investigación al medir las concentraciones de iones internos, todos ellos están de acuerdo de que en presencia de sal *D. hansenii* crece mejor y acumula más  $\text{Na}^+$  interno que *S. cerevisiae* (**González - Hernández et al., 2004; Neves et al., 1997; Prista et al., 1997**).

Otros grupos de investigación se han enfocado en caracterizar la función de genes de *D. hansenii* que puedan estar involucrados con la resistencia de este organismo a altas concentraciones de sal y pH. Como es el caso de *DhNHX1* un gen ortólogo al transportador de  $\text{Na}^+$  *NHX1* de *S. cerevisiae*. **Carcia-Salcedo et al (2007)** clonaron el gen *DhNHX1* en un plásmido y transformaron una cepa mutante de *S. cerevisiae* que carecía de sus propios transportadores de sodio *ENA1*, *ENA4*, *NHA1* y *NHX1* (ya que se ha demostrado que la delección de dichos genes causa hipersensibilidad a  $\text{Na}^+$  en esta levadura (**Benito et al, 2002; Haro et al, 1991**)). La cepa transformada recobró la tolerancia a los cationes además de la capacidad de acumular  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  en vacuola. Un esfuerzo dirigido a transformar a *D. hansenii* fue el que llevaron a cabo **Ricaurte y Govind en 1999**. Ellos reportaron la transformación de *D. hansenii* por electroporación al incorporar un plásmido autoreplicativo;

sin embargo, hasta la fecha no se ha reportado ningún avance adicional en el tema por parte de este grupo de investigación. Durante el desarrollo de este trabajo, se reportó la primera transformación de *D. hansenii* por recombinación homóloga realizada por el grupo de **Minhas et al (2008)**, al irradiar células de *D. hansenii* con luz UV crearon una mutante auxotrófica de histidina. Posteriormente, amplificaron el gen *HIS4* (con sus regiones UTR 5' y 3') y lo clonaron en pGEM (pGEM-HIS4). Dicho plásmido se utilizó para la transformación mediante electroporación para después seleccionar a las levaduras que tenían la capacidad de crecer en un medio sin histidina.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existe un interés creciente por especies de levaduras diferentes a *S. cerevisiae* con características muy atractivas sobre la levadura del pan, tal es el caso de *D. hansenii* y *S. kluyveri* ambas levaduras se han utilizado tanto para el conocimiento básico de su metabolismo como para fines de aplicación práctica. Hasta el momento sólo se han transformando a *D. hansenii* y *S. kluyveri* mediante la inclusión de plásmidos auto replicativos lo cual limita en gran medida su experimentación ya que este tipo de transformación no permite la interrupción de genes debido a que la secuencia de DNA foráneo no se inserta dentro del genoma de la levadura (Ricaurte y Govind, 1999; Moller y Tidemand, 2001).

Así la elaboración de cepas mutantes en estas especies de levaduras, permitirá estudiar los genes de *S. kluyveri* y *D. hansenii* en su propio contexto sin la necesidad de expresarlos heterológamente en *S. cerevisiae*, además de caracterizar la función de los genes involucrados en la resistencia a Na<sup>+</sup> en *D. hansenii* o llevar a cabo la producción de proteínas recombinantes con alto rendimiento en *S. kluyveri*. Por lo que un protocolo que nos permita llevar a cabo la interrupción de genes y/o la inserción de secuencias foráneas dentro del genoma de ambas levaduras de manera rutinaria, rápida y eficaz es fundamental. Cabe mencionar que dicha metodología para transformar estas dos especies de levaduras no puede ser la misma que se usa para *S. cerevisiae* ya que esta levadura tiene una frecuencia de recombinación homóloga muy alta y para otras especies de hongos se desconoce la frecuencia de este evento.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

*D. hansenii* y *S. kluyveri* son levaduras que tiene un alto potencial en el área de la biotecnología y la investigación básica; sin embargo, han sido poco exploradas debido a la escasez de herramientas moleculares que nos permitan su utilización. En los últimos años se ha incrementado el número de grupos de investigación interesados en dichas levaduras, tan es así, que se ha reportado la delección de genes en ambas levaduras, esto mediante vectores autoreplicativos e integrativos. Sin embargo, es necesario crear técnicas que nos permitan obtener módulos de interrupción génica de manera rápida para evitar los numerosos y tardíos pasos de clonación imprescindibles al utilizar vectores comunes.

## V. HIPÓTESIS

- Se pueden construir módulos de interrupción génica para *D. hansenii* y *S. kluyveri* mediante la técnica de PCR en tres pasos.

## VI. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

- Construir módulos de interrupción génica para dos especies de levaduras: *Debaryomyces hansenii* y *Saccharomyces kluyveri*.

### 6.2 Objetivos específicos

- Evaluar la sensibilidad de ambas especies de levaduras a los antibióticos, nourseotricina, geneticina e higromicina.
- Determinar los genes a interrumpir.
- Diseñar oligonucleótidos para la interrupción de los genes.
- Obtener ADN genómico y ADN plasmídico de calidad.
- Amplificar mediante PCR los fragmentos individuales de cada gen.
- Construir por PCR el módulo de interrupción para cada gen.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Medios de cultivo

#### YPD

El medio de cultivo líquido YPD es un medio rico que contiene: peptona al 2 %, extracto de levadura al 1 %, glucosa al 2 %; el medio de cultivo sólido contiene la misma cantidad de peptona, glucosa y extracto de levadura más agar al 2 %. En medio líquido YPD una cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* tiene un tiempo de duplicación de 1.5 horas. En algunos casos utilizaremos este medio adicionando algún antibiótico según se requiera.

#### LB

El medio de cultivo líquido LB es un medio rico para *Escherichia coli* el cual contiene triptona al 1 %, extracto de levadura al 0.5 %, NaCl al 1 % y en ocasiones puede estar adicionando con 100 mg/L de antibiótico según sea requerido. Al medio sólido se le agrega agar al 2 %.

### 7.2 Cepas de laboratorio

Las cepas con las que trabajamos fueron donadas por diversos grupos de investigación.(Cuadro II).

Cuadro II. Cepas de laboratorio empleadas en este estudio

ESPECIE	GENOTIPO RELEVANTE
<i>Debaryomyces hansenii</i> *	WT
<i>Saccharomyces kluyveri</i> **	WT
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	WT( <i>ura3-, leu2-</i> )
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	<i>ure2Δ :: KanMx</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	<i>alt1Δ:: Nat</i>
<i>Candida glabrata</i> ***	<i>mat1Δ::HPH</i>

\* Cepas donadas por el Dr. Alexander de Luna del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO)

\*\* Cepas donadas por la Dra. Alicia González Manjarrez del Instituto de Fisiología Celular (UNAM)

\*\*\* Cepa donada por IDra. Irene Castaño y Dr. Alejandro De Las Peñas del Laboratorio de Microbiología Molecular (IPICYT)

### 7.3 Sensibilidad a antibióticos

Se evaluó la sensibilidad de *S. kluyveri* y *D. hansenii* a tres antibióticos diferentes, geneticina que es el antibiótico al que confiere resistencia el módulo *KanMX*, nuorseotricina al que el módulo *NAT* confiere resistencia, e higromicina ya que el gen *Hph1* confiere la resistencia a este antibiótico. En *S. cerevisiae* se han reportado como las concentraciones letales: 100 µg/ml de nuorseotricina, 200 µg/ml de geneticina y 150 µg/ml de higromicina. Para nuestros fines, se efectuaron bioensayos en medio rico YPD adicionando concentraciones ascendentes de cada antibiótico (Cuadro III). Para los tres antibióticos se



usó a la cepa silvestre de *S. cerevisiae* como control negativo y como controles positivos a la mutante de *S. cerevisiae ure2Δ::KanMX* para geneticina, a la mutante de *S. cerevisiae alt1Δ::NAT* para nourseotricina y a la mutante de *Candida glabrata mat1Δ::HPH* para higromicina. Además para higromicina se utilizó un control negativo extra la cepa silvestre de *Candida glabrata*.

**Cuadro III.** Concentraciones de antibiótico para bioensayos de resistencia/sensibilidad.

ANTIBIÓTICO	1	2	3	4	5	6
µg/ml						
Geneticina	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml	250 µg/ml	300 µg/ml
Nouseotricina	25 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	125 µg/ml	150 µg/ml
Higromicina	50 µg/ml	100 µg/ml	200µg/ml	300µg/ml	400 µg/ml	-----

Se creció un cultivo celular para cada cepa en 50 ml de YPD durante 24 hrs a 28 °C en agitación constante (200rpm), se tomó una alícuota y se midió a una  $DO_{600nm}$  en el espectrofotómetro para efectuar las diluciones pertinentes de tal manera que pudimos obtener un cultivo final de  $DO_{600nm} = 0.8$ . A partir de este cultivo se llevaron a cabo 4 diluciones logarítmicas de cada cepa de las cuales se gotearon 3 µl de cada dilución en las cajas de YPD con diferentes concentraciones de antibiótico. Los goteos se mantuvieron a 28 °C durante 96 hrs registrando el crecimiento de las cepas por fotografías transcurridas las 24, 72 y 96 hrs.

## 7.4 Plásmidos

Se llevó a cabo la extracción de diferentes plásmidos. El plásmido pUG6 que contiene el gen  $Kan^R$  el cual confiere resistencia al antibiótico geneticina, el plásmido pSH47 que contiene la Recombinasa Cre la cual permite recuperar el marcador de selección *KanMX* (Guldener, 1996), el plásmido pIC29 que cuenta con un módulo transponible y el plásmido pRS426 que contiene el gen *Hph1*, que confiere resistencia a higromicina. (Gritz y Davies, 1983).

### 7.4.1 pUG6

El plásmido pUG6 tiene 4009 pb y contiene el marcador de selección  $Amp^R$  que permite seleccionar bacterias transformantes en ampicilina. Además posee el gen de *KanMX* proveniente del transposón Tn903 de *E. coli*, que al ser expresado en levadura confiere resistencia a geneticina (aminoglicosida G418). El gen *KanMX* de este plásmido está fusionado a una secuencia promotora y terminadora TEF del hongo filamentoso *Ashbya gossypii*, que permite la expresión del mismo en levaduras. El módulo *KanMX* del plásmido pUG6 está flanqueado por dos sitios de corte *loxP* los cuales son reconocidos por el sistema de recombinación del bacteriófago P1 (recombinasa Cre) para poder llevar a cabo la escisión del marcador *KanMX* por recombinación (Guldener y Heck, 1996) (Figura 3).

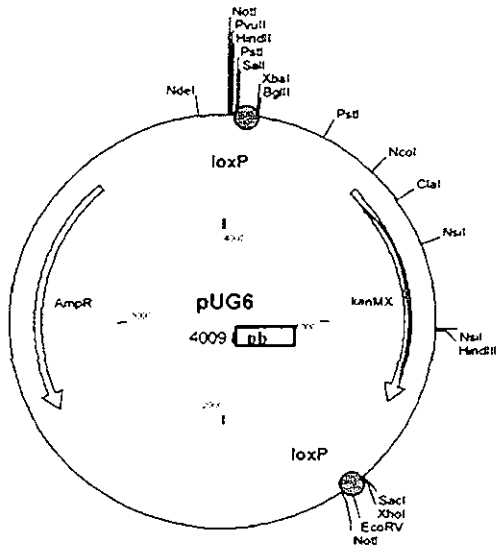


Figura 3. Esquema del plásmido pUG6.

#### 7.4.2 pSH47

El plásmido pSH47 lleva el gen para la recombinasa *Cre* que reconoce los sitios *loxP* y mediante recombinación homóloga entre los dos sitios remueve el marcador de *KanMX* dejando únicamente una marca *loxP* en el *locus* del gen escindido. Esto resulta muy útil debido a que el número de marcadores genéticos es limitado, por lo que procedimientos que nos permitan el rescate de marcadores es muy importante (Guldener, 1996) (Figura 4).

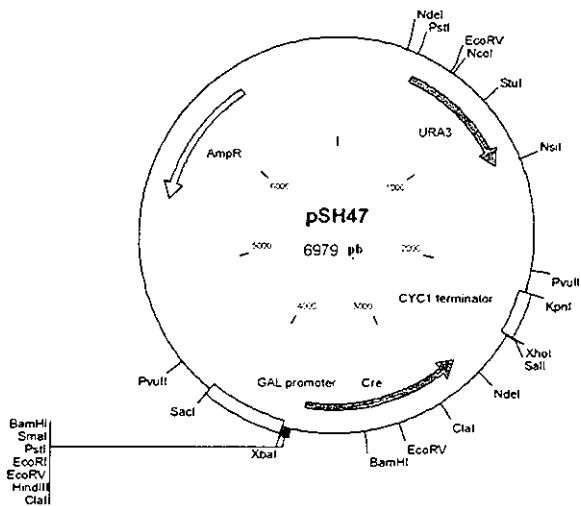


Figura 4. Esquema del plásmido pSH47

### 7.4.3 Plásmido pIC29

El plásmido pIC29 de 7199 pares de bases contiene el módulo transponible Tn7 el cual es reconocido por la enzima transposasa. Dicha enzima es capaz insertar el módulo Tn7 azarosamente en cualquier DNA aceptor. El módulo transponible contiene un origen de replicación de *E. coli*, el gen de *KAN1* que le confiere a *E.coli* resistencia a kanamicina . Además cuenta con el gen *HPH1* que a las levaduras les confiere la capacidad de crecer en el antibiótico higromicina (**Castaño I, datos no publicados**)(Figura 5).

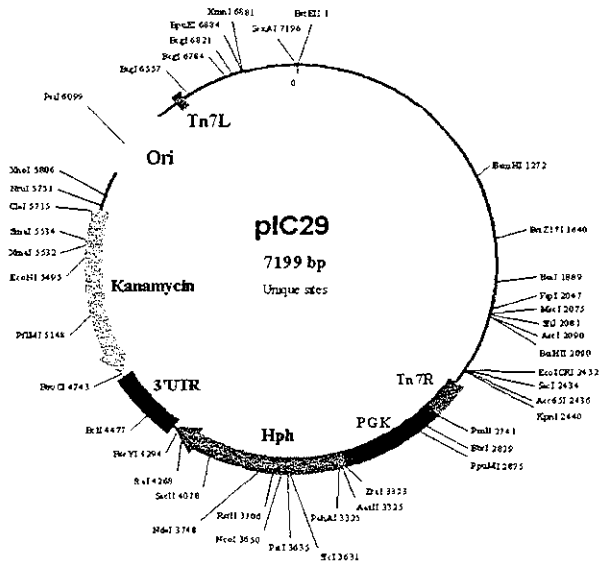


Figura 5. Esquema del plásmido pIC29

#### 7.4.4 Plásmido pRS426

El plásmido pRS426 de 5726 pb tiene el origen de replicación de levadura 2 micrones, el gen *URA3* para la biosíntesis de uracilo, el origen de replicación para bacteria y el gen *lacZ* para seleccionar bacterias transformantes *E. coli* además cuenta con un sitio de clonación múltiple en *lacZ* (Sikorski y Hieter, 1989) (Figura 6).

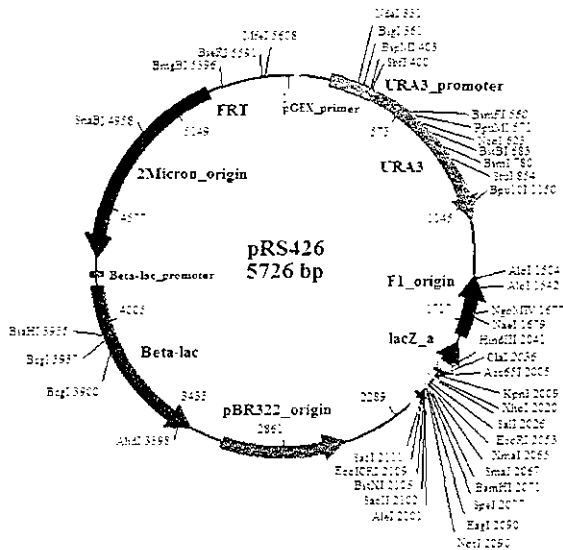


Figura 6. Esquema del plásmido pRS426

## 7.5 Producción de pUG6 y pSH47 en *E. coli*

En el laboratorio se cuenta con los plásmidos pSH47y pUG6 provenientes de una extracción anterior; sin embargo, requeríamos mayor cantidad de éste, de tal manera que se produjo heterológamente en bacterias de *E. coli*.

En cuanto a los plásmidos, pIC29 y pSH47 se encuentran salvaguardados en bacterias *E. coli* a  $-80^{\circ}\text{C}$  por lo que no fue necesario llevar a cabo procesos previos de transformación.

### **7.5.1 Transformación de *Escherichia coli* por temperatura con pUG6 y pSH47**

Bacterias *E. coli* tratadas previamente con  $\text{CaCl}_2$  fueron transformadas mediante choque térmico con el ADN plasmídico de pUG6 y de pSH47.

Se incubaron 100  $\mu\text{l}$  de células competentes con 10  $\mu\text{l}$  de ADN plasmídico durante 15 minutos en hielo. Posteriormente se dió un choque térmico a 42 °C por 2 minutos y después se incubaron durante 1 minuto en hielo. Se recuperaron las células en 1 ml de medio LB y se mantuvieron por 45 minutos a 37 °C, se platearon en cajas de LB con carbenicilina al 1%, y se incubaron las cajas a 37 °C durante 24 horas.

### **7.5.2 Selección de las colonias transformantes**

Transcurridas las 24 horas seleccionamos 10 colonias transformantes las cuales se platearon en parches; una sola colonia se estría en una área de aproximadamente 2 cm en medio de selección LB + 1% de carbenicilina manteniendo el cultivo durante 24 hrs a 37 °C. A partir de las colonias que crecieron exitosamente se les extrajo el DNA plasmídico.

### **7.6 Extracción de DNA plasmídico pUG6 y pSH47**

La extracción del DNA plasmídico de pUG6 y pSH47 se llevo a cabo con dos protocolos, TEN-MINIPREPS y por medio del kit comercial MINI-PREP de MO BIO Inc.

### 7.6.1 TEN-MINIPREPS

TEN-MINIPREPS es un protocolo de extracción rápido para determinar si las células provenientes de la transformación cuentan o no con el plásmido en su interior; sin embargo, en ocasiones es necesario purificar las muestras provenientes de este tipo de extracción ya que suele acarrear ARN y proteínas dificultando la visualización de moléculas menores a 1000 pb en el gel de agarosa. El ADN plasmídico proveniente de este tipo de extracción fue el que se utilizó para el análisis de restricción.

#### PROTOCOLO TEN MINIPREPS

1. Se centrifugan las células a 3000 rpm por 5 minutos para desechar el sobrenadante y recuperar la pastilla.
2. Se le agrega 100  $\mu$ l de agua destilada estéril para resuspender las células al agitar con ayuda del vortex.
3. Se adicionan 300  $\mu$ l del buffer TENS, mezclando con vortex para homogenizar.

**Buffer TENS para 40 ml**

NaOH 10 N	0.4 ml
SDS 20 %	10 ml
TRIS-HCl 2 M	0.2 ml
EDTA 0.5 M	0.08 ml
Agua destilada	38.32 ml



4. Se adicionan posteriormente 150  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y se agita en el vortex durante 3 seg.
5. Se centrifuga durante 2 minutos a 13 000 rpm para que las células y el DNA genómico formen un botón.
6. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se mezcla con 900  $\mu$ l de etanol 100% frío (previamente enfriado a -20 °C)
7. Se centrifuga por 2 min a 13 000 rpm y se descarta el sobrenadante.
8. Se lava el botón con 1 ml de etanol al 70% frío y se deja secar el botón frente a un mechero durante una hora.
9. Se resuspende el botón en 50  $\mu$ l de agua milliQ estéril.

## 7.6.2 MINI-PREP

Para obtener un ADN plasmídico de mayor pureza se utilizó el kit de UltraClean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep de los laboratorios MO BIO Inc. Se realizó la extracción de pSH47 y pUG6; ya que el DNA plasmídico de pUG6 obtenido mediante este protocolo, se utilizó para la amplificación del gen Kan<sup>R</sup> y la clonación del mismo en bacterias de *E. coli*.

### 6 Minute Mini Plasmid Prep

1. Se crece el cultivo celular a una densidad  $D_{600nm} = 2$  o mayor

2. Se agregan 2ml de cultivo en un tubo de 2 ml, y se centrifuga durante 1 min a 13000 rpm. Se descarta el sobrenadante, para agregar más cultivo al mismo tubo y se vuelve a centrifugar, repitiendo esto hasta centrifugar los 4 ml del cultivo.
3. Se remueve todo el líquido visible con ayuda de la pipeta.
4. Se agregan 50  $\mu$ l de la solución 1 al botón celular.
5. Se resuspende el botón con ayuda del vortex a la máxima velocidad durante 1 min, esto para eliminar todos los grumos.
6. Se agregan 100 $\mu$ l de la solución 2 y se mezcla ligeramente por inversión una sola vez.
7. Se agregan 325  $\mu$ l de la solución 3 invirtiendo ligeramente una vez para mezclar.
8. Se centrifuga 1 min a 13 000 rpm.
9. Se decanta el sobrenadante a la columna.
10. Se centrifuga 30 seg a 13 000 rpm.
11. Se agregan 300  $\mu$ l de la solución 4 a la columna
12. Se retira la columna del tubo colector, se elimina el líquido del tubo colector y se vuelve a insertar la columna.
13. Se agregan 300  $\mu$ l de la solución 4 dentro de la columna filtradora.
14. Se centrifuga 30 seg a 13 000 rpm descartando el líquido del tubo colector y se centrifuga otra vez 5 segundos.
15. Se traspasa la columna a un nuevo tubo colector agregando 50  $\mu$ l de la solución 5.
16. Se centrifuga 30 segundos a 13 000 rpm, se remueve la columna, el DNA plasmídico se encuentra en el tubo colector.

## 7.7 Purificación del DNA plasmídico

Cuando la extracción del DNA plasmídico no era lo suficientemente pura se llevo a cabo el protocolo de Fenol-Cloroformo-Isoamílico para eliminar RNA y proteínas.

### FENOL-CLOROFORMO-ISOAMÍLICO

1. Se agrega un volumen de Fenol-Cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 y se agita en el vortex durante 15 segundos
2. Se centrifugan durante 2 minutos a 13 000 rpm, recuperando la fase superior que es la que tiene el DNA plasmídico; esto se repite tres veces teniendo especial cuidado en no tocar las otras fases ya que estas son proteínas y RNA.
3. Posteriormente, se agregan dos volúmenes y medio de etanol al 100% frío y se mezcla por inversión.
4. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga 10 min a 13 000 rpm para descartar el sobrenadante.
5. Se lava el botón con 1 volumen de etanol al 70% frío, se deja secar y se resuspende en 40  $\mu$ l de TE (Tris y EDTA) 10mM.

## 7.8 Extracción de ADN plasmídico pIC29 y pRS426

Debido a que estos plásmidos son los que se usaran para llevar a cabo la mutagénesis basada en la reacción enzimática de la transposasa Tn7, era necesario una extracción y purificación de mayor calidad, de modo que las sustancias utilizadas no intervinieran con los

reactivos de la reacción de mutagénesis , es por esto, que se realizó una purificación de DNA plásmidico a mediana escala mejor conocido como midipreps mediante el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System de Promega Corporation.

#### PROMEGA MIDI-PREP

1. En 50 ml de medio LB con carbenicilina 1% se creció un cultivo celular con bacterias *E. coli* pIC29 y pSH47 transformantes durante toda la noche a 37°C en agitación constante.
2. Se tomó 1 ml de muestra y se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro a 600 nm esperando obtener una lectura entre 2 y 4.
3. Las células fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante.
4. Se resuspendieron las células en agua estéril.
5. Se agregó la solución de lisis invirtiendo el tubo 3 veces.
6. Se centrifugó el lisado a 13 000 rpm durante 15min, al formarse el botón se transfirió a la columna.
7. La columna fue instalada en el equipo de vacío y se hizo pasar el liquido a través de la membrana de la columna, adhiriéndose el DNA plasmídico a dicha membrana.
8. Se agregaron 5 ml de la solución "Endotoxin Removal" a la columna y se volvió a aplicar vacío.
9. Se lavó la membrana con 20 µl de la solución de enjuague al aplicar vacío durante 1 min.

10. Para eluir el DNA plasmídico se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml y se agregaron 500  $\mu$ l de agua estéril se aplicó el vacío 1 min para hacer pasar el líquido a través de la membrana.

### 7.9 Análisis de restricción y verificación del ADNplasmídico

Una vez extraído y purificado el ADN plasmídico se efectuó la construcción del mapa de restricción para cada plásmido con ayuda de la base de datos yeastgenome, dichas enzimas nos permiten tanto linearizar los plásmidos como obtener 2 fragmentos de fácil visualización (Figura 7).

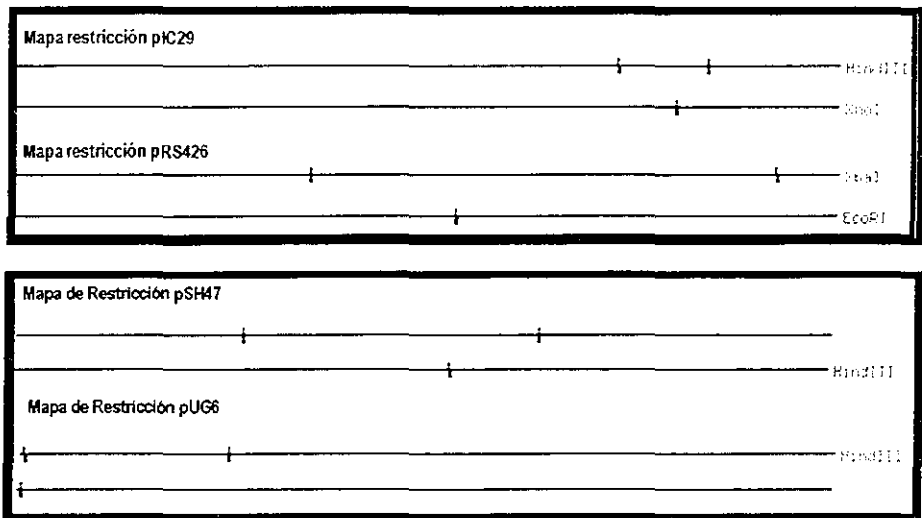


Figura 7. Mapa de restricción de pIC29, pRS426, pUG6 y pSH47.

Se encontraron 4 diferentes enzimas que nos permitían digerir y linearizar los plásmidos obteniendo fragmentos mayores a 1000 pb (Cuadro III).

**Cuadro III.** Fragmentos esperados al digerir los plásmidos

	LINEARIZAR	DIGERIR
pUG6	<i>Pvu II</i> 1. 4009pb	<i>Hind III</i> 1. 1009pb 2. 3000pb
pSH47	<i>Hind III</i> 1. 6978pb	<i>Pvu II</i> 1. 2528 2. 4450
pIC29	<i>Xho I</i> 1. 7202	<i>Hind III</i> 1. 778 2. 6424
pRS426	<i>Eco RI</i> 1. 4675	<i>Xba I</i> 1. 2122 2. 2553

Cada reacción se llevó a cabo en 20  $\mu$ l totales conteniendo 4  $\mu$ l de plásmido 50 ng/ $\mu$ l, 2  $\mu$ l del buffer correspondiente, 1  $\mu$ l de la enzima correspondiente y 13  $\mu$ l de agua milliQ estéril.

### 7.10 Análisis de los genes a interrumpir

Para la búsqueda de los genes biosintéticos de *S. cerevisiae* ortólogos a *D. hansenii* y *S. kluyveri* utilizamos las siguientes bases de datos:

- <http://www.yeastgenome.org>
- <http://cbl.labri.fr/Genolevures>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

En la base de datos de yeastgenome se descargó la secuencia de los genes biosintéticos *HIS3*, *LEU2*, *URA3*, *TRP1*, *ADE2* de *S. cerevisiae*. De estos mismos genes se realizó la búsqueda de sus ortólogos en *S. kluyveri* y *D. hansenii* con la base de datos NCBI y Genolevures, encontrando genes putativos de *LEU2*, *HIS3* y *URA3* en *D. hansenii* y *HIS3* y *LEU2* en *S. kluyveri*. Posteriormente con los genes encontrados y con ayuda del programa BIOEDIT se realizó un BLAST de aminoácidos entre *S. cerevisiae* y *D. hansenii* y entre *S. cerevisiae* y *S. kluyveri*, encontrado un alto grado de similitud para las secuencias putativas de *LEU2* y *HIS3* en *S. kluyveri* y *HIS3* y *URA3* en *D. hansenii* (Ver apartado de resultados figura 24).

De los genes ortólogos encontrados se procuró descargar el ORF (por sus siglas en inglés, Open Reading Frame) y 1 Kb en el extremo 5'UTR y 3' UTR del gen endógeno.

### 7.11 Diseño de oligonucleótidos

Para cada gen, se diseñaron seis oligonucleótidos, para construir el módulo de interrupción. El **1**, es un oligonucleótido sentido del extremo 5', el **2** es un oligonucleótido híbrido antisentido del extremo 3' que tiene una cola homóloga al marcador genético, el **3** es un oligonucleótido sentido que se une al marcador genético en su extremo 5', el **4** es un oligonucleótido antisentido que se une al marcador genético en su extremo 3', el **5** es un oligonucleótido híbrido sentido que se une al extremo 5' del fragmento 3' el cual tiene una cola complementaria al extremo 3' del marcador genético, y el **6** es un oligonucleótido antisentido que se une al extremo 3' del fragmento 3' del gen endógeno (Figura 8).

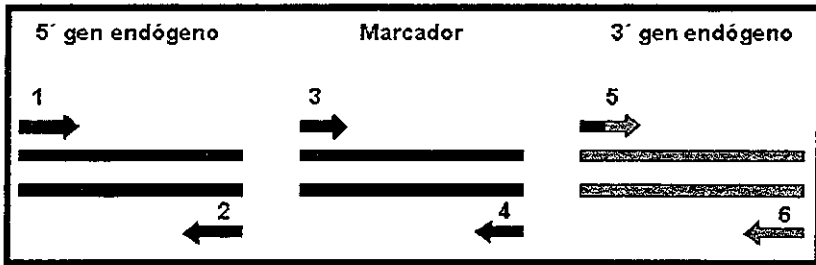


Figura 8. Seis oligonucleótidos diferentes para la técnica de PCR en tres pasos.

Se diseñaron oligonucleótidos anidados para cada gen, esto para una vez obtenida la fusión de los fragmentos de interrupción contar con oligonucleótidos que nos permitan amplificar el módulo completo.

Para obtener temperaturas de alineamiento entre 55 y 65°C de los oligonucleótidos éstos se diseñaron con un porcentaje de guaninas y citocinas superior al 50%, para que la temperatura de alineamiento sea entre 55 a 65°C. Sirviéndonos del software Primer Select de DNASTAR, Inc. nos aseguramos que los oligonucleótidos no forman horquillas, dímeros, ni falsos inicios de polimerización.

## 7.12 Extracción de ADN genómico de levadura

La extracción del ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* y *Debaryomyces hansenii* se llevo a cabo mediante el siguiente protocolo.

1. Se crecieron 10 ml de cultivo (YPD) de levaduras a saturación, a 30 °C y 250 rpm.
2. Se centrifugaron las células 3 min a 3000 rpm, se desecho el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 500 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.
3. Se volvió a centrifugar a 3000 rpm por 5 seg.



4. Se descartó el sobrenadante y se agitó el botón con ayuda del vortex para resuspender.
5. Se adicionaron 200  $\mu$ l de una solución de: TRITON 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8, Na EDTA 1 mM.
6. Se adicionaron 200  $\mu$ l de la solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
7. Se adicionaron 0.3g de perlas de vidrio a cada muestra, agitando con el vortex a la velocidad máxima durante 4 min.
8. Se agregaron 200  $\mu$ l TE10mM pH 8 y se centrifugó por 5 min a 13 000 rpm. Posteriormente se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio, evitando tocar la otra fase.
9. Se adicionó 1 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión 6 veces.
10. Se volvió a centrifugar por 2 min a 14000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 400  $\mu$ l de TE + 3  $\mu$ l de RNAasa\_A (10mg/ $\mu$ l). Se incubó por 5 min a 37 °C.
11. Se adicionaron 10  $\mu$ l de acetato de amonio 4M y 1 ml de etanol al 100%. Mezclando por inversión.
12. Se centrifugó durante 2 min a 14000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 30 min.
13. Se resuspendió con 50  $\mu$ l de TE 10 mM.

Se cargaron 5µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1% y se corrió la muestra a 90 volts durante 30 min, se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó en el fotodocumentador con luz ultravioleta.

### 7.13 Amplificación de los productos de PCR

Una vez obtenido el ADN genómico de nuestras levaduras de estudio además de tener aislado y purificado el plásmido con el marcador genético se llevó a cabo la amplificación de los fragmentos 5' y 3' de los genes endógenos *HIS3* de *S. kluyveri* y *HIS3* de *D. hansenii* así como *URA3* de *D. hansenii* por PCR utilizando los oligonucleótidos previamente diseñados, los cuales nos permitieron obtener fragmentos mayores 1000 pb además, se amplificó el casete de *KanMX* de 1654 pb contenido en el plásmido pUG6.

Cuadro IV. Tamaño de los fragmentos esperados para cada producto de PCR.

PRODUCTO DE PCR	TAMAÑO
5' de <i>D. hansenii</i> <i>HIS3</i>	1058 pb
3' de <i>D. hansenii</i> <i>HIS3</i>	1047 pb
<i>KanMX</i> de <i>D. hansenii</i> <i>HIS3</i>	1654 pb
5' de <i>D. hansenii</i> <i>URA3</i>	970 pb
3' de <i>D. hansenii</i> <i>URA3</i>	1100 pb
<i>KanMX</i> de <i>D. hansenii</i> <i>URA3</i>	1654 pb
5' de <i>S. kluyveri</i> <i>HIS3</i>	690 pb
3' de <i>S. kluyveri</i> <i>HIS3</i>	1225 pb
<i>KanMX</i> de <i>S. kluyveri</i> <i>HIS3</i>	1654 pb

Para la amplificación de los fragmentos individuales mediante PCR se estandarizaron condiciones tanto de cantidad de reactivo como de temperatura de reacción. Los oligonucleótidos se usaron a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , el DNA a 200  $\mu\text{M}$  y se realizó la reacción en un volumen total de 50  $\mu\text{l}$ . Se utilizó la enzima Taq Platinum de Invitrogen con su respectivo buffer 10X y  $\text{MgCl}_2$  50 mM, se estandarizó la cantidad idónea de este cofactor que resultó en 3  $\mu\text{l}$ . Además se determinó la concentración idónea de DNA polimerasa y dntp's 0.25  $\mu\text{l}$  y 1  $\mu\text{M}$  respectivamente, más aún se estandarizó la temperatura de desnaturalización y extensión y en caso de no haber amplificación, se realizó un gradiente de temperatura para determinar la temperatura óptima de alineamiento (Cuadro V). Una vez obtenidos los productos de PCR se tomaron 5  $\mu\text{l}$  de muestra y se corrieron en un gel de agarosa al 1% durante 1 hr a 90 volts, se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio y se visualizó con luz ultra violeta. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb para referenciar los fragmentos esperados.

**Cuadro V.** Condiciones de PCR para los fragmentos de *D. hansenii* HIS3

<b>Segmento</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	<b>93°C</b>	3 min.
.....10 ciclos.....		
Desnaturalización	<b>93°C</b>	45 seg.
Alineamiento	<b>58°C</b>	1 min. 30 seg.
Extensión	<b>68°C</b>	2 min.
.....20 ciclos.....		
Desnaturalización	<b>93°C</b>	45 seg.
Alineamiento	<b>58°C</b>	30 seg.
Extensión	<b>68°C</b>	1 min. 30 seg.*
*Incrementando 10 seg por ciclo.		
Extensión final	<b>68°C</b>	7 min.
	<b>4°C</b>	10min

### 7.14 Purificación productos de PCR

Posterior a la reacción de PCR se cargó el total de la reacción (50 µl) en un gel de agarosa al 1% y se colocó en una cámara de electroforesis con TAE 1X adicionado con bromuro de etidio, se corrió a 70 volts durante 1 hr a una temperatura de 4°C. Se visualizó el gel con luz UV en el transiluminador y se cortaron las bandas esperadas con un bisturí. La purificación de dicha banda se realizó con el kit de Quiagen para purificación de banda. Cada

fragmento se resuspendió en 30  $\mu$ l de Tris 10mM pH8. Por último se cargó en un gel de agarosa para visualizar el producto de PCR posterior a la purificación.

### 7.15 Construcción de un módulo de interrupción mediante PCR en 3 pasos.

Para obtener el módulo de interrupción se llevó a cabo la fusión de los fragmentos individuales mediante una reacción de PCR con un volumen final de 50  $\mu$ l, los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 5 mM, el  $MgCl_2$  a 1.5 mM y los fragmentos purificados se utilizaron en relación 1:2 es decir 2  $\mu$ l de cassette y 1  $\mu$ l del fragmento 5' y 3'. Utilizamos para cada reacción 0.25  $\mu$ l de Taq Platinum realizando hot start al inicio de la reacción, las condiciones de PCR se describen en el cuadro VI.

Cuadro VI. Condiciones de PCR para los fragmentos de *D. hansenii* HIS3

Segmento	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	93°C	2 min.
Desnaturalización	93°C	45seg
Alineamiento	58°C	30min
Extensión	68°C	2 min.
.....		
Extensión final	68°C	7 min.
	4°C	10min.

Se corrió el total de la reacción en un gel de agarosa y se purifico con Quiagen, se resuspendió en 30  $\mu$ l de Tris y se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

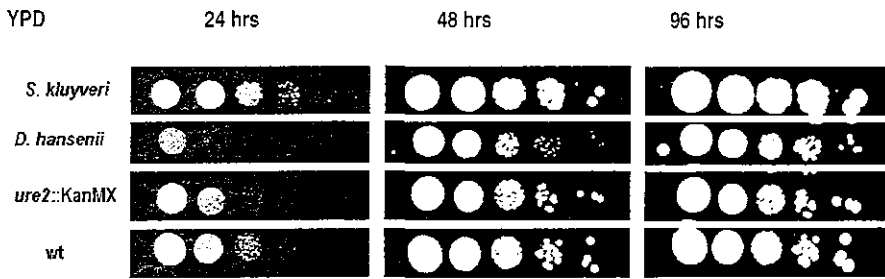
## VIII. RESULTADOS

### 8.1 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

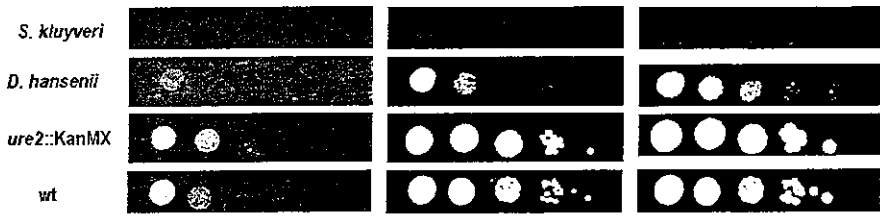
Para evaluar la resistencia de *D. hansenii* y *S. kluyveri* al antibiótico geneticina se gotearon diluciones seriadas de estas cepas en cajas YPD con concentraciones ascendentes de dicho antibiótico. Las células se mantuvieron a una temperatura constante de 28 °C por 96 horas.

#### 8.1.1 Resistencia Geneticina

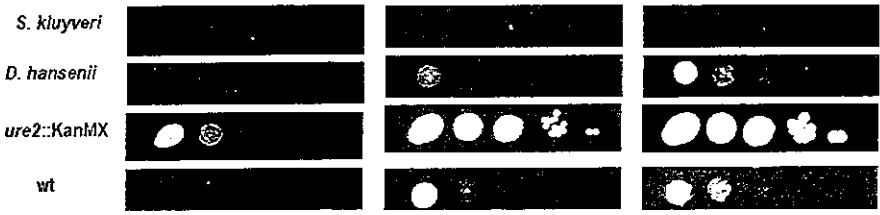
En los ensayos de resistencia a geneticina se observó que la cepa silvestre de *S. cerevisiae* es sensible al antibiótico únicamente a concentraciones mayores a 150 µg/ml; el control positivo, la mutante de *S. cerevisiae* *URE2Δ::KanMX* resultó resistente a la concentración máxima ensayada de 300 µg/ml y para las cepas analizadas en este estudio no hubo crecimiento dentro del intervalo de 150 µg/ml a 300µg/ml , de tal manera que catalogamos a 200 µg/ml de geneticina como la concentración idónea de antibiótico para suprimir el crecimiento de *S. kluyveri* y *D. hansenii* (Figura 9).



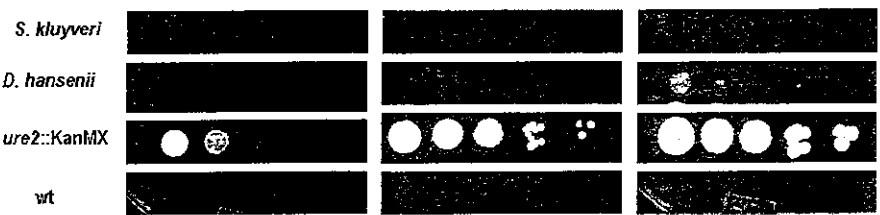
YPD + 50 µg/ml Geneticina



YPD + 100 µg/ml Geneticina

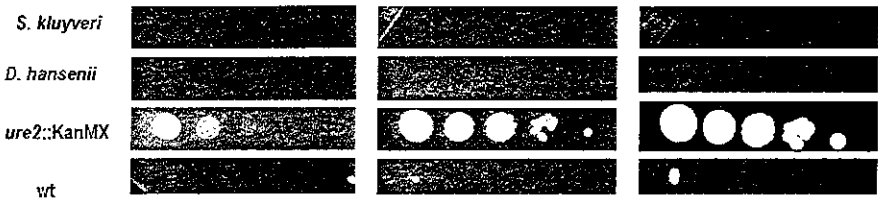


YPD + 150 µg/ml Geneticina

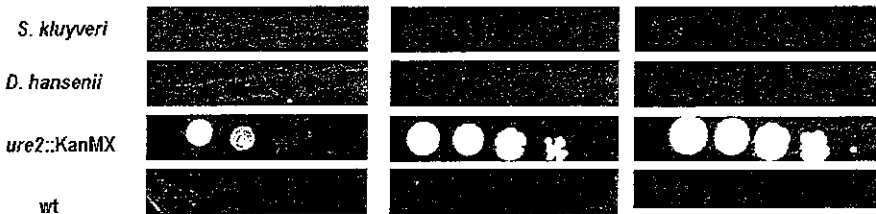




YPD + 200 µg/ml Geneticina



YPD + 250 µg/ml Geneticina



YPD + 300 µg/ml Geneticina

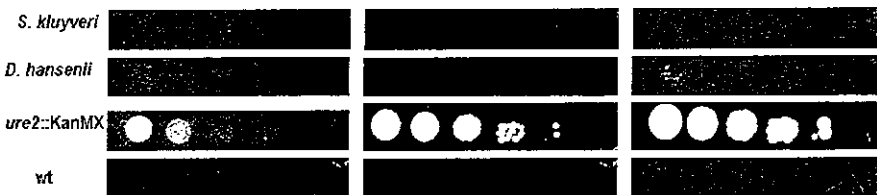
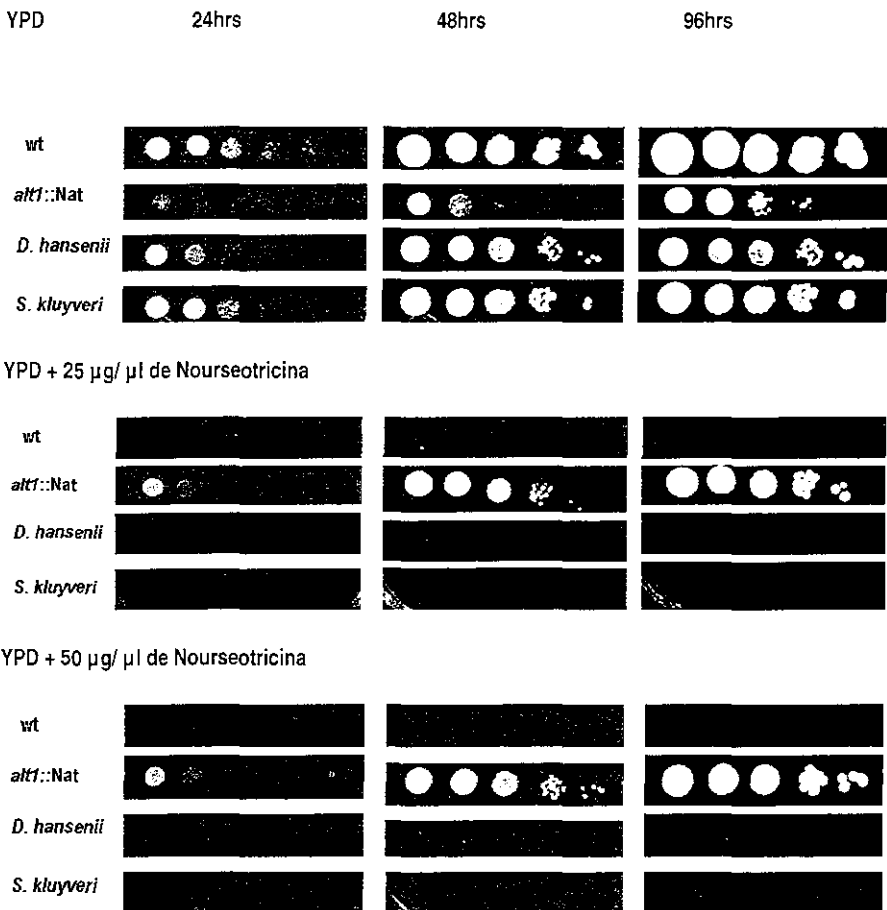


Figura 9. Resultados de goteos para evaluar la sensibilidad/resistencia al antibiótico geneticina de las cepas silvestres de *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces kluyveri* y *Saccharomyces cerevisiae*

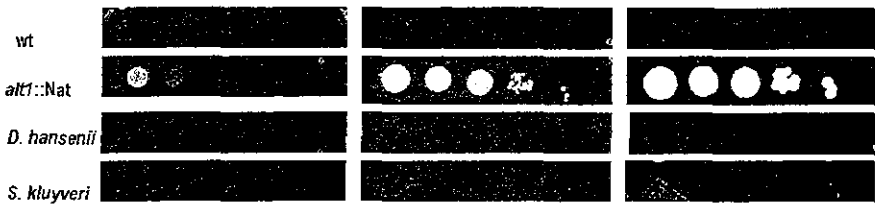
BIBLIOTECA CUCBA

### 8.1.2 Resistencia a Nourseotricina

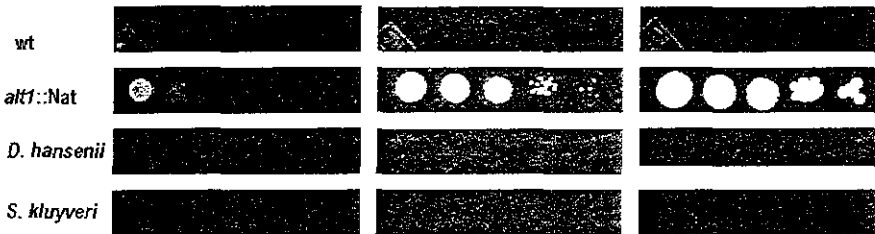
En los ensayos de resistencia a nourseotricina se observó que entre 25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a 150  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  solamente creció el control positivo, la mutante *alt1 $\Delta$ ::NAT* de *S. cerevisiae*. Es por esto que determinamos que 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de nourseotricina es la concentración inhibitoria del crecimiento de *S. kluyveri* y *D. hansenii*. (Figura 10).



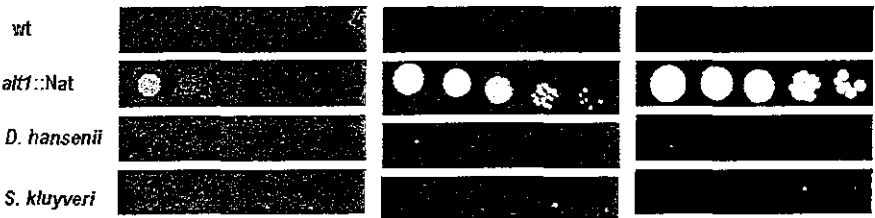
YPD + 75 µg/ µl de Nourseotricina



YPD + 100 µg/ µl de Nourseotricina



YPD + 125 µg/ µl de Nourseotricina



YPD + 150 µg/ µl de Nourseotricina

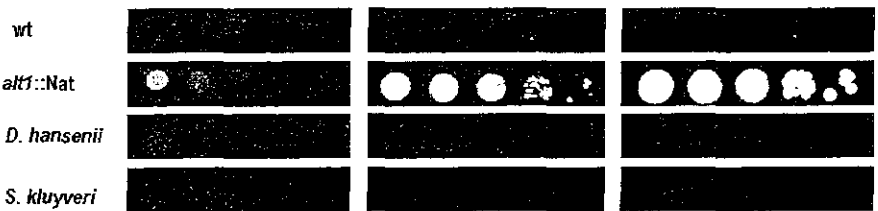
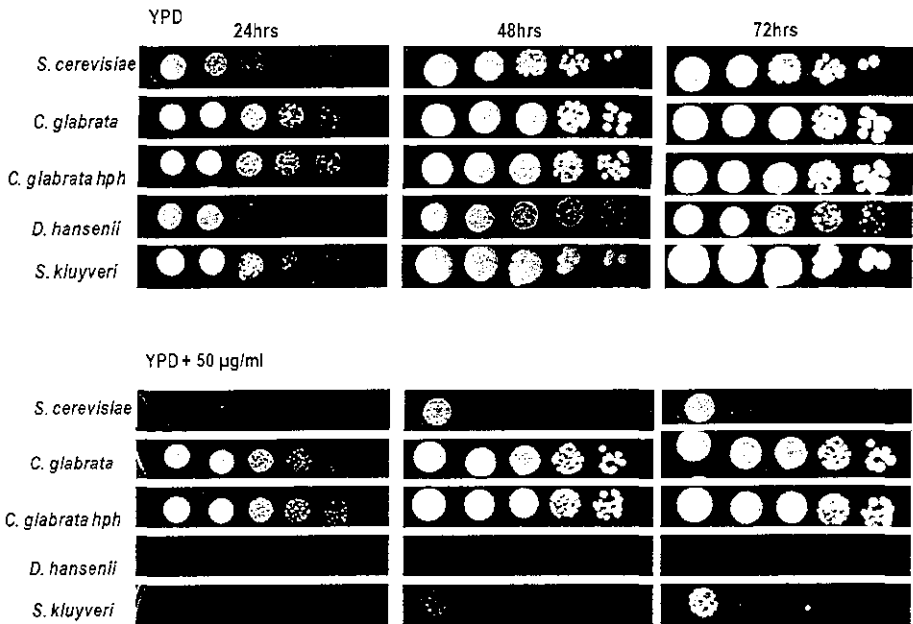


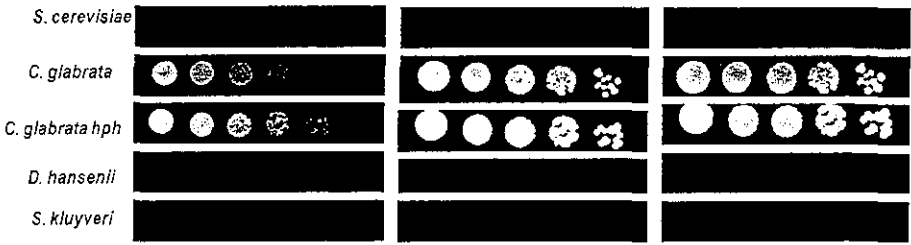
Figura10. Resultados de goteos para evaluar la sensibilidad/resistencia al antibiótico Nourseotricina de las cepas silvestres de *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces kluyveri* y *Saccharomyces cerevisiae*

### 8.1.3 Resistencia a Higromicina.

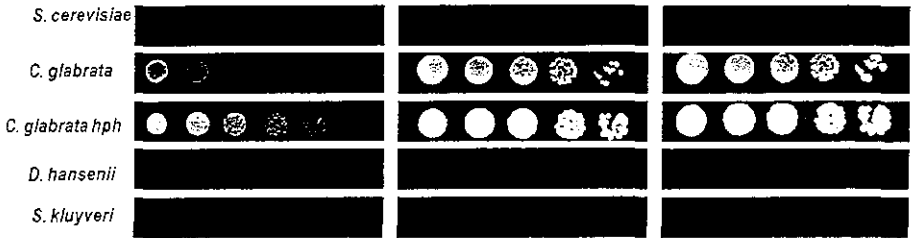
Al evaluar la sensibilidad de las cepas de estudio al antibiótico higromicina se encontró que para la cepa silvestre de *S. cerevisiae* se inhibió su crecimiento a partir de 50 µg/ml; sin embargo, la cepa silvestre de *C. glabrata* pudo crecer normalmente hasta 200 µg/ml y para las cepas de estudio se vio inhibido el crecimiento de *D. hansenii* a 50 µg/ml mientras que para *S. kluyveri* se necesitaron de 100 µg/ml para detener su crecimiento (Figura 11).



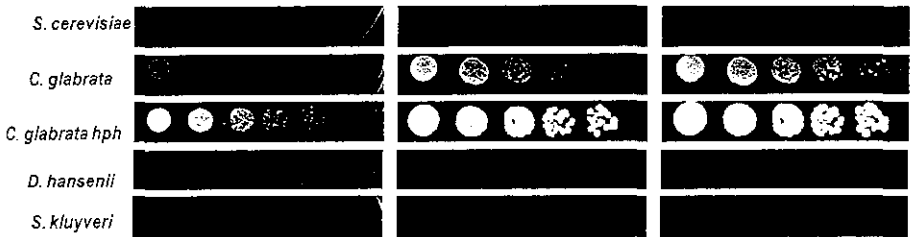
YPD + 100 µg/ml



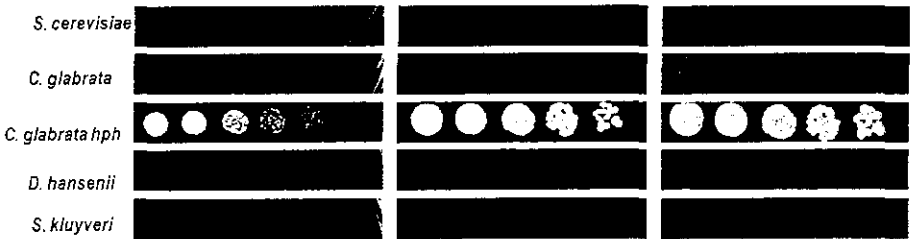
YPD + 200 µg/ml



YPD + 300 µg/ml



YPD + 400 µg/ml



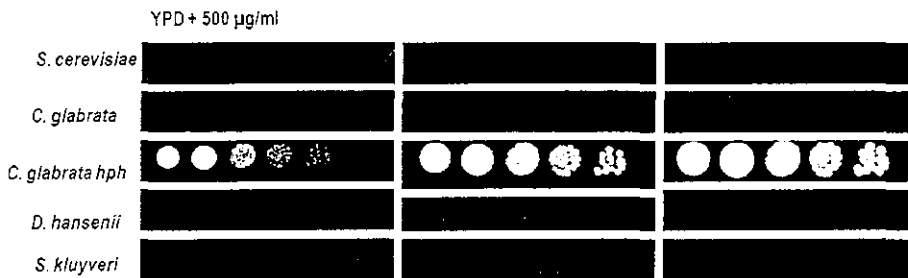


Figura 11. Resultados de goteos para evaluar la sensibilidad/resistencia al antibiótico higromicina de las cepas silvestres de *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces kluyveri* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## 8.2 OBTENCIÓN Y VERIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO pUG6 Y pSH47

### 8.2.1 Producción de pUG6 y pSH47

Al transformar bacterias *E. coli* con los plásmidos pUG6 y pSH47 se obtuvieron colonias transformantes para ambos plásmidos (Figuras 12 y 13).

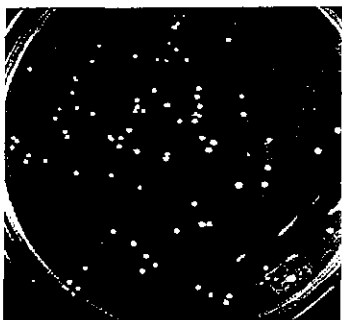


Figura 12. Bacterias *E.coli* transformadas con pUG6

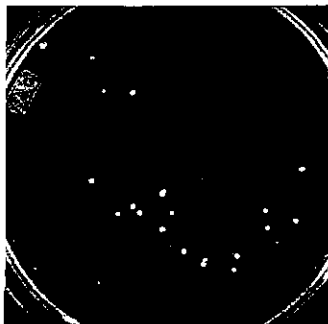


Figura. 13 Bacterias *E.coli* transformadas con pSH47

## 8.2.2 Selección de las colonias transformantes

De las diez colonias transformantes seleccionadas se realizaron parches en medio de selección LB carbenicilina y se obtuvo crecimiento (Figuras 14 y 15).

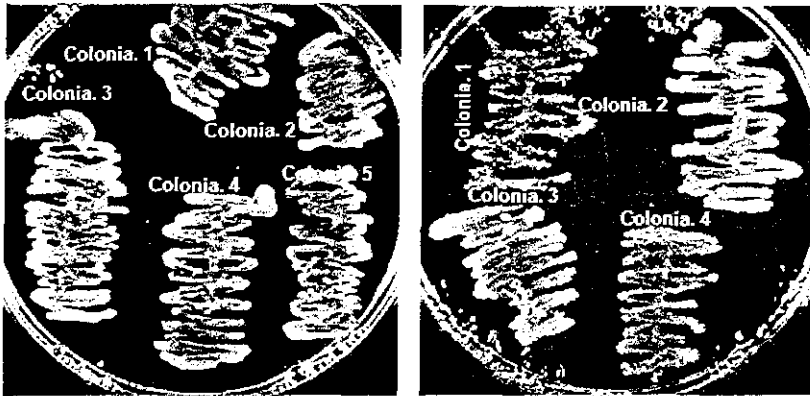


Figura 14. Parches de *E.coli* transformantes con pUG6    Figura. 15 Parches *E.coli* transformantes con pSH47

## 8.3 Extracción de ADN plasmídico

### 8.3.1 Extracción de ADN plasmídico pUG6 y pSH47

Se obtuvo ADN plasmídico de pUG6 y pSH47 mediante el protocolo TEN-MINI PREPS a partir de las colonias de *E. coli* transformantes. En el carril 1 se muestra el marcador de peso de 1 Kb y en los carriles siguientes muestras de DNA plasmídico de 4 colonias transformantes diferentes (Figuras 16 y 17). En ambos geles se observan 3 bandas ya que el

DNA plasmídico adquiere 3 conformaciones diferentes; círculo abierto (OC), lineal y superenrollado (CCC) migrando diferencialmente en el gel de azarosa.

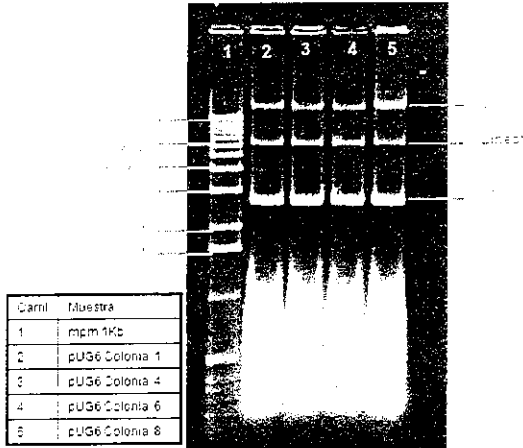


Figura 16. Extracción de pUG6 mediante TEN – MINIPREPS

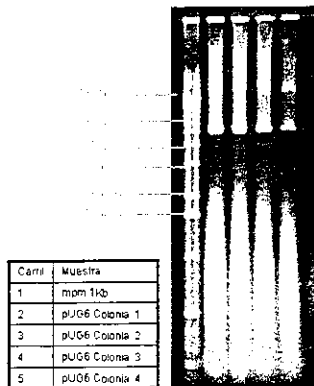


Figura 17. Extracción de pSH47 mediante TEN - MINIPREPS



En las figuras 16 y 17 puede observarse un barrido por debajo de 2000 pb, este barrido corresponde a proteínas y RNA que dificultan la visualización de las bandas en un rango de 100 a 2000 pb de tal manera que se llevo a cabo la purificación de este DNA plasmídico obtenidos de TEN - MINIPREPS siguiendo el protocolo Fenol: Cloroformo: Isoamílico (Figuras 18 y 19); Este DNA plasmídico fue el que se usó para el análisis de restricción.

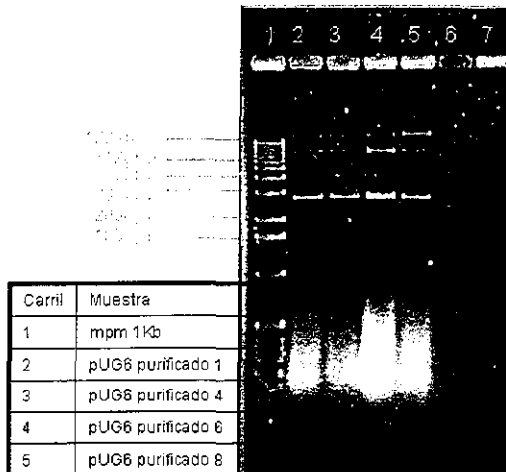


Figura 18. Extracción de pUG6 mediante TEN – MINIPREPS

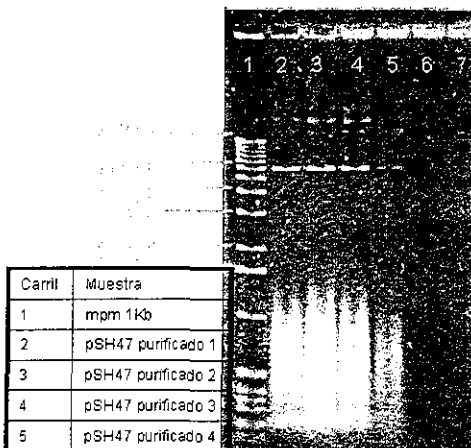


Figura 19. Extracción de pSH47 mediante TEN - MINIPREPS

Para amplificar el casete de *KanMX* contenido en pUG6 se extrajo DNA plasmídico de mayor pureza mediante el kit de UltraClean™ 6 Minute Mini Plasmid Prep. En el primer carril se encuentra el marcador de peso 1Kb y en el siguiente el plásmido pUG6 (Figura 20).

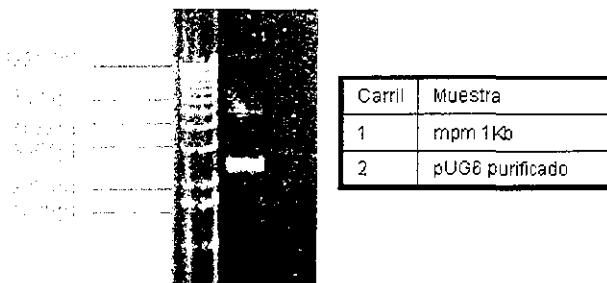


Figura 20. Extracción de pUG6 mediante UltraClean™

### 8.3.2 Extracción de DNA plasmídico pIC29 y pRS426

Se extrajo DNA plasmídico de buena calidad y en mayor cantidad con el kit de Midiprep de Promega. En el primer carril se encuentra el marcador de peso molecular, en el 2° y 3° los plásmidos pRS426 y pIC29 (se pueden observar las diferentes conformaciones OC, lineal y CCC) (Figura 21).

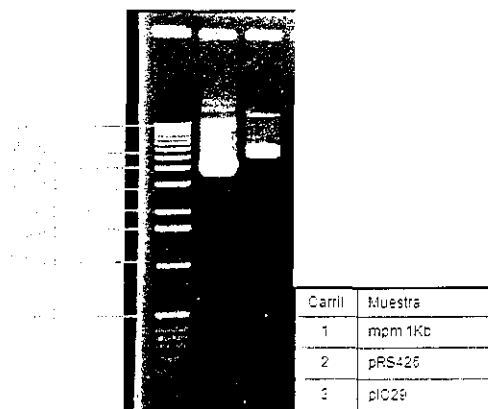


Figura 21. Extracción de pUG6 mediante MINIPREP UltraClean 6 minute, Mo Bio

### 8.3.3 Análisis de restricción

Con el DNA plasmídico obtenido de TEN-MINIPREPS se llevo a cabo el análisis de restricción de pUG6 y pSH47 al digerirlos con *Hind* III y *Pvu* II para confirmar la integridad de ambos plásmidos, este analisis se hizo para dos colonias transformantes diferentes la numero 6 y la 8. En la figura 21 se hace el análisis de restricción para pUG6; al digerir con

*Hind* III se esperaban 2 bandas una de 1009 pb y otra de 3000 pb (ver el carril 2) al linearizar con *Pvu* II se esperaba una banda de 4009 pb (ver el carril 3),. En la figura 22 se analiza a pSH47 en el carril 2 se lineariza con *Hind* III esperando una banda de 6978 pb, en el carril 3 al digerir con *Pvu* II se obtienen las bandas esperadas de 2528 pb y 4450 pb al compararlo con los marcadores de peso del carril 4 y 8 .

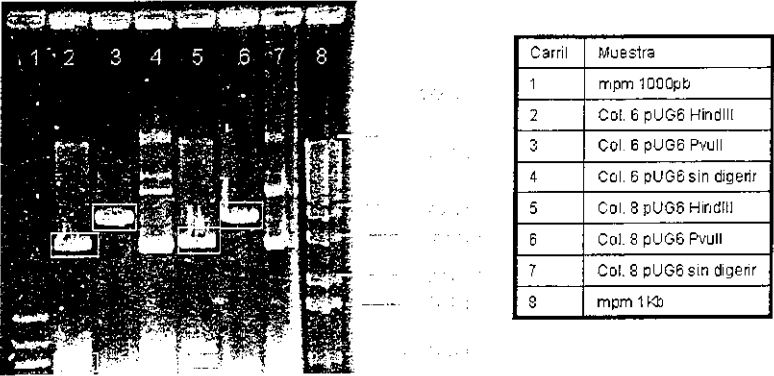


Figura 21. Digestión de pUG6 con las enzimas de restricción *Hind* III y *Pvu* II

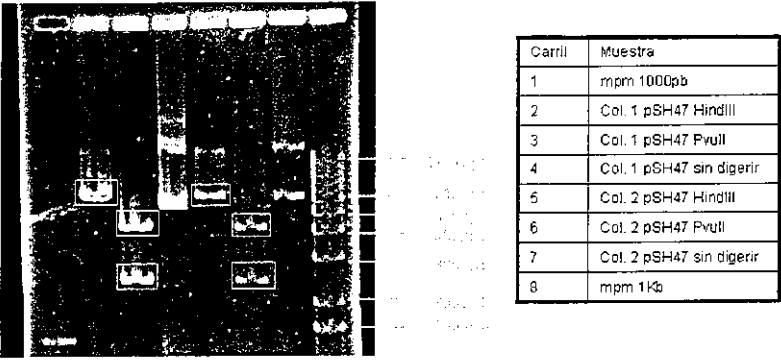


Figura 22. Digestión de pSH47 con las enzimas de restricción *Hind* III y *Pvu* II

Se realizó el análisis de restricción de pIC29 y pRS426 (Figura 23). Al digerir pRS426 con la enzima *Xba* I se obtuvieron seis bandas debido a la digestión parcial, dentro de estas se encuentran las bandas esperadas de 2553 pb y 3212 pb. Para pIC29 se observaron las bandas esperadas de 6085 pb y 1117 pb al digerir con la enzima *Eco* RI.

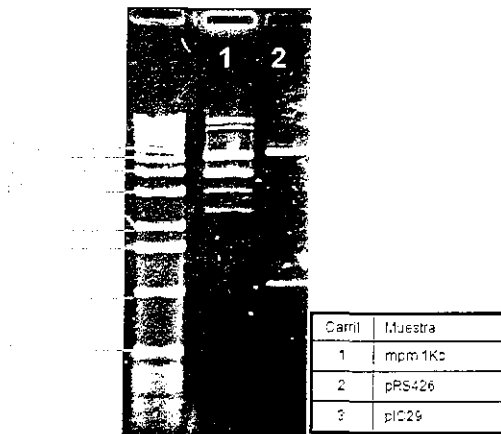


Figura 23. Digestión de pIC29 y pRS426

#### 8.4 ANÁLISIS DE LOS GENES A INTERRUMPIR

Después de descargar las secuencias nucleotídicas de genes ortólogos a *S. cerevisiae* de nuestras cepas de estudio, encontramos 3 genes con alta homología *HIS3*, *URA3* y *LEU2* de los cuales seleccionamos únicamente *HIS3* para *S. kluyveri* y *D. hansenii* y *URA3* para *D. hansenii*. Al realizar el BLAST de aminoácidos de *HIS3* de *S. cerevisiae* contra el putativo *HIS3* de *D. hansenii* encontramos que del 85% de los aminoácidos 74% de ellos son idénticos entre sí; para *URA3* de *S. cerevisiae* contra el putativo *URA3* de *D. hansenii* existe una similitud de aminoácidos de 83% y una identidad del 74%. Finalmente al comparar la

secuencia de aminoácidos del gen *HIS3* de *S. cerevisiae* contra el *HIS3* putativo en *S. kluyveri* encontramos una similitud del 84% y una identidad del 79% (Ver figura 24 donde el prefijo "YOR" y "YEL" corresponden a la secuencias de *S. cerevisiae* y "DEHA" a *D. hansenii*).

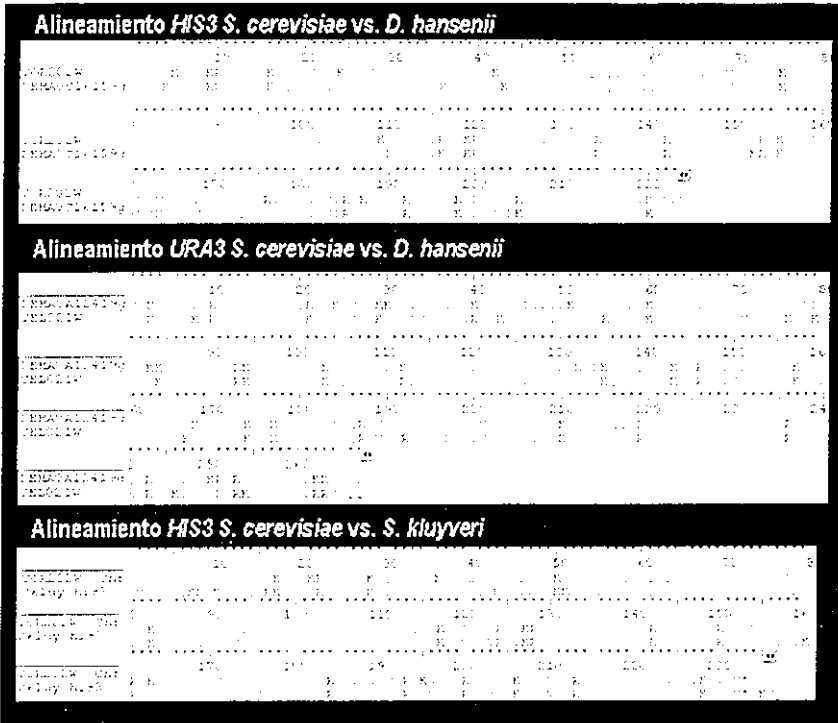


Figura 24. Alineamiento de los genes a interrumpir de *D. hansenii* y *S. kluyveri* comparado con *S. cerevisiae*

### 8.5 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se llevo a cabo el diseño de oligonucleótidos y se calculó su temperatura de alineamiento de cada uno de ellos de acuerdo a como se describe en Materiales y métodos. En el Cuadro VIII se observa las secuencias de los oligonucleótidos donde los oligos 1, 3, 4, y 6 son

oligonucleótidos normales de aproximadamente 20 pb mientras que los 2 y 5 son oligonucleótidos híbridos de 40 pb en los que la parte gris es la que se une al módulo de resistencia KanMx y la parte negra a la secuencia del gen.

Cuadro VIII. Oligonucleótidos, temperatura de alineamiento y secuencia.

Oligonucleótido	Secuencia	T <sub>m</sub> (°C)
D_han_HIS3_1	GCGCTTGGTCTCTCCTCGGG	63.1
D_han_HIS3_2	CGITGCAGTCTTAGCCATCC	67.6
D_han_HIS3_3	CCAGCTGAAGCTTCGTACG	54
D_han_HIS3_4	CGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	57.9
D_han_HIS3_5	CGTTCGAAGTACTAAGGGTG	67.2
D_han_HIS3_6	GTTCCTGGGTCACATTCGCC	58.4
D_han_URA3_1	CCTTGTCTGGGAGGTTCTGACC	60.3
D_han_URA3_2	GCCACAGGAGACGGATGAGC	71
D_han_URA3_3	CCAGCTGAAGCTTCGTACG	54
D_han_URA3_4	CGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	57.9
D_han_URA3_5	GTGCACCTGTCCAAAGACC	69.9
D_han_URA3_6	CCTGACCAGGTGTGCCACC	61.6
S_kdu_HIS3_1	TCAACGCAGCAATCACACTG	53.5
S_kdu_HIS3_2	TCGAGAGTCTCAGAAGACTC	66
S_kdu_HIS3_3	CCAGCTGAAGCTTCGTACG	54
S_kdu_HIS3_4	CGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	57.9
S_kdu_HIS3_5	GGCACCAATGACGTTCCCTC	71.2
S_kdu_HIS3_6	CACGTATCGCTCATGTTCCG	54
ANIDADOS		
DhanHIS3_Fw	CCACATGGCGTCTTTGTAC	61.5
DhanHIS3_Rv	ATGATTGGAAGCTCAAGTGG	58
DhanURA3_Fw	TTTGAATATGGCTTGTCCC	56.4
DhanURA3_Rv	ACTGGACTTATCTTCTATGG	56.4
SkduyHIS3_Fw	CTC TTC CTG TTG TCT CTT GG	59.8
SkduyHIS3_Rv	CACTACATCGTCAAGAATGG	58

## 8.6 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LEVADURA

Se llevó a cabo la extracción del ADN genómico de *D. hansenii* y *S. kluyveri* de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y métodos. En la Figura 25 se puede observar la banda correspondiente al ADN genómico de las levaduras de estudio que migra en el gel por arriba del marcador de selección.

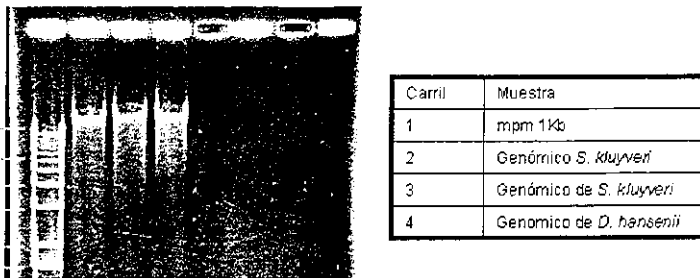
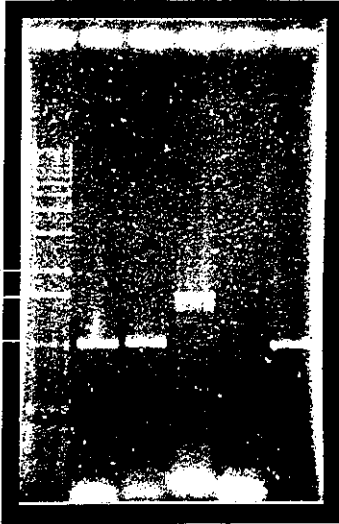


Figura 25. DNA genómico de *D. hansenii* y *S. kluyveri*

## 8.7. Amplificación y purificación de los productos de PCR

Se amplificó exitosamente el fragmento 5' de *D. hansenii HIS3* obteniendo la banda esperada de 1039 pb (Carril2), el 3' de *D. hansenii HIS3* de 1045 pb y el casete KanMX de *D. hansenii HIS3* de 1654 pb utilizando como control positivo de amplificación el gen *URE2* de *S. cerevisiae* de 1004 pb. La figura 26 muestra los fragmentos posterior a la purificación de banda realizada con el kit de Quiagen.

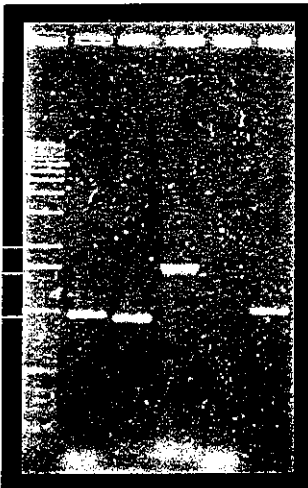




Carril	Muestra	Bandas Esperadas
1	mprim 1Kb	
2	5' de <i>D. hansenii</i> HIS3	1039pb
3	3' <i>D. hansenii</i> HIS3	1045pb
4	<i>KanMX</i> c/colas de <i>D. hansenii</i> HIS3	1654pb
5	Control - 5' de <i>D. hansenii</i> HIS3	----
6	Control + de <i>S. cerevisiae</i> URE2	1004pb

Figura 26. PCR de los fragmentos 5' y 3' de *D. hansenii* HIS3 y el casete de *KanMX* con colas de *D. hansenii* HIS3

Se obtuvieron las bandas esperadas para los fragmentos de *D. hansenii* URA3 (Figura 27), de 970 pb del extremo 5', 945 pb del extremo 3' y de 1654 pb del módulo de *KanMX* los cuales se purificaron con el kit de Quiagen para purificación de banda.



Carril	Muestra	Bandas Esperadas
1	mprim 1Kb	
2	5' de <i>D. hansenii</i> URA3	970pb
3	3' de <i>D. hansenii</i> URA3	945pb
4	<i>KanMX</i> c/colas de <i>D. hansenii</i> URA3	1654pb
5	Control - 5' de <i>D. hansenii</i> URA3	---
6	Control + de <i>S. cerevisiae</i> URE2	1004pb

Figura 27. PCR de los fragmentos 5' y 3' de *D. hansenii URA3* y el casete de *KanMX* con colas de *D. hansenii HIS3*

Mediante PCR se amplificó el extremo 5' del módulo de *KanMX* y el extremo 3' de *HIS3* de *S. kluyveri* obteniendo las bandas esperadas de 690pb, 1654pb y 1225pb respectivamente. Se purificó de banda con Quiagen. (Figura 28).

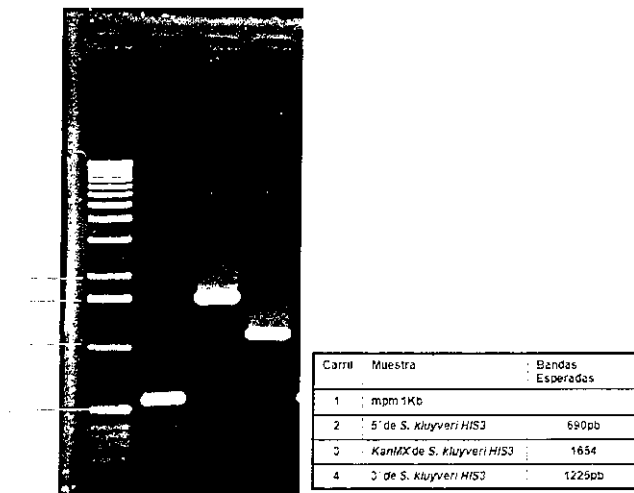


Figura 28. PCR de los fragmentos 5' y 3' de *S. kluyveri HIS3* y el casete de *KanMX* con colas de *S. kluyveri HIS3*

## 8.8 PCR de fusión.

### 8.8.1 *Debaryomyces hansenii HIS3*

La reacción de PCR fusión se efectuó conforme se describe en Materiales y métodos. El total de la reacción (50µl) se corrió en un gel de agarosa y se cortó la banda esperada de 3759 pb y se purificó con el kit de Quiagen (Figura 29).



Figura 29. Corte de la banda esperada de 3759pb que corresponde del módulo de *D. hansenii* *HIS3*

Se realizó una reacción de PCR adicional utilizando los oligonucleótidos anidados, el módulo de *D. hansenii* *HIS3* purificado se visualizó en un gel de agarosa (Figura 30).

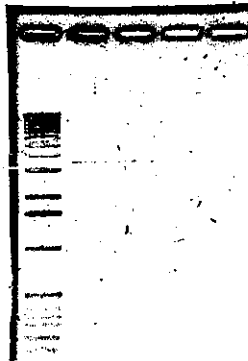


Figura 30. Módulo *D. hansenii* *HIS3* purificado.

### 8.1.2 *Debaryomyces hansenii* URA3

Se amplificó el módulo de *D. hansenii* URA3 y se corrió el total de la reacción en un gel de agarosa para cortar la banda esperada y purificar con el kit de Quiagen (Figura 31).

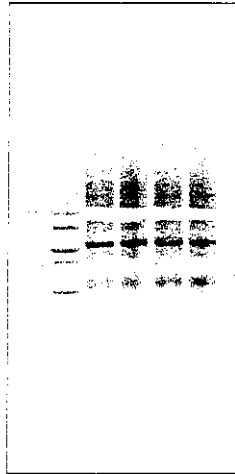


Figura 31. Corte de la banda esperada que corresponde al módulo *D. hansenii* URA3

Con el módulo de URA3 de *D. hansenii* purificado se realizó un PCR con oligonucleótidos anidados (Figura 32).



Figura 32. Módulo de *D. hansenii* URA3

## IX. DISCUSIÓN

*D. hansenii* y *S. kluyveri* son especies de levaduras que no han sido estudiadas tan extensamente como *S. cerevisiae*, a pesar de contar con características muy atractivas para su estudio se conoce poco acerca de la función de sus genes y son escasas las herramientas moleculares para su manejo, de tal manera que el objetivo de este trabajo es contribuir a la creación de dichas herramientas.

El primer punto crítico al desarrollar este proyecto fue la búsqueda de genes biosintéticos ortólogos a nuestras levaduras de estudio ya que el genoma de *S. kluyveri* no estaba por completo secuenciado.

En cuanto a los ensayos de sensibilidad/resistencia, en la literatura no existe reporte de las concentraciones letales de dichos antibióticos para las cepas de estudio, únicamente donde **Ricaurte et al (1999)** reportan que 100 µg/ml es la concentración letal de geneticina para *D. hansenii* así que para determinar la cantidad de antibiótico a probar nos basamos en lo reportado para *S. cerevisiae* y determinamos que 200 µg/ml de geneticina es la concentración inhibitoria del crecimiento de *D. hansenii* y *S. kluyveri* lo cual coincide con lo reportado para *S. cerevisiae*. Para nourseotricina, la concentración de 25 µg/ml resultó suficiente para inhibir el crecimiento de *D. hansenii* y *S. kluyveri* después de 96 hrs. Sin embargo, para higromicina *D. hansenii* inhibió su crecimiento a 50 µg/ml que fue la primera concentración probada, mientras que *S. kluyveri* necesitó del doble de antibiótico para inhibir su crecimiento.

En cuanto al tiempo de crecimiento decidimos registrarlo durante 96 hrs debido a que observamos que en un goteo donde no había crecimiento a las 24 hrs, transcurridas 72 hrs las células se recuperaban y formaban colonias. Esto podría deberse a un fenómeno de adaptación al antibiótico o a que las generaciones precedentes agotaron el antibiótico del medio.

La fusión de los fragmentos para crear el módulo de interrupción nos había resultado infructuoso durante seis meses, por lo que creímos pertinente optar por una opción alterna al PCR en 3 pasos que además nos permitiera determinar la tasa de transformación; estrictamente queríamos utilizar un plásmido y transformar a nuestras levaduras de estudio; sin embargo, este plásmido debía contar con origen de replicación y marcador de selección para *E. coli* y para levadura. Al no contar con esta herramienta, decidimos construir el plásmido deseado mediante la técnica de mutagénesis basada en Tn7. pIC29 funcionaría como el plásmido donador ya que en su segmento transponible tiene el origen de replicación *ori* para *E. coli* así como el gen de resistencia a kanamicina *KAN1*; y pSH47 sería el aceptor al contar con el origen de replicación 2 micras para levadura y el gen de higromicina  $\beta$  fosfotransferasa (*Hph1*) además de contar con el gen *LacZ* para seleccionar en *E. coli* así que la estrategia a seguir nos permitiría insertar el transposón de pIC29 dentro de pSH47 para obtener el plásmido deseado al seleccionar las bacterias azules Km<sup>R</sup>. Fue por esta razón que se reporta la extracción, purificación y digestión de dichos plásmidos; sin embargo, no obtuvimos buenos resultados por lo que no se reportan los experimentos en este trabajo.

En cuanto a los oligonucleótidos al iniciar el proyecto se diseñaron 4 híbridos y 2 sencillos de acuerdo a lo reportado por el grupo de **Kuwayama et al (2002)**. Sin embargo, el grupo de **Yu et al (2004)** construyó un módulo de interrupción génica sin utilizar oligonucleótidos híbridos en el marcador de selección, creímos innecesario el uso de oligonucleótidos híbridos para amplificar *KanMX*

Al amplificar los fragmentos usamos diversas técnicas, usando los reactivos de la enzima Taq polimerasa de Invitrogen al no dar resultado se realizó un gradiente de temperatura igualmente infructuoso. Posteriormente, nos basamos en el protocolo de PCR touchdown (**Korbie 2008**) específico para altas temperaturas de alineamiento para oligonucleótidos con abundancia de C y G, también optamos por cambiar de enzima ya que se había reportado que la Expand era ideal para amplificar fragmentos mayores a 1 Kb y además variamos la concentración de MgCl<sub>2</sub>, de oligonucleótidos, el número de ciclos, la T<sub>m</sub>

y el tiempo de extensión y se volvió a remplazar la enzima con la Taq Platinum de Invitrogen dicha enzima mostraba buenos resultados al amplificar módulos de interrupción mayores a 3 kb. (Yu et al, 2004)

Con la asesoría del Dr. Omar Arrollo técnico del laboratorio de Microbiología Molecular del IPICYT pudimos amplificar el módulo ya que al parecer la enzima utilizada juega un punto crucial en el desarrollo del experimento. No fue hasta que utilizamos las temperaturas y tiempos señalados por el fabricante que obtuvimos amplificación. Otro punto clave es que a enzima Taq platinum tiene actividad exonucleasa; a temperatura ambiente los fragmentos individuales amplificados se degradan, por lo que posterior a los 7 min de extensión era necesario bajar la temperatura a 4°C y después mantener los fragmentos a -20°C. Es por esta razón que no podíamos fusionar los fragmentos individuales; ya que al mantenerlos a temperatura ambiente (en ocasiones más de 24 horas) estos eran degradados y la fusión no ocurría.

## X Perspectivas

En el presente trabajo se construyeron módulos de interrupción génica para los genes *HIS3* y *URA3* de *D. hansenii* esto puede llevarse a cabo mediante un eficiente método de transformación. El método de transformación no puede ser el mismo que el usado para transformar a *S. cerevisiae* mediante iones alcalinos (**Ito et al 1984**), ya que al ser *D. hansenii* un organismo halófito es poco probable que pueda ser transformado con esta metodología. Sin embargo **Minhas et al (2008)** lograron transformar a *D. hansenii* mediante electroporación, de tal manera que esta sería la técnica adecuada para interrumpir *HIS3* y *URA3* de *D. hansenii*. En cuanto *S. kluyveri* aún queda llevar a cabo la fusión de los fragmentos para construir el módulo de interrupción *HIS3*. Por otra parte en cuanto a la transformación de *S. kluyveri* no parecería existir ningún impedimento para transformar con iones alcalinos; sin embargo se ha reportado mayor eficiencia de transformación de ésta mediante electroporación (**Manivasakam y Schiestl 1993**).



## REFERENCIAS

1. Benito B, Garcíadelas B, Rodríguez-Navarro A (2002) Potassium or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology* 148: 933-941
2. Carcía-Salcedo R, Vera M, Calero F y Ramos J (2007) Characterization of *DhKHA1*, a gene coding for a putative Na transporter from *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research* 7: 905-911
3. Costanzo M y Fox T (1980) Transformation of Yeast by Agitation with glass beads. *Genetics* 120, 667-670
4. Delorme E (1989) Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Applied and Environmental microbiology* 55:2242-2246
5. Dmytruk K, Voronovsky A y Sibirny A (2006) Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. *Current Genetics* 50: 183–191
6. Erdeniz N, Mortensen U y Rothstein R (2007) Cloning-Free PCR-Based Allele Replacement Methods. *Genome Research* 7: 1174-1183
7. Fitzpatrick D, Logue M, Stajich J, y Butler G (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *Evolutionary Biology* 6:99 doi:10.1186/1471-2148/6/99
8. Garcia, H., Martinez, M., Vazquez, R. y Delgado, J. (1985) Transformation of *Kluyveromyces lactis* Cells by plasmid DNA does not require alkaline cations. *Biotechnology Letters* 7(10): 723-726
9. Genolevures: Genomic Exploration of the Hemiascomycete yeasts <http://cbi.labri.fr/genolevures> Center for Bioinformatics, Bordeaux

10. González-Hernández JC, Jiménez-Estrada M, Peña A (2005) Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress *Extremophiles* 9: 7-16.
11. Gritz L y Davies J (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *GENE Elsevier* 25: 179-188
12. Guldener U y Heck S (1996) A new efficient disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 24(13): 2519-2524
13. Haro R, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Letters* 291(2):189-191.
14. Hinnen A, Hicks J y Fink G (1978) Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci* 75(4): 1929-1933
15. Hutchison T, and Hartwell, L. (1967) Macromolecule Synthesis in Yeast Spheroplasts. *Bacteriology* 94(5):1697-1705
16. Ito H, Murata K y Kimura A (1984) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations or thiol compounds. *Agricultural and Biological Chemistry* 48(2): 341-347
17. Klinner U y Schafer B (2003) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *Microbiology Reviews* 28: 201-223.
18. Kuwayama H y Obara S (2002) PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Research*. 30: 1-5
19. Luque J (2001) *Biología Molecular e ingeniería Genética*. Madrid: Harcourt
20. Minhas A, Biswas D y Mondal A (2008) Development of host vector for high-efficiency transformation and gene disruption in *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research* 9: 95-102

21. Møller K y Christensen B (2001) Aerobic glucose metabolism of *Saccharomyces kluyveri*: growth, metabolite production, and quantification of metabolic fluxes. *Biotechnology and Bioengineering* 77(2): 186 – 193
22. Møller K y Langkjaer B (2004) Pyruvate decarboxylases from the petite-negative yeast *Saccharomyces kluyveri*. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 558–568
23. Møller K y Tidemand L.D. (2001) Production of a heterologous proteinase A by *Saccharomyces kluyveri*. *Applied Microbiology Biotechnology* 57: 216–219
24. Neves M, Oliveira R y Lucas C (1997) Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Microbiology* 143: 1133-1139
25. Prista C, Almagro A, Loureiro-Dias M y Ramos J (1997) Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Applied Environmental Microbiology* 63: 4005-4009
26. Pyrika A y Wnuk D (1998) Disseminated infection with *Saccharomyces kluyveri* in a patient with AIDS. *Infection* 26, 48-50
27. Ramos J (2005) Introducing *Debaryomyces hansenii*, a salt loving yeast. En: N. GUNDE – CIMERMAN et al. *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya*. Amsterdam: 441-445.
28. Ricaurte M y Govind N (1999) Construction of Plasmid Vectors and Transformation of the Marine Yeast *Debaryomyces hansenii*. *Marine Biotechnology* 1: 15–19
29. Romanos M y Scorer C (1992) Heterologous protein expression in yeast. *Yeast* 8:423–488
30. Sherman F (2002) *Getting Started with Yeast*. Modified from: *Methods Enzymology*, 350, 3-41

31. Sikorski R y Hieter P (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19-27
32. Valenzuela L y González A (2001) *Saccharomyces cerevisiae*. Microbios en línea. Distrito Federal: CPD-DGSCA.
33. Vera M y Ramos J (2006) Intracellular Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> distribution in *Debaryomyces hansenii*. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of DhNHX1. *FEMS Yeast Research* 7 (1): 102–109
34. Wartman T, Boer E, Huardo-Pico A, Sieber H, Bartelsen O, et al. (2002) High-level production of secretion of recombinant proteins by the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*. *Yeast Research* 2: 363-369
35. Wang T, Choi Y y Lee B (2001) Transformation Systems of non-*Saccharomyces* Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 21(3): 177 – 218
36. Watson J. D. (1992) *Recombinant DNA*. New York: W.H.Freeman.
37. Yu, J, Hamari Z, Han K, Seo J et al. (2004) Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetic and Biology* 41, 973-981

"Un sueño sólo puede triunfar sobre la realidad si se le da la oportunidad. "

Stanislaw Lem

BIBLIOTECA CUCBA